

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université SAAD DAHLAB de Blida**

**Faculté des Sciences AGRO-VETERINAIRES  
Département des Sciences Agronomiques**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

**Spécialité : Protection des plantes et environnement**

### **EFFET BACTERICIDE, FONGICIDE ET NEMATICIDE *IN VITRO* DE QUATRE ESPECES VEGETALES SPONTANEEES**

**Par**

**TAFIFET Lamia**

**Devant le jury composé de :**

<b>A. BOUTEKRABT</b>	<b>Professeur USDB</b>	<b>Président</b>
<b>Z.KRIMI</b>	<b>Professeur USDB</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Z.DJAZOULI</b>	<b>Maître de Conférence USDB</b>	<b>Examineur</b>
<b>A.GUENDOOUZ-BENRIMA</b>	<b>Maître de Conférence USDB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Dh. NEBIH</b>	<b>Chargée de Cours USDB</b>	<b>Co-promotrice</b>

**Blida, Novembre 2010**

## RESUME

### EFFET BACTERICIDE, FONGICIDE ET NEMATOCIDE *IN VITRO* DE QUATRE ESPECES VEGETALES SPONTANEEES

Cette étude a pour objectifs d'évaluer l'efficacité nématocide et bactéricide *in vitro* d'extraits aqueux de quatre espèces spontanées ; *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* et *Urtica dioica* ainsi que l'effet fongicide d'une Crucifère ; *Raphanus raphanistrum* en même temps que les quatre autres espèces citées.

Les extraits aqueux se sont révélés tous actifs quantitativement et qualitativement sur la gamme des pathogènes étudiés : sept bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, *Ralstonia solanacearum* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), dix champignons dont 9 phytopathogènes (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Alternaria chlamydosporia*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Aspergillus fumigatus*, *Phomopsis vaccinii*) et les nématodes à galles appartenant au genre *Meloidogyne*.

Les résultats de l'effet antibactérien des extraits ont montré une efficacité très élevée de l'espèce *Euphorbia helioscopia* ainsi que *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis* sur les souches bactériennes étudiées en particulier ; *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium vitis* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Les tests du pouvoir antifongique des extraits bruts ont montré une efficacité très significative des espèces spontanées ; *Calendula arvensis* et *Raphanus raphanistrum* avec des pourcentages d'inhibition qui dépassent 55%. Les résultats obtenus de l'effet nématocide ont montré une efficacité hautement significative d'*Urtica dioica* en induisant jusqu'à 100% de mortalité des larves après 72h de traitement.

**Mots clés :** *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, *Urtica dioica*, *Raphanus raphanistrum*, extrait aqueux, activité biopesticide.

## ABSTRACT

### **IN VITRO BACTERICIDAL, FUNGICIDAL AND NEMATICIDAL EFFECT FOUR SPONTANEOUS SPECIES**

This study aims to evaluate the in vitro nematicidal and bactericidal effectiveness of aqueous extracts from four spontaneous species, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* and *Urtica dioica* and the fungicidal effect of a crucifer, *Raphanus raphanistrum* in along with four other species mentioned .

The aqueous extracts appeared all active quantitatively and qualitatively on the range of pathogens studied : seven phytopathogenic bacteria (*Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* pv. *Carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*, *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.), ten fungi of which 9 phytopathogenic (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Alternaria chlamydosporia*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Aspergillus fumigatus*, *Phomopsis vaccinii*) and nematodes of the genus *Meloidogyne*.

The results of the antibacterial effect of extracts showed a very high efficiency of *Euphorbia helioscopia* and *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis* on the bacterial strains studied in particular; *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium vitis* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

The antifungal tests to crude extracts showed a highly significant efficiency of spontaneous species, *Calendula arvensis* and *Raphanus raphanistrum* with percentages of inhibition that exceed 55%.

The results of the nematicidal effect showed a highly significant efficiency of *Urtica dioica* by inducing until to 100% mortality of larvae after 72 h of treatment.

**Keywords:** *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, *Urtica dioica*, *Raphanus raphanistrum*, aqueous extract, biopesticide activity.

## ملخص

تقييم مخبري لنشاط مضاد بكتيري مضاد فطري و مضاد نيماتودي لأربعة نباتات تلقائية

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضاد بكتيري و مضاد نيماتودي لمستخلصات مائية خام لأربعة *Urtica dioica Plantago lanceolata و Calendula arvensis، Euphorbia helioscopia* نباتات

و ضد فطري لنفس النباتات المذكورة اضافة *Raphanus raphanistrum*

الى كل المستخلصات النباتية أظهرت نتائج ايجابية كما و نوعا على 7 بكتيريات *Agrobacterium tumefaciens Ralstonia solanacearum Agrobacterium vitis, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora pv. Carotovora, Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis, Xanthomonas campestris pv. citri, Fusarium oxysporum* 10 فطريات *Fusarium solani, Alternaria alternata, Alternaria chlamydosporia, Rhizoctonia solani, Gaeumannomyces graminis var tritic و Aspergillus fumigatus, Phomopsis vaccinii*

و النيماتود العقدي *Meloidogyne*

التأثير الضد بكتيري *Plantago lanceolata, Calendula arvensis Euphorbia helioscopia* أظهرت نشاط جد قوي على *Erwinia carotovora pv. carotovora, michiganensis* النباتات *subsp. michiganensis. Erwinia amylovora, Agrobacterium vitis Clavibacter* السلالات

النتائج المتحصل عليها في تقييم التأثير امضاد فطري أظهرت فعالية جد كبيرة للنباتتين *Calendula arvensis Raphanus* بنسبة (55%)

*raphanistrum*

نتائج الفعالية الضد نيماتودية أظهرت تأثير جد *Urtica dioica* وذلك بعد الحصول على نسبة الديدان الميتة

معتبر للنبته

الكلمات المفتاحية : *Calendula arvensis, Euphorbia helioscopia, Plantago lanceolata* ,

*Urtica dioica Raphanus raphanistrum* , مستخلصات مائية خام نشاط ضد حيوي.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

Je tiens à remercier les membres de jury de thèse d'avoir accepté d'honorer et d'enrichir mon travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance et mes respects.

Je tiens à exprimer ma gratitude, mes sincères remerciements, ma reconnaissance et mes respects à ma promotrice **Professeur KRIMI Z.** de m'avoir dirigée, orientée et aidée par ses précieux conseils tout le long de ce travail, sa rigueur scientifique, ses qualités humaines, sa présence, sa patience, ainsi que sa disponibilité.

Mes sincères remerciements et mes respects vont à ma co-promotrice **Madame NEBIH D.** pour son encadrement, son aide et sa disponibilité.

Mes vifs remerciements et mes respects vont à **Professeur BOUTEKRABT A.** qui me fait l'honneur de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements et ma grande considération au **Docteur DJAZOULI Z.,** pour sa disponibilité et ses conseils tant enrichissants, son aide dans la réalisation de toutes les analyses statistiques de ce travail, qui, grâce à lui, j'ai appris toutes les fonctionnalités du logiciel SYSTAT. Veuillez accepter Dr, le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je voulais remercier amplement **Docteur GUENDOUIZ-BENRIMA A.** d'avoir bien voulu accepter d'être membre de jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont sans doute à mes parents ainsi que ma sœur SAMIRA et mes frères MOHAMED et IMAD qui n'ont cessé à me soutenir.

