

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

MEMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

ANTAGONISME *IN VITRO* ET *IN PLANTA* DE BACTERIES ENDOPHYTES ISOLEES DE PLANTES SPONTANEEES A L'EGARD D'UNE COLLECTION D'ORGANISMES PHYTOPATHOGENES

Par

Imane BELLABD

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Professeur, Université de Blida 1	Président
A. MEKLAT	Maître de conférences, Université de Blida 1	Examinatrice
H. BOUREGHDA	Maître de conférences, E.N.S.A (El Harrach)	Examinatrice
Z. KRIMI	Professeur, Université de Blida 1	Directrice de mémoire

Blida, Novembre 2015



Dédicaces

A ceux qui me sont les plus chers au monde, qui ont été toujours présents pour moi, m'ont soutenue dans les durs moments et qui ont regardé mes réussites avec grands yeux :

A mon papa que j'adore

Et à ma maman chérie

Que Dieu vous garde



RESUME

L'intérêt porté à l'exploitation des microorganismes en lutte biologique est devenu de plus en plus croissant du fait qu'ils peuvent avoir un large spectre d'action et agissent sur plusieurs pathogènes des végétaux. Ce travail a été conçu sur l'exploitation de l'intérêt de bactéries endophytes en bioprotection et a été orienté vers l'utilisation de ce type de microorganismes à l'égard d'une collection de champignons phytopathogènes à savoir ; *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* l'agent responsable du piétin échaudage et *Seridium cupressi* agent de dépérissement d'arbres forestiers ainsi que quatre organismes phytopathogènes de la pomme de terre d'importance économique à l'échelle mondiale à savoir, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* et *Phytophthora infestans*.

Les tests d'antagonisme *in vitro* des huit souches bactériennes endophytes à l'égard des agents fongiques ont montré une diversité dans les résultats. Les bactéries endophytes testées se sont montrées antagonistes envers les divers agents phytopathogènes révélant une réduction de la croissance mycélienne. L'endophyte bactérien *Bacillus* spp. PF3 n'a pas eu d'effet antagoniste sur la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata*, cependant, un effet maximal a été enregistré chez *Seridium cupressi* en combinaison avec les huit bactéries endophytes testées où l'inhibition du développement mycélienne était maximale.

Deux endophytes, à savoir, *Bacillus* spp. PF3 et *Pseudomonas* spp. PS1, testés *in vitro* avant et après inoculation de folioles détachées de pomme de terre par deux isolats pathogènes de *P. infestans* ont montré une efficacité mais uniquement dans la prévention contre le mildiou.

Les résultats obtenus à travers cette étude révèlent l'importance de l'utilisation de ces bactéries endophytes en bioprotection.

Mots clés : Bioprotection, Antagonisme, Bactérie endophyte, Champignon phytopathogène, Mildiou de la pomme de terre.

ABSTRACT

Interest in the use of microorganisms in biological control has become increasingly growing that they can have a broad spectrum of action and act on several plant pathogens. This work was designed on the operation of the endophytic bacteria of interest bioprotection and was referred to the use of such microorganisms in respect of a collection of plant pathogenic fungi namely; *Gaeumannomyces graminis var. tritici* the causative agent of take-all and *Seridium cupressi* forest tree dieback agent and four plant pathogens of potatoes of economic importance in the world namely, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora infestans*.

The antagonism in vitro eight bacterial strains endophytes against fungal agents showed diversity in the results. Endophytic bacteria tested have shown antagonistic towards various phytopathogenic agents showing a reduction of mycelial growth. The extract bactériende endophyte *Bacillus* spp. PF3 had no antagonistic effect on mycelial growth of *Alternaria alternata*, however, the maximum effect was recorded in *Seridium cupressi* in combination with the eight endophytic bacteria tested where inhibition of mycelial growth was greatest.

Two endophytes, *Bacillus* spp. PF3 and *Pseudomonas* spp. PS1, tested *in vitro* before and after inoculation of detached leaves leaflets potato by two pathogenic isolates of *P. infestans* have shown efficacy in preventing but only against late blight.

The results obtained through this study show the importance of using these endophytic bacteria in bioprotection.

Keywords: Bioprotection, Antagonism, endophytic bacteria, fungi, late blight.

المخلص

أصبح الاهتمام باستخدام الكائنات الدقيقة في مكافحة الحيوية متزايد لم له من اثر في مكافحة عدة أمراض النباتية. وقد قام هذا العمل على استغلال البكتيريا المتعايشة داخل الأنسجة النباتية ضد

Gaeumannomyces graminis var. tritici و *Seridium cupressi*

وكذا مجموعة من الفطريات المسببة لخسائر هامة لزراعة البطاطس في العالم ألا وهي

Alternaria alternata, Fusarium solani, Rhizoctonia solani

و *Phytophthora infestans*

أظهر اختبار العداء في المخبري لثمانية سلالات بكتيريا اختلافا في النتائج ضد مختلف العوامل

المرضة للنبات حيث أن البكتيريا *Bacillus spp. PF3* لم تؤثر على نمو *A. alternata*

في حين أن البكتيريا الثمانية حدث كثيرا من نمو الفطر *S. cupressi*

هذا وقد أظهرت تجارب عداء *Bacillus spp. PF3* و *Pseudomonas spp. PS1*

ضد عزلتين من الفطر المسبب البياض الزغبي *P. infestans* وعلى أوراق البطاطس نتائج ايجابية

خلال العلاج الوقائي

النتائج التي تم الحصول عليها من خلال هذه الدراسة تظهر أهمية استخدام هذه البكتيريا المتعايشة داخل

الأنسجة نباتية في الحماية البيولوجية وكذا مكافحة العديد من الفطريات المسببة لخسائر زراعية

الكلمات المفتاحية : الحماية البيولوجية، العداء، البكتيريا المتعايشة داخلي الأنسجة نباتية ، العفن الفطري

البياض الزغبي

REMERCIEMENTS

Ce modeste travail est le fruit d'efforts et d'aides apportés par plusieurs personnes.

D'abord je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir accordé la force et le courage dont j'avais besoin pour réaliser ce modeste travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Mme KRIMI (Professeur à l'université Saad Dahlab -Blida-) qui m'a encadré et dont je serai toujours reconnaissante pour sa disponibilité et l'aide dont elle m'a accordé le long de ce travail.

Ma gratitude à Mr SNOUSSI (Professeur à l'université Saad Dahlab -Blida-) de m'avoir fait honneur en présidant le jury.

Mes sincères remerciements à Mme BOUREGHDA (Maitre de conférences à l'ENSA –El Harrach-) et à Mme MEKLAT (Maitre de conférences à l'université Saad Dahlab -Blida-) qui m'ont fait plaisir en faisant partie des membres de jury.

Je remercie également Hayat (ingénieur du laboratoire de Bactériologie à l'université Saad Dahlab -Blida-) de m'avoir orienté lors de mes expérimentations.

Merci à mon adorable sœur Selma et à mon beau frère Mohamed ainsi qu'à mes frères Anis, Mustapha et Mohamed pour m'avoir encouragé et d'avoir été derrière moi.

Merci à mes amis : Rima, Meriem, Souad, Housseem, Abdelkader, Abderraouf et Azza pour leur soutien sans oublier les étudiants que j'ai côtoyé au sein du laboratoire de Bactériologie et je tiens à préciser pour Lamia, Chahrazed et Razika

Et enfin j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et que j'ai oublié de citer.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1	Généralités sur la culture de la pomme de terre.....	5
1.1.1.	Historique de la culture et de la production de la pomme de terre dans le monde.....	5
1.1.2.	La culture et la production de la pomme de terre.....	6
1.1.2.1	Superficies des différents types de culture de pomme de terre en Algérie.....	7
1.1.2.2	Niveau de production de la pomme de terre.....	8
1.1.2.3	Rendement de la pomme de terre.....	9
1.1.3.	Variétés.....	10
1.1.4.	Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme.....	10
1.2	Le mildiou de la pomme de terre.....	12
1.2.1.	Historique.....	12
1.2.1.	L'agent pathogène.....	12
1.2.3.	Biologie du pathogène.....	13

1.2.4.	Symptomatologie.....	15
1.2.5.	Pertes.....	16
1.2.6.	Moyens de lutte.....	17
1.2.6.1	Méthodes prophylactiques.....	17
1.2.6.2	Lutte chimique.....	17
1.2.6.3	Lutte génétique.....	18
1.2.6.4	Lutte par utilisation de microorganismes.....	18
1.3	La lutte biologique par utilisation des organismes endophytes.....	19
1.3.1.	Définition et propriétés d'un organisme endophyte.....	20
1.3.2.	Origine des bactéries endophytes et effets sur les organismes phytopathogènes.....	22
1.3.2.1	Les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents endophytes, agents de biocontrôle et de croissance des plantes.....	23
1.3.2.2	Les <i>Bacillus</i> spp. endophytes, agents de biocontrôle et de croissance des plantes.....	27
CHAPITRE 2 MATERIEL ET METHODES		
2.1	Antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes à l'égard de pathogènes.....	30
2.1.1.	Souches, cultures et suspensions bactériennes.....	30
2.1.2.	Matériel fongique.....	31
2.1.3.	Antagonismes <i>in vitro</i> des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. et <i>Bacillus</i> spp. endophytes à l'égard des différents agents.....	32
2.1.7.	Lecture.....	33
2.2	Isolement de <i>P. infestans</i> et obtention de souches pour inoculation.....	34
2.2.1.	Méthodes de préparation du milieu de culture et d'isolement de <i>P. infestans</i>	34
2.2.2.	Caractérisation et identification des isolats obtenus.....	38
2.3	Essai de bioprotection à l'égard de <i>Phytophthora infestans</i> par les bactéries endophytes.....	39
2.3.1.	Matériel végétal	39
2.3.2.	Préparation des suspensions bactériennes.....	40

2.3.3.	Inoculation des feuilles de pomme terre détachées par les isolats de <i>P. infestans</i>	40
2.3.3.1.	Traitement et protocole expérimental.....	40

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1	Comportement des cinq agents pathogènes à l'égard de bactéries endophytes..	
3.1.1.	Action des <i>Bacillus</i> spp.....	44
3.1.2.	Action des <i>Pseudomonas</i> spp.....	44
3.1.3.	Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par <i>Alternaria alternata</i>	49
3.1.4.	Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium de <i>Fusarium solani</i>	50
3.1.5.	Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition de <i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	51
3.1.6.	Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par <i>R. solani</i>	51
3.1.7.	Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par <i>S. cupressi</i>	52
3.2	Résultats d'isolement de <i>Phytophthora infestans</i> , et de l'essai de bioprotection de la pomme de terre contre <i>P. infestans</i> par utilisation des <i>Bacillus</i> . spp et <i>Pseudomonas</i> . spp.....	54
3.2.1.	Caractérisation morphologique et culturale des deux isolats de <i>P. infestans</i>	54
3.2.2.	Etude de la fertilité des croisements <i>in-vitro</i>	55
3.2.3.	Comportement des folioles de pomme de terre traitées par les suspensions bactériennes à l'égard de <i>P. infestans</i>	55
3.2.4.	Développement des nécroses sur les feuilles.....	58
3.2.5.	Temps d'incubation et de latence	60
3.2.6.	Taux de sporulation.....	61
3.2.7.	Analyse de la variance du diamètre des lésions induites par l'isolat (1) de <i>P. infestans</i>	62
3.2.8.	Analyse de la variance du diamètre des lésions de l'isolat (2) de <i>P. infestans</i>	62

3.2.9.	Analyse de la variance de l'intensité de sporulation pour l'isolat (1) de <i>P. infestans</i>	63
	Analyse de la variance de l'intensité de sporulation pour l'isolat (2) de <i>P. infestans</i>	64
3.2.11	Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (1) de <i>P. infestans</i>	65
3.2.11.	Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (2) de <i>P. infestans</i>	65
	DISCUSSION GENERALE.....	67
	CONCLUSION.....	76
	ANNEXES	
	LISTE DES ABREVIATIONS	
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Evolution des superficies occupées par la culture de pomme de terre

Figure 1.2 : Evolution de la production de pomme de terre (Qx)

Figure 1.3 Evolution des rendements de pomme de terre (qx/ha)

Figure 1.4 : Organes de reproduction de *P. infestans*

Figure 1.5 : Symptômes du mildiou sur différents organes de pomme de terre

Figure 1.6 : Bactéries à l'intérieur d'une plante de riz

Figure 1.7 : Le marché mondial des biopesticides microbiens

Figure 2.1 : Isolement de *P. infestans*

Figure 3.1 : Pourcentage d'inhibition (RIR) résultant de l'effet des suspensions bactériennes des six souches de *Bacillus*. spp sur les cinq champignons phytopathogènes

Figure 3.2 : Pourcentage d'inhibition (RIR) résultant de l'effet des suspensions bactériennes des deux souches de *Pseudomonas* spp sur les cinq champignons phytopathogènes

Figure 3.3 : Antagonisme in vitro des huit suspensions bactériennes sur *Alternaria alternata*

Figure 3.4 : Antagonisme in vitro des huit suspensions bactériennes sur *Fusarium solani*

Figure 3.5 : Antagonisme in vitro des huit suspensions bactériennes sur *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Figure 3.6 : Antagonisme in vitro des huit suspensions bactériennes sur *Rhizoctonia solani*

Figure 3.7 : Antagonisme in vitro des huit suspensions bactériennes sur *S. cupressi*

Figure 3.8 : Croissance mycélienne des cinq pathogènes sous les différents traitements

Figure 3.9 : Aspect macro et microscopique des deux isolats de *P. infestans*

Figure 3.10 : Oospore de *P. infestans* issue de confrontation entre les deux isolats

Figure 3.11 : Résultats des réactions des folioles de pommes de terre inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans* et traitement par les souches bactériennes

Figure 3.12 : Résultats des réactions des folioles de pommes de terre inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans* et traitement par les souches bactériennes endophytes

Figure 3.13 : Vitesse de développement des nécroses causées par l'isolat (1) de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes

Figure 3.14 : Vitesse de développement des nécroses causées par l'isolat (2) de *P. infestans* lors du traitement par les deux bactéries endophytes.

Figure 3.15 : Vitesses de croissance journalière des nécroses causées par les deux isolats de *P. infestans* lors du traitement par les deux bactéries endophytes.

Figure 3.16 : Pourcentage des surfaces foliaires infectées par les deux isolats de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes.

Figure 3.17 : Taux de sporulation sur les folioles inoculées par les deux isolats de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes.

Figure 3.18 : Lésions nécrotiques causées par les isolats de *P. infestans* après traitements par les suspensions bactériennes.

Figure 3.19 : Intensité de sporulation causée par les isolats de *P. infestans* après traitements par les suspensions bactériennes à différents stades

Figure 3.20 : Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (1) de *P. infestans*

Figure 3. 21 : Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (2) de *P. infestans*

Tableau 1.1 : Principaux pays producteurs de pomme de terre dans le monde

Tableau 1.2 : Consommation de la pomme de terre en Algérie

Tableau 1.3 : Principales maladies et principaux ravageurs de la pomme de terre

Tableau 2.1 : Souches bactériennes utilisées dans les tests d'antagonisme

INTRODUCTION

Les maladies des plantes entraînent encore aujourd'hui des pertes économiques considérables; c'est pourquoi la protection des cultures contre les agents pathogènes reste encore plus que nécessaire.

Dans les pays industrialisés, les pertes atteignent près de 40% et concernent toutes les étapes de production (avant et après la récolte) ; elles sont encore plus importantes dans les pays en développement (plus de 50%). Les enquêtes réalisées par la FAO à l'échelle mondiale en 1965 et 1988-1990 ont montré qu'en absence de toute mesure de lutte, les pertes potentielles dues aux maladies, aux animaux ravageurs et aux plantes adventices s'élevaient selon les cultures et la zone géographique concernée, entre 50 et 80% de la production potentielle [1].

Depuis un siècle, le contrôle des maladies des plantes cultivées dépend essentiellement de l'usage extensif des pesticides ; la lutte chimique a apporté des solutions rapides, simples et efficaces aux problèmes de protection des cultures. Cependant, des études ont montré que ces produits chimiques sont toxiques aux microorganismes vivant dans le sol, aux animaux et même à l'homme [2]. De même, l'impact de ces pesticides sur l'apparition de souches pathogènes résistantes a été maintes fois documenté [3]. C'est le cas par exemple de l'apparition de souches résistantes de *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre à l'égard de certaines matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides, comme le métalaxyl et son énantiomère méfénoxam, le béalaxyl, et l'oxadixyl [4]. L'apparition de la souche US-8 est un exemple de souche virulente de mildiou qui résiste aux fongicides actuels [5].

Le besoin de contrôle des maladies des plantes par des méthodes efficaces et respectueuses de l'environnement devient dès lors, l'une des plus importantes nécessités, afin de nourrir les milliards de personnes sous alimentées sur cette planète [2]. C'est pourquoi, la production biologique s'est fixée comme objectif prioritaire de réduire l'utilisation de ces produits chimiques à moyen terme, puis de les supprimer à long terme. Pour y parvenir à lutter contre le mildiou de la pomme de terre, il faut par conséquent, trouver et tester de nouveaux moyens de lutte contre cette maladie destructive [6].

La pomme de terre est probablement l'espèce végétale qui a le plus bénéficié de techniques pour améliorer sa résistance aux maladies et la production de plants [7]. La sélection variétale conventionnelle pratiquée depuis près d'un siècle a permis de créer des variétés résistantes aux pathogènes limitant ainsi l'usage des pesticides, et donc leurs effets néfastes sur les producteurs, les consommateurs et l'environnement. Ces techniques nécessitent cependant énormément de temps entre le croisement initial et la valorisation d'une nouvelle variété issue de croisement. Le fait que la pomme de terre cultivée soit tétraploïde et hétérozygote, rend néanmoins difficile la création rapide de nouveaux clones résistants par sélection classique [8]. Autrement, il faut au moins 10 à 15 années pour créer une nouvelle variété de pomme de terre [7]. Aussi, les coûts inhérents sont énormes et la technique n'est pas parfaite, puisque, des caractères non souhaités accompagnent bien souvent les améliorations visées par la sélection, avec des effets négatifs sur l'environnement ou sur la santé des consommateurs.

Concernant le cas particulier de la pomme de terre, une autre technique basée sur l'introduction de gènes de résistance à caractère monogénique a été engagée [9]. Actuellement, onze de ces gènes (R1-R11) ont été identifiés et introduits chez *Solanum tuberosum* à partir de *S. demissum* pour obtenir des cultivars d'intérêt scientifique [10]. Mais par rapport à ces derniers, les isolats algériens de *P. infestans* ont montré un spectre de virulence complexe, où la plupart d'entre eux contournent les onze gènes de résistance spécifique à l'égard de la gamme différentielle [11].

Afin de faire face à ce genre de problèmes, une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse a fait son apparition, il s'agit de l'utilisation de certains microorganismes non pathogènes ou biopesticides microbiens.

Les bactéries, les champignons, les levures, et même les virus utilisés comme biopesticides offrent globalement un effet protecteur établi sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste basée sur la production d'antibiotiques ou d'enzymes qui inhibent la croissance des pathogènes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal [12]. Des succès ont été réalisés dans le contrôle des pathogènes des cultures et la promotion de la croissance des plantes en introduisant des rhizobactéries (PGPR. Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et autres organismes microbiens qui favorisent la croissance des plantes et interviennent dans la lutte biologique [13]. Dans le cadre des contrôles des stress biotiques et abiotiques, une panoplie de recherches rapporte un intérêt à un groupe de bactéries associées aux végétaux et qui ne causent pas de symptômes spécifiques aux maladies, ce sont les bactéries endophytes [14].

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudomonas* colonisant d'une manière endophyte des racines, semblent être efficaces et utiles dans le contrôle de plusieurs organismes pathogènes telluriques [15]. L'utilisation de ces bactéries comme agents de lutte biologique a été rapportée par plusieurs travaux, notamment, ceux de Prieto et *al.*, (2011) [16] sur l'action de *Pseudomonas fluorescens* PICF7 et *Pseudomonas putida* PICP2, sur *Verticillium dahliae* Kleb. agent de la verticilliose de l'olivier. En outre, lorsque les graines ou organes de multiplication inoculés par ces bactéries, ces dernières vont se déplacer par la suite dans la partie végétative, le plant et les fruits obtenus seront immunisés et minimisant par conséquent, la nécessité d'une application fréquente de souches bactériennes [17]. Un travail mené par Haddad et *al.*, (2013) [18] a montré par ailleurs, que des semences de tomate bactérisées ont produit des plantes ayant même montré une augmentation dans les paramètres de croissance comparés au témoins ainsi qu'une augmentation de l'indice de vigueur de cette même plante.

Des méthodes de protection de cultures testées expérimentalement à travers quelques études menées par Alim (2011) [19] et Djellout (2011) [20] sur des bactéries endophytes isolées des plantes spontanées ont permis de diminuer ou supprimer les symptômes de la pourriture molle causée par *Pectobacterium carotovorum* ainsi que la maladie de crown gall causée par *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium vitis*

Huit souches bactériennes endophytes appartenant aux genres *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp ayant attribué préalablement des effets bénéfiques sur la croissance, sont mises à l'essai dans la présente étude, pour tester leur activité d'antagonisme sur des pathogènes de la pomme de terre à savoir, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* et de bioprotection à l'égard de *P. infestans* agent du mildiou de la pomme de terre. Parallèlement, les endophytes bactériens ont été analysés pour leur pouvoir antagoniste sur d'autres fungi tels que *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* pathogène des Graminées (Poacées) et *Seiridium cupressi* agent du dépérissement d'arbres forestiers.

Ce travail a été mené selon les étapes suivantes :

- Une détermination *in vitro* de l'effet antagoniste des bactéries endophytes sur une collection de champignons phytopathogènes
- Un isolement de *P. infestans* à partir de tissus infectés de pomme de terre (feuilles, tiges...)
- Une caractérisation des isolats de *P. infestans*.
- Un essai de bioprotection de la pomme de terre à l'égard de *P. infestans* par utilisation de bactéries endophytes.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités sur la culture de la pomme de terre

1.1.1. Historique de la culture et de la production de la pomme de terre dans le monde

L'histoire de la pomme de terre a débuté il y a environ 8 000 ans dans la Cordillère des Andes, où les premières communautés arrivées dans le Sud du continent américain avaient commencé à domestiquer des espèces sauvages près du lac Titicaca [21].

La propagation de cette culture dans le monde a ensuite commencé par son introduction en Europe vers la fin du 16^{ème} siècle, suite à la conquête du Pérou par les conquistadors espagnols de 1532 à 1572. Elle parvint en Inde, en Chine et au Japon, grâce aux marins qui furent parmi les premiers à l'apprécier [22].

Le marché de la pomme de terre a connu de profonds changements à la fin du 20^{ème} siècle, avec une évolution aussi bien dans la production que dans la distribution [7]. Mondialement, cette culture qui a offert 49682 millions de \$ en 2012 occupe après la canne à sucre, le maïs, le riz et le blé, la cinquième place des produits agricoles cultivés, avec une production annuelle approchant les 364 millions de tonnes et une superficie de 18,5 millions d'hectares [23].

La valeur énergétique de ce légume l'a rendue également attractif à l'échelle mondiale dans l'affouragement du bétail bovin pour leur engraissement et la production laitière, dans la fabrication des pâtes et même dans la production de carburants ; d'ailleurs 0,4 ha de pomme de terre produit 4536 L d'alcool éthylique par an [24, 25].

Selon, les statistiques de la FAO, la production et la demande de la pomme de terre ont enregistré une forte croissance en Asie, en Afrique et en Amérique latine. Ces données sont passées de moins de 30 millions de tonnes au début des années 60 à plus de 165 millions de tonnes en 2010 [22] (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Principaux pays producteurs de pomme de terre dans le monde [20]

Pays	Production (millions de tonnes)
Chine	74.80
Inde	36.58
Fédération de Russie	21.14
Ukraine	18.71
Etats unis d'Amérique	18.02
Allemagne	10.20
Pologne	8.77
Bélarus	7.87
Pays-Bas	6.84
France	6.58

1.1.2. La culture et la production de la pomme de terre en Algérie

En Algérie, la pomme de terre a été introduite par les colons français il y a environ un siècle et demi, elle est devenue actuellement une culture de base qui revêt un caractère stratégique de par sa place dans l'alimentation, les surfaces qu'elle occupe, les emplois qu'elle procure et les volumes de production qu'elle génère [26]. De ce fait, les flux financiers qu'elle mobilise sont considérables tant en amont qu'en aval [27]. Et depuis son introduction au milieu du 19ème siècle, la pomme de terre est devenue une des principales cultures destinée à l'alimentation humaine, particulièrement à partir des années soixante. Elle est considérée comme un aliment de base au même titre que les céréales et les légumes secs. Durant les quinze dernières années, la consommation est passée de 35 à 57kg/habitant/an, soit un accroissement de 1,5kg/habitant/an [28].

En termes de consommation, il est noté une évolution sans cesse croissante (Tableau 1.2) :

Tableau 1.2 : Consommation de la pomme de terre en Algérie [27]

Année	1970	1988	1995	2002	2005
Population	13.300.000	23.700.000	27.700.000	31.300.000	32.000.000
Consommation (hab/ an)	20 kg	42 kg	41kg	42 kg	+ 50 kg
Consommation (T)	273.647	1.000.700	1.200.000	1.333.465	+1.600.000

En effet, la consommation par habitant et par an a subi une croissance très significative entre 1970 et 1988, passant de 20 kg à 42 kg pour se maintenir à un niveau constant jusqu'en 2002. A partir de 2005, la consommation a encore augmenté en raison des prix très accessibles affichés sur le marché, en 2006, elle a été estimée à près de 65 kg par habitant [27].

En Algérie on distingue trois principaux **types** de culture selon les régions climatiques et la précocité : Culture de primeur, culture de saison et culture d'arrière saison

1.1.2.1. Superficies des différents types de culture de pomme de terre en Algérie

Les superficies cultivées en pomme de terre placent l'Algérie à la huitième place en Afrique, après le Nigeria, le Malawi, le Rwanda, l'Angola, le Kenya, l'Egypte et l'Ouganda [22]. Ces superficies n'ont cessé d'augmenter en allant de 26.000 ha à l'indépendance pour atteindre plus de 160.000 ha en 2013, soit environ 24% des superficies des cultures maraichères et 3,85% de la SAU [27, 29] La culture de saison est en première place tant par les surfaces occupées (50.000 ha en moyenne au cours du dernier quinquennat) que par sa participation au volume global de la production. Celle d'arrière saison occupe la seconde place avec près de 30.000 ha, cependant, la culture primeur occupe moins de 5.000 ha [30].

D'après la figure 1.1, on note d'une façon générale une augmentation des superficies occupées par la culture de pomme de terre, à partir de l'année 2001.

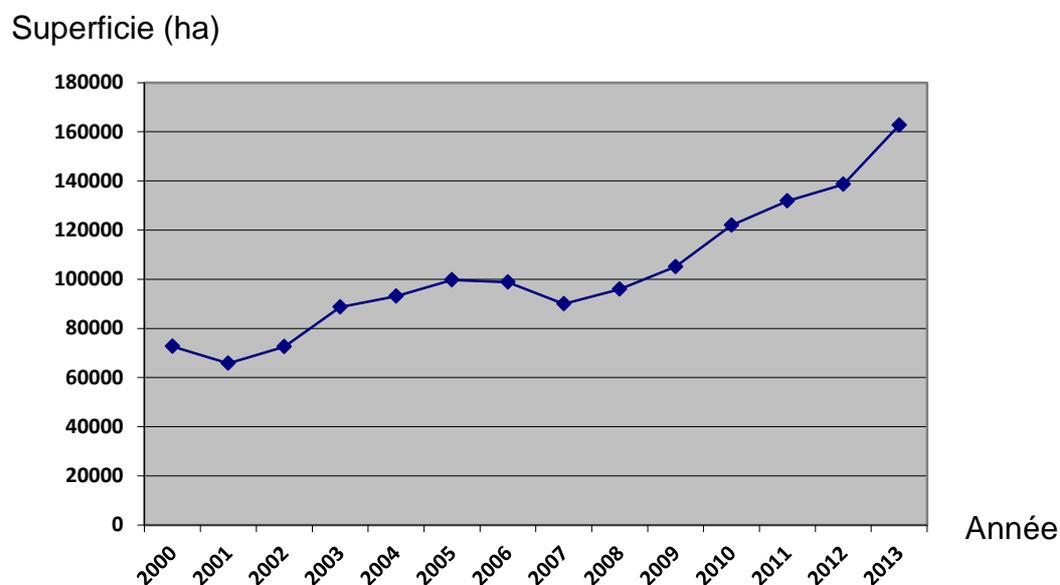


Figure 1.1 : Evolution des superficies occupées par la culture de pomme de terre [29]

1.1.2.2. Niveau de production de la pomme de terre

En 2010, les chiffres de production de la pomme de terre ont permis à l'Algérie d'occuper la troisième place en Afrique après l'Egypte et l'Afrique du sud [22].

La production de la pomme de terre a connu une progression importante et régulière, et une production record qui avoisine les 49 millions de quintaux en 2013 (Fig. 1.2), soit un rendement moyen de 320 q/ha ; cependant cette production croissante est due surtout à une évolution des superficies, et non à une évolution de rendement.

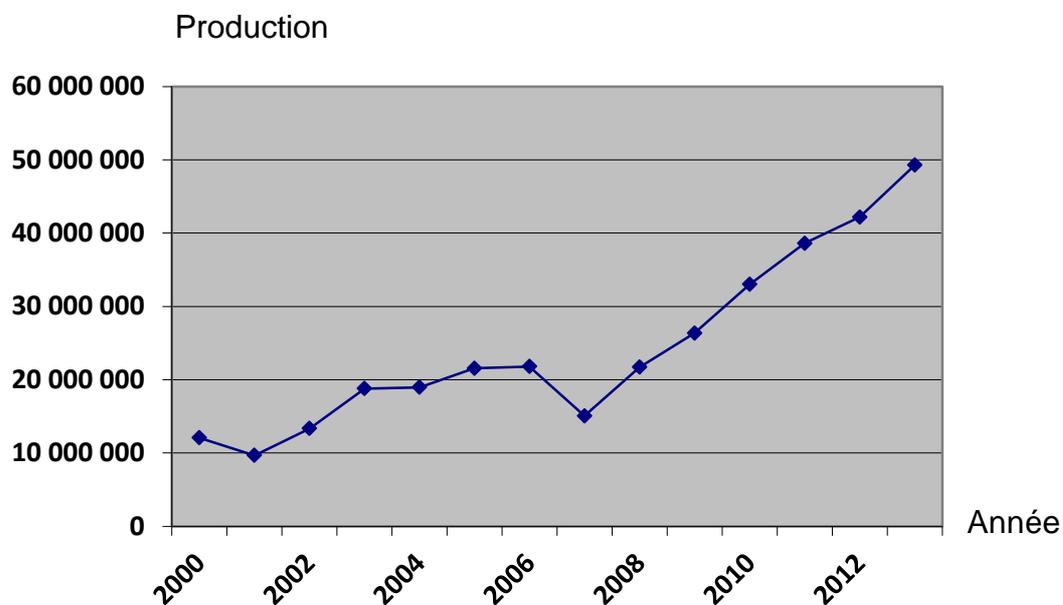


Figure 1.2 : Evolution de la production de pomme de terre (Qx) [29]

1.1.2.3. Rendement de la pomme de terre

L'Algérie occupait en 2010 la cinquième place en Afrique avec un rendement de 25 T/ha, et ceci après l'Egypte, le Maroc, les îles Maurice et la Réunion [22].