A tous mes enseignants et mes professeurs qui ont assuré ma formation sans oublier les personnels du département d'agronomie de Blida.

Aux personnels de la bibliothèque et du laboratoire de phytobactériologie et de zoologie pour leur disponibilité et leur compréhension en particulier AMINA et DJAMILA. A Mme SAHRAOUI, Mme BENBLIDIA et Mme MOHAMED MAHMOUD ainsi que ma chère amie LABDI Chems El Houda qui m'a soutenue.

Je remercie également toute personne ayant contribué de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

## DEDICACES

***Je dédis ce modeste travail :***

*Aux êtres les plus chers au monde, mes parents qui m'ont encouragée  
durant ces années d'études.*

*A ma sœur Samira et mes frères Mohamed et Imad, qui m'ont soutenue.*

*A tous mes oncles et toutes mes tantes.*

*A mes cousins et cousines*

*A toute la famille TAFIFET et KERMEZLI.*

*A tous mes enseignants.*

*A Mme et Mr Ramdane.*

*A tous mes collègues de PG protection des plantes et environnement  
(2009/2010)*

*A tous mes amis en particulier : Houda L, Amel Z, Selma, Kheira, Rym,  
Hafedha, Nardjess, Zaza, Wassila.*

*TAFIFET Lamia*

## TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	
REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
TABLE DES MATIERES	
Liste des illustrations et graphiques	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION .....	8

### **CHAPITRE 1 : LES BACTERIES PHYTOPATHOGENES ..... 12**

1.1. Taxonomie et caractéristiques des bactéries phytopathogènes.....	12
1.1.1 . Les bactéries macergènes ou agents de pourritures molles .....	13
1.1.2. Les bactéries nécrogènes.....	14
1.1.3. Les bactéries glaçogènes .....	14
1.1.4. Les bactéries vasculaires .....	15
1.1.5. Les bactéries oncogènes.....	15
1.2. Les fonctions requises pour les bactéries phytopathogènes, pour la colonisation de l'hôte .....	16
1.2.1. Mode d'action des bactéries phytopathogènes.....	17
1.2.2 Le quorum sensing .....	19
1.3. Régulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes.....	19
1.4. Importance économique des bactéries phytopathogènes .....	21

### **CHAPITRE 2 : LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES..... 22**

2.1. Généralités sur les champignons phytopathogènes.....	22
2.2. Les différents mécanismes de parasitisme chez les champignons phytopathogènes.....	22
2.3. Cycle parasitaire des champignons phytopathogènes.....	23
2.3.1 Adhésion des spores et pénétration dans la plante.....	23
2.3.2. Spécificité d'hôte et reconnaissance par la plante hôte.....	24
2.3.3. Colonisation de la plante-hôte.....	24
2.3.4. Sporulation .....	25
2.4. Maladies fongiques dues aux champignons phytopathogènes et impact économique.....	25

### **CHAPITRE 3: LES NEMATODES PHYTOPARASITES ..... 29**

3.1 Généralités .....	29
3.2. Importance économique des nématodes phytoparasites .....	30

3.3. Position systématique des nématodes à galles .....	32
3.4. Morphologie des nématodes à galle .....	33
3.5. Variabilité interspécifique chez les nématodes à galles.....	33
3.6. Séquençage du génome de nématode à galles.....	34
3.7. Biologie et cycle de développement.....	34
3.8. Importance économique des nématodes à galle .....	36
3.9. Notion d'indice de galle .....	38

## **CHAPITRE 4: LUTTE CONTRE LES MALADIES ET LES DEGATS CHEZ LES PLANTES .....39**

4.1. La lutte préventive .....	39
4.1.1. Les mesures de certification et de quarantaine .....	39
4.1.2. L'hygiène .....	41
4.1.3. La rotation .....	41
4.1.4. Le travail du sol.....	42
4.2. La lutte curative .....	42
4.2.1. La lutte physique .....	42
4.2.1.1. Effet de la température sur les organismes vivants .....	42
4.2.1.2. La solarisation.....	43
4.2.1.3. La thérapie .....	43
4.2.2. La lutte chimique .....	43
4.2.3. La lutte génétique .....	44
4.2.4. La lutte biologique .....	45
4.3. Importance des biopesticides d'origine végétale .....	47
4.4. Les pesticides d'origine végétale utilisés actuellement.....	49
4.4.2. l'azadirachtine .....	49
4.4.3. Les huiles essentielles .....	50
4.4.4. Les glycosinolates .....	50

## **CHAPITRE 5: MATERIEL ET METHODES.....52**

5.1. Introction .....	52
5.2. Objectifs .....	52
5.3. Matériel végétal .....	53
5.3.1. Espèces végétales étudiées.....	53
5.3.2. Description botanique et activités biologiques des espèces choisies.....	54
5.3.2.1. <i>horbia helioscopia</i> ou Euphorbe réveille-matin ( <i>Euphorbiaceae</i> ).....	54
5.3.2.3. <i>Calendula arvensis</i> ou Souci des champs ( <i>Asteraceae</i> ou <i>Compositae</i> ) .....	54
5.3.3. Récolte et conservation du matériel végétal.....	55
5.3.4. Préparation des extraits aqueux.....	56
5.3.5. Préparation de la gamme de concentration des filtrats végétaux .....	57
5.4. Tests biologiques.....	57
5.4.1. Evaluation de l'activité bactéricide des extraits aqueux .....	57
5.4.1.1. Souches bactériennes testées .....	57
5.4.1.3. Préparation de l'inoculum bactérien .....	58
5.4.1.4 Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal .....	59
5.4.1.4.1 Méthode de diffusion sur gélose.....	59
5.4.1.4.2 Méthode de spectrophotométrie.....	60
5.4.2. Etude du pouvoir antifongique <i>in vitro</i> des extraits aqueux.....	60



5.4.2.1. Les souches fongiques et milieux de culture .....	60
5.4.2.2. Activité antifongique <i>in vitro</i> .....	61
5.4.2.3. Test de sporulation.....	62
5.4.3. Evaluation de l'efficacité nématocide des extraits aqueux .....	63
5.4.3.1 Extraction et préparation des larves (J2) de <i>Meloidogyne</i> .....	63
5.4.3.2 Test <i>in vitro</i> de l'efficacité nématocide sur les larves .....	63
5.5. Calcul des concentrations létales 50.....	64
5.6. Analyse statistique des résultats.....	65
<b>CHAPITRE 6 : RESULTATS .....</b>	<b>65</b>
6.1. Résultats de l'effet bactéricide des biopesticides étudiés .....	65
6.1.1. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits végétaux par la méthode du spray .....	65
6.1.2. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits végétaux par la méthode de spectrophotométrie .....	73
6.2. Evaluation du pouvoir antifongique des extraits végétaux sur les 10 isolats fongiques choisis.....	76
6.2.1. Etude des corrélations des extraits aqueux et leurs dilutions vis-à-vis des souches fongiques testées.....	80
6.2.2. Résultats d'étude du test de sporulation .....	82
6.3. <i>Efficacité nématocide des extraits végétaux testés .....</i>	<b>83</b>
6.3. 1. <i>Evaluation de la toxicité des extraits aqueux et du Vydate. ....</i>	<b>83</b>
6.3.2. Variations de l'effet des différents traitements (extraits végétaux et produit chimique) sur les larves (J2) de <i>Meloidogyne</i> en fonction du temps.....	88
6. 3.3. Évaluation de l'effet irréversible des traitements effectués.....	89
6.4. calcul de la CL 50.....	91
<b>CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>93</b>
7.1. Des plantes spontanées à pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne	94
7.2. Activité fongistatique et fongicide des espèces végétales spontanées.....	98
7.3. Effet toxique des extraits aqueux sur les nématodes à galles .....	101
CONCLUSION.....	106
APPENDICES.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	126