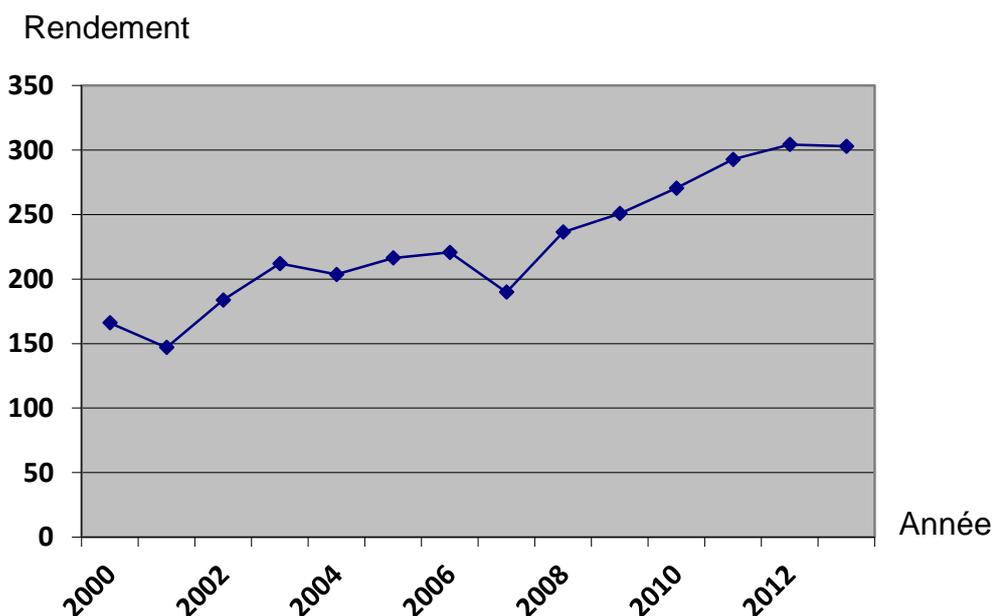


Figure 1.3 Evolution des rendements de pomme de terre (Qx/ha) [29]

D'après la figure 1.3 nous notons une évolution du rendement, mais qui n'est pas très significative durant les sept premières années. Cependant cette évolution est considérable entre 2008 et 2012. Cet essor de la filière a entraîné un accroissement de son poids économique et social et la filière représentait en 2007 un chiffre d'affaire évalué à 98 milliards de DA, soit près de 1,5 milliards de \$. Cette évolution est due essentiellement à son introduction vers les années 90 dans les zones sahariennes du pays où les rendements ne cessent de s'accroître ; à El-Oued, des plateformes d'essais ont atteint les 720 qx/ha [26].

1.1.3. Variétés

Solanum tuberosum forme un groupe ayant un nombre chromosomique de base de 12 et allant du niveau diploïde au niveau hexaploïde, mais, la majorité des variétés de pomme de terre cultivées est du type tétraploïde [31, 32]. Le catalogue mondial des variétés de pomme de terre 2009/2010 avance un chiffre de 4500 variétés réparties dans 102 pays [33]. Selon Polese (2006) [34], la caractérisation variétale s'appuie sur l'usage culinaire et le goût des tubercules ; sur la forme et la couleur des tubercules, sur la profondeur des yeux et sur la forme et la couleur des feuilles et des tiges. Sur le plan cultural, les éléments de choix variétal sont : la précocité de tubérisation, la productivité et la résistance aux différents stress biotiques.

1.1.4. Principaux problèmes phytosanitaires de la pomme de terre

Les principaux problèmes phytosanitaires touchant la culture de pomme de terre sont provoqués par les maladies, les ravageurs et les nématodes (Tableau 1.3). Les principales maladies sont causées essentiellement par les champignons, les virus et les bactéries.

Tableau 1.3 : Principales maladies et principaux ravageurs de la pomme de terre

[34, 35]

Maladies	Durant la végétation		A la récolte et durant le stockage	
	Maladies	Agent causal	Maladies	Agent causal
Provoquées par des champignons	Rhizoctone brun	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctone brune	<i>Rhizoctonia solani</i>
	Dartrose	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Gale argentée	<i>Helminthosporium solani</i>
	Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i>	Dartrose	<i>Colletotrichum coccodes</i>
	Alternariose	<i>Alternaria solani</i>	Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i>
	Verticilliose	<i>Verticillium</i> ssp	Alternariose	<i>Alternaria solani</i>
	Sclérotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Gale poudreuse	<i>Spongospora subterranea</i>
	Pourriture grise Flétrissement fusarien	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. tuberosi	Galle verruqueuse Pourriture aqueuse Pourriture rose Rhizoctone violet Pourriture sèche	<i>Synchytrium endobioticum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Phytophthora erythroseptica</i> <i>Rhizoctonia corcorum</i> <i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>
Provoquées par des bactéries	Pourriture molle et jambe noire Flétrissement bactérien Pourriture brune	<i>Erwinia</i> sp	Galle commune	<i>Streptomyces scabies</i>
		<i>Clavibacter michiganensis</i>	Flétrissement bactérien	<i>Clavibacter michiganensis</i>
		<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Pourriture molle	<i>Erwinia</i> sp
			Pourriture brune	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Provoquées par des virus	Enroulement (PLVR) Mosaïques (PYMV) Frisolées Bigarrures (PVY)			
Ravageurs	Au cours de la végétation		A la récolte et au stockage	
Nématodes	Anguillule des racines			
Mollusques	Limace Agreste			
Insectes	Punaise verte Cicadelles de la pomme de terre Pucerons Doryphore Altise de la pomme de terre Teigne de la pomme de terre Vers gris		Vers fils de fer Vers blanc	

Le mildiou est l'une des maladies les plus redoutables pour la pomme de terre où tous les organes de la plante peuvent être atteints : jeunes pousses, feuilles et pétioles, bouquets terminaux, tiges et tubercules [9]. Au cours de ces dernières années, la maladie du mildiou de la pomme de terre a connu une évolution alarmante dans plusieurs pays du monde [37]

1.2. Le mildiou de la pomme de terre

1.2.1. Historique

Le mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, et agent du mildiou des Solanées est originaire de la vallée de la Toluca au Mexique [38, 39]. Après l'avoir décrit en premier par Jean Montagne, mais comme *Botrytis infestans*, Speerschneider a prouvé en 1857 qu'il s'agit de l'agent causal de mildiou de la pomme de terre [40, 41]. Ce n'est qu'en 1876, qu'Anton de Bary a décrit *Phytophthora* comme « destructeur de plantes », et *Phytophthora infestans* comme l'espèce type d'un nouveau genre [42].

En Europe, la première épidémie remontait à 1845 et provoqua une famine entre 1846-1851, en causant la mort d'un million de personnes et fit émigrer un million et demi d'Irlandais aux USA [43].

1.2.2. L'agent pathogène

P. infestans est l'agent pathogène du mildiou de la pomme de terre, il appartient à la classe des Oomycètes, les analyses biochimiques et la comparaison des séquences génétiques mitochondriales et ribosomiaux ont montré qu'ils sont peu reliés aux vrais champignons [44, 2]. Sur le plan taxonomique, les Oomycètes sont plus proches des algues brunes que des champignons supérieurs [45]. Pourtant, en dépit de leur origine évolutive différente, la morphologie des hyphes, leur mycélium et les spores des oomycètes montrent des ressemblances remarquables aux champignons [46]. Des analyses génétiques ont montré que les noyaux des hyphes sont diploïdes et renferment un gros génome avec une taille estimée à 2.5×10^8 pb et comportant de nombreuses séquences d'ADN répétitives [47].

1.2.3. Biologie du pathogène

La mutabilité a souvent été invoquée par les auteurs pour expliquer la haute fréquence d'apparition dans les populations naturelles de *P. infestans* de nouveaux pathotypes capables de surmonter des gènes de résistance [48]. De la même façon, nombre d'auteurs s'accordent pour admettre l'existence probable chez ce pathogène d'une forme simplifiée de parasexualité entraînant des recombinaisons mitotiques, mais il apparaît cependant plus raisonnable de penser que la recombinaison des caractères héréditaires et le remaniement du matériel génétique interviennent surtout pendant la phase sexuelle du cycle biologique [48].

Le cycle biologique de *P. infestans* comprenant une phase sexuée et une phase asexuée est majoritairement aérien, il est peut être accompli en cinq à sept jours si les conditions sont favorables [9]. A partir des feuilles malades, des sporanges tombent sur le sol et contaminent les tubercules qui peuvent pourrir en terre ou en cours de conservation. La dissémination du pathogène est facilitée par le ruissellement d'eau et sa pénétration dans les tubercules se fait par les lenticelles ou par des blessures. Le pathogène survit pendant l'hiver dans les tubercules contaminés [49].

La phase asexuée est la phase de multiplication épidémique, alors que la phase sexuée a lieu quand les deux types sexuels A1 et A2 sont en présence et représente la source de variation génétique [5]. Le résultat de la reproduction sexuée est une oospore à paroi épaisse et riche en glucane (Fig. 1.4). Elle constitue la forme de survie du pathogène pouvant persister plusieurs années dans le sol à condition que la température reste relativement basse et que l'éclairement ne soit pas continu [41]. Généralement, les sporanges peuvent survivre jusqu'à 40 jours dans le sol, tandis que les zoospores ont une durée de vie de 10 jours [50].

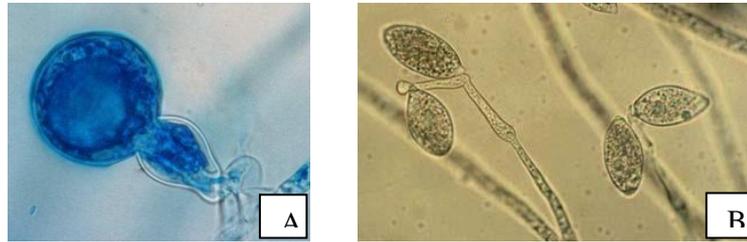


Figure 1.4 : Organes de reproduction de *P. infestans* [9, 51]

A : Oospore de *P. infestans* sous microscope (Photographie INRA – Corbiere).

B : Sporanges de *P. infestans* d'après: Wilmer Perez et CIP Archives

P. infestans est hétérothallique, pathogène héli-biotrophe quasi obligatoire, c'est-à-dire qu'il passe par des phases initiales de croissance biotrophiques avant de tuer l'hôte [40, 52]. C'est un organisme dont l'apparition des deux types de reproduction connus (A1 et A2) ont été limités jusqu'aux années 80 au Mexique, alors que dans le reste du monde, seul le type sexuel A1 était présent [53]. D'après Jones et Simko (2005) [54], la présence seule du type sexuel A1 a limité la reproduction sexuée et par conséquent la variabilité génétique. Mais à partir de 1980, cette situation a changé et l'épidémie s'est propagée d'abord en Europe après importation de la pomme de terre à partir du Mexique, foyer des deux types sexuels suite à une sécheresse qui sévit en 1976 [55].

En parlant d'organes de reproduction et de cellules, Dyakov et Ozeretskoykaya (2007) [56] indiquent que c'est les composés de la membrane cellulaire des isolats avirulents de *P. infestans* qui se comportent comme éliciteurs induisant la synthèse de phytoalexines dans la cellule végétale ayant montré une incompatibilité. Le glucane –cité plus haut- a un rôle dans l'accumulation de la rishitine (sesquiterpène) dans la cellule en cas d'incompatibilité.

Les spores contenues dans les sporanges sont disséminées par le vent, par les pucerons et par les gouttelettes d'eau, et la germination des sporanges est soit indirecte (libérations des zoospores), soit directe (qui a rarement lieu et qui nécessite des un optimum de 24°C) [35]. Une humidité relative supérieure à 90% [57, 2] ou une humidité du sol de plus de 20%, sont particulièrement favorables au

développement de la maladie, avec une durée d'incubation du pathogène de 5 jours (à 16-20 °C) ou de 9 jours (à 8-12 °C) [35].

1.2.4. Symptomatologie

Les symptômes du mildiou peuvent être observés sur l'ensemble des organes de la pomme de terre : jeunes pousses, feuilles et pétioles, bouquets terminaux et tubercules [58].

- ✚ Sur les feuilles : les symptômes se présentent sous forme de taches nécrotiques humides brunes entourées parfois d'un anneau jaunâtre [51]. En présence de chaleur et d'humidité, la limite du tissu sain et du tissu malade peut se couvrir à la face inférieure des feuilles par un duvet blanc ; en temps sec, les taches deviennent cassantes [35] Fig. 1.5 (A,B).
- ✚ Sur la tige : les nécroses sèches sont d'une coloration foncée et la tige est cassante au niveau des taches ; en présence d'humidité élevée, les nécroses s'étendent, brunissent et provoquent l'affaissement des fanes [51] Fig. 1.5 (C).
- ✚ Sur le tubercule : des taches claires brunes et superficielles peuvent apparaître sur la peau des tubercules. En coupant le tubercule, des taches d'une coloration brun clair peuvent apparaître [51] Fig. 1.5 (D, E), mais les parties atteintes restent fermes (pourriture sèche) [35]. Les lésions causées par *P. infestans* sur tubercules sont fréquemment infectées par des virus, des bactéries et des champignons, ce qui provoque une destruction secondaire des tissus [59].

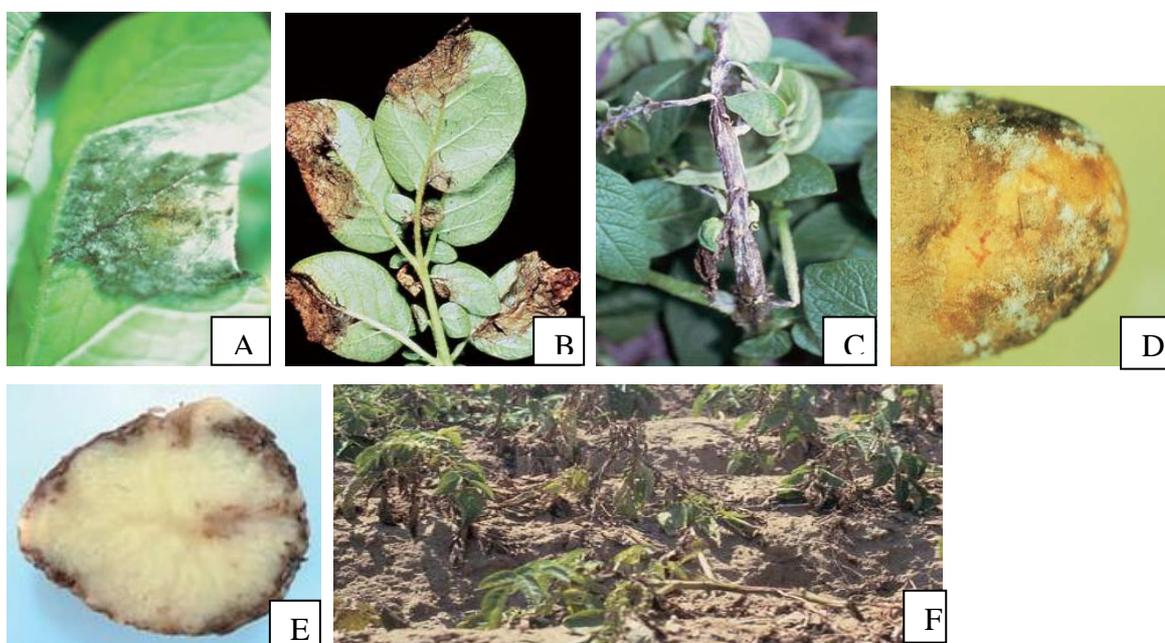


Figure 1.5 : Symptômes du mildiou sur différents organes de pomme de terre
[2, 51]

A : Lésion sur une feuille recouverte de sporulations (D.P. Weingarten, Université de la Floride).

B: Nécroses sur feuilles (D.P. Weingarten, Université de la Floride).

C: Nécrose sur tige (D.P. Weingarten, Université de la Floride).

D: Sporangies sur tubercule infecté (Weingarten, Université de la Floride).

E: Symptômes sur tubercule de pomme de terre (Wilmer Perez et CIP Archives).

F: Plants détruits au champ (D.P. Weingarten, Université de la Floride).

1.2.5. Les pertes

Les attaques n'ont pas les mêmes conséquences selon le stade de la culture et l'organe atteint. Cook (2006) [60] préconisa qu'une lésion sur tige peut détruire un plant de pomme de terre portant dix feuilles ou cinquante folioles, alors qu'une lésion de la même taille sur une feuille n'a pas les mêmes conséquences. Les attaques précoces induisent une diminution de la photosynthèse, alors que les attaques tardives conduisent à une baisse de la qualité des tubercules et peuvent atteindre 20 à 40% et même jusqu'à 100% en moins de trois semaines [61]. On estime les coûts monétaires des traitements à plus de deux milliards \$/an et ceux dus aux pertes de rendements à des milliards de \$/ an dans le monde [21, 5].

1.2.6. Moyens de lutte

L'incidence économique de la maladie sur l'agriculture mondiale n'est pas négligeable et son contrôle par les méthodes de lutte culturales et chimiques traditionnelles est toujours onéreux et souvent incomplètement efficace [62]. Aussi, très tôt, s'est imposé la nécessité d'organiser la lutte sur le plan génétique et biologique

1.2.6.1. Méthodes prophylactiques

D'une façon générale, ces pratiques ont pour but de réduire les sources d'inoculum primaire pour limiter l'importance des attaques ; elles consistent principalement à éliminer les fanes de cultures après la récolte et à planter des tubercules sains [36]. Selon Lambion (2006) [63], la lutte contre le mildiou en agriculture biologique s'appuie essentiellement sur la prévention en limitant les facteurs favorisant la maladie.

1.2.6.2. Lutte chimique

D'après Soltner (1988) [64], des traitements préventifs peuvent être effectués en utilisant des produits organiques de synthèse (cuprède, manébe, phaltane...) et des produits cupriques (sulfate de cuivre, oxyde de cuivre...) ou leur association. Or, le cuivre est un métal lourd recalcitrant et l'application répétée de ces produits conduit donc à une pollution du sol [6]. En outre, l'utilisation massive de fongicides systémiques a également conduit à sélectionner des isolats résistants à ces matières actives, qui appartiennent principalement au groupe des phénylamides (métalaxyl et son énantiomère méfénoxam, béalaxyl, oxadixyl) [40]. Toutes ces raisons, ajoutées aux contraintes de plus en plus élevées qui sont placées pour satisfaire à l'homologation de ces produits chimiques, font que leur marché diminue de manière significative depuis l'an 2000 et devrait suivre la même tendance dans les années à venir et de nouvelles stratégies de contrôle du mildiou de la pomme de terre doivent être développées [12].

1.2.6.3. Lutte génétique

Actuellement plusieurs gènes conférant une résistance envers *P. infestans* ont été clonés et chacun d'entre eux appartient à la classe NBS-LRR

(Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat) des gènes de résistance de plantes [62]. Ainsi onze gènes de résistance monogéniques (dénommés de R1 à R11) provenant de *S. demissum* et qui ont été incorporés dans divers cultivars de pomme de terre agissent en induisant des HR cellulaires chez l'hôte autour du point de pénétration du pathogène accompagnées par l'accumulation de phytoaléxines comme la richitine et la lubimine [48, 56]. Mais cette résistance spécifique conférée aux cultivars de pommes de terre est souvent contournée par les populations parasites [65]. Les sélectionneurs s'orientent donc actuellement vers la résistance horizontale qui est polygénique et qui se traduit par une réponse quantitative correspondant à un ralentissement du développement de l'épidémie dans la culture [48, 9].

1.2.6.4. Lutte par utilisation de microorganismes

L'utilisation d'organismes vivants, ou des produits de leurs gènes pour limiter ou supprimer les activités et les populations de pathogènes, nous paraît être un bon compromis pour faire référence à la lutte biologique.

Selon Daayf et *al.*, (2003) [66] et Beaulieu et *al.*, (2004) [67], des bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia* et *Streptomyces* pourraient contribuer à limiter l'infection du feuillage ou des tubercules de pomme de terre, par la production d'antibiotiques, et (ou) par l'induction de systèmes de défense chez la plante. Certains produits sont disponibles sur le marché et commercialisés, c'est le cas du biofongicide Serenadenc, une préparation en poudre mouillable de *Bacillus subtilis* souche QST-713 qui une fois appliquée en prévention, agit comme antagoniste contre *P. infestans* en inhibant la fixation du pathogène, interrompant sa croissance et induisant une résistance acquise dans la plante [43].

1.3. La lutte biologique par utilisation des organismes endophytes

D'après Jijakli (2004) [68], le terme de lutte biologique fut proposé au début du 20^{ème} siècle pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre des organismes vivants ou produits de leurs gènes. Dans ce contexte, les microorganismes endophytes ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leur potentiel de servir d'agents de lutte biologique.

Selon Toofanee et Dulymamode (2002) [69], le terme endophyte signifiant organismes vivant à l'intérieur des plantes (Endon Gr. = Dans, phyton = plante) (Fig. 1.6) fut introduit pour la première fois en 1866 par De Bary, alors que Gayathri et Muralikrishnan (2013) [70], rapportaient que c'est Darnel qui a découvert en premier les bactéries endophytes en 1904.

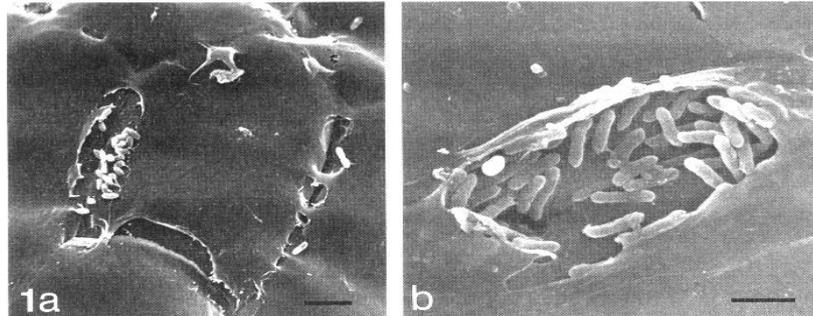


Figure 1.6 : Bactéries à l'intérieur des tissus racinaires d'une plante de riz [71]

Wilson (1995) [72] indiqua que ces microorganismes associés aux plantes saines peuvent avoir plusieurs formes telles que les Mollicutes et surtout les champignons et les bactéries qui représentent les endophytes les plus connus. Cependant, ces organismes sont relativement peu étudiés alors qu'ils représentent une source potentielle de nouveaux produits naturels qui peuvent être exploités dans l'industrie, dans la médecine et dans l'agriculture en tant que biopesticides [73].

Les biopesticides au sens large, avec un marché de 672 millions de \$, représentaient en 2005 environ 2,5% des ventes des produits phytosanitaires (Fig. 1.7). Cependant, les produits microbiens sont minoritaires et les produits bactériens autres que ceux à base de *Bacillus thuringiensis* par exemple, ne comptaient que pour une faible partie [12]. L'exploitation du potentiel de ces organismes microbiens, notamment ceux des endophytes reste, par conséquent, une technologie toujours émergente.

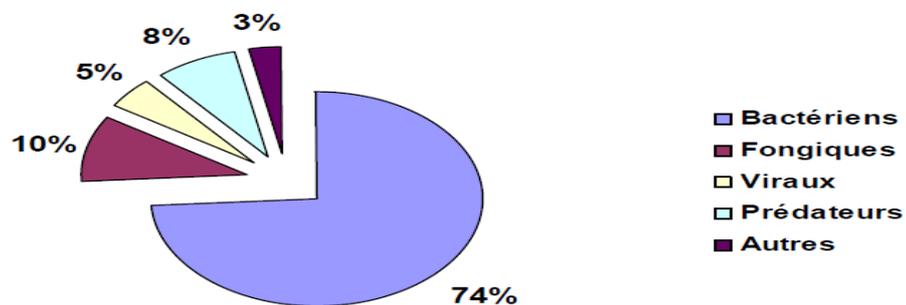


Figure 1.7 : Le marché mondial des biopesticides microbiens [74]

1.3.1. Définition et propriétés d'un organisme endophyte

Les endophytes résident entièrement dans les tissus végétaux et peuvent se développer dans les racines, les tiges et / ou feuilles. Zinniel et *al.*, (2002) [75], ont identifié les bactéries endophytes comme des micro organismes associés aux plantes et pouvant coloniser les tissus végétaux vivants sans causer des symptômes visibles spécifiques aux maladies. Selon Umamaheswari et *al.*, (2013) [76], ces bactéries résidant à l'intérieur des tissus végétaux peuvent former des relations avec la plante basées sur la symbiose, le mutualisme, le commensalisme et/ou le trophobiotisme.

Des travaux ont montré que des fossiles des premières plantes terrestres qui remontent à plus de 460 millions d'années hébergeaient des endophytes qui ont probablement joué un rôle crucial en facilitant la colonisation des terres par les plantes [77]. Il n'est pas loin de penser que les 300.000 espèces de plantes qui se trouvent sur terre, sont toutes colonisées par un ou plusieurs endophytes, qu'elles soient Gymnospermes ou Endospermes [70]. Cependant, Bacon et Hinton (2007) [78], ont déclaré que certains endophytes sont restreints à certaines familles de plantes, et que si certains sont associés uniquement aux légumineuses, d'autres sont compatibles avec une large gamme de plantes incluant les monocotylédones et les dicotylédones.

On suppose donc que de telles associations sont d'intérêt réciproque et que les deux partenaires en tirent bénéfice [79]. Selon Panaccione et Annis (2001) [80], les plantes qui sont exemptes d'endophytes sont beaucoup moins vigoureuses. Des travaux rapportent que des biocénoses entières ainsi que leurs multiples interactions peuvent être profondément influencées par la symbiose entre les végétaux et les organismes endophytes. C'est ainsi qu'il a été démontré que la présence de *Neotyphodium* sp, un champignon endophyte avait une influence négative sur la densité de pucerons des céréales (*Rhopalosiphum padi*), car, le champignon en association avec la plante, produit divers alcaloïdes toxiques pour ces insectes [81]. Ce même type d'interaction a été décrit chez *Trichoderma asperellum* T34, un PGPF (Plant Growth Promoting Fungi) qui en colonisant les racines d'*Arabidopsis* et en devenant endophyte, déclenche des gènes responsables de la synthèse de l'acide jasmonique qui accroît la résistance

de la plante envers des attaques parasitaires ultérieures et induit une ISR (Induced Systemic Resistance) [82].

Concernant les bactéries endophytes, on rapporte que ces dernières se sont montrées avoir un rôle dans l'amélioration de la croissance des plantes, dans le changement phénotypique ainsi qu'un effet sur leur absorption des nutriments en renforçant la solubilisation et l'absorption des minéraux dans le sol comme le fer et le phosphore. La fourniture de phytohormones, d'enzymes, de l'azote et des substances antimicrobiennes comme les antibiotiques et les sidérophores, ainsi que la prévention de développement de certaines maladies en synthétisant des composés antifongiques ont été rapportés [13]. L'ensemble de ces actions est généré suite à la synthèse par les bactéries d'une source importante de métabolites secondaires actifs comme les dérivés de terpénoïdes, de stéroïdes, d'alcaloïdes et d'isocoumarines [83]. La dégradation des métaux lourds, des polluants récalcitrants tels que, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, l'ammoniac, les déchets d'animaux, le chloroforme, le dichlorométhane, le xylène et d'autres polluants hydrophobes ou activité de bioremediation est également une propriété largement décrite chez les bactéries endophytes [78].

Ces bactéries sont généralement bénéfiques aux plantes hôtes puisque beaucoup d'entre elles peuvent être symbiotiques et/ ou diazotrophiques en fournissant jusqu'à 80% d'azote indispensable à la survie de la plante [84], c'est le cas de bactéries *Azospirillum* spp., *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ideonella dechlorantans*, *Azoarcus* sp, *Paenibacillus* et certaines *Pseudomonas* [78].

1.3.2. Origine des bactéries endophytes et effets sur les organismes phytopathogènes

On considère que les bactéries endophytes proviennent de l'environnement externe, principalement de la rhizosphère et qu'elles pénètrent le végétal principalement à travers le cortex des racines, mais, les parties aériennes peuvent aussi être un endroit de pénétration [85, 70]. Vanbleu et Vanderleyden, (2007) [86], suggèrent que la pénétration est plus facile dans beaucoup de cas grâce aux

activités hydrolytiques pour certaines espèces de bactéries, notamment celles qui synthétisent des enzymes pectinolytiques; et c'est l'espace intercellulaire qui semble être leur habitat favorable vu sa richesse en carbohydrates, acides aminés et composés inorganiques servant comme éléments de base pour leur survie [78]. Les travaux précédents révèlent que la densité des ces cellules peut atteindre 10^7 CFU / g de poids frais du tissu végétal, sachant que dans les normes, elle varie entre 10^2 et 10^6 CFU/g. Ce taux est variable en fonction du génotype de la plante, celui de la bactérie et des facteurs environnementaux qui entrent en jeu.

En dehors de l'effet sur la fourniture de nutriments et de facteurs de croissance aux plantes, certaines bactéries endophytes élicitent la croissance des plantes et l'ISR envers une multitude de pathogènes [87]; à titre d'exemple, il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* que la SAR (Systemic Acquired Resistance) déclenchée par une souche avirulente de *P. syringae* pv. *tomato* ainsi que l'ISR induite par *Pseudomonas fluorescens* WCS417r avaient un effet sur les souches virulentes de *P. syringae*, et même sur *Fusarium oxysporum* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* [88].