## LISTE DES ILLUSTRATION, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1.</b> Vue d'ensemble schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines chez les bactéries Gram négatif [59].	18
<b>Figure 2.1.</b> Principaux symptômes causés par les champignons phytopathogènes.	26
<b>Figure 3.1.</b> Cycle de développement des nématodes à galles [148 ; 147].	36
<b>Figure 3.2.</b> Dégâts sur racines de tomate (A), carotte (B), concombre (C), laitue (D) et sur tomates en serre (E) et melons en plein champ (F) [147].	38
<b>Figure 5.1 :</b> Les cinq espèces végétales utilisées dans les activités antagonistes [originale]	53
<b>Figure 6.1.</b> Pouvoir antibactérien des extraits aqueux représentés par des zones d'inhibition [originale].	67
<b>Figure 6.2.</b> effet des extraits des plantes spontanées, compartiments de plante, dose d'extrait ; sur les sept souches bactériennes	
<b>Figure 6.3.</b> Sensibilité des bactéries à chaque espèce spontanée et ses compartiments.	70
<b>Figure 6.4 :</b> Cercle de corrélation des huit extraits avec leurs différentes dilutions.	71
<b>Figure 6.5.</b> Classification hiérarchique ascendante des différents extraits avec leurs dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes).	71
<b>Figure 6.6.</b> Analyse en Composantes Principales (ACP) des sept souches bactériennes.	72
<b>Figure 6.7 :</b> Effet des extraits des plantes spontanées sur la croissance des souches bactériennes après 24h d'incubation.	75
<b>Figure 6.8.</b> Effet des extraits des plantes sur la croissance bactérienne après 48H d'incubation.	76
<b>Figure 6.9.</b> Pouvoir antifongique des extraits bruts testés représentés par l'inhibition de la croissance mycélienne.	78
<b>Figure 6. 10.</b> Effet des extraits des plantes spontanées (compartiment, dose) sur les isolats fongiques.	79

<b>Figure 6.11.</b> Classification hiérarchique des différents extraits avec leurs différentes dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes). .....	81
<b>Figure 6.12.</b> Analyse en Composante Principale (ACP) des dix souches fongiques. ....	82
<b>Figure 6.13.</b> Suivi de la croissance mycélienne après ré-ensemencement.....	83
<b>Figure 6.14:</b> Effet fongistatique de l'extrait de <i>Raphanus raphanistrum</i> sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	83
<b>Figure 6.15.</b> Toxicité des extraits aqueux des plantes et du Vydate en fonction du temps.....	85
<b>Figure 6.16.</b> comparaison de l'effet choc après 6h entre le Vydate et l'extrait aqueux de l'ortie .....	86
<b>Figure 6.17.</b> Activité nématocide des extraits aqueux sur le comportement des larves de <i>Meloidogyne</i> spp. [originale] .....	87
<b>Figure 6.18.</b> Classification hiérarchique ascendante des différents extraits végétaux et le Vydate avec leurs dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes).....	88
<b>Figure 6.19.</b> Analyse en Composantes Principales (ACP) des différents traitements en fonction du temps d'exposition des larves de <i>Meloidogyne</i> .....	89
<b>Figure 6.20.</b> Revitalisation des juvéniles de <i>Meloidogyne</i> après 72h de traitement. ....	91
<b>Tableau 1.1</b> Position taxonomique des principaux genres de procaryotes phytopathogènes [18].....	13
<b>Tableau 3.1.</b> Principaux nématodes phytoparasites et principales cultures attaquées [121].....	31
<b>Tableau 6.1.</b> Résultats des tests de sensibilité des sept souches aux extraits purs et à leurs différentes dilutions (Diamètres des zones d'inhibition en mm).....	66
<b>Tableau 6.2.</b> Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiments et doses des extraits sur le diamètre d'inhibition des bactéries. ....	68
<b>Tableau 6.3.</b> Modèle G.L.M. appliqué au pouvoir antibactérien de chaque espèce spontanée.....	69
<b>Tableau 6.4.</b> Résultats des tests de sensibilité des souches bactériennes aux extraits végétaux après 48h de traitement exprimés en pourcentages d'inhibition.....	74

<b>Tableau 6.5.</b> Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiments et doses des extraits sur la croissance bactérienne après 24h de traitement.....	75
<b>Tableau 6.6.</b> Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiment et dose des extraits sur la croissance bactérienne après 48h de traitement. ....	76
<b>Tableau 6.7.</b> Résultats des tests du pouvoir antifongique de l'extrait de <i>Calendula arvensis</i> avec les dix souches fongiques. ....	77
<b>Tableau 6.8.</b> Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres.....	79
<b>Tableau 6.9.</b> Croissance mycélienne (mm) de <i>Fusarium oxysporum</i> inhibée par l'extrait de <i>Raphanus raphanistrum</i> après ré-ensemencement .....	82
<b>Tableau 6.10.</b> Effet des différents extraits des plantes et du Vydate sur les taux moyens de mortalité les larves (L <sub>2</sub> ) de <i>Meloidogyne</i> . ....	84
<b>Tableau 6.11.</b> Modèle G.L.M. appliqué au pouvoir nématocide des traitements utilisés (N: 108).....	84
<b>Tableau 6.12.</b> modèle GLM appliqué sur l'effet choc après 6h entre le Vydate et l'extrait aqueux de l'ortie .....	86
<b>Tableau 6.13.</b> les taux de revitalisation des les larves (L <sub>2</sub> ) de <i>Meloidogyne</i> .....	90
<b>Tableau 6.14 :</b> modèle GLM appliqué sur le taux de la revitalisation de <i>Meloidogyne</i> après traitement. ....	90
<b>Tableau 6.15.</b> CI 50 des extraits aqueux et du Vydate pour les tests nématocide.	91
<b>Tableau 6.16.</b> CI 50 des extraits aqueux pour les tests antifongiques .....	92
<b>Tableau 6.17.</b> CI 50 des extraits aqueux pour les tests antifongiques.....	92

## INTRODUCTION

Les plantes faisant partie elles mêmes des ressources naturelles vivantes, sont aussi la source directe ou indirecte par le lien trophique de l'ensemble des êtres vivants sur la planète (êtres humains, bactéries, champignons,...). Elles exercent des fonctions écologiques et économiques très diversifiées; certaines espèces végétales constituent différentes sources industrielles, énergétiques et pharmaceutiques [1].