L'ISR déclenchée par des bactéries endophytes se manifeste principalement par la libération de l'Acide Jasmonique (JA), de l'éthylène (ET) et les ROS qui semblent être les principaux acteurs dans l'activation des voies de signalisation de la défense associés parfois aux VOCs (Composés Volatiles) comme le 2,3-butanediol et l'acétone [89]

1.3.2.1. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytes, agents de biocontrôle et de croissance des plantes : mode d'action

Le genre *Pseudomonas* regroupe 160 espèces de bactéries à Gram négatif (Gram-), en forme de bacille dont la taille varie entre 0,5 à 1,3 μ m, appartenant à la sous-classe des Gammaprotéobactéria, Ce sont des bactéries, non sporulées, très généralement mobiles grâce à des ciliatures polaires, aérobies et chimioorganotrophes [90].

Pseudomonas représente un genre caractérisé par une grande diversité génétique et une distribution écologique très vastes, du fait que les individus qu'il

représentent sont présents dans des environnements très variés tels que le sol, les milieux aquatiques et associés aux animaux et aux plantes [91].

Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme agents potentiels de biocontrôle à l'encontre des phytopathogènes et comme agents utilisés dans la bioremediation des sols.

Pour agir, ces bactéries ont besoin en premier lieu d'atteindre un nombre précis et donc former un biofilm, et selon McDougald et *al.*, (2008) [92], la protéine LapA associée à la membrane externe des *P. fluorescens* est responsable de l'attachement entre les cellules bactériennes pour la constitution du biofilm. Chez *P. putida*, il existe un régulateur membranaire appelé MorA qui contrôle la formation du biofilm, le développement flagellaire, la motilité et même la chimiotaxie, qui semble être principalement activée par le diphényle et l'éthylène produit par beaucoup de végétaux.

Il a été montré aussi que le système du quorum sensing régule certaines fonctions biologiques des *Pseudomonas*, telles que la phytopathogénicité, la promotion de la croissance des plantes, l'antagonisme envers des microorganismes nuisibles pour les plantes et /ou l'induction de la résistance chez les plantes. Cette activité a été décrite pour être contrôlée par deux autoinducteurs le N-acyl-homosérine (AHL) et le 3O-C6-HSL (N-(3-oxohexanoyl) homosérine lactone [93]. Selon les mêmes auteurs, certaines souches comme *P. fluorescens* CHA0, et *P. fluorescens* SBW25 produisent des molécules de signalisation qui peuvent être des solvants organiques.

Les *Pseudomonas* et principalement *P. fluorescens* associée à différentes espèces végétales, sont donc connues pour leur capacité à renforcer la résistance de ces dernières et à réduire l'incidence de certaines maladies, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant ; la stimulation de la croissance, l'induction de l'ISR, l'acquisition du fer et la production de sidérophores, la production d'antibiotiques, la synthèse d'enzymes

de dégradation des parois cellulaires fongiques et la compétition avec d'autres microorganismes dans l'environnement de la plante.

1.3.2.1.1. La stimulation de la croissance des plantes

Les bactéries endophytes ont beaucoup de similarité et partagent beaucoup de traits avec les PGPR qui stimulent la croissance des plantes [94], d'ailleurs et d'après Boukerma (2012) [95], *P. fluorescens* engendre sur la tomate des situations de phyto-stimulation se traduisant par des gains dans la biomasse et une nette amélioration des aspects physiologiques et biochimiques (chlorophylle totale, proline et protéines totales).

- **Solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas* spp. fluorescents**

Le nitrogène et le phosphore constituent des éléments limitants dans de nombreux sols, pour faire face au manque en phosphore, plusieurs espèces de *Pseudomonas* fluorescents interviennent dans la solubilisation des phosphates inorganiques et dans la minéralisation des phosphates organiques et leur mise au profit de la plante [96].

- **Synthèse de phytohormones**

La croissance induite par les *Pseudomonas* bénéfiques est due principalement à la synthèse des hormones de croissance comme la cytokinine et l'auxine et qui ont un rôle dans la division et l'élongation cellulaire [97]. En plus de ces deux hormones, les *Pseudomonas* fluorescents ont la capacité de synthétiser l'éthylène, une hormone volatile, mais qui peut avoir un effet inverse et inhiber la croissance racinaire [98].

- **Dénitrification**

La dénitrification fréquente chez les *Pseudomonas*, notamment *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. stutzeri*, est un processus dans lequel les nitrates (NO₃-), les nitrites (NO₂-) ou l'oxyde nitreux (NO₂) sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons pour la production d'énergie en absence d'oxygène [92]. Ces réactions ont lieu de sorte que des métallo-enzymes comme la nitrate réductase,

nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase interviennent dans la réduction des nitrates en azote gazeux (N₂) [98].

1.3.2.1.2. Induction de l'ISR

Le mécanisme de l'ISR est similaire à celui de la SAR, sauf qu'il est – et contrairement à la SAR- stimulé par des microorganismes bénéfiques et principalement par des rhizobactéries non pathogènes. Une première infection de la racine par un *Pseudomonas* non pathogène, stimule les capacités de défense de la plante à une infection ultérieure par un pathogène sur un organe qui peut être différent de la racine [99]. Reignault et Sancholle, (2005) [100] rapportent que la SAR est dépendante de l'acide salicylique (SA) et des protéines PR, alors que l'ISR qui correspond principalement à la synthèse du jasmonate (JA) et de l'éthylène, ne l'est pas. D'ailleurs 52% de produits résultant de l'ISR correspondent à l'éthylène et au jasmonate [101].

La réaction de résistance semble être déclenchée par la reconnaissance entre les PRRs (pattern recognition receptors) et les PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), molécules de structure présentes à la fois chez les microorganismes pathogènes et non pathogènes avant de passer par la voie ODA (pathway (octadecanoid)) et induire une synthèse de JA [102].

D'après Miller et *al.*, (2008) [96], l'ISR induite par *P. fluorescens* est en fonction de l'écotype de la plante/cultivar ; par exemple une souche de *P. fluorescens* peut induire l'ISR sur certains écotypes d'*Arabidopsis thaliana*, mais, pas sur d'autres.

1.3.2.1.3. La chélation du fer

Pour capter le Fe³⁺ du milieu externe qui avoisine 10⁻¹⁷ Mol dans le sol à pH 7, et donc priver les autres germes de cet élément, la plupart des microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs produisent des composés extracellulaires de faible poids moléculaire ayant une très forte affinité pour le fer, appelés les sidérophores. *P. fluorescens* produit la pseudobactine, un sidérophore qui prive les agents pathogènes du fer, tels que *Fusarium oxysporum* [103].

La prochlorine et la Quinolobactine molécules produites par certaines souches de *P. fluorescens* comme ATCC 17400, sont aussi considérées comme des siderophores, de même, l'acide pyridine-2,6-dithiocarboxylique (PDTC) synthétisé par les souches de *P. putida* et *P. stutzeri* [104]. Ces molécules ont un double effet vu qu'elles sont impliquées aussi dans l'amélioration de la croissance et la santé des plantes et qu'elles contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux [105,106]

1.3.2.1.4. Mécanismes d'antagonisme

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les parois cellulaires et actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont ; le viscosinamide, l'acide anthranilique, les phénazines (phenazine-1-carboxylic acid, phenazine-1-carboxamide (PCA), les diacetylphloroglucinols pyolutéorine, la pyrrolnitrine, les lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces molécules agissent comme des antibiotiques envers une large gamme de microorganismes du sol [107].

1.3.2.2. Les *Bacillus* spp. endophytes, agents de biocontrôle et de croissance des plantes

Les bactéries du genre *Bacillus* les plus dominantes dans la classe des endophytes, sont associées aux plantes et identifiées aussi comme antagonistes, elles sont largement utilisées en biotechnologie [108].

Le genre *Bacillus*, regroupe des bactéries à Gram +, en forme de bâtonnets et renfermant une endospore très résistante aux différents stress chimiques et physiques. Les bactéries du genre *Bacillus* peuvent survivre à de hautes températures, aux pH extrêmes, à la salinité, à la sécheresse, et en présence de détergents [90]. Par ailleurs, elles présentent la faculté de dégrader des polluants et des pesticides comme le chlorpyrifos et le bifenthrin [109]. Ces dernières propriétés rendent la manipulation en plein champ de ces bactéries en lutte biologique plus pratique et d'usage avantageux [110].

Comme toutes les autres bactéries, les espèces appartenant au genre *Bacillus*, agissent par utilisation d'un biofilm, où différentes activités biologiques sont assurées à l'échelle communautaire, parmi elles ; la stimulation de la croissance, l'induction de l'ISR, l'acquisition du fer et la production de sidérophores intervenant à la compétition, la production d'antibiotiques, la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec d'autres microorganismes [111].

1.3.2.2.1. La stimulation de la croissance des plantes

Les lipopeptides cycliques (LPs) produits par *Bacillus*, possèdent en plus de leur activité antimicrobienne – détaillée ci-dessous - un effet sur la colonisation des plantes par ces bactéries et agissent sur leur motilité, d'ailleurs, la suppression de la surfactine chez *B. subtilis* souche 6051 rend cette dernière incapable de former des biofilms robustes [112, 113]

Comme les *Pseudomonas*, les bactéries du genre *Bacillus* et qui ont une large distribution par rapport aux autres PGPR's interviennent sur la promotion de la croissance et principalement celle, des tissus racinaires [114]. Podil et Kishore (2007) [115], par des expériences menées *in vitro* et réalisées sur *Arabidopsis thaliana*, ont montré que la promotion de la croissance est due principalement à la libération du 3-hydroxy-2-butanone (acétoïne) et 2,3-butanediol, substances volatiles produites par *Bacillus subtilis* et *B. amyloliquefaciens*.

En plus de la synthèse de métabolites secondaires à activité de phytostimulation, les *Bacillus* sont connus pour présenter une grande capacité à solubiliser les phosphates et le mettre sous forme minérale assimilable ; qui intervient directement dans la croissance des plantes [116].

1.3.2.2.2. La résistance systémique induite (ISR)

Van Loon, (2007) [117] indique que le traitement des semences de tomate par *B. cereus*, était bénéfique dans la lutte contre *phytophthora infestans*, *Alternaria solani* et *Septoria lycopersici in planta*. Cependant, l'ISR activée par les différentes souches de *Bacillus*, n'est pas toujours caractérisée par la présence des trois substances connues (AS, ET et AJ). D'ailleurs l'ISR induites par *B.subtilis* GB03 a

été identifiée comme indépendante de AS et AJ alors qu'elle semblait exiger l'ET et deux VOCs qui sont 2, 3-butanediol et 3-hydroxy-2-butanone (acétoïne) présents aussi dans l'ISR induite par *B. amyloliquefaciens* IN937a [118].

1.3.2.2.3. Mécanismes d'antagonisme

Le genre *Bacillus* est considéré comme une usine microbienne pour la production d'une vaste gamme de molécules biologiquement actives inhibitrices potentiellement des agents phytopathogènes. Les molécules synthétisées sont entre autres ; la kanosamine ou zwittermycin A, antibiotiques produits par *B. cereus* [119].

Des séquences du génome *Bacillus* sont consacrées à la synthèse d'antibiotiques et ont la potentialité de synthétiser diverses molécules antimicrobiennes comme les lipopeptides cycliques (LP), la surfactine, l'iturine et la fengycine (ou plipastatine) [120]. D'ailleurs, plus de 8,5% du génome de *B. amyloliquefaciens* révèle un énorme potentiel pour produire des antibiotiques, sidérophores et métabolites secondaires, y compris la polyketides bacillaene et difficidin alors que *B. polymyxa* produit la polymyxine, antibiotique agissant principalement contre des bactéries à Gram - [121, 90].

Des études récentes montrent que ces LP's peuvent agir non seulement comme des « antagonistes » ou « tueurs » en inhibant la croissance des organismes phytopathogènes, mais aussi, comme « écarteurs » en facilitant la colonisation des racines et comme des « immuno- stimulateurs » en renforçant le potentiel de résistance de l'hôte [112].

Dans le reste des cas, ces bactéries agissent principalement en produisant des toxines ou des enzymes. C'est ainsi que des souches de *Bacillus* spp. ont montré un effet fongicide sur des organismes phytopathogènes, tels que ; *Alternaria alternata*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*, d'ailleurs la bactérie *B. megaterium* B 153-2-2 inhibe les activités des enzymes extracellulaires, telles que la cellulase, la pectinase et la pectine lyase produites par *R. solani*, en produisant une endoprotéinase extracellulaire [111]. Cependant, *B. subtilis* est une espèce connue pour synthétiser l'enzyme AiiA, une

metalohydrolase qui inactive l'acyl-HSL auto-inductrice impliquée dans le quorum sensing d'*Erwinia carotovora*, et donc une approche alternative en cours de développement basée sur l'introduction du gène responsable à la production de cette enzyme qui pourrait empêcher cette dernière bactérie agent de la pourriture molle de coloniser les plantes [122].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Le but de la première partie de ce travail est de déterminer l'effet de huit souches de bactéries endophytes sur une collection de champignons phytopathogènes. En premier lieu, nous avons eu recours aux repiquages et purifications des souches d'*Alternaria alternata*, de *Fusarium solani*, de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, de *Rhizoctonia solani* et de *Seiridium cupressi* avant de déterminer en second lieu, l'effet probable antagoniste *in vitro*, des bactéries endophytes sur ces champignons phytopathogènes.

La seconde partie du présent travail, inclut l'isolement de *P. infestans* à partir de tissus naturellement infectés de pomme de terre (feuilles, tiges...) et l'identification des "mating type" des isolats avant de déterminer *in situ* l'effet de bioprotection de deux bactéries endophytes sur les isolats obtenus.

2.1. Antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes à l'égard de pathogènes

2.1.1. Souches, cultures et suspensions bactériennes

Les bactéries étudiées pour leur effet antagoniste à l'égard des champignons phytopathogènes proviennent de la collection du laboratoire de Phytobactériologie de Université de Blida (Tableau 2.1). Ces isolats endophytes ont été isolés d'espèces végétales spontanées puis identifiés par voie biochimique et moléculaire sur la base de l'analyse de la séquence ribosomique du 16S [123]. Six souches de *Bacillus* spp. et deux de *Pseudomonas* spp. isolées à partir de plantes spontanées et connues pour leur activité à promouvoir la croissance [18], ont été choisies parmi la collection du laboratoire afin de déterminer leur effet sur une gamme de champignons phytopathogènes (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Souches bactériennes utilisées dans les tests d'antagonisme [18]

Souche	Plante hôte
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	<i>Urtica dioica</i>
<i>Bacillus cereus</i> EHR1	<i>Euphorbia helioscopia</i>
<i>Bacillus pumilus</i> OS2	<i>Urtica dioica</i>
<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	<i>Euphorbia helioscopia</i>
<i>Bacillus</i> spp. CR1	<i>Calendula arvensis</i>
<i>Bacillus</i> spp. PF3	<i>Plantago lanceolata</i>
<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	<i>Euphorbia peplus</i>
<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	<i>Plantago lanceolata</i>

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents et les *Bacillus* spp. sont connus pour la production de molécules et de métabolites biologiquement actives et inhibiteurs des agents phytopathogènes comme les enzymes dégradant les parois cellulaires et les antibiotiques actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons [119, 124].

Les bactéries ont été purifiées sur milieu LPGA (Annexe 1), la purification étant une étape nécessaire afin d'obtenir des clones purs. Les souches initialement conservées sur milieu gélosé incliné ont subi plusieurs purifications successives en boîtes de pétri. Cette méthode consiste à faire des étalements sectoriels dans une boîte de pétri avec une culture bactérienne pour chaque souche, à l'aide d'une anse stérile à raison de trois secteurs par boîte contenant le milieu LPGA à pH=7, suivie par une étape d'incubation à 28-30°C.

Pour la préparation des suspensions bactériennes, nous avons récupéré les cultures bactériennes âgées de 48 h à l'aide de pipettes Pasteur recourbées. Les cultures sont par la suite ajustées à 10^8 cfu par spectrophotométrie à une DO de 0,2 [18].

2.1.2. Matériel fongique

Un des buts de ce travail était de vérifier *in vitro* l'effet antagoniste des bactéries endophytes sur *Gaeumannomyces graminis var. tritici* et *Seiridium cupressi* ainsi que sur trois autres pathogènes fongiques affectant la pomme de

terre, à savoir *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* et *Rhizoctonia solani*. Une collection de cinq champignons phytopathogènes ont fait l'objet du test d'antagonisme, ils nous ont été fournis gracieusement par le Pr. L. V. Lopez Llorca du laboratoire de phytopathologie de l'Université d'Alicante (Espagne).

La purification des souches est réalisée après plusieurs repiquages par transplantations successives des disques mycéliens de chaque champignon dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1), suivie par une étape d'incubation à 28-30°C jusqu'à l'obtention de clones purs.

Toutes les manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous la hotte, avec l'appoint de deux becs Bunsën.

2.1.3. Antagonismes *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. endophytes à l'égard des différents agents pathogènes

L'analyse de l'activité antifongique des endophytes vis-à-vis des champignons phytopathogènes cités précédemment, a été effectuée par la méthode de confrontation directe. À l'aide d'une anse stérile, une colonie bactérienne est raclée, puis transférée dans un tube contenant de l'eau distillée stérile. Après homogénéisation de la suspension bactérienne, un volume de 0,5 ml est prélevé pour être déposé et soigneusement étalé sur la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Un disque mycélien du champignon prélevé du pourtour d'une culture pure âgée de 7 jours est découpé. Cet explant est déposé par la suite au centre de la boîte de Pétri sur laquelle la bactérie endophyte à tester a été étalée. Les repiquages et les confrontations sont effectués en même temps.

Les témoins négatifs sont représentés par des boîtes de pétri contenant uniquement la culture du champignon phytopathogène sur le milieu PDA sur lequel a été étalé 0,5ml d'eau distillée stérile. Pour chaque champignon et pour chaque culture bactérienne, l'essai de confrontation est répété quatre fois. Les boîtes de pétri sont par la suite entourées avec le parafilm le long du bord pour éviter les contaminations. Enfin, les boîtes sont incubées durant 7 jours à une température de 28-30°C.

L'antagonisme *in vitro* a été évalué après avoir déterminé le pourcentage (le taux) de développement de chaque mycélium traité par une suspension bactérienne. Au total, 180 boîtes de pétri sont utilisées (8 souches bactériennes x 5 pathogènes x 4 répétitions + 20 boîtes du témoin) pour chaque test.

2.1.7. Lecture

La lecture des résultats est effectuée après sept jours d'incubation. L'évaluation d'une activité antifongique des endophytes positive se traduit par un arrêt dans la croissance mycélienne. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant les diamètres de la croissance radiale du pathogène en millimètre à l'aide d'une règle graduée.

Le taux d'inhibition relative (RIR : relative inhibition ratio) correspondant à la formule suivante, nous a permis d'évaluer l'activité antagoniste des bactéries endophytes.

$$\text{RIR (\%)} = (\text{Dck} - \text{Dt}) \times 100 / \text{Dck}$$

- Dt correspond au diamètre du mycélium dans les boîtes traitées par la suspension bactérienne endophyte
- Dck correspond au diamètre du mycélium dans le témoin

Après calcul, les souches ayant un RIR supérieur à 50% sont considérées comme ayant une activité antagoniste significative [125].

Analyse statistique

Après avoir identifié le RIR pour chaque souche endophyte en confrontation avec chaque champignon; l'analyse statistique des diamètres des mycéliums qui se sont développés sous l'effet des huit suspensions bactériennes étudiées, est réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) à un seuil de 5%. Elle est suivie d'une comparaison des moyennes dans le cas où l'interaction entre les deux facteurs (suspension bactérienne et isolat fongique) est significative. Cette analyse est réalisée à l'aide du logiciel Systat version 13.1 pour le paramètre (antagonisme) évalué, lors des tests *in vitro*.

Les résultats obtenus sont ensuite représentés sous forme de graphiques en fonction des suspensions bactériennes des endophytes testés et des champignons étudiés.

2.2. Isolement de *P. infestans* et obtention de souches pour inoculation

En Algérie, des attaques sévères de la pomme de terre par le mildiou ont été enregistrées depuis 2007, et l'apparition de la maladie bien qu'elle surgit souvent à la fin du cycle végétatif de la culture, caractérise plusieurs zones de production de la pomme de terre lorsque les conditions sont favorables [37, 11].

2.2.1. Méthodes de préparation du milieu de culture et d'isolement de *P. infestans*

Des échantillons de feuilles et de tiges prélevés à partir de plantes de pomme de terre infectées en provenance de cultures dans la région d'Alger et celle de Ouamri à Médéa, présentant des symptômes spécifiques du mildiou de la pomme de terre ont été mis dans des sachets en plastique et transportés dans une glacière pour éviter leur dessiccation. Ces échantillons de pomme de terre avec des symptômes de mildiou ont été analysés au laboratoire à l'œil nu et observés sous la loupe binoculaire.

P. infestans est considéré parmi les agents pathogènes difficiles à isoler et à maintenir en vie surtout en absence d'antibiotiques à cause de ses caractéristiques très particulières de biotrophie, à savoir sa faible compétitivité et ses exigences nutritives strictes [37] ; ce qui nécessite des repiquages très fréquents sur milieu adéquat. Par conséquent, un des objectifs de ce travail est de mettre au point une ou plusieurs techniques relativement rapide et fiable pour isoler et mettre en culture le champignon sans l'utilisation excessive des antibiotiques. Toutefois, nous avons utilisé un seul antibiotique, en l'occurrence, l'Ampicilline, vu sa disponibilité sur le marché.

Dans la bibliographie, plusieurs milieux de cultures sont utilisés pour l'isolement et la mise en culture de *P. infestans*: un milieu à base d'haricot, un milieu à base de pois-chiche, le milieu Corn Meal Agar et un milieu à base de petits pois [37].

Le milieu de culture gélosé choisi et manipulé lors des isollements et des repiquages de *P. infestans* est préparé à base de petit pois congelé. A cet effet, 125 g de petit pois congelé sont bouillis dans 600 ml d'eau distillée pendant 20 à 30 min. Le jus ou le bouillon obtenu est filtré à travers une passoire, auquel est ajouté 15 g d'agar-agar et ajusté d'eau distillée à 1L et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Après un refroidissement modéré, l'ampicilline est incorporée au milieu à raison de 200 mg/L, le tout est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15 à 20 ml / boîte.

Préalablement à l'étape d'isolement, les échantillons symptomatiques de mildiou ont été maintenus en chambre humide. Le but de cette manipulation est de raviver le pathogène et d'obtenir des lésions bien sporulées sur les tissus infectés qui ont tendance en général à faner lorsqu'ils sont transportés. Cette étape est réalisée en créant des conditions favorables pour la survie et le développement de l'agent pathogène et qui se résument dans la température ambiante et l'humidité. Pour réaliser ces conditions, nous avons mis en contact la face supérieure des feuilles infectées avec du papier buvard stérile imbibé avec 5 ml d'eau distillée stérile qui est par la suite déposée dans les boîtes de Pétri [126]

La technique suivie pour isoler ce pathogène est dite : la technique par appât, c'est une technique indirecte ; des fragments infectés (feuilles ou tiges) de 4 à 6 mm de diamètre prélevés au front d'avancement de la lésion sont lavés à l'eau du robinet puis désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium 1% pendant 2 à 3 minutes, ils sont ensuite trempés dans l'eau distillée stérile deux à trois fois et puis séchés pendant une ou deux minutes avant d'être placés sur des fragments de tubercules de pomme de terre (variété spunta, saine et sensible d'une épaisseur de 5 mm) désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 1% , lavées à l'eau distillée stérile et séchées.

Les fragments de tubercules sont déposés dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm et l'incubation est faite à 18°C et à l'obscurité jusqu'à apparition de fructifications.

L'étape suivante consiste à repiquer sur le milieu petit pois gélosé préalablement coulé dans des boîtes de Pétri, des sporocystes prélevés dans des conditions aseptiques à la surface du tissu infecté et au front d'avancement de la lésion à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Le prélèvement du mycélium est délicat, d'ailleurs l'extrémité de la pipette ne doit toucher que les sporocystes attachés à l'extrémité du mycélium et surtout pas la surface des tissus infectés pour éviter tout type de contamination. L'incubation des boîtes est effectuée à l'obscurité à 20°C.

Afin de maintenir le pathogène en vie, des repiquages successifs du mycélium, issu de la germination directe des sporocystes sont réalisés sous conditions d'asepsie après 15 à 20 jours d'incubation, de sorte que des fragments soient mis sur milieu gélosé à base de petit pois préalablement coulé dans des boîtes de Pétri et incubés sous les mêmes conditions citées ci dessus.

Pour réussir l'isolement et le repiquage de *P. infestans*, les manipulations ont été réalisées en conditions d'asepsie.

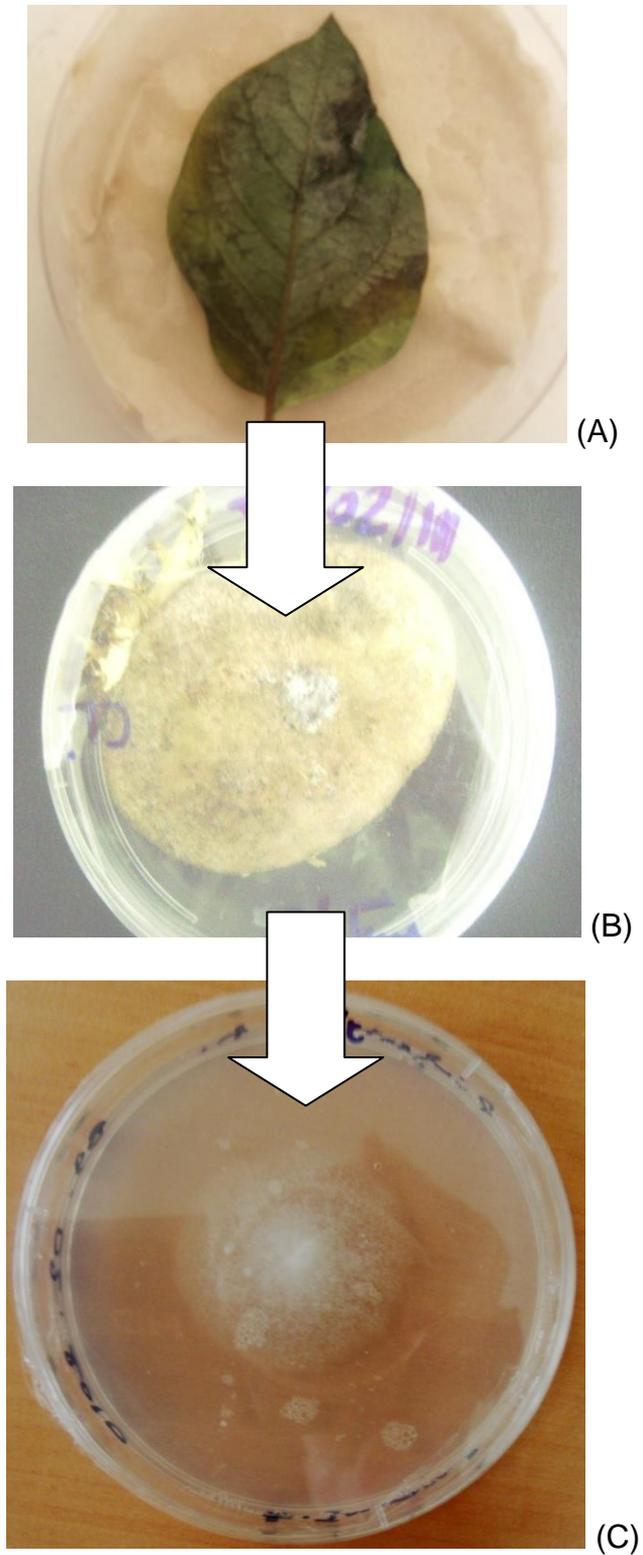


Figure 2.1 : Isolement de *P. infestans*

A : Dépôts d'une feuille présentant des symptômes de mildiou dans une enceinte humide

B : Isolement par appât

C : Mycélium de *P. infestans* âgé de quatre jours

2.2.2. Caractérisation et identification des isolats obtenus

A l'aide d'une loupe binoculaire on a pu observer l'aspect du mycélium des deux isolats tandis que c'est à l'aide d'un microscope optique on a déterminé les dimensions et les tailles des sporanges, sachant que :

$$T_o = T_a / G \text{ micro}$$

- T_o : Taille de l'objet
- T_a : Taille apparente
- $G \text{ micro}$: Grossissement du microscope

Le comportement de *P. infestans* en présence de différents moyens de lutte, -y compris les agents de lutte biologique varie a cause de la grande variabilité qui le caractérise suite à l'existence des deux types sexuels A1 et A2

La confrontation nous permet de déterminer le profil pathologique des isolats au laboratoire et leur type sexuel vu que les oospores (organes de reproduction) se forment uniquement lors d'un contact entre des isolats de types sexuels opposés A1 et A2 [48].

Au laboratoire, le type sexuel d'un isolat est déterminé par confrontation, en conditions contrôlées, de l'isolat à caractériser avec deux autres de référence, un de type sexuel A1 et l'autre de type A2 [127], et en absence d'isolat de référence, on peut comme même vérifier par confrontation si les isolats sont de même type sexuel ou non sans déterminer l'appartenance exacte de chacun.

Les ébauches des organes sexués apparaissent dans la zone de confrontation des mycéliums, 2 à 3 jours après qu'ils étaient entrés en contact et le gamétozyte femelle pénètre à travers l'anthéridie ; sa différenciation en oogone nécessite 12 heures environ. Ce dernier présente un aspect sphérique et granuleux. La jeune anthéridie enserre le pied de l'oogone [37]

- **Etude de la fertilité des croisements *in-vitro* : Confrontation et incubation**

Une pastille mycélienne de 4 mm de diamètre est prélevée à la périphérie d'une colonie âgée de 10 jours de chaque confrontant. Les deux pastilles sont

placées dans une boîte de Petri contenant le milieu de culture petit pois à 2 cm l'une de l'autre. Quatre répétitions sont effectuées et les croisements sont incubés à 20 °C et à l'obscurité pendant 10 jours [126].

2.3. Essai de bioprotection à l'égard de *P. infestans* par les bactéries endophytes

L'activité antagoniste de deux bactéries endophytes sur l'agent du mildiou de la pomme de terre a été analysée. Vu que le *Phytophthora infestans* et les bactéries endophytes ne poussent pas sur le même milieu de culture, nous avons opté de pratiquer ce test *in situ* sur des folioles détachées de pomme de terre. .

Deux bactéries endophytes (PS1 appartenant au genre *Pseudomonas* spp. et PF3 du genre *Bacillus* spp.) préalablement étudiées dans les tests d'antagonisme *in vitro* précédents, ont été testées sur la pomme de terre, afin de déterminer leurs effets de biocontrôle *in situ* sur les folioles de pomme de terre infectées de souches de *P. infestans* isolées d'échantillons symptomatiques du mildiou de la pomme de terre.

2.3.1. Matériel végétal

Les tests *in situ* nécessitent des organes végétaux ou des plantules, qui à l'origine sont issus de semences de pomme de terre appartenant à une variété sensible au mildiou. Dans notre cas, nous avons utilisé des feuilles de la variété Spunta.

A cet effet, des feuilles d'un même verticille et de tailles sensiblement identiques, sont prélevées à l'aide d'un scalpel stérile de plants de pomme de terre var. Spunta âgés de quatre semaines, cultivés en plein champ et d'apparence saine. Un total de soixante folioles par isolat sont utilisées (2 feuilles x 5 répétitions x 6 traitements). Les folioles d'apparence saine sont lavées à l'eau du robinet et désinfectées par la suite pendant 2 minutes en utilisant une solution d'hypochlorite de sodium à 1%. Une étape de rinçage à l'eau distillée stérile et séchage avec du papier absorbant stérile est effectuée.

2.3.2. Préparation des suspensions bactériennes

L'activité antagoniste des biopesticides est souvent associée à la production de métabolites secondaires [128]. Pour évaluer l'implication des métabolites toxiques dans l'activité antagoniste des souches endophytes, l'effet de l'application des suspensions des endophytes bactériens cultivés sur le milieu LPGA pendant 48 h a été évalué *in situ* à l'égard des deux isolats de *P. infestans*.

Les suspensions des bactéries endophytes sont préparées à une concentration de 10^8 (DO=0,2) pour être directement appliquées par pulvérisation avant et après l'inoculation du pathogène afin de déterminer si elles ont un effet préventif et/ou curatif à l'égard du mildiou de la pomme de terre.

2.3.3. Inoculation des feuilles de pomme de terre détachées par les isolats de *P. infestans*

L'inoculum consiste en une suspension de sporanges préparée à partir des cultures de *P. infestans* âgées de deux semaines et ayant produit une sporulation abondante sur le milieu à base de petits pois sans antibiotiques. Un volume de 10 ml d'eau distillée stérile est versé dans chaque boîte de Pétri et la surface de la culture est soigneusement raclée avec une pipette Pasteur recourbée pour récupérer un maximum de sporanges. La suspension de sporanges est récupérée dans des tubes à essai stériles qui sont ensuite ajustés pour obtenir une concentration de 5.10^4 sporanges/ml. Ces suspensions sont placées immédiatement à une température de 4°C pendant au moins 2h pour permettre la maturation des sporanges et faciliter par conséquent, la libération des zoospores avec lesquelles l'inoculation des plantules des deux groupes de traitements est réalisée.

2.3.3.1. Traitements et protocole expérimental

Pour chaque isolat pathogène, deux feuilles de la variété Spunta, sont déposées dans une boîte de Pétri, soit au total, soixante boîtes (5 répétitions x 6 traitements x 2 isolats).

- Dix boîtes contenant les folioles saines du témoin négatif

- Cinq boîtes contenant les feuilles du témoin positif inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles du témoin positif inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Pseudomonas* spp. PS1 deux jours avant d'être inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*,
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Pseudomonas* spp. PS1 deux jours avant d'être inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Bacillus* spp. PF3 deux jours avant d'être inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Bacillus* spp. PF3 deux jours avant d'être inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Pseudomonas* spp. PS1, deux jours après avoir été inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Pseudomonas* spp. PS1 deux jours après avoir été inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Bacillus* spp. PF3 deux jours après inoculation par l'isolat (1) de *P. infestans*
- Cinq boîtes contenant les folioles traitées par *Bacillus* spp. PF3 deux jours après avoir été inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*

Dans chaque boîte, nous déposons du papier buvard stérile humidifié avec 5 ml d'eau distillée stérile et sur lequel sont déposées les folioles détachées avec leur face supérieure contre le papier.

Les boîtes de Pétri sont tapissées de papier Wattman et régulièrement humectées pour créer des conditions d'humidité favorable aux pathogènes testés et afin d'éviter la dessiccation. Les boîtes contenant les feuilles inoculées sont préalablement incubées à l'obscurité durant les 12 premières heures, puis en chambre climatisée avec une photopériode de 16 h et des températures contrôlées (15°/18° nuit/jour). Les boîtes sont disposées selon un protocole expérimental en blocs aléatoires complets.

La lecture des résultats intervient trois jours après l'inoculation. Le pouvoir de biocontrôle des deux bactéries endophytes étudiées à l'égard du mildiou, est déterminé par étude de l'agressivité des isolats qui est à son tour déduite par les critères suivants :

➤ **Le temps d'incubation**

Ce temps représente la période en jours qui s'écoule du premier jour d'inoculation à l'apparition des premiers symptômes (nécroses).

➤ **La taille de la lésion nécrotique**

Après huit jours d'incubation, les bordures des lésions symptomatiques sont calquées sur du papier transparent et les surfaces délimitées sont mesurées afin d'apprécier la taille des lésions nécrotiques.

➤ **Le temps de latence (apparition des sporanges)**

C'est le temps en jours qui s'écoule du premier jour d'incubation à l'apparition des premières fructifications (sporangiophores et sporanges). Ce critère a été évalué par mesure de la concentration en sporanges. Après huit jours d'incubation, les folioles inoculées sont mises pendant 24h à 20°C et à l'obscurité. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri stériles et lavées avec 10 ml d'eau distillée stérile. La concentration obtenue en sporanges des différentes suspensions foliaires issues des traitements effectués, est déterminée à l'aide de la cellule de Malassez. Six mesures sont effectuées pour chaque interaction suspension bactérienne x isolat. Les observations et comptages se font au microscope optique au grossissement X 100.

Analyse statistique

Après avoir déterminé le temps d'incubation et le taux de sporulation sous les conditions de l'expérimentation ; l'analyse statistique des critères mesurés (dimension des lésions et taux de sporulation) pour les deux suspensions bactériennes étudiées, est réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) à un seuil de 1%. Elle est suivie d'une comparaison des moyennes dans le cas où l'interaction entre les deux facteurs (suspensions bactérienne et isolat de

Phytophthora) est significative. Cette analyse est réalisée à l'aide du logiciel Systat 13.1 pour l'ensemble des paramètres mesurés pour le test *in situ*.

Les résultats obtenus sont ensuite représentés sous forme de graphiques en fonction des suspensions bactériennes et des isolats de *Phytophthora* étudiés.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Comportement des cinq agents pathogènes à l'égard des bactéries endophytes

La comparaison des taux d'inhibition enregistrés montre une variabilité dans l'action en fonction de l'isolat bactérien et de la souche fongique.

Sur la base de ces résultats, nous notons la variabilité de l'action de cinq isolats bactériens à l'égard des champignons phytopathogènes. Cette différence réside dans la nature des modes de réaction développés par les isolats fongiques qui crée une certaine spécificité dans l'interaction bactérie antagoniste-champignon phytopathogène.

3.1.1. Action des *Bacillus* spp.

Le test d'antagonisme *in vitro* des six souches de *Bacillus* spp. à l'égard de la collection de pathogènes a montré des variabilités de réponses. Dans le cas d'*Alternaria alternata* traité par la suspension de *Bacillus* spp. (souche PF3) et celui de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* traité par *Bacillus subtilis* (EHF5) où on constate une faible activité antagoniste du fait que le mycélium des deux champignon s'est développé et que le RIR était de l'ordre de 20,1 % et 36,4 % respectivement (Fig. 3.1 ; Fig. 3.3 et Fig. 3.5)

Des boîtes du *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* traitées par la suspension de *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, qui comparées à celles du témoin ne montraient pas beaucoup de différences (Fig. 3.5 et Annexe 2) ; et avec un RIR de 2,12 %, la faible activité antagoniste de *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4) sur *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* est donc confirmée

Cependant on a remarqué que le mycélium du *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* traité par des suspensions de *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus pumilus* OS2 et *Bacillus* spp. PF3 s'est bien développé en prenant même un diamètre supérieur à celui du témoin correspondant respectivement à 7,33 cm, 6,8 cm et 8,2 cm (Annexe 2).

Dans le reste des cas, les différentes bactéries ont montré une activité antimicrobienne plus ou moins importante où les RIR variaient entre 52,2% pour *Fusarium solani* traité par *Bacillus cereus* EHR1 et 100% pour le *Seiridium cupressi* qui s'est montré très sensible aux différentes bactéries endophytes (Fig. 3.1). Les résultats illustrant les diamètres mycéliens développés sont résumés dans le tableau de l'annexe 2.

3.1.2. Action des *Pseudomonas* spp.

Les deux souches de *Pseudomonas* spp. semblent avoir un effet en terme d'antagonisme sur les cinq champignons vu que ces derniers ont développé des mycéliums de diamètres réduits, voire une croissance nulle comme dans le cas du *S. cupressi* (Fig. 3.7) (Annexe 2)

L'antagonisme le plus marquant résultait de l'effet des suspensions des deux souches de *Pseudomonas* spp. sur le *S. cupressi* (Fig. 3.7). C'est ainsi que les RIR qui prenaient donc des valeurs largement supérieures à 50 % variaient entre 74,6 % et 100 % (Fig. 3.2).

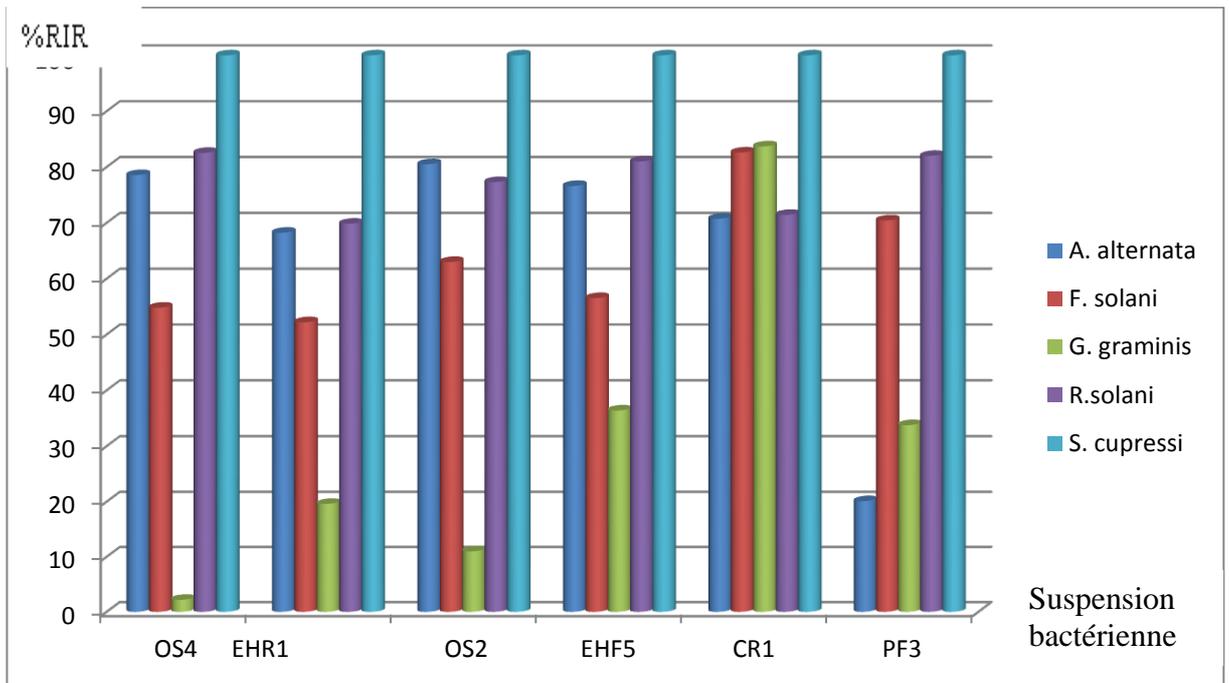


Figure 3.1 : Pourcentage d'inhibition (RIR) résultant de l'effet des suspensions bactériennes des six souches de *Bacillus*. spp sur les cinq champignons phytopathogènes

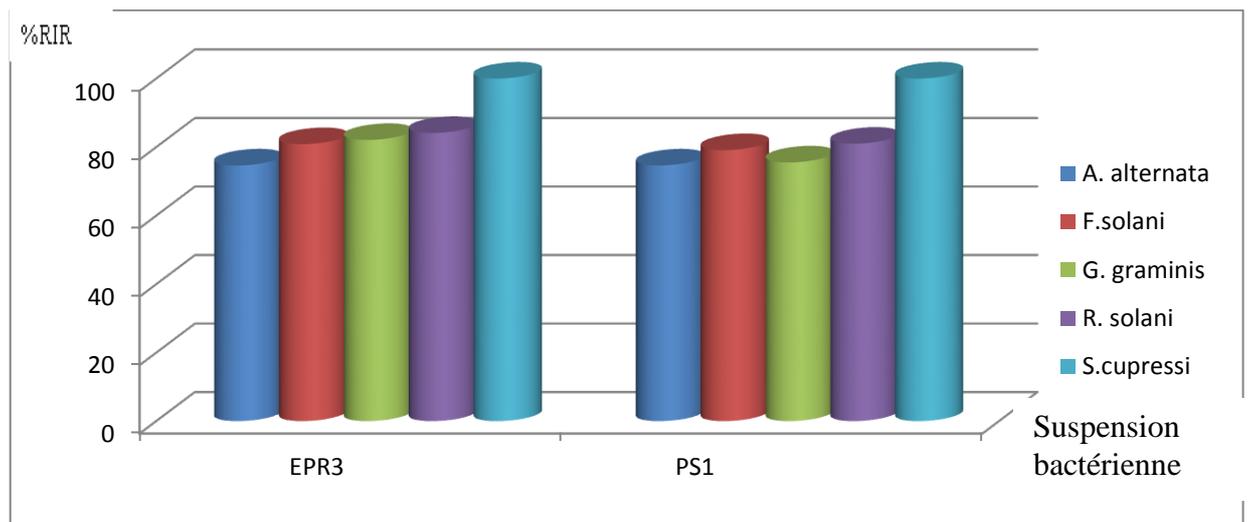


Figure 3.2 : Pourcentage d'inhibition (RIR) résultant de l'effet des suspensions bactériennes des deux souches de *Pseudomonas* spp sur les cinq champignons phytopathogènes

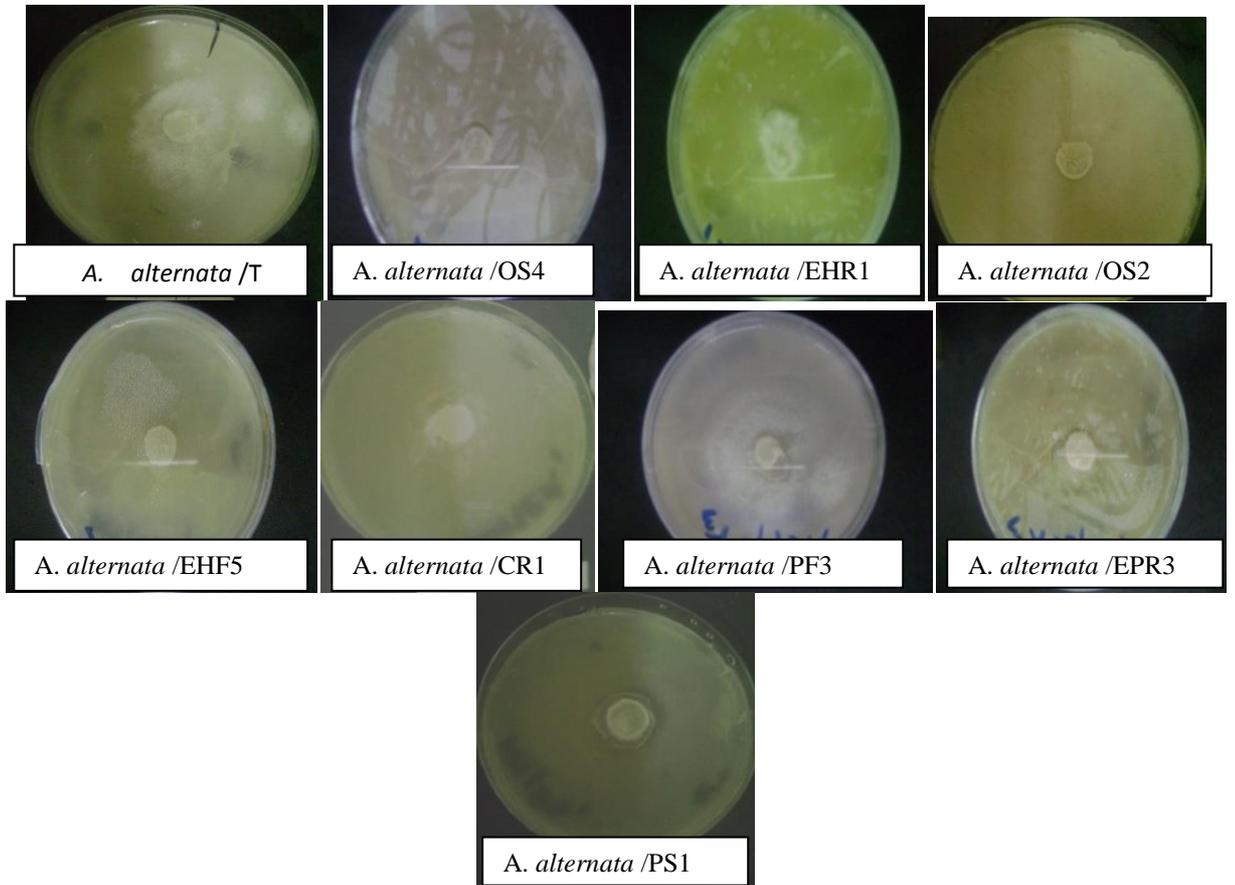


Figure 3.3 : Antagonisme *in vitro* des huit bactéries sur *A. alternata*

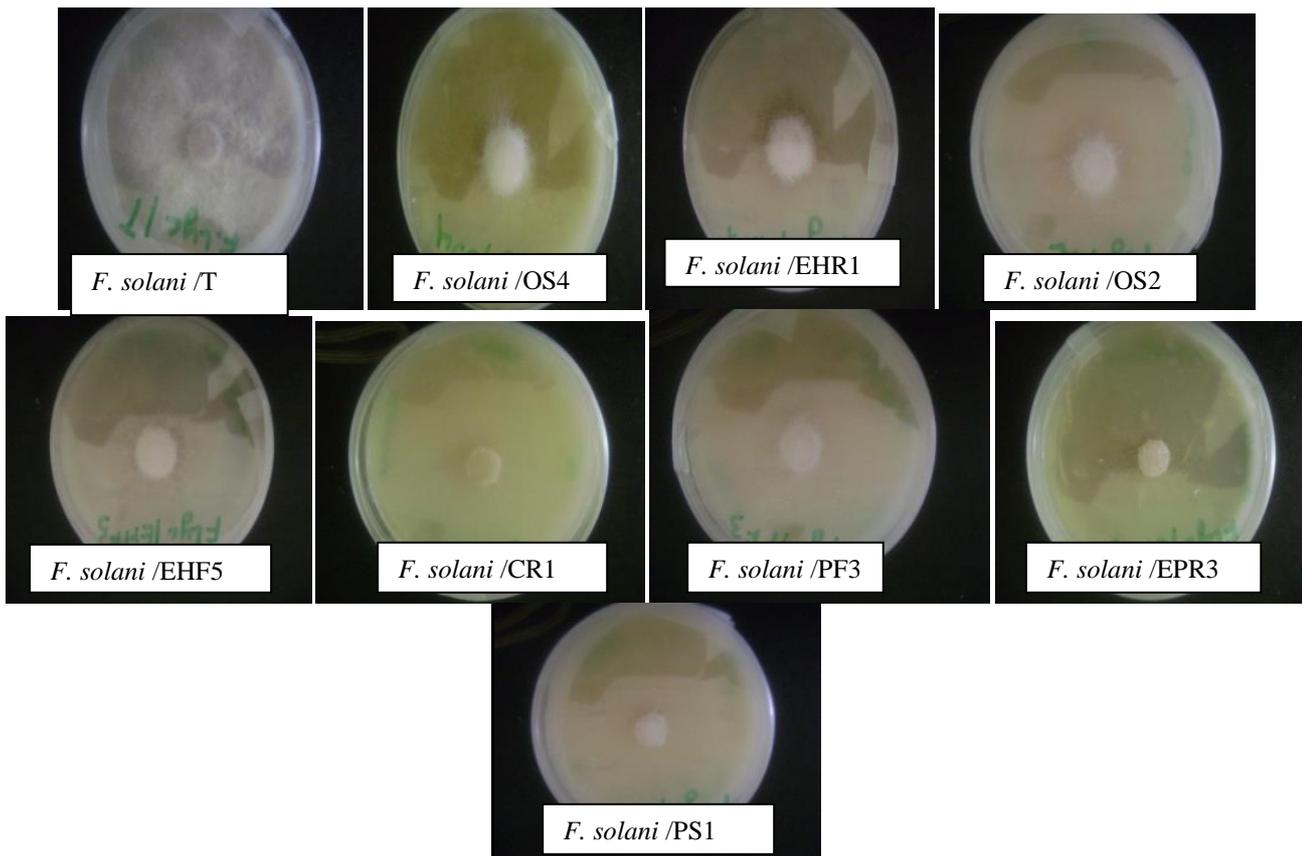


Figure 3.4 : Antagonisme *in vitro* des huit suspensions bactériennes sur *Fusarium solani*

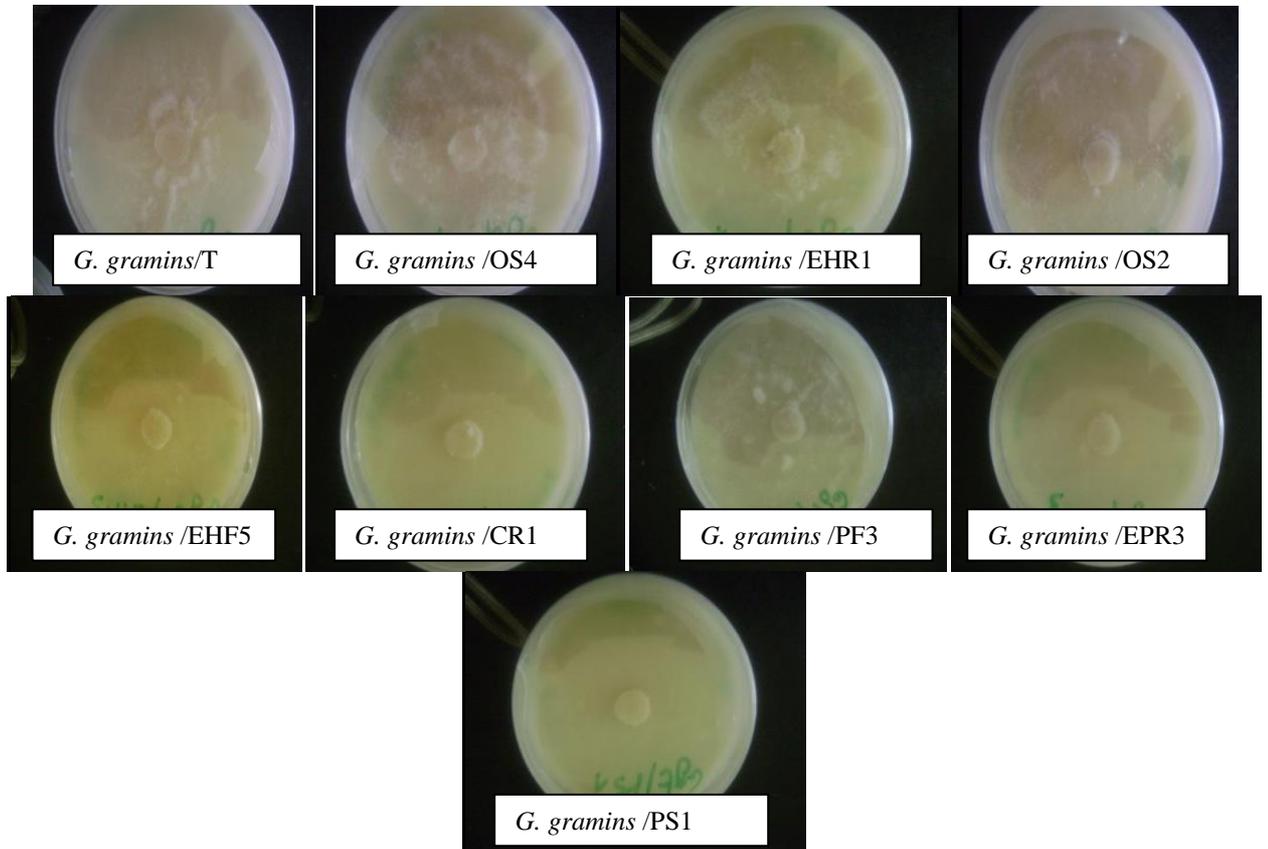


Figure 3.5 : Antagonisme *in vitro* des huit suspensions bactériennes sur *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

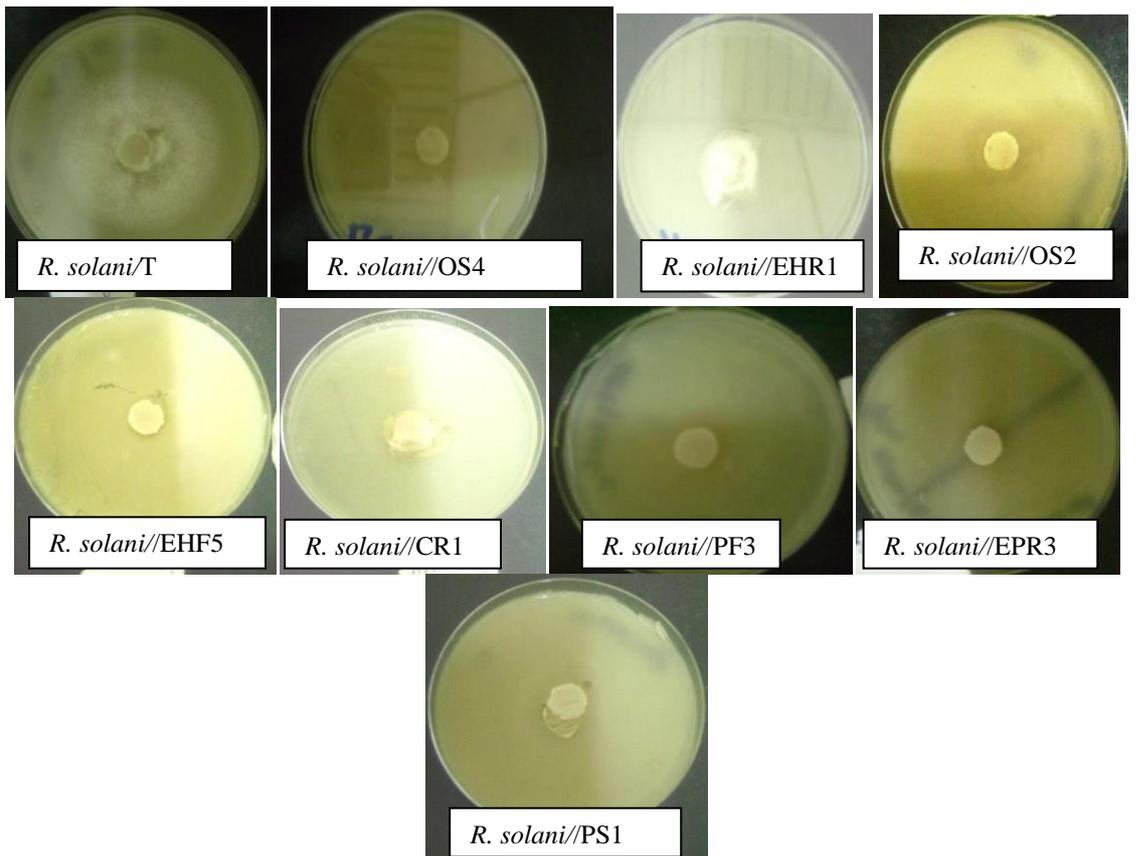


Figure 3.6 : Antagonisme *in vitro* des huit suspensions bactériennes sur *R. solani*

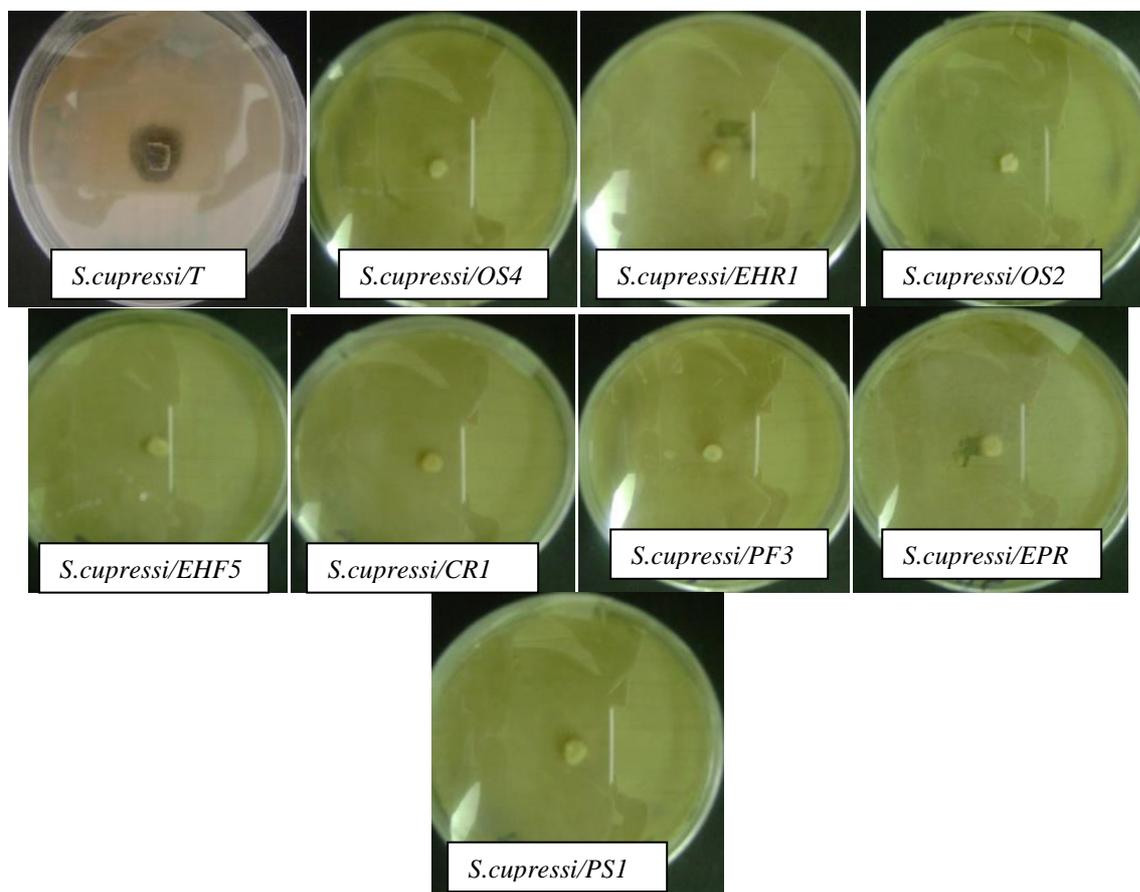


Figure 3.7 : Antagonisme *in vitro* des huit suspensions bactériennes sur *S. cupressi*

3.1.3. Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par *Alternaria alternata*

L'effet des traitements sur le développement du mycélium d'*Alternaria alternata* a été étudié et l'analyse statistique a montré l'existence d'une différence hautement significative ($P=0,000$) du facteur traitement (Tableau 1, Annexe 6). Ceci indique que la même variabilité de l'inhibition du diamètre mycélien est observée entre les différents disques mycéliens des champignons phytopathogènes traités par les différentes bactéries.