Toutefois, les plantes sont attaquées non seulement par divers types de micro-organismes pathogènes, mais aussi par d'autres ennemis parmi lesquels; des mollusques, des nématodes, des acariens et des insectes. Elles peuvent développer des stratégies complexes et efficaces pour faire face aux pathogènes.

Les maladies affectant les plantes peuvent être d'origine fongique, virale ou bactérienne. Ces organismes attaquent toutes les parties de la plante et génèrent des symptômes très variés causant des dégâts sur les cultures et par conséquent des pertes agricoles. Le contrôle de ces maladies des plantes se doit d'être efficace en utilisant des méthodes de lutte conventionnelles représentées par les méthodes physiques, chimiques, génétiques et biologiques.

À partir de la seconde guerre mondiale, l'essor de la chimie organique associé à la prise en considération des problèmes du monde agricole a débouché sur la mise au point d'un nombre sans cesse croissant de produits phytosanitaires. Ils se répartissent actuellement en une dizaine de classes, les herbicides, les fongicides et les insecticides-acaricides, représentant plus de 90% du marché mondial [2].

Les méthodes de lutte chimiques sont efficaces contre les champignons par l'utilisation de fongicides alors que les maladies virales et bactériennes sont incurables et nécessitent des moyens de lutte préventifs.

L'usage des produits pesticides est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. Selon les constatations des experts mondiaux, la demande en pesticides est telle que leur quantité de production double pratiquement tous les 10 ans depuis 1945. Ce sont les pays en voie de développement qui les utilisent de plus en plus. Au niveau mondial, la valeur marchande des pesticides est de l'ordre de 32 milliards de dollars, dont 3 milliards pour les pays en voie de développement [3].

Les phénomènes de résistance des agents phytopathogènes et des ravageurs aux pesticides ont conduit à utiliser des concentrations de plus en plus fortes de substances actives. Cette augmentation s'est révélée source de désordres écologiques qui ont été qualifiées « d'effet 4R » pour résistance, rémanence, résurgence et rupture des chaînes trophiques [4].

A titre d'exemple, les organochlorés sont particulièrement rémanents dans la biosphère et leur diffusion à travers ses différents compartiments va provoquer des contaminations qui ne sont pas sans conséquences. Les risques provoqués par l'accumulation de leurs résidus se sont accrus : fragilisation des écosystèmes, impact sur la reproduction ainsi que sur la santé humaine. Ces effets intentionnels touchent également les insectes auxiliaires. Ces phénomènes de résistance aux insecticides observés sur les insectes sont également apparus chez les champignons vis-à-vis des fongicides mais aussi chez les adventices pour les herbicides [5].

Face à ces profils toxicologiques et écotoxicologiques nettement importants constatés au cours de ces dernières décennies et qui sont liés à l'accumulation des résidus de pesticides, il était urgent de développer des méthodes de contrôle et de protection plus écologiques tout comme les approches alternatives complémentaires et innovantes. Cette démarche s'inscrit dans le cadre du développement d'une protection intégrée, raisonnée ou biologique telle que l'utilisation de biopesticides.

Les biopesticides occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie. Ils s'appliquent avec un

pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologiques classiques (ex. lâchers de prédateurs ou de parasites), même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles [6 ; 7]. Les biopesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes.

En 1998, si le marché des pesticides était évalué à 31,2, milliards USD dont 9 pour les seuls insecticides, celui des biopesticides s'élevait seulement à 240 millions USD [8]. Depuis 1997, le pourcentage d'utilisation de biopesticides a progressivement augmenté avec un accroissement de 10% par an [9].

Le biopesticide d'origine microbienne qui a connu le plus grand succès commercial, le *Bacillus thuringiensis* occupe cette dernière décennie environ 1,5 % du marché mondial des insecticides [10].

D'autre part, l'histoire de l'humanité est associée à l'utilisation des plantes ou d'extraits de plantes pour leurs effets thérapeutiques. FABRE et DILLEMANN [11], considèrent comme la plus vieille pharmacopée du monde une tablette sumérienne, gravée au cours du III<sup>e</sup> millénaire avant J-C. et sur laquelle figurent des indications sur l'usage thérapeutique d'extraits végétaux.

Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales [12].

A cet effet, de nombreuses espèces végétales ont été répertoriées comme présentant une activité biopesticide sur une large gamme d'insectes phytophages, de bactéries, de champignons et de nématodes phytoparasites.

Dans ce contexte, la présente étude rentre dans le cadre de la recherche et l'inventaire de la flore naturelle locale pouvant présenter des effets pesticides. Elle a pour objectifs de valoriser certaines plantes considérées habituellement comme

mauvaises herbes et de mettre au point des méthodes de lutte intégrées peu coûteuses, efficaces et facilement utilisables par les agriculteurs.

Ce travail est basé sur l'étude de l'effet bactéricide et nématocide d'extraits bruts aqueux issus de quatre espèces végétales (*Urtica dioica*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia*, *Calendula arvensis*) et l'effet fongicide d'une Crucifère ; *Raphanus raphanistrum* en même temps que les quatre autres espèces citées.

Les extraits aqueux obtenus (parties aériennes et parties souterraines) avec les différentes concentrations sont testés *in vitro* à l'égard d'une gamme de bactéries et champignons phytopathogènes ainsi que des nématodes à galles. A travers notre démarche scientifique, nous cherchons à répondre aux hypothèses suivantes :

Les extraits aqueux des quatre espèces adventices *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* et *Urtica dioica* sont ils efficaces *in vitro* sur les larves des nématodes à galles *Meloidogyne* spp. et, présentent ils une activité fongicide et bactéricide *in vitro* sur des champignons et les bactéries phytopathogènes ?



# CHAPITRE 1

## LES BACTERIES PHYTOPATHOGENES

Chez les plantes, le nombre de bactéries infectant les végétaux est faible par rapport aux bactéries saprophytes et celles infectant les animaux [13]. Actuellement, une grande attention est faite sur le potentiel des organismes phytopathogènes entre autres les bactéries [14 ; 15] qui sont considérés comme des agents bioterroristes ou bioagresseurs et classés dans la liste des organismes de quarantaine [15]. Ces microorganismes constituent une menace pour la sécurité nationale du fait des pertes qu'ils causent sur les récoltes [15].

### 1.1. Taxonomie et caractéristiques des bactéries phytopathogènes

Actuellement 350 espèces, sous-espèces ou pathovars ont été dénombrées appartenant à 21 genres, se répartissant dans diverses familles [16]. Elles sont non sporulées, aérobies strictes ou anaérobies facultatives et appartiennent aussi bien à la sous-division des *Firmicutes* (Gram positif) qu'à celle des *Gracillicutes* (Gram négatif). La sous-division des *Ténéricutes* contient aussi des bactéries phytopathogènes (les spiroplasmes et les phytoplasmes) dont l'absence de paroi, les caractères de parasites généralement biotrophes intracellulaires en font des micro-organismes au comportement pathogène particulier [16]. Ces derniers microorganismes sont en général inféodés au phloème des plantes malades.

Les bactéries pénètrent les tissus végétaux par les ouvertures naturelles telles que les stomates, les hydathodes, les néctarthodes, les cicatrices foliaires et les lenticelles [17]. Les bactéries phytopathogènes causant les principales maladies sont réparties chez les principaux genres suivants : *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Erwinia spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Clavibacter spp.*, *Ralstonia spp.* et *Ponthoea spp.* (Tableau 1.1).