L'analyse de la variance a fait ressortir les moyennes du diamètre mycélien développé par *Alternaria alternata* sous différents traitements ; ces moyennes variaient entre 4,1 cm et 1 cm (Fig. 3.8).

- Le premier groupe comprend les disques traités par la suspension du *Bacillus* spp. PF3 et ceux traités par l'eau (témoins) et dont les moyennes

du diamètre mycélien développé se rapprochaient, ce qui indique que la suspension du *Bacillus* spp. PF3 n'a pas d'effet antagoniste sur *Alternaria alternata*.

- Le deuxième groupe est constitué par le reste des suspensions bactériennes à savoir *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus pumilus* OS2, *Bacillus subtilis* EHF5, *Bacillus* spp. CR1, *Pseudomonas* spp. EPR3 et *Pseudomonas* spp. PS1 ayant montré un effet antagoniste sur le pathogène vu que les moyennes des diamètres mycéliens ne dépassaient pas 1,6 cm.

3.1.4. Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium de *Fusarium solani*

L'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence hautement significative ($P=0,000$) du facteur traitement par les souches endophytes (Tableau 2, Annexe 8).

Les moyennes du diamètre mycélien du *F. solani* développé sous différents traitements variaient entre 1 cm et 2,75 cm alors que celle des boîtes témoins se rapprochait de 5,7 cm (Fig. 3.8)

- Les suspensions de *Bacillus subtilis* EHF5, *Bacillus pumilus* OS4 et *Bacillus cereus* EHR1 ont permis le développement d'amas mycéliens de diamètres variant entre 2,5 cm et 2,75 cm en terme de moyenne.
- Les disques traités par les suspensions de *Bacillus pumilus* OS2 et *Bacillus* spp. PF3 ont développé à leur tour des amas mycéliens dont les diamètres étaient de 2,13 cm, 1,7 cm respectivement, et on peut conclure que ce groupe chevauchait avec le premier
- Le troisième groupe est constitué par les suspensions de *Pseudomonas* spp. PS1, *Pseudomonas* spp. EPR3 et *Bacillus* spp. CR1 ayant montré un effet antagoniste sur le pathogène vu que les moyennes des diamètres mycéliens de 1 cm valaient le diamètre des disques utilisés dans les tests.

3.1.5. Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*

L'analyse de la variance a montré une différence hautement significative ($P < 0.05$) du facteur traitement et donc de l'interaction traitement x pathogène (Tableau 3, Annexe 8)

Selon cette analyse, *Gaeumannomyces graminis var. tritici* a développé un mycélium dont la taille moyenne qui variait entre 1 et 8,2 cm sous les différents traitements (Fig. 3.8)

- Les suspensions de *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus pumilus* OS2 et *Bacillus* spp. PF3 n'ont montré aucun effet antagoniste envers le pathogène, d'ailleurs ils ont induit à un développement mycélien équivalent et parfois même supérieur (cas de *Bacillus cereus* EHR1 et *Bacillus* spp. PF3) à celui des boîtes témoins.
- Les disques traités par EHF5 ont aussi permis une sporulation mycélienne mais se développant sur un diamètre réduit par rapport aux mycéliums cités dans le groupe ci-dessus.
- Le troisième groupe est constitué par les suspensions de *Pseudomonas* spp. PS1, *Pseudomonas* spp. EPR3 et *Bacillus* spp. CR1 ayant montré le plus de résultats en termes d'antagonisme, avec des diamètres mycéliens réduits variant entre 1 cm et 1,5 cm.

3.1.6. Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par *R. solani*

L'analyse de la variance a révélé encore l'existence d'une différence hautement significative du facteur traitement pour le développement du diamètre mycélien du pathogène (Tableau 4, Annexe 8).

- *Rhizoctonia solani* traité par *Bacillus cereus* EHR1 et *Bacillus* spp. CR1 ont développé des filaments mycéliens formant des disques ayant respectivement 1,9 cm et 1,8 cm de diamètre respectivement (Fig. 3.8)
- Le reste des suspensions ont montré un effet antagoniste envers le pathogène vu que le diamètre mycélien variait entre 1 cm et 1,4 cm (Fig. 3.8).

3.1.7. Analyse des résultats du test d'antagonisme : inhibition du mycélium développé par *S. cupressi*

L'analyse de la variance a révélé à son tour l'existence d'une différence hautement significative du facteur traitement pour le développement du diamètre mycélien du pathogène (Tableau 5, Annexe 8).

- Le développement de *S. cupressi* était nul dans les huit cas où on a utilisé des suspensions bactériennes et l'inhibition du développement mycélien était maximale (Fig. 3.8).

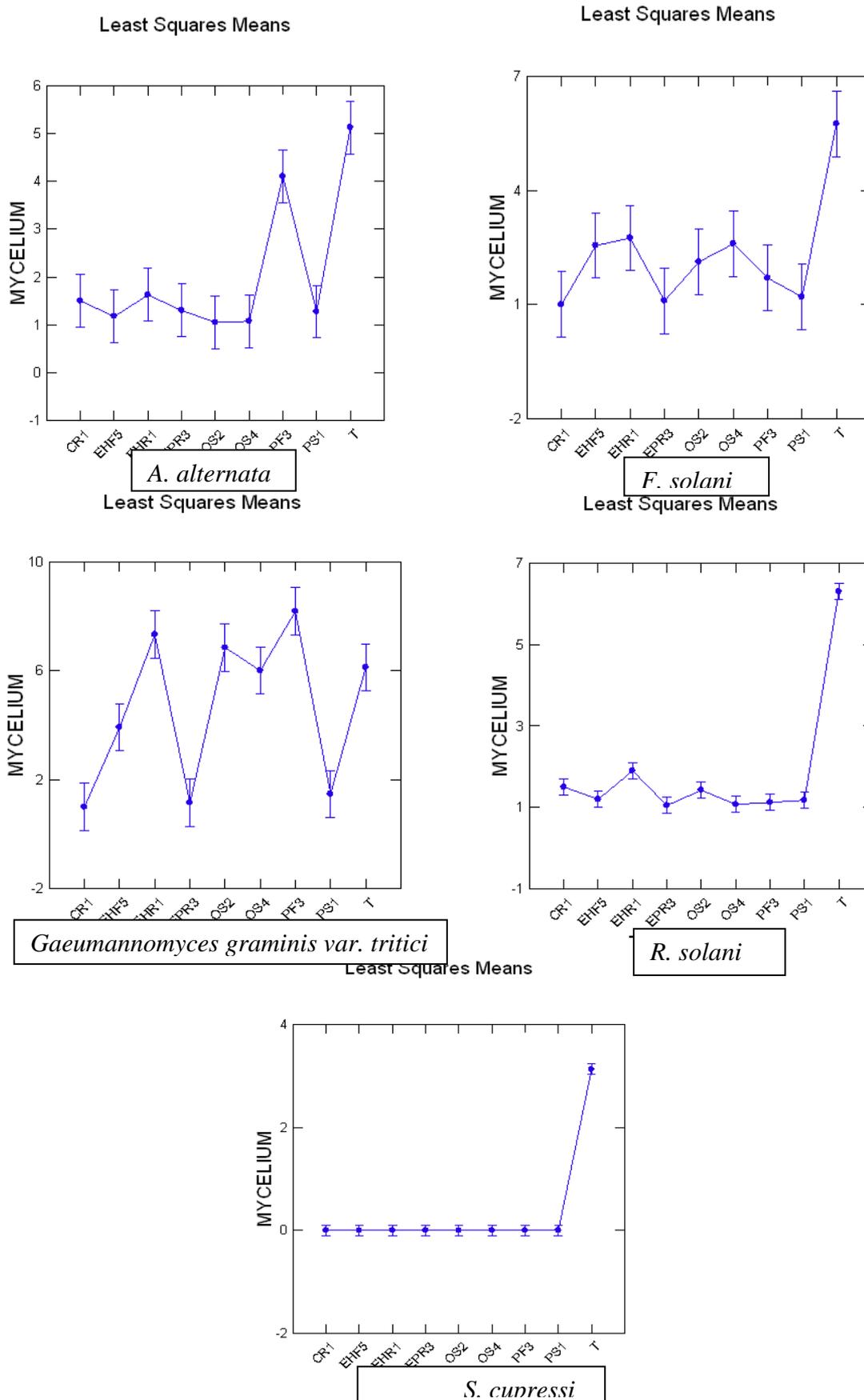


Figure 3.8 : Croissance mycélienne des cinq pathogènes sous les différents traitements

3.2. Résultats d'isolement de *P. infestans* et de l'essai de bioprotection de la pomme de terre contre *P. infestans* par utilisation des *Bacillus. spp* et *Pseudomonas. spp.*

3.2.1. Caractérisation morphologique et culturale des deux isolats obtenus de *P. infestans*

Les deux isolats sur milieu à base de petit pois se manifestent par des cultures denses avec un mycélium blanc abondant qui occupe souvent la presque totalité de la surface des boîtes de Pétri.

Le mycélium représente un aspect humide sous loupe binoculaire et des formes ressemblant à des gouttelettes d'eau font leur apparition (Fig. 3.9). La longueur de la plupart des sporanges est comprise entre 20-40 μm , tandis que leur largeur est de 10-15 μm (Fig. 3.9).

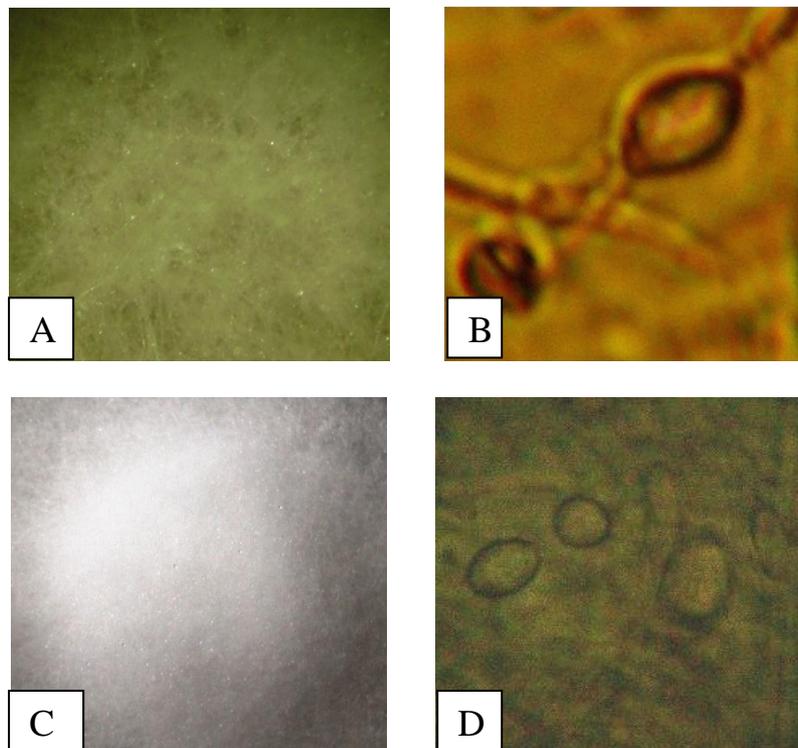


Figure 3.9 : Aspect macro et microscopique des deux isolats de *P. infestans*

A : Mycélium de l'isolat (1) sous loupe binoculaire

B : Sporangies de l'isolat (1) sous microscope (X100)

C : Mycélium de l'isolat (2) sous loupe binoculaire

D : Sporangie de l'isolat (2) sous microscope (X100)

- **Interprétation**

Les observations réalisées sur les caractères des sporanges, ont montré que ces derniers sont hyalins légèrement allongés, citriformes et à paroi mince. Sur 40 sporanges mesurés, la taille (longueur et diamètre) des deux isolats étudiés n'a pas montré de grandes différences (Annexe 3).

3.2.2. Etude de la fertilité des croisements *in-vitro*

Le résultat de la confrontation entre les deux isolats correspondait à des oospores issues de la reproduction sexuée (Fig.3.10), ce qui signifie bien évidemment que nos isolats sont de types sexuels différents.



Figure 3.10 : Observation microscopique d'oospore de *P. infestans* issue de la confrontation entre les deux isolats (X 100)

3.2.3. Comportement des folioles de pomme de terre traitées par les suspensions bactériennes à l'égard de *P. infestans*

En plus des feuilles des deux témoins positifs, les feuilles traitées par les suspensions bactériennes deux jours après avoir été inoculées par le pathogène ont à leur tour montré des symptômes similaires à ceux du mildiou de la pomme de terre. Les symptômes apparaissent sous forme de taches nécrotiques sur les feuilles avec apparition de sporulations (Fig. 3.11, Fig. 3.12).

Dans le reste des cas où les feuilles ont été traitées préventivement par les suspensions bactériennes de *Bacillus* spp. PF3 et de *Pseudomonas* spp. PS1, c'est-à-dire avant d'être inoculées par les isolats pathogènes, nous n'avons observé aucun symptôme typique au mildiou (Fig. 3.11, Fig. 3.12).

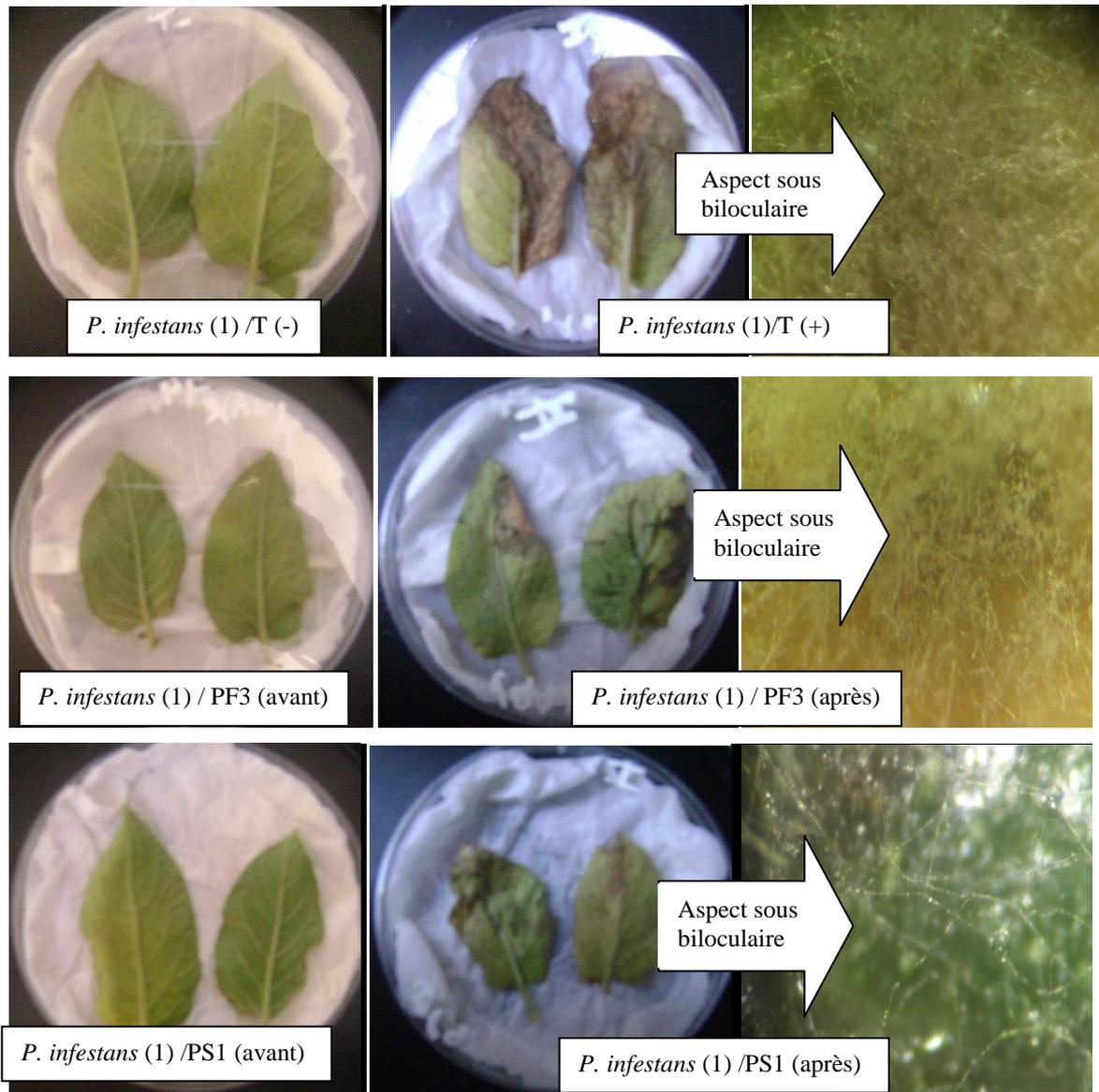


Figure 3.11 : Résultats des réactions des folioles de pommes de terre inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans* et traitement par les souches bactériennes endophytes.

- *P. infestans* (1) / T (-), *P. infestans* (1) / PF3 (avant) et *P. infestans* (1) / PS1 (avant): **Folioles d'apparence saine**
- *P. infestans* (1) / T (+), *P. infestans* (1) / PF3 (après) et *P. infestans* (1) / PS1 (après) : **Nécroses et sporulations apparentes**

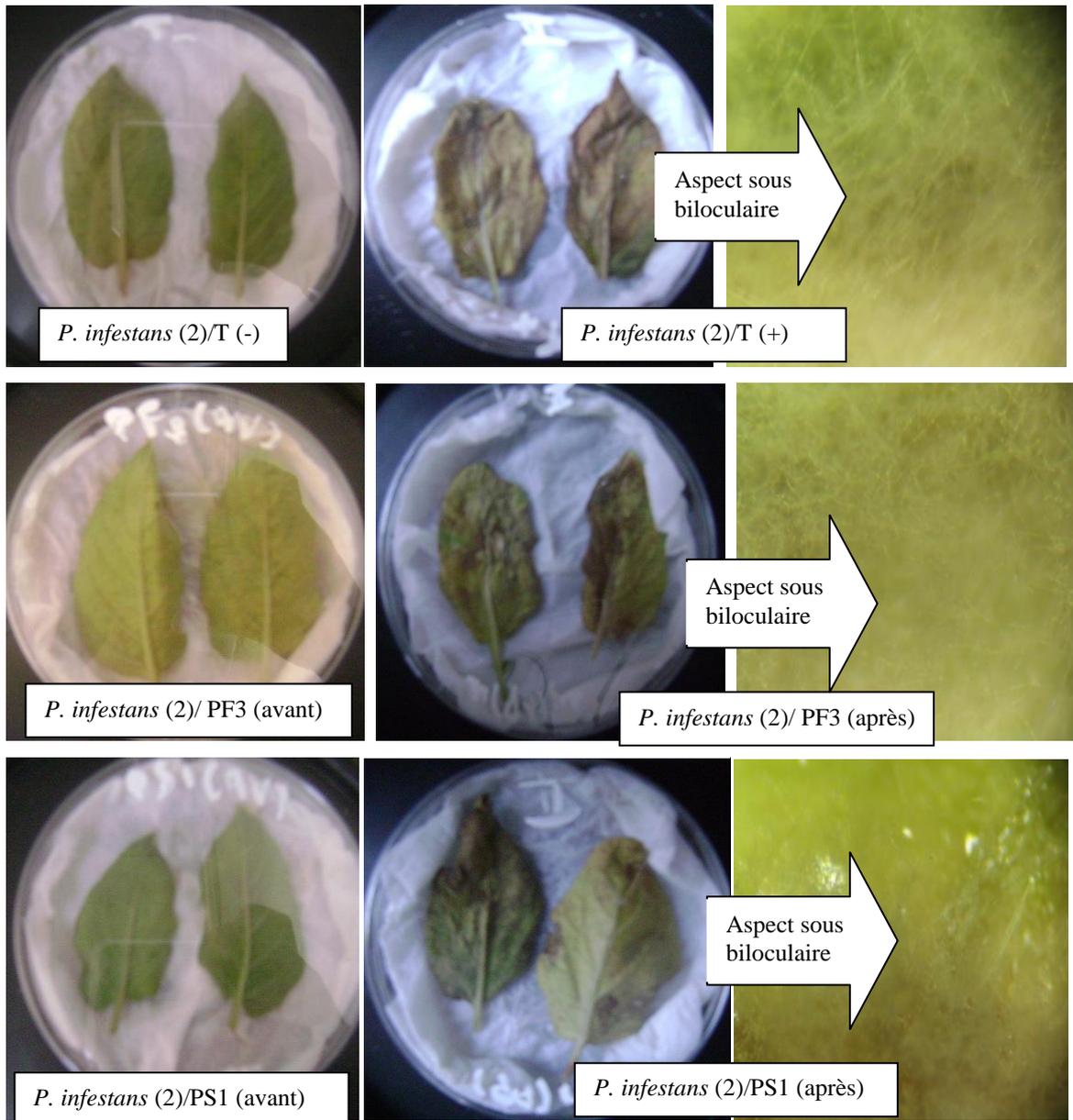


Figure 3.12 : Résultats des réactions des folioles de pommes de terre inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans* et traitement par les souches bactériennes endophytes.

- *P. infestans* (2) / T (-), *P. infestans* (2) / PF3 (**avant**) et *P. infestans* (2) / PS1 (**avant**): **Folioles d'apparence saine**
- *P. infestans* (2) / T (+), *P. infestans* (2) / PF3 (**après**) et *P. infestans* (2) / PS1 (**après**) : **Nécroses et sporulations apparentes**

En comparant les feuilles traitées par les différentes suspensions bactériennes PF3 et PS1, avant et après inoculation par les isolats pathogènes

avec celles du témoin positif, nous pouvons déduire que seules les folioles traitées après inoculation ont développé des nécroses visibles à l'œil nu. Les fructifications apparaissent sous la loupe binoculaire sont similaires à celles développées par les feuilles des témoins positifs, alors que les feuilles traitées préventivement par les bactéries avaient toujours un aspect sain similaire à celui des feuilles du témoin négatif (Fig.3.11 et Fig.3.12).

3.2.5. Développement des nécroses sur les folioles inoculées par les suspensions bactériennes

Le développement des lésions nécrotiques sur les feuilles, diffère d'un isolat à un autre et bien sûr d'un traitement à un autre (traitement préventif ou curatif) (Fig. 3.13 et Fig. 3.14).

En effet, les nécroses développées sur les feuilles inoculées par l'isolat (1) avant d'être traitées par *Bacillus. spp.* PF3 et par *Pseudomonas spp.* PS1 ont fait leur apparition au bout de deux à trois jours d'incubation et ont recouvert plus de 15% de la surface foliaire en huit jours après avoir montré des vitesses de croissance moyennes proches et qui étaient de l'ordre de 2,89 mm/j et 2,87 mm/j (Fig.3.15 et Fig.3.16). Cependant, chez le reste des folioles traitées par les deux bactéries avant d'être inoculées par le même isolat, ces vitesses sont nulles avec pratiquement aucun symptôme.

Pour l'isolat (2), des lésions sont apparues au bout de deux à trois jours après pour couvrir plus de 74% des surfaces des feuilles du témoin positif et 19% à 30,5% des surfaces foliaires traitées par PS1 et PF3 après inoculation (Fig.3.15 et Fig.3.16)

De façon générale, on a remarqué que les feuilles traitées curativement par les suspensions bactériennes, et notamment celles traitées avec *P. spp.* PS1 représentaient des lésions d'un diamètre et d'un pourcentage d'infection foliaire réduit par rapport aux feuilles des témoins positifs (Fig. 3.16).

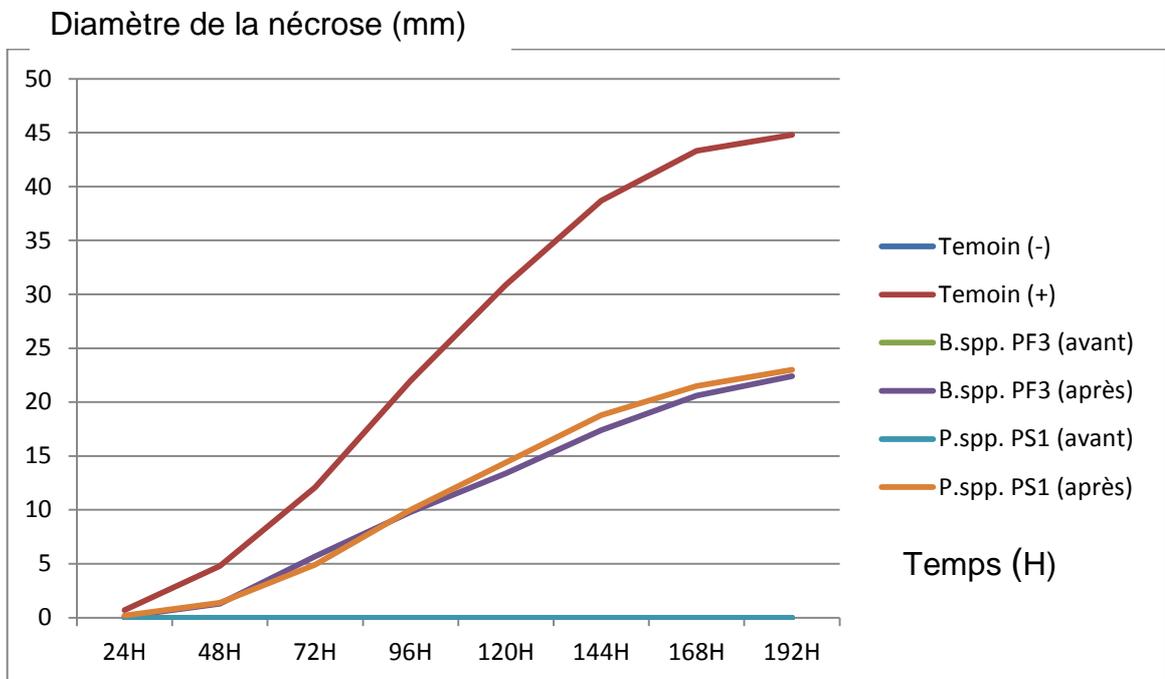


Figure 3.13 : Vitesse de développement des nécroses causées par l'isolat (1) de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes.

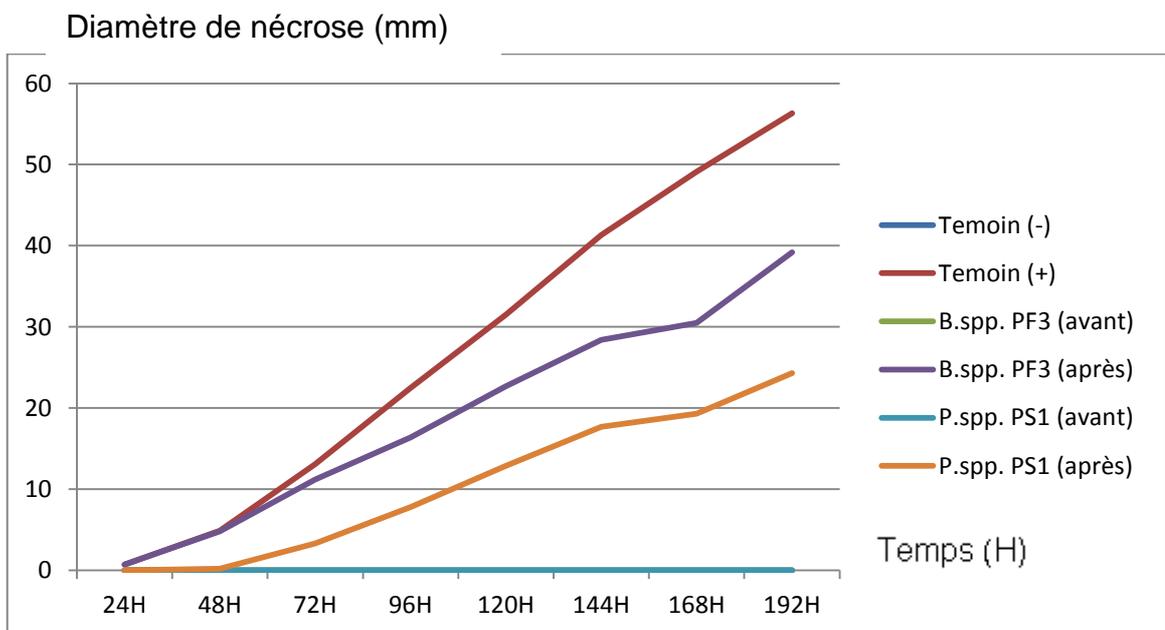


Figure 3.14 : Vitesse de développement des nécroses causées par l'isolat (2) de *P. infestans* lors du traitement par deux bactéries endophytes.

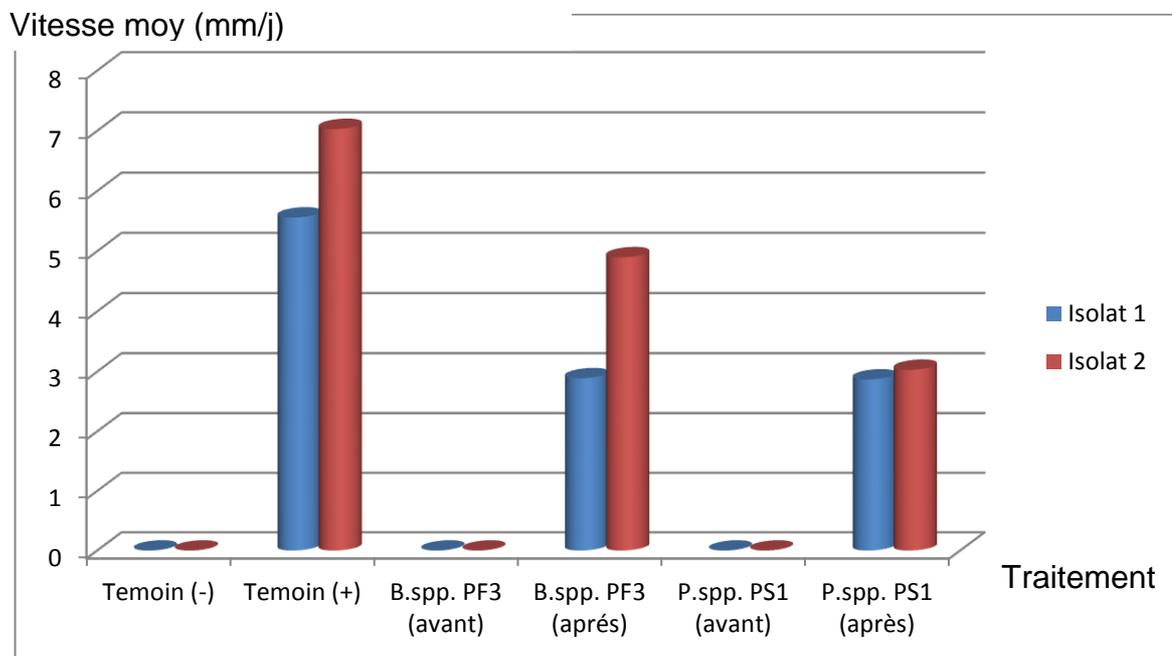


Figure 3.15 : Vitesses de croissance journalière des nécroses causées par les deux isolats de *P. infestans* lors du traitement par les deux bactéries endophytes.

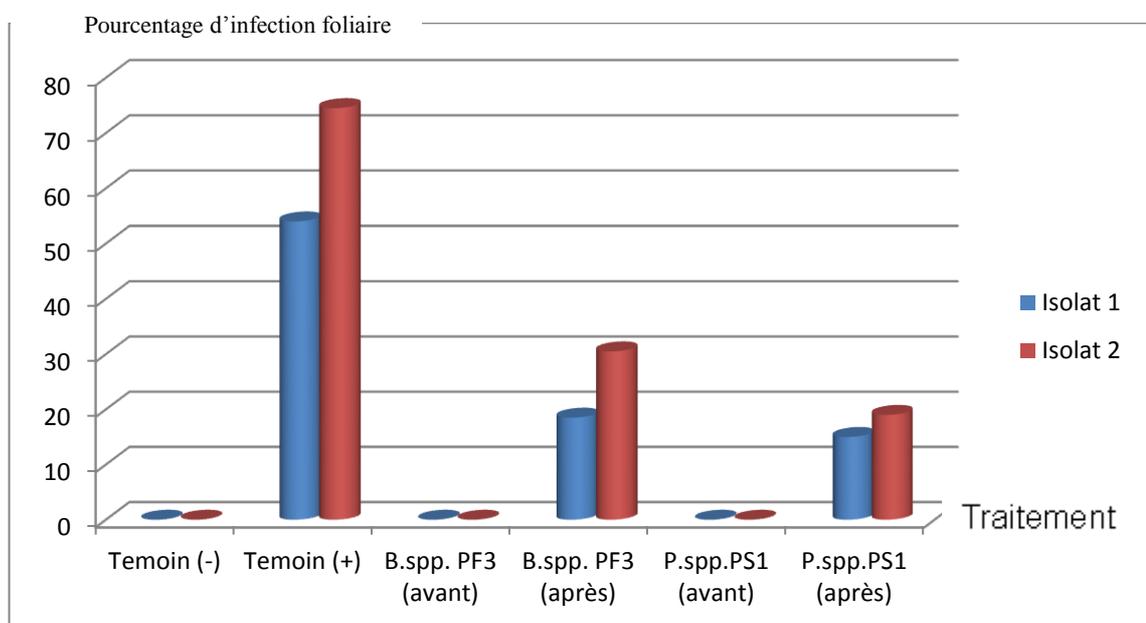


Figure 3.16 : Pourcentage des surfaces foliaires infectées par les deux isolats de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes.

3.2.7. Temps d'incubation et de latence

Comme autre critère de notation, la période d'incubation pour les deux isolats ayant induit des nécroses sur les feuilles infectées (feuilles du témoin positif et feuilles inoculées par *P. infestans* avant d'être traitées par *B. spp.* PF3 et *P. spp.* PS1) est de deux jours (Annexe 4). Les lésions provoquées sur ces

feuilles sont de diamètre variable dépassant même les 60 mm sur les feuilles témoins et 50 mm sur les feuilles traitées après 8 jours d'incubation. La période de latence est de 5 jours pour les deux isolats.

3.2.8. Taux de sporulation

Après avoir examiné les fructifications foliaires apparues sur les feuilles inoculées par *P. infestans* avant d'être traitées par *Bacillus spp.* PF3 et *Pseudomonas spp.* PS1 et celles des témoins positifs sous la loupe biloculaire, nous avons eu recours à la détermination de leur concentration en sporanges sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez ; et nous avons remarqué que les premières (feuilles traitées) ont montré un taux de sporulation réduit par rapport aux secondes (celles des témoins positifs) (Annexe 7 et Fig. 3.17).

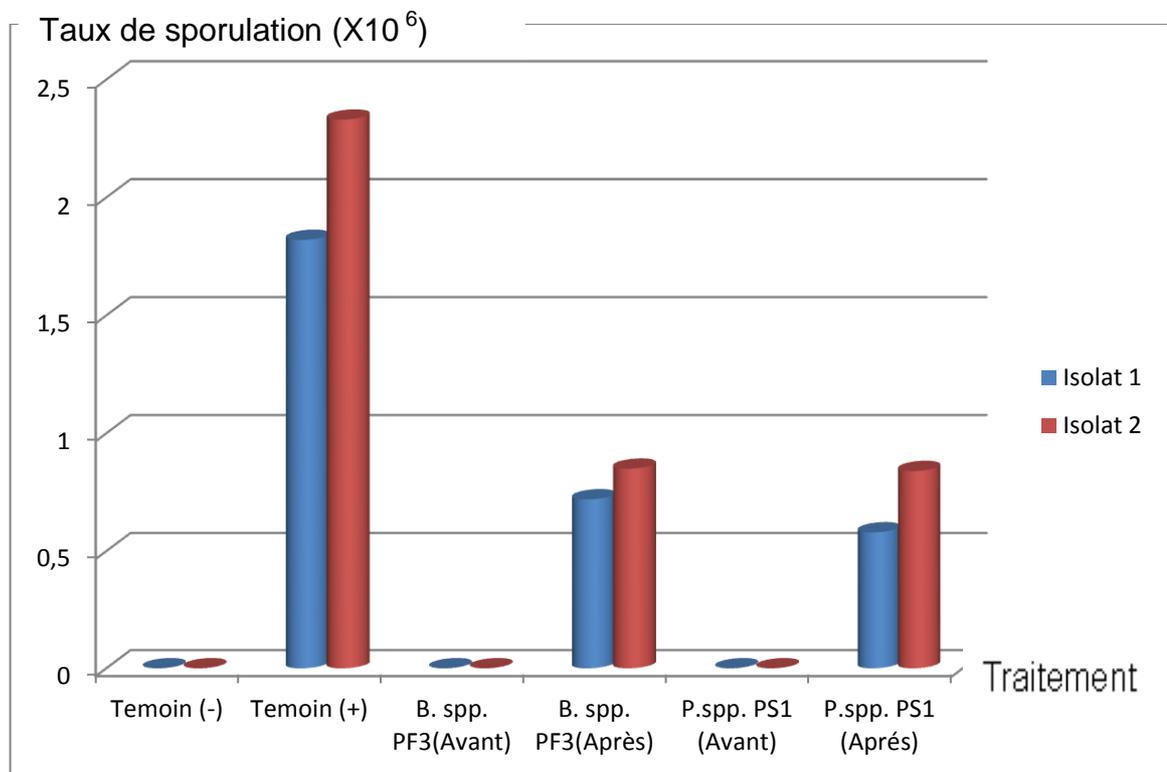


Figure 3.17 : Taux de sporulation sur les folioles inoculées par les deux isolats de *P. infestans* et traitement par les deux bactéries endophytes.

De façon générale, on peut dire que l'isolat (2) s'est montré plus sévère envers cette variété de pomme de terre puisque les paramètres étudiés

(diamètres nécroses et taux de sporulations) de cet isolat se sont manifestés par des valeurs plus importantes par rapport à l'isolat (1).

3.2.7. Analyse de la variance du diamètre des lésions induites par l'isolat (1) de *P. infestans* sur les folioles après traitement par les suspensions bactériennes

L'analyse de la variance montre une différence hautement significative ($P < 0,05$) pour le facteur traitement qui induit un effet significatif sur le niveau d'agressivité de l'isolat (Tableau 6, Annexe 8).

En plus des folioles des témoins positifs, des lésions sont enregistrées sur les folioles traitées après inoculation par *P. infestans*, cependant et après avoir estimé les moyennes des tailles des lésions, on a constaté que celles (moyennes) développées par ces folioles sont largement inférieures à celles développées par les folioles témoins (Fig. 3.18) ; on peut en déduire que les traitements tardifs ont réduit l'infection sans l'avoir complètement inhibée.

3.2.8. Analyse de la variance du diamètre des lésions de l'isolat (2) de *P. infestans* sur les folioles après traitement par les suspensions bactériennes

Comme l'isolat (1), l'analyse de la variance montre une différence hautement significative ($P < 0,05$) pour le facteur traitement (Tableau 7, Annexe 8).

Les dimensions des lésions les plus importantes sont enregistrées chez les folioles des témoins positifs suivi par celles des folioles traitées après inoculation de l'isolat (2) de *P. infestans* (Fig. 3. 18 et Annexe 5).

Le reste des folioles traitées préventivement par les deux suspensions bactériennes avant d'être inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans* n'ont pas développé de nécroses.

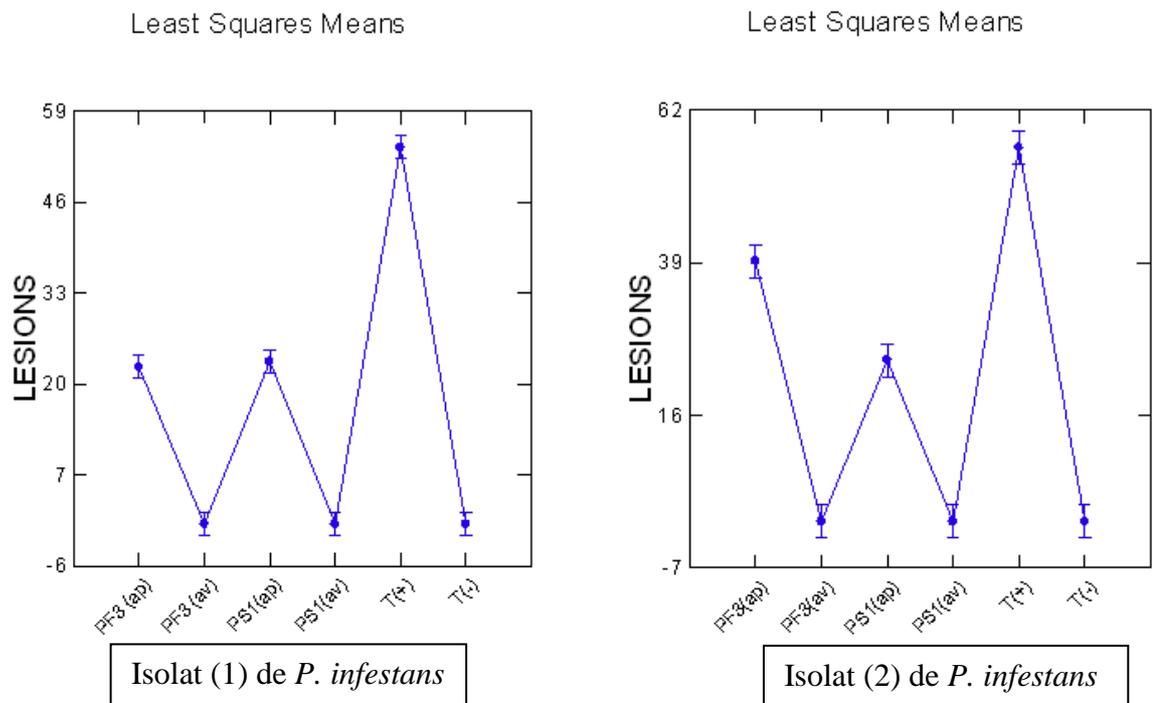


Figure 3.18 : Lésions nécrotiques causées par les isolats de *P. infestans* après traitements par les suspensions bactériennes

3.2.9. Analyse de la variance de l'intensité de sporulation pour l'isolat (1) de *P. infestans* sur les folioles après traitement par les suspensions bactériennes

L'étude de la variabilité de l'intensité de sporulation induite par l'isolat (1) en fonction des traitements utilisés a été effectuée et l'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence hautement significative ($P < 0,05$) du facteur traitement (Tableau 8, Annexe 8).

En termes de sporulation et mise à part les feuilles témoins, les feuilles traitées tardivement par les deux bactéries, semblent être les seules ayant montré des duvets blanchâtres (Fig. 3.11) ; mais après estimation des moyennes des taux de sporulation, on a constaté que celles (moyennes) développées par ces feuilles sont largement inférieures à celles développées par les feuilles témoins ; on peut en déduire que le traitement tardif a permis une réduction du taux de sporulation sans l'inhiber.

Le reste des feuilles traitées préventivement c.-à-d. avant d'être inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans* n'ont pas développé de sporulations spécifiques à *P. infestans* (Fig. 3.19).

3.2.10. Analyse de la variance de l'intensité de sporulation pour l'isolat (2) de *P. infestans* sur les folioles après traitement par les suspensions bactériennes

L'analyse de la variance montre une différence hautement significative ($P < 0,05$) pour le facteur traitement qui induit un effet significatif sur le niveau d'agressivité de l'isolat en terme de sporulation (Tableau 9, Annexe 8).

Les taux de sporulation les plus importants sont enregistrés chez les feuilles témoins positifs suivis par ceux des folioles traitées après inoculation de l'isolat (2) de *P. infestans* (Fig. 3. 19 et Annexe 7).

Le reste des folioles traitées par les deux suspensions bactériennes avant d'être inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans* n'ont pas développé de fructifications mycéliennes.

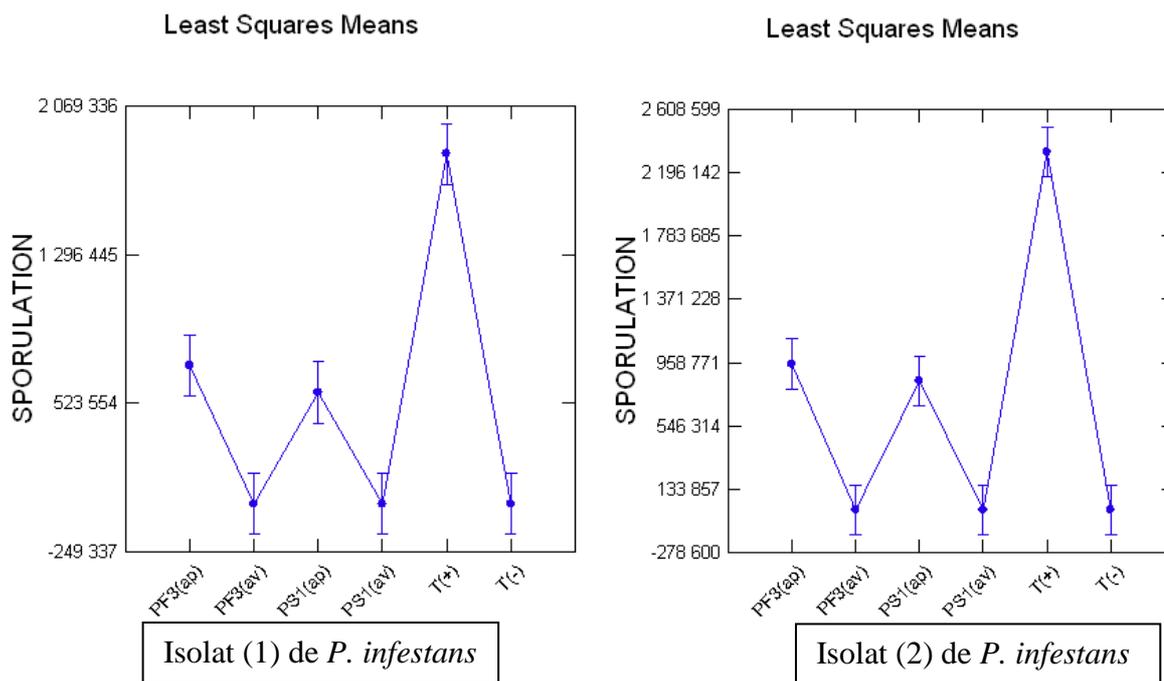


Figure 3.19 : Intensité de sporulation causée par les isolats de *P. infestans* après traitements par les suspensions bactériennes à différents stades

3.2.11. Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (1) de *P. infestans*

Le test de corrélation entre le taux de la sporulation et le diamètre des nécroses induites par l'isolat (1) de *P. infestans* a montré l'existence d'une bonne corrélation ($R^2 = 0,932$) entre ces deux paramètres (Tableau 10, Annexe 8). Ces résultats montrent que plus le diamètre des lésions s'agrandit, plus le taux de sporulation devient important (Fig. 3. 20). Par conséquent, le taux de sporulation constitue une fonction croissante en fonction du diamètre des lésions.

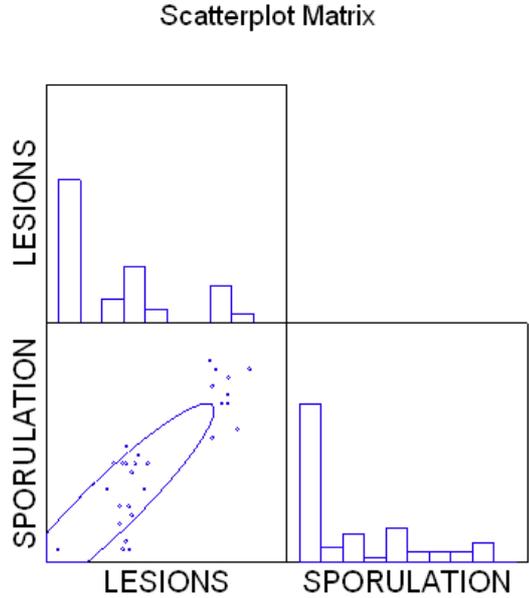


Figure 3.20 : Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (1) de *P. infestans*

3.2.12. Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (2) de *P. infestans*

Des matrices de corrélation entre les différents paramètres ont été réalisées et le Tableau11 (Annexe 8) présente les différents coefficients de corrélation entre les paramètres utilisés dans cette étude pour caractériser l'isolat (2), à savoir entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses.

Par ailleurs, -et après avoir consulté la table de Pearson- une bonne corrélation ($R^2 = 0,917$) entre les deux paramètres a été mise en évidence dans la présente étude (Tableau 11, Annexe 8).

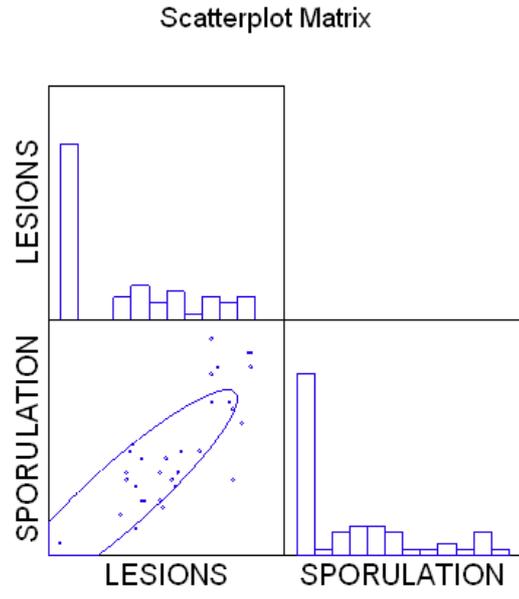


Figure 3. 21 : Corrélation entre le taux la sporulation et le diamètre des nécroses provoqués par l'isolat (2) de *P. infestans*

DISCUSSION GENERALE

Le principal objectif de ce travail était de déterminer les réactions et le comportement de six organismes phytopathogènes en présence de huit souches de bactéries endophytes et donc d'étudier l'antagonisme *in vitro* et *in planta* de ces bactéries à l'égard de quatre organismes phytopathogènes connus pour leurs dégâts causés sur la culture de la pomme de terre à l'échelle mondiale à savoir, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* et deux isolats de *P. infestans* présentant des profils pathologiques différents ainsi que *Gaeumannomyces graminis var. tritici* l'agent responsable du piétin échaudage et *Seiridium cupressi* agent de dépérissement d'arbres forestiers.

L'évaluation de l'antagonisme *in vitro* et *in planta* des bactéries endophytes a révélé l'existence de variations de comportement des six organismes phytopathogènes précédemment cités.

Sur la base de nos résultats, nous avons noté la variabilité de l'action de la même souche bactérienne à l'égard des isolats fongiques (c'est ce qui a été observé pour *Bacillus amyloliquefaciens* OS4 de *Bacillus cereus* EHR1 et de *Bacillus* spp.PF3). Cette différence réside dans la nature des isolats fongiques et le mode d'action développé par les souches bactériennes qui crée une certaine spécificité dans l'interaction bactérie antagoniste- organisme phytopathogène.

D'abord, l'étude de l'antagonisme *in vitro* des huit souches bactériennes a montré que les mycéliums des cinq champignons (*A. alternata*, *F. solani*, *R. solani*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici* et *S. cupressi*) présentaient des niveaux variables de croissance. Les analyses de la variance des diamètres mycéliens développés par les cinq agents phytopathogènes en interaction avec les bactéries endophytes testées a montré l'existence d'une différence hautement significative ($P < 0,05$) du facteur traitement.

En termes de croissance, les mycéliums des cinq champignons ont montré des comportements différents, d'ailleurs, le cas d'*Alternaria alternata* traité par la suspension de *Bacillus* spp. PF3 et celui du *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* traité par *Bacillus subtilis* EHF5 où on constate une faible activité antagoniste. Dans le cas du mycélium de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* traité par *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus pumilus* OS2 et *Bacillus* spp. PF3 nous avons noté une croissance mycélienne avec même un diamètre supérieur à celui du témoin ; ceci peut être expliqué par l'abondance de composés servant à la croissance mycélienne (carbone, azote, soufre, phosphore...) et issus d'une autre source mise que le milieu de culture, il s'agit bien des composés présents dans les métabolites les suspensions bactériennes. La croissance mycélienne est donc favorisée par la présence de composés synthétisés par les souches de *Bacillus* spp et assimilables par le champignon tel que la Proline source de carbone, la Purine, glutamate et la glutamine source d'azote [129, 130, 131, 132]

En outre, Lopez Gladko, (2008) [133] a indiqué que la majorité des composés inhibiteurs de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produits par les bactéries endophytes sont de nature volatile, c'est ce qui explique la faible sensibilité de ce champignon enregistrée par le test utilisé dans l'analyse de l'antagonisme *in vitro*, notamment envers *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, *Bacillus cereus* EHR1, *Bacillus pumilus* OS2, *Bacillus subtilis* EHF5 et *Bacillus* spp. PF3.

Gaeumannomyces graminis var. *tritici* a été influencé et inhibé par les deux suspensions bactériennes de *Pseudomonas* ; comme démontré par Thomashow et Weller, (1988) [134] qui indiquent que *Pseudomonas fluorescens* 2-79 est à l'origine de la phenazine-l-carboxylate qui atténue la croissance de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. D'autre part, Bonsall et al., (1997) [135] ainsi que Kwak et al, (2012) [136] ont détecté un autre composé antimicrobien produit par *Pseudomonas* dans les racines de blé et intervenant dans la suppression du piétin-échaudage, causée par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, il s'agit du 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG).

Dans le reste des cas, les différentes suspensions bactériennes ont montré une activité antimicrobienne plus ou moins grande, marquée par

Seiridium cupressi qui s'est montré le plus sensible envers les huit suspensions bactériennes vu que le développement de son mycélium était nul.

Des différences ont été détectées entre les mycéliums traités par les espèces de *Bacillus* et ceux traités par *Pseudomonas*, de sorte que les premiers se sont en général mieux développés par rapport aux seconds, ceci peut être expliqué par le fait que les *Pseudomonas* produisent plus de composés inhibiteurs du développement mycélien par rapport aux *Bacillus*. Ces derniers résultats ont été notamment observés aussi par Mitoi et al., (2012) [111], lorsqu'ils ont effectué une comparaison entre l'effet antagoniste de *Pseudomonas aeruginosa* et celui de *Bacillus licheniformis* antagonistes d'*Alternaria alternata* et de *Fusarium oxysporum*.

Rhizoctonia solani, *Seiridium cupressi* et *Fusarium solani* sont les trois champignons qui se sont montrés sensibles envers toutes les bactéries utilisées.

Nos résultats corrélerent avec ceux de Silva et al., (2004) [128], et ceux de Van Loon, (2007) [117] qui affirment que *Bacillus pumilus* SE34 et *Bacillus cereus* associés au chlorothalonil induisent respectivement un effet antagoniste sur *F. oxysporum* f. sp. *pisii* et *Alternaria solani*. D'une manière générale, les souches de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*, limitent le développement du mycélium d'*Alternaria alternata* et de *Fusarium oxysporum* [137, 138, 111]

Il a été démontré que la bactérie *Bacillus pumilus* SE34 réduit aussi l'incidence de *Rhizoctonia solani* en plein champ et intervient dans la formation de barrières cytochimiques responsable de la réduction ou dans la suppression de la sévérité de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* [139, 140].

Selon Manjula et Podile, (2001) [141] ainsi que Sid Ahmed et al., (2003) [142], *Bacillus* associé à la chitine (0,5 %) aurait plus d'effet sur *Rhizoctonia solani* et *Fusarium udum*.

Schuhegger et al., (2006) [143] ; Srivastava et Shalini, (2008) [144] ainsi que Ramyasmruthi et al ., (2012) [124] Confirment que les *Pseudomonas* fluorescents (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*) ainsi que *Bacillus spp.*

agissent comme antagonistes sur *Rhizoctonia solani*, sur *Phytophthora nicotianae*, sur *Pythium* sp. sur *Fusarium* sp, et sur *Alternaria alternata* ainsi qu'une large gamme de champignons phytopathogènes de la pomme de terre grâce à la production de pigments fluorescents, en sidérophores, en composés volatils tels que l'acide cyanhydrique (HCN), aux antibiotiques et aux enzymes lytiques (chitinase, β -1,3-glucanase, protéase, cellulase et lipase). L'enzyme glucosidase qui hydrolyse les isoflavones glucoside a aussi été extraite de *Pseudomonas* spp. endophytes [145]

La bibliographie rapporte aussi que la chitinase extracellulaire ainsi que la laminarinase synthétisées par l'endophyte *Pseudomonas stutzeri*, interviennent dans la lyse du mycélium de *F. solani*. Certaines souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* secrètent des chitinases extracellulaires qui inhibent le pathogène à différents stades et principalement lors de la germination des conidies et du développement des hyphes [146, 147].

Des composés antifongiques ont été isolés à maintes reprises à partir de *Bacillus* et de *Pseudomonas* endophytes, c'est le cas de la surfactants produite par *Bacillus subtilis*, de bacillomycin D secrété de *Bacillus amyloliquefacines* FZB42, de la Phenazine et de la punilacidin extraite de *Bacillus pumilus* MAIIM4A et agissant sur un grand nombre de champignons telluriques et principalement sur les espèces du genre *Fusarium* et *Rhizoctonia solani* [148]

La Phenazine citée ci-dessus, peut aussi être extraite de *Pseudomonas fluorescens* Pf4 qui semble aussi avoir un effet antagoniste sur *Fusarium solani*, sur *Alternaria alternata* et sur *Rhizoctonia solani* grâce aux peroxidases, aux polyphenol oxidase, aux phenylalanine ammonia lyase, au 1, 3- glucanase, aux HCN et à l'acide salicylique [149]

Ownley et Windham (2004) [150] ainsi que Lemanceau et al., (2009) [106] expliquent cet antagonisme par la production de Pyoverdine et de Pseudobactine, un siderophore qui prive les espèces du genre *Fusarium* des ions ferriques ; cependant il ne faut pas oublier que la disponibilité en nutriments tels que le CO_2 , le fructose, le mannitol, le glucose, l' NH_4Mo_2 et le glycérol influencerait la production en sidérophores et en acide salicylique précurseur [151].

Bacillus subtilis et *Bacillus amyloliquefaciens* produisent des composés volatiles comme le 3-hydroxy-2-butanone (acétoin) et le 2, 3-butanediol, qui semblent avoir un effet antagoniste sur beaucoup de pathogènes et dont la voie de signalisation dépend de l'éthylène [118].

Dans la seconde partie relative à l'isolement de *P. infestans*, nous avons remarqué que les cultures ont développé un mycélium dense et abondant qui occupe souvent la presque totalité de la surface des boîtes de Pétri et les dimensions des sporanges citriformes corrélaient avec celles décrites par Cacères et al., (2008) [51] et Thurston et Shultz, (1981) [152] qui indiquent que les dimensions sont de 21-38 µm x 10-23µm.

Le test de compatibilité sexuelle *in vitro* à l'origine de la formation d'oospores a révélé la coexistence des deux types sexuels A1 et A2 au sein des populations de *P. infestans* dans les zones où les échantillons ont été prélevés. Ces résultats complètent et concordent avec ceux obtenus sur des isolats issus de plants de pomme de terre collectés dans les régions Ouest et centre du pays : Ain Defla, Mostaganem, Oran, Tiaret, Chlef, Tlemcen, Sidi Bel Abbès, Ain Temouchent, Alger, Boumerdes, Tipaza et Khemis Meliana [153]

En effet, sachant que *P. infestans* est une espèce hétérothallique, l'isolement de souches autofertiles (2 isolats) était une première indication de la présence de souches sexuellement compatibles dans la région nord centre du pays.

Cependant, la présence de la souche A2 ne peut être considérée comme importante que si sa fréquence dépasse 10 % des isolats collectés [154]. Selon Corbière (2010) [153], le "mating type" A1 est largement plus abondant en Algérie que le mating type A2 du fait que les premiers se développent mieux et plus rapidement que les seconds sous les températures ambiantes qui caractérisent le pays notamment les régions connues pour leur production de la pomme de terre, alors que le type sexuel A2 est le plus répandu dans certains pays tels que la Corée de Sud et certaines régions du Canada [155, 156]. En France, sa détection a été rapportée uniquement sur la tomate [157].