Les bactéries produisent des symptômes variés sur les plantes infectées tels que les nécroses, les flétrissements, Les pourritures molles et les tumeurs ; en utilisant différentes stratégies dans leurs mécanismes d'action.

**Tableau 1.1** Position taxonomique des principaux genres de procaryotes phytopathogènes [18].

<b>Bactérie Gram - : <i>Proteobacteria</i></b>	<b>Genres</b>
Section des $\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Agrobacterium</i>
Section des $\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>
	<i>Ralstonia</i>
Section des $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidovorax et Xylophilus</i>
	<i>Erwinia</i>
	<i>Pseudomonas</i>
Section des $\delta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonas</i>
Section des $\epsilon$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Liberobacter</i>
<b>Bactérie Gram +</b>	
<b>Contenu en C+G &lt; 50%</b>	
Section des <i>Clostridia</i>	<i>Clostridium</i>
Section des <i>Mollicutes</i>	<i>Phytoplasma et Spiroplasma</i>
Section des <i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>
<b>Contenu en C+G &gt; 50%</b>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i>
	<i>Clavibacter</i>
	<i>Rhodococcus</i>
	<i>Sterptomyces</i>

Selon le mode d'action utilisé, quatre types de bactéries ont pu être classées : Les bactéries macergènes, les bactéries nécrotrophes ou nécrogènes, les bactéries glaçogènes, les bactéries vasculaires et les bactéries oncogènes [18].

#### 1.1.1 . Les bactéries macergènes ou agents de pourritures molles

Ces bactéries produisent des enzymes pectinolytiques induisant la polarisation et la liquéfaction des tissus [19]. Au contact de l'air, le contenu cellulaire brunit par oxydation des phénols et dégage une odeur nauséabonde caractéristique de la pourriture molle [20]. Les symptômes typiques rencontrés chez les différents pathovars d'*Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovora*) sont favorisés par une atmosphère confinée, un excès d'humidité et par les blessures qui favorisent la pénétration des bactéries en surface ou logées dans les lenticelles [21]. Les bactéries pectinolytiques infectent de nombreux organes (racines de carotte, navet, betterave, bulbes d'oignon, tiges du céleri, fruits de

tomate, tubercules de pomme de terre, ....etc), soit en cours de végétation ou pendant la conservation [18].

### 1.1.2. Les bactéries nécrogènes

Les bactéries nécrogènes produisent des symptômes de type nécroses foliaires ou racinaires. Le cas le plus décrit est l'espèce *Erwinia amylovora* agent causal du feu bactérien des Rosacées fruitières à pépins [22]. Outre les *Maloideae*: pommier (*Malus domestica*), poirier (*Pyrus communis*), Cognassier (*Cydonia oblonga*), cette maladie infecte environ 150 espèces dont 36 genres de la famille des Rosacées, qui pour la plupart sont des arbustes ou des arbres d'ornement (*Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, *Rubus* et *Sorbus*) [23; 24].

La multiplication et la progression des bactéries dans le parenchyme sont accompagnées par des nécroses de tissus mais chez les cultivars résistants, les nécroses sont limitées aux sites d'infection [25]. En effet, les symptômes de type nécrose sont le résultat de l'action de diverses protéines secrétées par le pathogène selon un système dit 'système de sécrétion de type III' [26; 25].

La bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *citri* est une autre espèce nécrogène redoutable causant la maladie du chancre bactérien des agrumes (*Rutaceae*). Cet agent infecte l'ensemble des parties aériennes de l'arbre [18]. De par la sévérité des symptômes qu'elle induit; des chutes précoces de fruits, altération de leur qualité externe, défoliations importantes, chancres sur rameaux, cette bactérie a été classée dans la liste des organismes de quarantaine A1 de l'OEPP [27; 28]. La dissémination de la bactérie est principalement réalisée par la pluie et le vent et par la commercialisation de plants de pépinière infectés [29; 30].

### 1.1.3. Les bactéries glaçogènes

L'exemple typique est l'espèce *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* agent du bactériose très grave sur les arbres fruitiers à noyaux. Ce type de bactéries induit la formation de cristaux de glace à des températures voisines de 0°C. à -5°C. [31; 18]. Ces populations épiphytes constituent la source majeure de la cristallisation nucléique corrélée à la présence du gène *ICE* qui code pour une protéine localisée sur la membrane externe de la bactérie [32]. Elles sont actives à un

niveau d'humidité très bas en surface des feuilles où elles constituent une réserve de l'inoculum et de l'initiation des maladies. Ces bactéries possèdent un système de sécrétion des protéines analogue au type III [33].

#### 1.1.4. Les bactéries vasculaires

Les bactéries vasculaires envahissent les vaisseaux conducteurs du xylème des racines, se disséminent à travers la tige et provoquent le flétrissement par la production excessive d'exopolysaccharides (EPS). Elles sont appelées trachéobactéries, l'exemple type est décrit par l'espèce *Ralstonia solanacearum* [34]. *Ralstonia solanacearum* est un organisme de quarantaine de la liste A2 [35]. Cette bactérie phytopathogène présente un très vaste spectre d'hôtes constitué par plusieurs centaines d'espèces spontanées et cultivées, mais sévit surtout sur les Solanacées [36].

L'espèce *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*Corynebacterium michiganensis*) est également une bactérie vasculaire responsable du chancre bactérien de la tomate, c'est un agent pathogène de quarantaine de la liste A2 de l'OEPP et est transmis par les semences [37]. En cas d'infection, cette dernière bactérie se localise dans les vaisseaux du xylème [38] où elle provoque des cavités lysogènes. Les vaisseaux contaminés contiennent des dépôts granulaires visqueux, des thylls et des masses bactériennes [39]. Le pathogène produit aussi un glycopeptide toxique biologiquement actif [40].

Ce type de bactéries forme une capsule ou du mucus de nature polysaccharidique (EPS), autour des bactéries assurant pour ce fait une protection de la bactérie dans l'environnement et contribuant à la virulence par le blocage des vaisseaux du xylème et ayant pour conséquence ; les symptômes de flétrissement [41].

#### 1.1.5. Les bactéries oncogènes

Les bactéries phytopathogènes appartenant à ce groupe provoquent la prolifération incontrôlée des cellules des tissus infectés liée à une surproduction de substances de croissance. Ce type de symptômes d'hyperplasies et d'hypertrophies cellulaires est observé chez *Agrobacterium spp.* se traduisant par la présence d'excroissances (tumeur) plus ou moins sphériques, blanchâtres, spongieuses à fermes et dont le surface est irrégulière [42; 43].

Une tumeur est formée suite au transfert, à l'intégration et à l'expression des gènes de l'ADN-T chez la plante. Le transfert de ce brin sous forme d'une nucléoprotéine vers la cellule végétale a été décrit selon un système de sécrétion de type IV [43; 44]. Le fragment d'ADN ainsi intégré dans le génome de la cellule végétale s'exprime et la cellule végétale est colonisée génétiquement pour produire des hormones de croissance d'une manière anarchique, ainsi que des substances dites opines ; nécessaires au métabolisme bactérien.