La production d'oospores nécessitant la présence des deux types sexuels est variable *in vivo* selon l'organe ou l'hôte infecté alors que le taux de ces organes de reproduction produits *in vitro* dépendait du milieu de culture [48]. Selon Swiezynski et *al.*, (2001) *in* Hammi (2003) [37], il y aurait des pommes de terre ayant un feuillage sensible et des tubercules résistants. Ces cas sont très rares, puisque la majorité des pommes de terre disposent souvent d'un feuillage résistant et de tubercules sensibles, alors que certaines études ont montré que même s'il y a une corrélation entre la résistance du feuillage et celle des tubercules, elle est relativement faible [37]

L'utilisation massive de semences de pomme de terre d'origines et de variétés différentes pendant les dernières années pourraient expliquer la présence des deux types. En effet et selon Hammi (2003) [37], d'autres facteurs peuvent être à l'origine de la présence de populations du type sexuel A2 tels que sa virulence vis à vis des variétés cultivées, sa résistance aux fongicides habituellement utilisés et son pouvoir d'adaptation au milieu.

Les tests d'antagonisme *in situ* des deux souches bactériennes envers les deux isolats de *P. infestans* à différents profils pathologiques ont révélé l'existence d'une différence hautement significative du facteur traitement lors de l'évaluation des diamètres des nécroses développés par les deux isolats ainsi que le taux de sporulation induite.

Contrairement aux folioles traitées préventivement, celles inoculées par *P. infestans* avant d'être traitées par l'une des deux bactéries ont développé des symptômes caractéristiques du mildiou de la pomme de terre, à savoir des nécroses suivies par l'apparition de sporulation (duvet blanchâtre). Mais il est clair aussi que l'importance de la suppression du mildiou de la pomme de terre par ces bactéries dépend du cultivar utilisé [158].

A cet effet, il sera donc à conclure que les bactéries endophytes utilisées dans la lutte contre *P. infestans* agissent préventivement et ne peuvent avoir un effet curatif. D'ailleurs Kloepper et *al.*, (2004) [159] ainsi que Baker et *al.*, (2007) [160] affirment que *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, et

Pseudomonas aeruginosa, - et comme beaucoup de bactéries endophytes -, agissent envers plusieurs agents pathogènes et principalement les Oomycètes en induisant des ISR. Cette dernière réaction s'est manifestée par utilisation de *Bacillus pumilus* SE34 et de *Pseudomonas fluorescens* 891361 et a permis de diminuer la sévérité du mildiou de la pomme de terre causé par *P. infestans* et inhiber la germination des sporanges et des zoospores. La synthèse du BABA (l'acide DL- 3- amino-n-butyrique) et l'induction de la SAR et des ISR dépendent uniquement de l'AJ et de l'ET qui traduisent l'efficacité des bactéries citées précédemment [161, 162].

Ongena et al., (2004) [112], rapportent que les plantes de pomme de terre traitées par *Pseudomonas putida* BTP1 se manifestaient par des ISR et présentaient une hausse dans la concentration en acide linoléique et en acide linoléique associés à la synthèse de la lipoxigénase ou de l'hydroperoxyde lyase qui rentrent dans la voie de la synthèse de l'oxylipine. Par ailleurs, selon Cohen et al., (1991) [163], des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* peuvent synthétiser de l'acide arachidonique, oléique et éicosapentaénoïque qui semblent intervenir dans l'ISR contre *P. infestans*. Un autre composé en l'occurrence la massetolide A est un lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* SS101 actif sur la tomate contre *P. infestans* [164].

Les souches bactériennes *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 ainsi que *Pseudomonas fluorescens* SE34 élicitent aussi l'ISR envers le mildiou de la pomme de terre [160]. Mais la question qui se pose est : es qu' il serai juste de dire que l'ISR est impliquée dans nos tests *in vitro* vu que nous avons utilisé des feuilles détachées et non des plantules entières et vivantes qui peuvent synthétiser les phytohormones induites dans l'ISR (à savoir AJ, ET....)

Il est donc plus évident et plus logique de parler de métabolites secondaires libérés par ce genre de bactéries endophytes que d'aborder le sujet de l'ISR. L'antagonisme induit par *Pseudomonas fluorescens* par exemple revient au fait que ces bactéries abritent les GacS / GacA, un système de régulation à deux composants et dans lequel GacS, qui est le capteur kinase, reconnaît les signaux environnementaux et GacA, qui est régulateur transcriptionnel, active la production de métabolites secondaires et des enzymes extracellulaires [165].

Il est recommandé de combiner l'application de ces bactéries à certains produits pour avoir un résultat, c'est le cas de *Bacillus pumilus* et de *Bacillus cereus* qui, combinés respectivement au chlorothalonil et au chitosane réduisent l'incidence du mildiou de la pomme de terre [128, 117]. Dans ce même ordre d'idées, l'association *Bacillus* à la chitine (0,5 %) a donné des effets positifs sur *P. infestans* [142].

Cependant, il est à noter aussi que l'application de bactéries endophytes sur les feuilles inoculées en premier par *P. infestans* avait montré un résultat, même si on a remarqué que des symptômes du mildiou de la pomme de terre étaient toujours présents et que la suppression de cette maladie n'était pas totale. Nos résultats ont prouvé, et d'après le test d'antagonisme que les feuilles traitées par les bactéries endophytes après inoculation par l'un des isolats de *P. infestans* ont montré des symptômes moins sévères par rapport à ceux développés par les feuilles des témoins positifs ; d'ailleurs, nous avons noté et après comparaison entre les feuilles des deux groupes (catégories) que le pourcentage des surfaces infectées ainsi que le taux de sporulation sur les dernières étaient les plus marquants.

L'explication est que les bactéries avec lesquelles nous avons traité les feuilles inoculées sont aussi intervenues dans l'antagonisme mais n'ont pas réussi à inhiber complètement le pathogène qui a dû se propager rapidement et représenter une cinétique de développements plus grande que celle du traitement (bactéries) puisqu'il était inoculé en premier dans les tissus foliaires.

Mais, il ne faut pas oublier que les conditions de plein champ peuvent fortement agir sur les résultats ; à ce sujet Falkho et *al.*, (1988) [166] ont remarqué la neutralité de *Bacillus subtilis* inoculés aux plantes, *in vitro* et sous des conditions contrôlées (température, intensité lumineuse et humidité constantes) ; tandis que ces traitements induisaient de la résistance sur plantes cultivées sous serres ou en plein champ et sous des conditions environnementales instables.

Il serait donc intéressant de continuer le travail en déterminant et en identifiant par exemple les molécules responsables de l'antagonisme ou même en évaluant l'effet des bactéries endophytes testées dans cette étude sur d'autres agents phytopathogènes.

CONCLUSION

La bioprotection semble être un substituant de la lutte chimique, d'ailleurs l'Agence de Protection Environnementale (EPA) encourage l'usage des biopesticides en considérant qu'ils représentent moins de risques que les pesticides conventionnels.

Notre étude a porté et après isolement et identification des isolats de *P. infestans* (détermination "mating-type"); sur les volets suivants: les tests d'antagonisme *in vitro* et *in planta* des huit souches bactériennes endophytes à l'égard de sept agents fongiques à savoir *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Seiridium cupressi* et cinq agents fongiques affectant la pomme de terre (*Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* et deux isolats de *Phytophthora infestans*).

Les tests d'antagonisme *in vitro* ont montré une variabilité dans les réactions d'*Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Seiridium cupressi* envers les huit souches du genre *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp endophytes. Cependant et de façon générale, la majeure partie des souches bactériennes a montré un antagonisme positif envers les divers pathogènes. L'inhibition mycélienne est variable et les diamètres mycéliens sont de 10 à 90 mm. Dans le cas d'*A. alternata* traité *in vitro* par *Bacillus* spp. PF3, une absence d'inhibition de la croissance mycélienne a été notée.

L'intérêt des tests d'antagonisme contre *P. infestans* sur folioles détachées revient au fait que le mycélium de ce pathogène nécessite un milieu spécifique pour pouvoir se développer et ne peut croître sur le même milieu utilisé pour les bactéries endophytes *Bacillus* spp et *Pseudomonas* spp.

Avant de procéder aux tests *in vitro*, nous avons eu recours à des tests de confrontation entre les deux souches de *P. infestans* isolées pour pouvoir déterminer si elles sont ou non d'un même "mating-type". Des oospores se sont formées, nous avons par conséquent conclu qu'il s'agit bien de deux types différents, et que l'une des souches (celle qui appartient au type A2) est plus agressive que l'autre.

Les tests d'antagonisme *in vitro* des endophytes testés à l'égard de l'isolat (1) de *P. infestans* ont montré que seules les feuilles traitées tardivement par les bactéries endophytes ont développé des symptômes caractéristiques du mildiou de la pomme de terre. Cependant, ces souches bactériennes ont eu un effet inhibiteur sur l'agent du mildiou dans le cas où elles ont été appliquées préventivement. Le diamètre des nécroses corrélait avec le taux de sporulation. .

Pour ce qui est du deuxième isolat de *P. infestans*, les tests d'antagonisme ont confirmé encore une fois l'efficacité des bactéries endophytes utilisées notamment dans le cas où elles ont été utilisées préventivement. L'analyse statistique fiabilise les résultats et prouve une bonne corrélation entre les paramètres ; diamètre des nécroses et taux de sporulation.

Les résultats révèlent que la taille des nécroses ainsi que le taux de sporulation sur les folioles traitées après inoculation de *P. infestans* étaient relativement faibles par rapport à celles des feuilles témoins, il est donc possible que les deux bactéries endophytes ont eu une action sur la réduction de la sévérité des symptômes mais pas à la suppression de la maladie.

L'utilisation des bactéries endophytes en bioprotection, notamment comme traitements préventifs semble donc être très prometteuse, d'ailleurs, des produits à base de ce genre de microorganismes sont utilisés avec succès, c'est le cas de BioYield™, de Kodiak et de BlightBan contenant *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, *Bacillus subtilis* Gb03 et *P. fluorescens* A506 [167].

Ainsi, les agents pathogènes testés et essentiellement ceux à l'origine du mildiou de la pomme de terre ; restent encore des problèmes phytosanitaires très redoutables notamment sur la culture de la pomme de terre en Algérie. Par

ailleurs, la nécessité de développer de nouvelles alternatives à la lutte chimique comme par exemple l'utilisation des biopesticides constituant l'un des moyens respectueux à l'environnement et à la santé humaine devient une pratique indispensable à prendre en considération. Cette pratique permet d'éviter d'éventuelles apparitions et émergences de nouvelles souches fongiques issues par exemple de la reproduction sexuée comme le cas de *P. infestans* et comme cela a été constaté en 2007, suite à l'apparition de souches résistantes aux fongicides appliqués.

En effet, l'existence en Algérie des deux types A1 et A2 de *P. infestans* montrée par des études et des travaux [153], pourrait conduire à l'apparition d'isolats plus agressifs avec une diversité génétique plus importante que les populations issues de la reproduction asexuée. Nous suggérons par conséquent d'étudier pour les travaux futurs, l'effet des bactéries endophytes testées aux cours de cette étude sur les génotypes de *P. infestans* qui se sont révélés résistants.

Reste que le choix ou la sélection d'un microorganisme susceptible à être utile dans la lutte biologique nécessite des évaluations de risque et des études épidémiologiques et génétiques pendant de longues périodes en prenant en considération tout le pathosystème plante-pathogène en interaction avec les facteurs du milieu.

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux de culture

- **LPGA :**

8 g Extrait de levure

8 g Bacto peptone

Glucose

17 g Agar

Eau distillée 1000ml

PH 7,2 à 7,8 , autoclavage 20 minutes à 120°C.

- **PDA (Potato Dextrose Agar)** (Jonsthor et Booth , 1983):

300 g Pomme de terre

15 g Agar

20 g Glucose

5 g Carbonate de calcium (Ca CO₃)

Eau distillée 1000ml

PH= 7, autoclavage 20minutes à 120°C.

Annexe 2: Croissance mycélienne exprimée en diamètre (cm)

Pathogène	Traitement	Répétition	Diamètre du mycélium (cm)
<i>Alternaria alternata</i>	Témoin	R1	5,5
		R2	5
		R3	4
		R4	6
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	R1	1,2
		R2	1,1
		R3	1
		R4	1
	<i>Bacillus cereus</i> EHR1	R1	1,7
		R2	1,8
		R3	1,5
		R4	1,5
	<i>Bacillus pumilus</i> OS2	R1	1
		R2	1
		R3	1,2
		R4	1
	<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	R1	1
		R2	1,1
		R3	1,3
		R4	1,3
	<i>Bacillus</i> spp. CR1	R1	1,6
		R2	1,5
		R3	1,4
		R4	1,5
	<i>Bacillus</i> spp. PF3	R1	6
		R2	3
		R3	4
		R4	3,4
	<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	R1	1,4
		R2	1,2
		R3	1,2
		R4	1,4
<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	R1	1,3	
	R2	1,4	
	R3	1,2	
	R4	1,2	
<i>Fusarium solani</i>	Témoin	R1	4
		R2	9
		R3	4
		R4	6
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	R1	2,2
		R2	2,7
		R3	3
		R4	2,5

	<i>Bacillus cereus</i> EHR1	R1	3
		R2	2
		R3	3
		R4	3
	<i>Bacillus pumilus</i> OS2	R1	2,5
		R2	2,3
		R3	1,7
		R4	2
	<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	R1	2,5
		R2	2,2
		R3	3
		R4	2,5
	<i>Bacillus</i> spp. CR1	R1	1
		R2	1
		R3	1
		R4	1
	<i>Bacillus</i> spp. PF3	R1	1,5
		R2	2
		R3	1,7
		R4	1,6
<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	R1	1	
	R2	1,2	
	R3	1	
	R4	1,2	
<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	R1	1,5	
	R2	1	
	R3	1,3	
	R4	1	
<i>Gueumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Témoïn	R1	7
		R2	5,5
		R3	6
		R4	6
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	R1	7
		R2	5,2
		R3	6,8
		R4	5
	<i>Bacillus cereus</i> EHR1	R1	9
		R2	6
		R3	7
		R4	7,3
	<i>Bacillus pumilus</i> OS2	R1	9
		R2	6
		R3	6
		R4	6,4
	<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	R1	4
		R2	3,5
		R3	4,2
		R4	4

	<i>Bacillus</i> spp. CR1	R1	1
		R2	1
		R3	1
		R4	1
	<i>Bacillus</i> spp. PF3	R1	7
		R2	9
		R3	9
		R4	7,7
	<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	R1	1,4
		R2	1
		R3	1
		R4	1,2
	<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	R1	2
		R2	1,4
		R3	1,5
		R4	1
<i>Rhizoctonia solani</i>	Témoin	R1	6
		R2	6
		R3	6,5
		R4	6,7
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	R1	1
		R2	1,1
		R3	1
		R4	1,2
	<i>Bacillus cereus</i> EHR1	R1	1,8
		R2	1,6
		R3	2,2
		R4	2
	<i>Bacillus pumilus</i> OS2	R1	1,3
		R2	1,3
		R3	1,5
		R4	1,6
	<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	R1	1
		R2	1,3
		R3	1,2
		R4	1,3
	<i>Bacillus</i> spp. CR1	R1	1,2
		R2	1,5
		R3	1,7
		R4	1,6
	<i>Bacillus</i> spp. PF3	R1	1,2
		R2	1,3
		R3	1
		R4	1
	<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	R1	1,2
		R2	1
		R3	1
		R4	1

	<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	R1	1,3
		R2	1
		R3	1,2
		R4	1,2
<i>Seridium cupressi</i>	Témoïn	R1	3,5
		R2	3
		R3	3,2
		R4	2,8
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OS4	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Bacillus cereus</i> EHR1	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Bacillus pumilus</i> OS2	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Bacillus subtilis</i> EHF5	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Bacillus</i> spp. CR1	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Bacillus</i> spp. PF3	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
	<i>Pseudomonas</i> spp. EPR3	R1	0
		R2	0
		R3	0
		R4	0
<i>Pseudomonas</i> spp. PS1	R1	0	
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	

Annexe 3: Mensurations de la longueur et de la largeur des sporanges (μm)

Isolat	Sporange	Longueur (μm)	Largeur (μm)	Sporange	Longueur (μm)	Largeur (μm)
Isolat (1)	1	35	12	11	34	15
	2	37	14	12	37	15
	3	29	17	13	39	13
	4	32	14	14	35	13
	5	37	15	15	40	15
	6	33	13	16	37	15
	7	34	14	17	37	12
	8	40	12	18	39	14
	9	35	15	19	40	14
	10	32	12	20	35	15
Isolat (2)	1	22	10	11	29	12
	2	20	12	12	32	12
	3	22	12	13	29	12
	4	24	14	14	30	14
	5	27	14	15	25	14
	6	30	14	16	31	16
	7	27	12	17	27	12
	8	25	12	18	30	13
	9	29	12	19	28	12
	10	29	15	20	30	15

Annexe 4 : Croissance des nécroses (mm) causées par *P. infestans*

Croissance de nécroses causées par l'isolat (1) de *P. infestans*

Traitement	Répétition	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
Témoin (-)	R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taille moyenne		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Témoin (+)	R1	3,00	9,00	18,00	28,00	40,00	47,00	54,00	62,00
	R2	0,00	4,00	10,00	17,00	28,00	37,00	45,00	53,00
	R3	0,00	3,00	8,00	15,00	23,00	31,00	40,00	50,00
	R4	2,00	8,00	16,00	27,00	36,00	42,00	50,00	55,00
	R5	2,00	8,00	15,00	24,00	33,00	40,00	48,00	55,00
	R6	0,00	3,00	11,00	20,00	28,00	37,00	43,00	50,00

	R7	0,00	4,00	12,00	24,00	30,00	37,00	42,00	49,00
	R8	0,00	4,00	11,00	22,00	30,00	37,00	44,00	51,00
	R9	0,00	3,00	10,00	21,00	28,00	38,00	47,00	55,00
	R10	0,00	2,00	10,00	22,00	33,00	41,00	50,00	58,00
Taille moyenne		0,70	4,80	12,10	22,00	30,90	38,70	43,30	44,80
PF3 (avant)	R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taille moyenne		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PF3 (après)	R1	0,00	0,00	3,00	5,00	7,00	12,00	17,00	20,00
	R2	0,00	2,00	6,00	11,00	13,00	17,00	20,00	22,00
	R3	0,00	3,00	5,00	9,00	13,00	17,00	20,00	22,00
	R4	0,00	2,00	6,00	10,00	14,00	19,00	22,00	23,00
	R5	0,00	1,00	4,00	8,00	13,00	16,00	19,00	20,00
	R6	1,00	3,00	8,00	13,00	16,00	18,00	20,00	22,00
	R7	0,00	2,00	10,00	14,00	16,00	19,00	22,00	24,00
	R8	0,00	0,00	8,00	14,00	20,00	24,00	26,00	28,00
	R9	0,00	2,00	5,00	8,00	12,00	18,00	23,00	25,00
	R10	0,00	0,00	2,00	6,00	10,00	14,00	17,00	18,00
Taille moyenne		0,10	1,30	5,70	9,80	13,40	17,40	20,60	22,40
PS1 (avant)	R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taille moyenne		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS1 (après)	R1	0,00	2,00	7,00	13,00	17,00	23,00	26,00	28,00
	R2	0,00	2,00	6,00	11,00	14,00	18,00	21,00	24,00
	R3	0,00	1,00	4,00	8,00	12,00	15,00	18,00	21,00
	R4	0,00	0,00	3,00	10,00	15,00	19,00	20,00	21,00
	R5	0,00	0,00	3,00	11,00	16,00	22,00	24,00	24,00
	R6	2,00	5,00	10,00	15,00	21,00	24,00	26,00	26,00
	R7	0,00	4,00	9,00	14,00	19,00	25,00	27,00	29,00
	R8	0,00	0,00	2,00	5,00	8,00	11,00	14,00	16,00
	R9	0,00	0,00	3,00	8,00	12,00	17,00	21,00	23,00
	R10	0,00	0,00	2,00	5,00	10,00	14,00	18,00	20,00

Taille moyenne	0,20	1,40	4,90	10,00	14,40	18,80	21,50	23,00
----------------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------

Croissance de nécroses causées par l'isolat (2) de *P. infestans*

Traitement	Répétition	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
Témoin (-)	R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taille moyenne		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Témoin (+)	R1	0,00	4,00	11,00	20,00	29,00	40,00	48,00	57,00
	R2	2,00	5,00	12,00	22,00	34,00	42,00	51,00	62,00
	R3	0,00	0,00	4,00	11,00	22,00	33,00	41,00	50,00
	R4	1,00	4,00	10,00	18,00	27,00	37,00	44,00	50,00
	R5	2,00	8,00	17,00	28,00	37,00	47,00	55,00	63,00
	R6	0,00	3,00	11,00	20,00	28,00	37,00	45,00	50,00
	R7	0,00	3,00	12,00	23,00	32,00	40,00	48,00	52,00
	R8	1,00	9,00	20,00	30,00	38,00	47,00	54,00	60,00
	R9	0,00	3,00	13,00	22,00	33,00	41,00	49,00	56,00
	R10	1,00	10,00	21,00	31,00	40,00	49,00	56,00	63,00
Taille moyenne		0,70	4,90	13,10	22,50	31,50	41,30	49,10	56,30
PF3 (avant)	R1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	R10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Taille moyenne		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PF3 (après)	R1	3,00	9,00	17,00	25,00	37,00	44,00	50,00	57,00
	R2	0,00	4,00	10,00	17,00	26,00	34,00	40,00	46,00
	R3	0,00	3,00	8,00	14,00	20,00	26,00	33,00	40,00
	R4	2,00	8,00	14,00	19,00	25,00	29,00	34,00	38,00
	R5	2,00	8,00	13,00	20,00	25,00	30,00	34,00	39,00
	R6	0,00	3,00	8,00	13,00	18,00	23,00	30,00	34,00
	R7	0,00	4,00	10,00	14,00	19,00	26,00	32,00	35,00
	R8	0,00	4,00	8,00	14,00	20,00	24,00	28,00	33,00
	R9	0,00	3,00	7,00	12,00	18,00	22,00	28,00	33,00
	R10	0,00	2,00	7,00	12,00	19,00	26,00	30,00	37,00

PF3 (après)	0,70	4,10	6,40	5,20	6,30	5,70	2,10	8,70	4,90
PS1 (avant)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PS1 (après)	0,00	0,20	3,40	4,20	5,10	4,80	1,60	5,00	3,03

Annexe 6 : Pourcentage des surfaces foliaires infestées

Isolat	Traitement Bactérien	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Isolat 1	Témoin (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Témoin (+)	65	55	50	55	55	50	50	50	50	60
	PF3 (avant)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PF3 (après)	15	20	20	20	15	20	20	25	20	10
	PS1 (avant)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PS1 (après)	25	15	10	10	15	20	25	10	10	10
Isolat 2	Témoin (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Témoin (+)	80	70	75	80	70	65	70	80	75	80
	PF3 (avant)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PF3 (après)	50	30	30	30	30	25	30	25	25	30
	PS1 (avant)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PS1 (après)	20	15	15	15	20	25	25	15	20	20

Annexes 7 : Taux de sporulation sur les folioles inoculées par les deux isolats de *P. infestans*

- Taux de sporulation sur les folioles inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*

Traitement	Répétition	Sporulation/ Feuille (x 10 ⁶)	Moyenne
Témoin (-)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	
	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
Témoin (+)	R1	2,1	1,82
	R2	1,7	
	R3	1,3	
	R4	1,7	
	R5	2	
	R6	1,9	
	R7	2,2	
	R8	2,1	
	R9	1,8	

	R10	1,4	
PF3 (avant)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	
	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
PF3 (après)	R1	0,5	0,72
	R2	1,2	
	R3	0,1	
	R4	0,5	
	R5	0,3	
	R6	1	
	R7	0,9	
	R8	0,7	
	R9	1	
	R10	1	
PS1 (avant)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	
	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
PS1 (après)	R1	0,7	0,58
	R2	0,4	
	R3	0	
	R4	1	
	R5	0,4	
	R6	1,1	
	R7	1	
	R8	0,7	
	R9	0	
	R10	0,5	

- Taux de sporulation sur les folioles inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*

Traitement	Répétition	Sporulation/ Feuille (x 10 ⁶)	Moyenne
Témoin (-)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	
	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
Témoin (+)	R1	1,9	2,33
	R2	2,7	
	R3	2,4	
	R4	2	
	R5	2,5	
	R6	2,9	
	R7	2,5	
	R8	1,7	
	R9	2	
	R10	2,7	
PF3 (avant)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	
	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
PF3 (après)	R1	0,9	0,85
	R2	1,3	
	R3	1,3	
	R4	0,8	
	R5	1	
	R6	0,5	
	R7	1,2	
	R8	1	
	R9	0,6	
	R10	0,9	
PS1 (avant)	R1	0	0
	R2	0	
	R3	0	
	R4	0	
	R5	0	

	R6	0	
	R7	0	
	R8	0	
	R9	0	
	R10	0	
PS1 (après)	R1	1,2	0,84
	R2	0,4	
	R3	1,3	
	R4	1	
	R5	0,8	
	R6	0,6	
	R7	0,6	
	R8	0,9	
	R9	1,4	
	R10	0,2	

Annexe 8 : Analyses statistiques

Tableau 1 : Analyse de la variance du test d'antagonisme *in vitro* a l'égard d'*A. alternata*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	72,060	8	9,008	31,230	0,000
Error	7,788	27	0,288		

Tableau 2 : Analyse de la variance du test d'antagonisme *in vitro* a l'égard de *F. solani*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	67,950	8	8,494	12,136	0,000
Error	18,898	27	0,700		

Tableau 3: Analyse de la variance du test d'antagonisme *in vitro* a l'égard de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*:

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	258,379	8	32,297	45,283	0,000

Error	19,257	27	0,713		
-------	--------	----	-------	--	--

Tableau 4: Analyse de la variance du test d'antagonisme *in vitro* à l'égard de *R. solani*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	91,006	8	11,376	301,121	0,000
Error	1,020	27	0,038		

Tableau 5: Analyse de variances du test d'antagonisme *in vitro* à l'égard de *S.cupressi*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	34,722	8	4,340	438,084	0,000
Error	0,267	27	0,010		

Tableau 6: Analyse de variances des lésions apparues après test *in vitro* sur feuilles détachées de pomme de terre inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	22 877,133	5	4 575,427	687,077	0,000
Error	359,600	54	6,659		

Tableau 7 : Analyse de variances des lésions apparues après test *in vitro* sur feuilles détachées de pomme de terre inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	29 048,133	5	5 809,627	379,898	0,000
Error	825,800	54	15,293		

Tableau 8: Analyse de variances du taux de sporulation après inoculation des feuilles détachées de pomme de terre inoculées par l'isolat (1) de *P. infestans*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	2,545E+013	5	5,090E+012	81,603	0,000
Error	3,368E+012	54	6,237E+010		

Tableau 9 : Analyse de variances du taux de sporulation après inoculation des feuilles détachées de pomme de terre inoculées par l'isolat (2) de *P. infestans*

Source	Type III SS	DDL	Carrés moyens	F-Ratio	P- Value
Traitement	4,208E+013	5	8,416E+012	128,741	0,000
Error	3,530E+012	54	6,537E+010		

Tableau 10: Corrélation entre le diamètre des lésions et le taux de sporulation induits par l'isolat (1) de *P. infestans*

Pearson Correlation Matrix

	<i>Lésions</i>	<i>Sporulations</i>
<i>Lésions</i>	1,000	
<i>Sporulations</i>	0,932	1,000

Tableau 11: Corrélation entre le diamètre des lésions et le taux de sporulation induits par l'isolat (2) de *P. infestans*

Pearson Correlation Matrix

	<i>Lésions</i>	<i>Sporulations</i>
<i>Lésions</i>	1,000	
<i>Sporulations</i>	0,917	1,000

LISTE DES ABREVIATIONS

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BAP : hormone de croissance Benzylaminopurine

CM : Carré Moyen

cm : centimètre

DDL : Degré De Liberté

ET : l'éthylène

g : Gramme

h : Heure

ha : Hectare

hab : Habitant

HR : Hypersensitive Response

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ISR : Induced Systemic Resistance

ITCMI : Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles

J : Jour

JA : Acide Jasmonique

Kg : Kilogramme

L : Litre

LPGA : milieu de culture Levure Peptone Glucose Agar

LPs : Lipopeptides cycliques

mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mm/h : Vitesse en millimètre par heure

µm : Micromètre

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

ODA : octadecanoid

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern

pb : Paires de bases

PDA : Potato Dextrose Agar

PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

Pr : Probabilité

pH : Potentiel Hydrogène

PRRs : Pattern Recognition Receptors

qx : Quintaux

R : Répétition

RIR : Relative Inhibition Ratio

ROS : Reactive *Oxygen* Species

SA : *Acide Salicylique*

SAR : Systemic Acquired Resistance

SAU : Surfaces Agricoles Utiles

SCE : Somme des Carré des Ecart

T : Tonnes

V : Vitesse

VOCs : Composés Volatiles

% : Pourcentage

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Semal, J et Lepoivre, Ph. (2003)**. Les maladies des plantes : Concepts généraux. *In*: Lepoivre, Ph. Phytopathologie. De Boeck Université, Bruxelles : De Boeck and Larcier S.A, 427 p.
- 2- **Agrios, G. N. (2005)**. Plant pathology, 5 th ed. Elsevier Academic Press, 922 p.
- 3- **Savary, S et Teng, P.S. (1994)**. La protection des cultures dans une agriculture durable. *La Recherche* 25 (271) : 1322-1329.
- 4- **Gisi, U and Cohen, Y. (1996)**. Resistance to phenylamide fungicides : A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34 : 549–572.
- 5- **Danan, S. (2009)**. Diversité structurale de locus de résistance à *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre et synténie chez les Solanacées. Thèse de doctorat en Biologie intégrale des plantes. Montpellier : Centre International D'Etudes Supérieures En Sciences Agronomiques Sup Agro, p 230.
- 6- **Krebs, H., Dorn, B et Forrer, H-R. (2006)**. Lutte contre le mildiou de la pomme de terre avec des préparations à base de plantes. Station de recherche Agroscope Reckenholz-Tänikon ART. *Revue suisse Agric.* 38 (4): 203-207.
- 7- **Gernot, R. (2006)**. Pomme de terre. Palémon, 156 p.
- 8- **Bachem, C. (2009)**. Décoder le génome de la pomme de terre. *In* : Eclairage sur un trésor enfoui. FAO. Rome.
- 9- **Montarry, J. (2007)**. Réponse adaptative des populations de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, au déploiement en

culture de son hôte *Solanum tuberosum*. Thèse de doctorat en Biologie et Agronomie. Rennes : L'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 144 p.