Les symptômes induits par *Agrobacterium tumefaciens* peuvent s'observer au collet ou sur les racines induisant la maladie connue sous le nom de 'crown gall' ou galle du collet. La gamme d'hôtes de cette bactérie est très large, elle regroupe 643 espèces de plantes comprises dans 93 familles [44]. D'autres espèces ; *Agrobacterium vitis* et *A. rubi* induisant respectivement le crown gall de la vigne et le 'cane gall' du *Rubus*; provoquent les mêmes types de symptômes [45].

## 1.2. Les fonctions requises pour les bactéries phytopathogènes, pour la colonisation de l'hôte

Si la rencontre d'une bactérie phytopathogène avec une plante fait généralement intervenir un agent vecteur (insectes, nématodes) ou des facteurs physiques (eau d'irrigation, pluie), il n'en demeure pas moins que pour être efficace, l'infection doit ensuite permettre à l'agent pathogène d'atteindre ses sites cibles de pénétration (stomates, hydrotodes, blessures naturelles et artificielles) et de s'y maintenir afin de permettre la colonisation ultérieure des tissus de la plante [46].

La capacité d'attachement d'une bactérie sur les tissus végétaux est un facteur qui influe fortement sur le développement ultérieur de l'interaction pathogène. Ainsi, il a été démontré qu'un mutant *attR* d'*Agrobacterium tumefaciens* qui a perdu la capacité à synthétiser des fibrilles de cellulose impliquées dans l'attachement aux cellules végétales, est fortement affecté dans sa capacité à coloniser le système racinaire des plantes. Un tel mutant ayant totalement perdu la capacité d'induire le développement de tumeurs sur des plants de tomate [47].

### 1.2.1. Mode d'action des bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des microorganismes extracellulaires. En se basant sur la spécificité parasitaire, ces derniers peuvent s'accroître sur la surface de la plante, entre les cellules des tissus (apoplaste) ou dans le système vasculaire [41; 48].

L'apoplaste est considéré comme l'environnement défavorable pour certains microorganismes, du fait qu'il contient plusieurs composés antimicrobiens et il est relativement pauvre en nutriments [49; 50; 51; 52].

La plante constitue pour l'agent phytopathogène une source importante de substrat à exploiter pour assurer sa propre croissance. Les bactéries phytopathogènes pour se nourrir et se multiplier aux dépens de la plante, utilisent plusieurs mécanismes de pathogénie, à savoir ; l'acquisition du fer ; les enzymes de dégradation des parois (enzymes hydrolytiques), en particulier les enzymes cellulolytiques et pectinolytiques [46].

Les exopolysaccharides (EPS) bactériens constituent aussi un mécanisme important notamment chez les bactéries des genres ; *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Ralstonia* aboutissant à l'occlusion vasculaire de la plante. Enfin, les toxines et les régulateurs de croissance gouvernent la production de symptômes spécifiques et les gènes *hrp* impliqués dans la sécrétion d'enzymes particulières contrôlant la physiologie de l'hôte [46].

En général, la sécrétion extracellulaire des protéines est considérée comme un mécanisme important de la virulence de l'infection bactérienne (figure 1.1). Les protéines destinées à l'environnement extracellulaire des bactéries à Gram-, doivent traverser les deux membranes au cours d'un transfert à travers l'enveloppe cellulaire bactérienne [58]. Il s'agit de la translocation à travers la membrane cytoplasmique et la membrane externe, qui sont séparées par le compartiment périplasmique et la couche de peptidoglycane [53].

Six voies pour la sécrétion extracellulaire ont été identifiées à ce jour [58]. Il s'agit notamment de la voie de sécrétion dite ; de type I, de type II, type III, type IV, type V et de type VI [54; 55; 56; 53; 57].

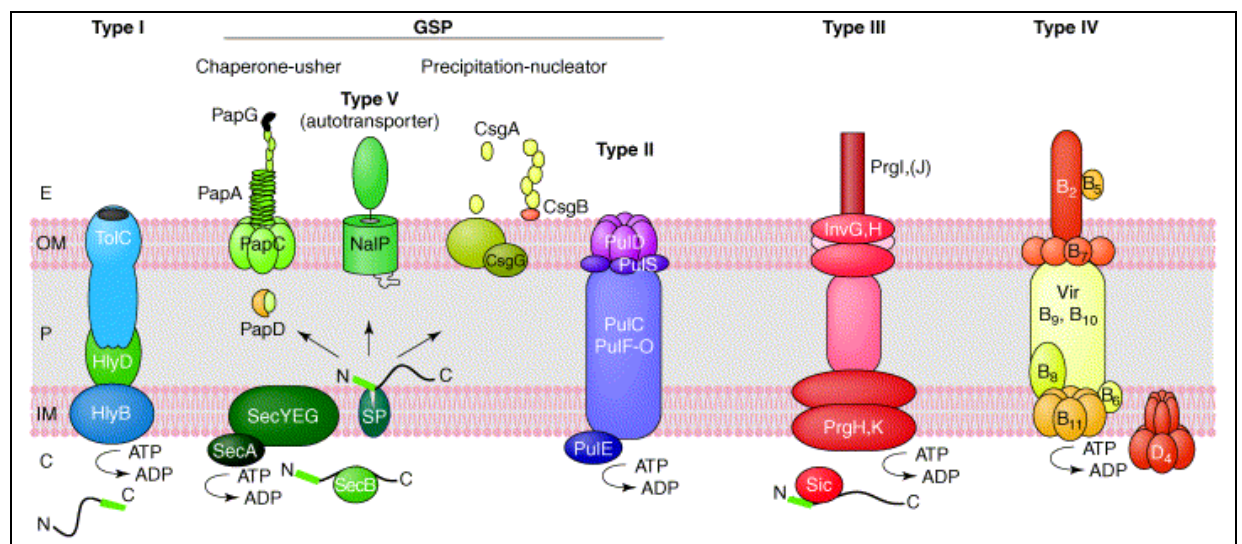
Le système de sécrétion de type I est présent chez la plupart des bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* *Xanthomonas citri* [57]. Ce système effectue la sécrétion de toxines [17].

La voie de sécrétion de type II se retrouve chez les bactéries à Gram négatif en particulier les nécrotrophes (*Xanthomonas citri*), elle est impliquée dans le transfert de protéines, de toxines et de facteurs de virulence [17].

La voie de sécrétion de type II est codée par au moins 12 gènes et plus particulièrement favorable au transport d'un groupe de protéines en apparence non reliés à travers la membrane externe [53].

Le système de sécrétion de type III est rencontré chez les bactéries biotrophes (*Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*) [57]. Le système de sécrétion de type III permet le transfert de protéines effectrices à travers la membrane bactérienne vers la plante hôte [17].

Le système de sécrétion de type IV chez *Agrobacterium tumefaciens* sert pour le transfert du T-DNA vers la cellule hôte [57]. Le système de sécrétion de type V est un système analogue et dérivé du type II. Cependant, le système de sécrétion de type IV appelé système tubulaire, récemment décrit chez un certain nombre de bactéries pathogènes à l'homme et aux plantes, permet le transport de deux types de protéines particulières ; Hcp et VgrG dont la sécrétion est analogue à la sécrétion des bactériophages [58].



**Figure 1.1.** Vue d'ensemble schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines chez les bactéries Gram négatif [59].

**C**, espace cytoplasmique ; **E**, espace extracellulaire ; **IM**, membrane intérieure ; **OM**, membrane externe ; **P**, periplasme.

### 1.2.2 Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme de régulation dépendant de la densité de population et contrôlant l'expression de certains gènes bactériens, notamment les gènes de virulence. Le QS permet donc la synchronisation de l'expression (ou de la répression) de gènes cibles au sein d'une population bactérienne [60].

Les bactéries à Gram négatif utilisent le quorum sensing pour contrôler leur densité de population en sécrétant de petites molécules de signalisation diffusibles appelées auto-inducteurs. Ces molécules assurent la communication entre deux cellules bactériennes et certains caractères ne sont exprimés que lorsque les bactéries sont accumulées à un certain seuil de densité cellulaire [41].

Le quorum sensing permet aux bactéries de produire et libérer des molécules de signalisation chimique ou auto-inducteurs qui provoquent l'augmentation de la concentration en fonction de la densité cellulaire [61]. Ces processus incluent la symbiose, la virulence, la compétence, la conjugaison, la production d'antibiotiques, la mobilité, la sporulation et la formation du biofilm bactérien [61].

### 1.3. Régulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes

Plusieurs espèces de bactéries phytopathogènes appartenant notamment aux genres *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Ralstonia*, produisent des quantités importantes d'exopolysaccharides (EPS) en culture pure ou lors de leur multiplication dans les plantes [62]. Chez *Ralstonia solanacearum*, des études ont montré que les EPS sont impliqués dans la pathogénie mais également dans les étapes précoces du processus infectieux en facilitant la progression de l'agent pathogène dans les tissus de l'hôte [46]. L'EPS intervient aussi dans les stades tardifs de la maladie en provoquant l'occlusion des vaisseaux du xylème dans les plantes infectées [63]. Plusieurs études ont révélé aussi que l'EPS peut jouer un rôle protecteur sur la bactérie vis-à-vis des réactions de défense de la plante, induites par la présence bactérienne [64].



Chez la bactérie *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, la régulation de la production des exo-enzymes, d'antibiotiques et d'enzymes par le système de sécrétion de type III est sous le contrôle du quorum sensing. Ce dernier fait appel à trois activateurs qui répondent à deux types de *N*-acyl-homoserine lactones (AHL). L'Expl homologue à *LuxI* (aussi reportée à *Carl*, *Ah1I* et *Hs1I*), fut la première enzyme auto-inductrice décrite [65].

Les bactéries phytopathogènes *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris* utilisent uniquement les acides gras et les dérivés de butyrolactone comme étant des signaux du QS pour la régulation de la production des facteurs de pathogénicité [66; 67; 68].

La galle du collet est liée à la présence dans les bactéries du plasmide Ti (*Tumor inducing*, plasmide inducteur de tumeur) [69]. Les gènes qui régulent ce processus sont exprimés en réponse à des signaux chimiques libérés par l'hôte [70]. Le plasmide Ti utilise le quorum sensing et les opines pour la régulation de la conjugaison et la réplication [60]. Les tumeurs produisent des métabolites appelés les opines, qui seront utilisées comme source de carbone par la bactérie [71].

Les gènes *hrp* constituent les déterminants-clés du pouvoir pathogène chez les bactéries phytopathogènes du fait que ces derniers, tout comme leurs contreparties chez les bactéries pathogènes d'animaux, codent pour un système de sécrétion de protéines particulier dit de type III [46]. Les premières protéines pour lesquelles un transit par la voie Hrp a été démontré sont les harpine HrpN d'*Erwinia amylovora* [72], et PopA de *Ralstonia solanacearum* [73].

De nombreuses souches toxigènes ont été décrites chez les bactéries phytopathogènes, notamment dans le genre *Pseudomonas*. Celles-ci libèrent des toxines, qui diffusent librement au sein des tissus végétaux, et sont responsables des symptômes de chlorose systémique caractéristique. Leur implication dans les étapes précoces du processus infectieux en facilitant la progression de l'agent pathogène dans les tissus de l'hôte a également été décrite [46].

Chez les bactéries à Gram positif notamment *Clavibacter michiganensis*, les protéines de sécrétion de type III sont insuffisantes ; les protéases et les cellulases sécrétées constituent un facteur essentiel dans la virulence bactérienne [74]. Cette bactérie secrète une autre protéines; un endo- $\beta$ -1-4,glucanase, CelA,

permettant à l'agent pathogène l'induction du flétrissement chez la plante hôte [75].

#### 1.4. Importance économique des bactéries phytopathogènes

Les maladies bactériennes sont responsables de pertes économiques considérables dans plusieurs pays, dépassant 120 milliards de dollars chaque année [76]. Les semences ou les plants infectés jouent un rôle important dans la dissémination des maladies aussi bien à l'échelle régionale qu'à l'échelle mondiale. Les échanges de semences et de matériel végétal peuvent introduire des maladies dans des pays jusqu'alors indemnes. En plus des pertes directes de production, l'introduction de maladies de quarantaine peut constituer un facteur limitant les échanges commerciaux entre les pays [77].

Les maladies bactériennes sont moins nombreuses que les infections fongiques et moins pernicieuses et généralisées que les viroses, certaines bactérioses des plantes ont cependant un caractère de gravité et un impact socio-économique [16]. Les attaques du feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* ont rendu les productions de poires relativement confidentielles en Amérique du Nord (pertes estimées à 1,7 millions de dollars, en 1968 et 4,7 millions de dollars en 1976 pour le seul état de Californie). Cette même maladie, introduite dans le Sud-Ouest de la France en 1978, a conduit à l'élimination dans le cadre de mesures d'éradication de la plupart des vergers de la fameuse variété de poire Passe-Crassane avec des conséquences sociologiques sérieuses [16].

Enfin, la recrudescence du crown gall causé par *Agrobacterium tumefaciens* dans les pépinières fruitières françaises a provoqué des restrictions à la commercialisation et des pertes financières allant jusqu'à 6 680 000 francs pour une grande entreprise, de 1987 à 1989 [16]. Les produits de pépinière atteints sont invendables et la présence de cette maladie dans le verger entraîne une réduction de la durée de vie des arbres qui survivent rarement une fois touchés [78; 79]. En Floride, sur les vergers d'agrumes établis sur de grandes surfaces, les pertes de rendements moyens dus au chancre bactérien des *Citrus* ont été estimées à 2-5 % sur oranger et 5-10 % sur pomelo. En zone tropicale où la bactérie est établie, des chutes de rendement par la chute de fruits avant récolte, de 30-50 % sont possibles sur des cultivars sensibles [28].

## CHAPITRE 2

### LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

#### 2.1. Généralités sur les champignons phytopathogènes

Les champignons encore appelés fungi ou Mycètes constituent un phylum à part entière parmi les eucaryotes, ils sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées [18; 80].

Les champignons sont des microorganismes appartenant au règne des *Fungi* ou *Eumycota*, pluricellulaires ou unicellulaires (levures). Ils possèdent une paroi cellulaire chitineuse, ils sont à caractères hétérotrophes, ubiquistes possédant un noyau défini avec une membrane nucléaire et des chromosomes associés à des histones [31; 81; 80].