- 10-Wastie, R.L. (1991).** Breeding for resistance. *In:* Ingram, D.S and Williams, P.H. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. *Advances in Plant Pathology*, vol. 7 Academic Press, London.
- 11-Beninal, L ; Corbière, R ; Kedad, A ; Andrivon, D & Bouznad, Z. (2009).** A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles : common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. *PPO-Special Report no. 13* : 237 – 242.
- 12-Jourdan, E. (2008).** Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Thèse de doctorat : Science. Centre Wallon de Biologie Industrielle., Faculté des sciences, 192 p.
- 13-Dalal, J and Kulkarni, N. (2013).** Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Current research in microbiology and biotechnology*. Vol. 1, No. 2 : 62-69
- 14-Sturz, A.V., and Nowak, J. (2000).** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops, *Appl. Soil Ecol.* 15:183-190.
- 15-Ziedan, E.H.E. (2006).** Manipulating endophytic bacteria for biological control to soil borne diseases of peanut. *Journal of Applied Sciences Research* 2(8): 497-502© 2006, INSInet Publication
- 16-Prieto, P., Schiliro, E., Maldonado-González, M.M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J.B., and J. Mercado-Blanco. (2011).** Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial Ecol.* 62:435-445.
- 17-Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V and Samiyappan, R. (2001).** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20 : 1-11
- 18-Haddad N; Krimi Z and Raio A. (2013).** Endophytic bacteria from weeds promote growth of tomato plants *in vitro* and in greenhouse. *In:* Schneider

C, Leifert C, Feldmann F (Eds), Endophytes for plant protection: the state of the art, pp. 27-32. ©

- 19-Alim, D. (2011).** Antagonisme bactérien sur des souches d'*Erwinia Spp.* pectinolytiques agent de la pourriture molle de la pomme de terre. Mémoire de magister spécialité phytopathologie. Université Saad Dahlab de Blida.
- 20-Djellout, H. (2011).** Identification et sélection d'antagonistes bactérien induisant une résistance systémique vis-à-vis *Agrobacterium Spp.* agents du crown Gall des arbres fruitiers et de la vigne. Mémoire de magister spécialité phytopathologie. Université Saad Dahlab de Blida.
- 21-Reader, J. (2008).** Potato a history of the propitious esculent. Yale University Press, United States of America, 315 p.
- 22-FAO. (2010).** Eclairage sur un trésor enfoui. FAO. Rome.
- 23-FAO STAT. (2012).** Statistiques Agricoles de la FAO.
- 24-Aeby, P. (2002).** Ensilage des pommes de terre crûes. Institut agricole de Grangeneuve , Station de production végétale et animale.
- 25-Glimn-Lacy, J and Kaufman, P. (2006).** Botany illustrated : Introduction to plants, major groups, flowering plant families, 2nd ed. Springer, 146 p.
- 26-Chetibi, E. (2008).** La pomme de terre pour lutter contre la faim dans le monde. *In* : Chetibi, E ; Smati, F ; Alloune, H et Derguine, H. Agriculture et développement, n°8. ITCMI, 57 p.
- 27-Anonyme. (2008).** Production de la pomme de terre en Algérie. *In* : Chetibi, E ; Smati, F ; Alloune, H et Derguine, H. Agriculture et développement, n°8. ITCMI, 57 p.
- 28-Mouhouche, B et Bazouche, M. (2008).** Etude de l'effet combine du régime hydrique et de la fertilisation minérale sur la production de pomme de terre (*Solanum tuberosum*): Production en quantité et qualité et valorisation de l'eau. *In*: Journée d'étude sur la filière pomme de terre: Situation actuelle et perspectives. INA : El Harrach.
- 29-MADR. (2013).** Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, Service statistique. Algérie.
- 30-Chehat, F. (2008).** La filière pomme de terre Algérienne : Une situation précaire. *In* : Journée d'étude sur la filière pomme de terre : Situation actuelle est perspectives. INA : El Harrach.

- 31-Carputo, D., Garreffa, P., Mazzei, M., Monti, L. and Cardi, C. (1998).** Fertility of somatic hybrids *Solanum commersonii* (2x, 1EBN) (+) *S. tuberosum* haploid (2x, 2EBN) in intra- and inter-EBN crosses. *Genome*, vol.41 : 776 -781.
- 32-Amrar, S. (2008).** La pomme de terre, biologie et physiologie. *In* : Chetibi, E ; Smati, F ; Alloune, H et Derguine, H. Agriculture et développement, n°8. ITCMI, 57 p.
- 33-Hils, U and Pieterse, L. (2009).** *World catalogue of potato varieties 2009/2010*, AgriMedia GmbH, 253 p
- 34-Polese, J-M. (2006).** La culture de la pomme de terre. Artémis, 94 p.
- 35-Rieckman, W. (1991).** Maladies et ravageurs de la pomme de terre. Th Mann, 168 p.
- 36-Kerlain, C ; Priou, S ; Jouan, B ; Pasco, C ; Prior, P ; Samson, R ; Corbière, R ; Tivoli, B ; Bedin, P ; Duvauchelle, S ; Andrivon, D ; Elimane, R et Perraton, B. (1996).** Maladie. *In* : Rousselle, P ; Robert, Y et Grosnier, J-C. La pomme de terre : Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. eds INRA, Paris, 607 p.
- 37-Hammi, A. (2003).** Caractérisation de populations de *Phytophthora infestans* (MONT.) de Bary dans la région de Sais, Thèse de doctorat Biologie spécialité phytopathologie. Fès., Université de Sidi Mohamed ibn Abdallah, 229 p.
- 38-Grünwald, N.J., Romero Montes, G., Lozoya Saldaña, H., Rubio-Covarrubios, O.A. and Fry, W.E. (2002).** Potato late blight management in the Toluca Valley: Field Validation of SimCast Modified for Cultivars with High Field Resistance. *Plant Disease*, 86 (10): 1163-1168.
- 39-Webster, J and Weber, R. (2007).** Introduction to fungi, 3rd ed. Cambridge University Press, 841 p.
- 40-Vidhyasekaran, P. (2004).** Concise encyclopedia of plant pathology. United States of America.: The Haworth Reference, 619 p.
- 41-Mizubuti, E.S.G and Fry, W.E. (2006).** Potato late blight. *In* : Cooke, B-M., Gareth Jones, D and Kaye, B. The Epidemiology of Plant Diseases, 2nd ed, Springer. Printed in the Netherlands. 583 P.
- 42-Naqvi, S.A.M.H. (2004).** Diagnosis and management of certain important fungal diseases of citrus. *In* : Naqvi, S.A.M.H. Diseases of fruits and

vegetables : Diagnosis and management, Vol 1, Print ©Kluwer Academic Publishers, 691p.

- 43-Kuepper, G et Sullivan, P. (2004).** Solutions biologiques de lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Appropriate technology : National Sustainable Agriculture Information Service –ATTRA- , 12 p.
- 44-Van der Peer , Y and de Wachter, R. (1997).** Evolutionary relationships among the eukaryotic crow taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J. Mol. Evol* ; 45, 619- 630.
- 45-Avila-Adame ,C., Gomez-Alpizar, L., Zismann, V., Jones, K. M., Buell,C. R and Ristaino, J. B. (2005).** Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* 49 : 39-46.
- 46-Lee, T.V.D. (2003).** Genetic analysis of *Phytophthora infestans*. Wageningen : Thèse de doctorat, Wageningen University, 105p.
- 47-Shaw, D. S. (1996).** Genetic analysis in the Oomycetous Fungus : *Phytophthora infestans*. In : Bos, C.J. Fungal genetics : Principles and Practice by. Marcel Dekker, Inc, 442 p.
- 48-Boccas, B. (1979).** La reproduction sexuée chez phytophthora, ses voies et quelques une de ses conséquences génétiques. Travaux et document de l'office de la recherche scientifique et technique Outre-mer (O.R .S.T.O.M). N° 100. Paris, 178 p.
- 49-Ducattillon, C., Van Koninckxloo, M et Vandemeulebroecke, K. (2006).** Le mildiou de la pomme de terre : Stratégies de lutte. Centre pour l'agronomie et l'agro industrie de la province Hainaut (CARAH).
- 50-Zan, K. (1962).** Activity of *Phytophthora infestans* in soil in relation to tuber infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 45, 205-221
- 51-Càceres, P. A., Pumisacho, M., Forbes, G.A., Andrade-Piedra, J.L. (2008).** Learning to control potato late blight - A facilitator's guide. Design & layout: Alfredo Puccini B.
- 52-Struck, C. (2006).** Infection strategies of plant parasitic fungi. In : Cooke,B-M., Gareth Jones, D and Kaye, B. The Epidemiology of Plant Diseases, 2nd ed, Springer. Printed in the Netherlands.583 P.

- 53-Goodwin, S. B., Cohen, B. A and Fry , W. E. (1994):** Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11591±11595.
- 54-Jones, R.W and Simko , I. (2005).** Resistance to late blight and other fungi. In : Razdan, K.M and Mattoo, A. K . Genetic improvement of *Solanaceous* crops : Potato, Vol. 1. Science Publishers, Inc. United States of America, 451 p.
- 55-Lacroix, M. (1999).** La tomate de serre, une plante hôte pour le Mildiou (*Phytophthora infestans*). Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation : Québec.
- 56-Dyakov, Y.T and Ozeretskovskaya, O.L. (2007).**Vertical pathosystem: avirulence genes and their products. In : Dyakov, Y.T., Dzhavakhiya, V.G and Korpela, T. Comprehensive and molecular phytopathology. Elsevier Academic Press, 497 p.
- 57-Strange, R.N. (2003).** Introduction to plant pathology. Wiley Editorial Offices. 464 p.
- 58-Duvauchelle, S et Andrivon, D. (1996).** Maladies à distribution géographique mondiale : Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In : Rousselle, P ; Robert, Y et Grosnier, J-C. La pomme de terre : Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. INRA, Paris, 607 p.
- 59-Rowe, R. C. (1993).** Potato management : A holistic approach. In : Rowe, R. C. (ed) Potato health management. American phytopathological society, St. Paul, MN. PP 3-10.
- 60-Cook, B.M. (2006).** Disease assessment and yield loss. In : Cooke, B-M., Gareth Jones, D and Kaye, B. The Epidemiology of Plant Diseases, 2nd ed, Springer. Printed in the Netherlands.583 P.
- 61-Gaucher, D., Duvauchelle, S et Andrivon, D. (1998).** Mildiou de la pomme de terre – le champignon évolue, la lutte aussi ! Perspectives Agricoles 236: 1-20.
- 62-Gururani, M-A., Venkatesh, J., Prakash Upadhyaya, C., Nookaraju, A., Kumar Pandey, S and Park, S-W. (2012).** Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, (78) : 51- 65.

- 63-Lambion, J. (2006).** Protection phytosanitaire en culture de pomme de terre biologique. Institut Technique de l'Agriculture Biologique, Paris.
- 64-Soltner, D. (1988).** Phytotechnie spéciale : les grandes productions végétales, céréales, plantes sarclées, prairies. Collection sciences et techniques agricoles. Paris.
- 65-Song, J., Bradeen, J.M., Naess, S. k., Raasch, J.A., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., Jia Liu., Hanhui Kuang., Austin-Phillips, S., Robin Buell, C., Helgeson, J.P and Jiming Jiang. (2003).** Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *PNAS*, vol. 100, no. 16 : 9128-9133.
- 66-Daayf, F., Adam, L and Fernando, W.G.D. (2003).** Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using invitro,detached-leaves, and whole-plant testing systems. *Can. J. Plant Pathologie. Vol. 25: 276-284.*
- 67-Beaulieu, C., Hogue, R et Bélanger, B. (2004).** Lutte biologique dans la culture de la pomme de terre : impacte sur la microflore et optimisation du procédé. Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke 2 L'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA), Sainte-Foy. # 201034
- 68-Jijakli. M-H. (2004).** La lutte biologique en phytopathologie. *In* : Lepoivre, Ph. Phytopathologie. De Boeck Université, Bruxelles : De Boeck and Larcier S.A, 427 p.
- 69-Toofanee, S.B and Dulymamode, R. (2002).** Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity*, 11: 169-175.
- 70-Gayathri, P and Muralikrishnan, V. (2013).** Isolation of endophytic bacteria from mangrove, bananas and sugarcane for their biological activities. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences. 1(1) : 19 – 27*
- 71-Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., del Valle, M.V., Pérez, A., Zepeda, A and Zenteno, E. (2000).** Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry* 33. © Elsevier Science Ltd: 167-172
- 72-Wilson D. (1995).** Endophyte- the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos. 73:274–276.*

- 73-Strobel, G and Castillo, U. (2008).** Sourcing natural products from endophytic microbes. *In* : Colegate, S.M and Molyneux, R. J. Bioactive natural products : Detection, isolation, and structural determination, 2nd ed, CRC press, 605 p.
- 74-Thakore, Y., (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3):194-208.
- 75-Zinniel D-K, Lambrecht P, Harris N-B, Feng Z, Kuczmariski D, Higley P, Ishimaru C-A, Arunakumari A, Barletta R-G, Vidaver A-K. (2002).** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol*. 68(5):2198-208.
- 76-UmaMaheswari, T., Anbukkarasi, K., Hemalatha, T and Chendrayan, K. (2013).** Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2(6): 127-136.
- 77-Redecker, D., Kodner, R. and Graham, L.E. (2000).** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289, 1920–1921.
- 78-Bacon, C.W and Hinton, D.M. (2007).** Bacterial endophytes : The endophytic niche, its occupants, and its utility. *In* : Gnanamanickam, S.S. Plant-Associated Bacteria. (ed.) © Springer, 712 p.
- 79-Bell, P and Hemsley, A, R. (2000).** Green plants : Their origin and diversity . 2nd ed , Université Press Cambridge
- 80-Panaccione. D.G and Annis. S.L. (2001).** Significance of fungal peptide secondary metabolites in the agri-food industry. *In* : Khachatourians, G.G and Arora, D.K. Applied Mycology and Biotechnology. Vol 1. Agriculture and Food Production. Elsevier, 435 p.
- 81-Müller, Ch. B. (2004).** Les endophytes influencent les réseaux alimentaires des insectes. *In* : Baur, B. HOTSPOT , Diversité des champignons , biodiversité : dialogue entre recherche et pratique. Information du forum biodiversité suisse, 24 p.
- 82-Antoun, H and Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *In* : Siddiqui, Z. A. (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, © Springer. Printed in the Netherlands
- 83-Soundarapandian, S and Dhandayuthapani, K. (2010).** Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with

medicinal plants – New avenues for phytochemicals. *Journal of Phytology*, 2(7): 91-100 ISSN: 2075-6240 An Open Access Journal Available

- 84-Fuentes- Ramirez, L and Caballero-Mellado, J.(2005).** Bacterial biofertilizers. *In* : Siddiqui, Z.A. (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*,. © Springer, Dordrecht, The Netherlands : 143-172
- 85-Mbai, FN., Magiri, E.N., Matiru, V.N ., Ng'ang'a, J and Nyambati V.C.S. (2013).** Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from kenyan basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research Vol. 3 No. 4* : 25-40.
- 86-Vanbleu, E and Vanderleyden, J . (2007).** Molecular genetics of rhizosphere and plant-root colonization. *In* : Elmerich, C and Newton, W.E. (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, © Springer, 321 p.
- 87-Kang, S-H., Hyun-Soo, Ch., Hoon, Ch., Choong-Min, R., Jihyun, F. K AND Seung-Hwan, P. (2007).** Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(1), 96–103
- 88-Nautiyal, C.S and DasGupta, S.M. (2007).** Screening of plant growth-promoting rhizobacteria, *In* : Varma, A and Oelmüller , R : *Advanced Techniques in Soil Microbiology*, eds New York, NY: Springer. 363–375.
- 89-Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J. (2009).** Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70 : 1581–1588
- 90-Janse, J.D. (2005).** *Phytobacteriology principles and practice*. © CABI Publishing. 360 p.
- 91-Kiil, k., Binnewies, T.T., Willenbrock, H., Kirkelund Hansen, S., Yang, L., Jelsbak, L., Ussery, D.W and Friis, C. (2008).** Comparative genomics of *Pseudomonas*. *In* : Bernd Rehm, H.A. *Pseudomonas : Model organism, pathogen, cell factory*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p
- 92-McDougald, D., Klebensberger, J., Tolker-Nielsen, T., Webb, J.S., Conibear, T., Rice, S.A., Kirov, S.M., Matz, C and Kjelleberg, S. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa: A Model for Biofilm Formation*. *In* : Bernd Rehm,

H.A. *Pseudomonas* : Model organism, pathogen, cell factory. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p.

- 93-Diggle, S.P., Heeb, S., Dubern, J.F., Fletcher, M.P., Crusz, S.A., Williams, P and Camara, M. (2008). Quorum Sensing in Pseudomonads.** *In* : Bernd Rehm, H.A. *Pseudomonas* : Model organism, pathogen, cell factory. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p.
- 94-Misko, A. L and Germida, J.J. (2002).** Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 399-407.
- 95-Boukerma, L. (2012).** Effet des PGPR (*Pseudomonas* spp. Fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Séminaire national de protection des cultures et environnement, session phytopathologie.
- 96-Miller, S.H., Mark, G.L., Franks, A and O'Gara, F. (2008).** *Pseudomonas*–Plant interactions. *In* : Bernd Rehm, H.A. *Pseudomonas* : Model organism, pathogen, cell factory. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p.
- 97-Suzuki, S., He, Y. and Oyaizu, H. (2003).** *Curr Microbiol*, 47, 138–143.
- 98-Mezaache, S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat en Microbiologie : Université Ferhat ABBAS Sétif, 221 p.
- 99-Durand-Tardif, M et Pelletier, G. (2003).** Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes ☆Contribution of molecular and cellular biology and genetics to plant protection. *Plant biology and pathology*, C. R. Biologies 326 : 23–35
- 100- Reignault, Ph and Sancholle, M. (2005).** Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts?. *Plant biology and pathology*. C. R. Biologies 328 : 821–833
- 101- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. (2004).** The transcriptome of

rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*17: 895-908.

- 102- Subramaniam, R., Nasmith, CH.G., Harris, L.J and Ouellet, T. (2009).** Insight into Fusarium- cereal pathogenesis. *In*: Bouarab, K; Brisson, N and Daayf, F. Molecular plant–microbe interactions. Library of congress cataloging-in-publication data, © CAB International, 340 p.
- 103- Ownley, B.H and Windham, M.T. (2006).** Biological control of plant pathogens. *In*: Trigiano, R.N., Windham, M.T and Windham, A.S. Plant pathology : Concepts and laboratory exercises. CRC press. 702 p.
- 104- Imperi, F., Mettrick, K.A., Shirley, M., Tiburzi, F., Draper, R.C., Visca, P and Lamont, I.L. (2008).** Iron transport and signaling in Pseudomonads. *In*: Bernd Rehm, H.A. Pseudomonas : Model organism, pathogen, cell factory. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p.
- 105- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C. and Lemanceau, P. (2007).** Iron acquisition from Fepyooverdine by Arabidopsis thaliana. *Molecular PlantMicrobe Interactions* 20, 441-447.
- 106- Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., and Briat, J.F. (2009).** Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil* 321: 513-535.
- 107- Rehm, B.H.A. (2008).** Biotechnological relevance of Pseudomonads. *In*: Bernd Rehm, H.A. Pseudomonas : Model organism, pathogen, cell factory. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 402 p.
- 108- Reva, O; Chan, W Y; Lapa, S et Borriss, R. (2013).** Complete genome sequence of a plant growth promoting and crop protective strain of *Bacillus atropheus* UCMB-5137. *In*: Schneider, C., Leifert, C and Feldmann F (Eds). Endophytes for plant protection: the state of the art. © 2013 Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Proceedings of the 5th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe held at the Faculty of Agriculture and Horticulture (LGF), Humboldt University Berlin, Berlin-Dahlem, Germany
- 109- Chen, W.M., Tang, Y.Q., Mori, K and Wu, X.L. (2012).** Distribution of culturable endophytic bacteria in aquatic plants and their potential for bioremediation in polluted waters. *Aquat Biol*, Vol. 15: 99–110.

- 110- **Schisler, D., Slininger, P., Behle, R. & Jackson, M. (2004).** Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271.
- 111- **Mitoi, M.E., Helepciuc, F.E., Brezeanu, A and Cornea, C.P. (2012).** Characterization of the impact of *Bacillus Licheniformis* and *Pseudomonas Aeruginosa* against *Alternaria Alternata* by phase contrast microscopy and transmission electron microscopy. *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi, Sect. II a. Biol. veget.*, 58, 2: 5-18
- 112- **Ongena, M and Jacques, Ph. (2007).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* Vol.16 No.3 : 115-125
- 113- **Sujatha, S., Gopaljee, J and RameshV.S. (2007).** Virulence functions of Xanthomonads. *In*: S.S. Gnanamanickam (ed.), *Plant-Associated Bacteria*, (ed.) © 2007 Springer.712 p.
- 114- **Danielsson, J. (2008).** *Bacillus* based biocontrol on Brassica. Thèse de doctorat. Université suédoise des sciences agronomiques, 39 p.
- 115- **Podile, A.R and Kishore, G.K. (2007).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *In* : Gnanamanickam, S.S. *Plant-Associated Bacteria*. (ed.) © Springer, 712 p.
- 116- **Cherif Silini H., Silini A., Arif F., Baiche K. (2012).** Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. 2nd ed of the international congress: "Microbial Biotechnology for Development" Marrakech, Marocco.
- 117- **van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- 118- **Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. and Paré, P. W. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1017–1026.
- 119- **Emmert, E.A.B., Handelsman, J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171, 1-9.
- 120- **Mukherjee, A.K and Das, K. (2005).** Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate

utilization by *B. subtilis* strains in a particular habitat. FEMS Microbiol Ecol 54 : 479-489

- 121- Borriss, R. (2013).** Structural and functional genomics of plant-associated Bacillus strains used for biocontrol of plant diseases. *In:* Schneider, C., Leifert, C and Feldmann F (Eds). Endophytes for plant protection: the state of the art. © 2013 Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Proceedings of the 5th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe held at the Faculty of Agriculture and Horticulture (LGF), Humboldt University Berlin, Berlin-Dahlem, Germany
- 122- Dickinson, M. (2003).** Molecular plant pathology. BIOS Scientific Publishers©, 273 p.
- 123- Krimi, Z. Raio, A. Dessaux, Y. Smain, K. and Khodja, R. (2012).** Bacterial endophytes from diverse spontaneous plant species with biological activities. COST FA1103 Endophytes in Biotechnology and Agriculture. Endophytes: from discovery to application. San Michele all'Adige (Trentino), November 14-16th, Italy.
- 124- Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K and Srividya, S. (2012).** Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. Asian Journal of Plant Science and Research, 2 (1):16-24
- 125- Lin, T., Zhao, L., Yang, Y., Guan, Q and Gong, M. (2013).** Potential of endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against Verticillium wilt disease. *Australian Journal of Crop Science*, 7(1):139-146.
- 126- Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Táborský, V., Ater, E. H and Doležal, P. (2010).** Mating type distribution of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic in 2007 and 2008. *Plant Protect. Sci.* Vol. 46, No. 3: 89–97
- 127- Glais, R et Corbière, R. (2005).** Comment mesure-t-on l'agressivité des souches de *Phytophthora infestans*. *In:* Montarry, J., Corbière, R.,

Glais, I et Andrivon, D. Mildiou de la pomme de terre : des populations qui changent. *Phytoma. La Défense des Végétaux* , N°599 : 28-30

- 128- **Silva, H.S.A ; Romeiro, R.S ; Carrer-Filho, R ; Pereira, J.L.A ; Mizubuti, E.S.G and Mounteer, A (2004).** Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, 152:371–375.
- 129- **Sinha, S ; Rappu, P ; Lange, S.C Pekka, M ; Zalkin, H and Smith, J. (1999).** Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. u PNAS u, vol. 96 u no. 23 : 13074–13079
- 130- **Marzluf, G.A. (2001).** Metabolic Regulation in Fungi. *In* : Khachatourians. G.G et Arora.D.K : Applied Mycology and Biotechnology : Volume 1. Agriculture and Food Production. Elsevier Science B.V. 435 p.
- 131- **Brill,J ; Hoffmann,T ; Putzer, H and Bremer, E. (2011).**T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* , 157 : 977–987
- 132- **Manabe, K ; Kageyama, Y ; Morimoto, T ; Shimizu, E ; Takahashi, H ; Kanaya, S ; Ara, K ; Ozaki, K and Ogasawara, N.(2013).** **Improved** production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. *Microbial Cell Factories*, 12:18. 10 p
- 133- **López Gladko, A. (2008).** Influence of *Pseudomonas kilonensis* / *brassicacearum* on growth of plants and fungi. Master Thesis : Institute of Environmental Sciences, University of Zurich, 63 P
- 134- **Thomashow LS and Weller DM. (1988).** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol* 170:3499–3508
- 135- **Bonsall, R. F., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1997).** Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 951-955.
- 136- **Kwak, Y., Bonsall, R. F., Okubara, P. B., Paulitz, T., Thomashow, L., Weller, D. (2012).** Factors impacting the activity of 2, 4 –

diacetylphloroglucinol- producing *Pseudomonas fluorescens* against take_all of wheat. *Soil Biology and Biochemistry* 54 : 48-56.

- 137- Baysal, O ; Çalis_kan, N and Yesilova, O. (2008).** An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73 : 25–32
- 138- Sgroy, V ; Cassán, F ; Masciarelli, O ; Del Papa, M.F, Lagares, A, Luna, V. (2009).** Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-009-2116-3
- 139- Benhamou, N ; Kloepper, J.w, Tuzun, S. (1998).** Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain : ultrastructure and cyto chemistry of the host response. *Planta* 204 : 153- 168.
- 140- Jetiyanon, K and Kloepper, J.W. (2002).** Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control* 24, 285–291.
- 141- Manjula, K and Podile, A.R. (2001).** Chetin-supplemented formulation improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF1. *Canadian journal of microbiology*, 47, 618-625.
- 142- Sid Ahmed, A, Ezziyyani, M, Pérez Sánchez, C, Candela, M.E. (2003).** Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, Vol 109, Issue : 633-637
- 143- Schuegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Hartmann A, Langebartels C. (2006).** Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 29:909–918
- 144- Srivastava, R. and Shalini, (2008).** Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. *EJEAFCHEM*, 7 (4). 2789- 2796.

- 145- **Yang L ; Ning Z.S ; Shi C.Z ; Chang Z.Y and Huan L.Y. (2004).** Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing beta-glucosidase from endophytic bacterium. *J Agric Food Chem.* 7;52(7):1940-1944.
- 146- **Lim, H.-S., Kim, Y.-S. and Kin, S.-D. (1991).** *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 510–516.
- 147- **Tikhonovich,I.A and Provorov, N.A.(2007).** Beneficial plant–microbe Interactions. *In* : Dyakov, Y.T., Dzhavakhiya, V.G and Korpela, T. Comprehensive and molecular phytopathology. Elsevier, 483 p.
- 148- **Pereira de Melo, F.M., Fiore, M.F., Beraldo de Moraes, L.A., Silva-Stenico, M.E., Scramin, S., Teixeira, M.A and Soares de Melo, I. (2009).** Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Sci.Agric.* 66: 583-592.
- 149- **Patil, B.V ; Naik, M.K ; Manujnath. H and Hosamani, A.C. (2013).** **Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) For Sustainable Agriculture.** *In* : Reddy, M.S., Faylon., P.S and Dar, W.D. Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials Manila, Philippines
- 150- **Ownley, B.H and Windham, M.T. (2006).** Biological control of plant pathogens. *In* : Trigiano, R.N., Windham, M.T and Windham, A.S. Plant pathology : Concepts and laboratory exercises. CRC press. 702 p.
- 151- **Duffy, B. K. and Défago, G. (1999).** Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2429-2438.
- 152- **Thurston, H. D and Shultz, O. (1981).** Late blight in compendium of potato disease. Hooker Eds. APS Press Michigan (USA). pp 40-42.
- 153- **Corbière, R ; Rekad, F. Z ; Galfout, A ; Andrison, D and Bouznad, Z. (2010).** Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. *PPO-Special Report no. 14* : 133 - 146.
- 154- **Shaw, D. S. (1991).** Genetics of *Phytophthora infestans*. *Advances in Plant Pathology* 7 :131-167.

- 155- Young, J.K., Chung, H.J and Fry, W.E. (1994). Changes in frequencies and distribution of A2 mating type and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in Korea. *Korean J. Plant pathol*, vol. 10, No(2): 92-98;
- 156- Chycoski, C. I., and Punja Z. K. (1996). Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Columbia and others regions of Canada during 1993 to 1995. *Plant Disease* 80: 579-589.
- 157- Lebreton, L, Duvauchelle, S., and Andrivon, D. (1996). Occurrence in France and Belgium of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in 1995. pp 262-263. In Abstracts of conference papers, 13th Triennial Conference, European Association of Potato Research Veldhoven, The Netherlands.
- 158- Amkraz, N. (2013). Utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. Thèse de Doctorat ; Spécialité : Phytopathologie. 230 p.
- 159- Kloepper, J.W ; Ryu, C.M and Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–1266
- 160- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. and Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97:239-243.
- 161- Yan, Z ; Reddy, M.S ; Ryu, C.M ; McInroy, J.A ; Wilson, M and Kloepper, J.W. (2002). Induced systemic resistance against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria, *Phytopathology*, 92 (2002), pp. 1329–1333
- 162- Edreva, A., (2004). A novel strategy for plant protection: induced resistance. *J. Cell Mol. Biol.*, 3, 61-69.
- 163- Cohen Y., Gisi U. et Mosinger E. (1991). Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38, 255-263.
- 164- Tran, H ; Ficke, A ; Asimwe, T ; Höfte, M and Raaijmakers, J.M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of

Phytophthora infestans and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.*, 175 : 731-742.

- 165- Heeb, S and Haas, D. (2001).** Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1351-1363.
- 166- Falkhof, a.g ; Dehne, h.w ; Schönbeck, f. (1988).** Dependence of the effectiveness of induced resistance on environmental conditions. *J. Phytopathology* 123:311-321
- 167- Reglinski, T., Dann, E and Deverall, B. (2007).** Integration of induced resistance in crop production. *In* : Walters, D., Newton, A and Lyon, G. *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection.* Blackwell Publishing.

www.eucablight.org

www.FAO.org

www.rennes.inra.fr

www.sciencedirect.com