Les filaments mycéliens formant les thalles peuvent être organisés en cellules, ce sont les hyphes rencontrés chez les formes les plus évoluées (Septomycètes qui regroupent les Ascomycètes et les Basidiomycètes), ou présentent une structure cœnocytique, ce sont les tubes ou siphons, qui se rencontrent chez les champignons inférieurs (Phycomycètes, Zygomycètes et Trichomycètes) [82].

Les filaments ou les hyphes s'associent pour former le mycélium, ces hyphes restent généralement indifférenciés et organisés. Seuls quelques groupes fongiques sont capables de produire certaines structures différenciées de leurs filaments végétatifs (vésicules, chlamydospores, boucles ou des sclérotés) [81 ; 80].

#### 2.2. Les différents mécanismes de parasitisme chez les champignons phytopathogènes

Les mécanismes de parasitisme chez les champignons sont diversifiés. Certains de ces champignons sont des parasites biotrophes obligatoires, associés à leur plante hôte tout au long de leur cycle de vie (les agents des rouilles, de

l'oïdium), tandis que d'autres parasites biotrophes facultatifs (les agents des charbons) n'infectent les plantes que pour accomplir une partie de leur cycle, généralement pour effectuer la reproduction sexuée [83]. De nombreux champignons sont nécrotrophes, tuant les cellules hôtes grâce à leur batterie de gènes d'agressivité; toxines spécifiques ou non spécifiques, sécrétion d'enzymes lytiques, protéases et inhibiteurs de protéases. Ils peuvent ainsi récupérer les nutriments sur les débris de la structure végétale [83]. Cependant, il existe aussi de nombreux champignons appelés hémi-biotrophes qui utilisent une combinaison de stratégies. Ceux-ci adoptent d'abord une infection biotrophique et par la suite causent des dommages plus importants et la mort des cellules au fur et à mesure que l'infection progresse et la sporulation commence [84].

Les mécanismes biochimiques impliqués dans le pouvoir pathogène sont regroupés en fonction de l'étape du cycle infectieux où ils interviennent, c'est-à-dire; adhésion et pénétration, reconnaissance par la plante hôte, colonisation et sporulation [84].

### 2.3. Cycle parasitaire des champignons phytopathogènes

#### 2.3.1 Adhésion des spores et pénétration dans la plante

Les spores fongiques véhiculées par l'eau, la pluie ou le vent, arrivent à la surface des plantes. Dès leur premier contact, les spores adhèrent fortement à la surface de la plante. Après leur adhésion, les spores germent et émettent des tubes germinatifs qui parcourent la surface de la plante en la modifiant à l'aide d'enzymes de dégradation des parois végétales telles que ; les protéases, les pectinases dont les plus produites les endo et exo-polygalacturonases, pectine lyases, polymethyl- galacturonases ; les cellulases et les cutinases [85]. Ce processus d'adhésion des spores dure 30 minutes chez la plupart des champignons phytopathogènes [84].

Dans la plupart des cas, les hyphes mycéliens issus de la germination des spores, différencient rapidement un organe de pénétration appelé l'appressorium [86]. Cette différenciation dépend de nombreux stimuli externes comme la présence de surfaces hydrophobes ou des topologies particulières (stomates, poils, etc...) [87; 88; 89]. Chez plusieurs espèces, les composés fongiques

hydrophobes impliqués dans ce phénomène d'adhésion ont été identifiés comme étant des protéines ou des glycoprotéines. Parmi les molécules les mieux caractérisées, figurent les hydrophobines, une famille de protéines hydrophobes de petite taille (environ 96 à 157 acides aminés) et riches en cystéine [90].

Ces stimuli physiques induisent chez le champignon des messagers cellulaires, tels que l'AMP cyclique, qui déclenche les processus cellulaires conduisant à la différenciation de l'appressorium. En effet, une forte concentration intracellulaire en AMP cyclique permet cette différenciation en l'absence de stimuli.

Le rôle des enzymes de dégradation des parois produites par le champignon pendant la pénétration est plus complexe. Pour pouvoir être fonctionnels, les appressoria ont besoin d'être mélanisés. Cette mélanisation des parois est nécessaire à la mise en place d'une forte pression à l'intérieur de l'appressorium qui permet la pénétration en force d'un hyphes mycélien à travers la paroi de la cellule épidermique. Le DHN-mélanine est un pigment foncé fongique produit par polymérisation du 1,8 -dihydroxynaphthalène. Ce monomère est obtenu par une série de réactions impliquant la synthèse de polykétide dans lequel se produit l'assemblage et la cyclisation de cinq molécules d'acétate, suivie de quatre étapes ultérieures de réactions alternatives de réduction et de déshydratation [84].

### 2.3.2. Spécificité d'hôte et reconnaissance par la plante hôte

La plupart des champignons ne sont capables d'attaquer qu'un petit nombre de plantes ou de cultivars. Les interactions entre la plante et le champignon intervenant dans cette spécificité a lieu dans les premières cellules infectées, juste après la pénétration. La spécificité d'hôte de certains champignons dépend de leur capacité à produire des toxines sélectives [91]. Ces toxines sécrétées pendant et après la phase de pénétration ne sont toxiques que pour la plante-hôte du champignon phytopathogène [91].

### 2.3.3. Colonisation de la plante-hôte

Lorsque le champignon échappe au système de reconnaissance de la plante, il peut continuer sa progression dans les tissus. Au cours de cette phase, le champignon est en condition de déficience nutritionnelle. Le champignon doit

aussi faire face aux réactions de défense qu'il a lui même déclenché lors de sa progression dans la plante. Certains champignons sont ainsi capables de détoxifier les composés fongitoxiques produits par la plante comme les phytoalexines ou les protéines PR (pathogenenesis related). Cette étape de reconnaissance plante-champignon est primordiale pour le succès de l'infection, car seuls les champignons qui n'auront pas été reconnus par les nombreux gènes de résistance de la plante pourront continuer leur processus infectieux. Cette reconnaissance fait intervenir d'une part un gène d'avirulence du champignon et d'autre part un gène de résistance de la plante c'est le type de relation dite 'gène pour gène' [92].

Le champignon pathogène de l'avoine *Gaeumannomyces graminis*, produit une enzyme capable de détoxifier le principal composé fongitoxique de l'avoine, une saponine appelé avanacine, à l'aide d'une glucosidase spécifique dont le gène de structure a été cloné [93]. L'obtention d'un mutant déficient en ce gène ou par son remplacement, a montré que cette fonction était indispensable à ce champignon pour attaquer l'avoine.

#### 2.3.4. Sporulation

L'étape finale du cycle infectieux correspond au moment où le champignon différencie ses organes de reproduction asexuée ou sexuée, et libère des spores qui dissémineront la maladie [84].

La propagation des champignons de plante à plante est généralement réalisée grâce à la transmission des spores. Cette étape de dissémination des spores fongiques peut être effectuée sur de longues distances par le vent et les courants d'air, ou bien, elles peuvent être déposées dans le sol et rester viables mais inactives jusqu'au déclenchement de la germination, qui se fait souvent par le biais de la détection de la présence de plantes hôtes potentielles dans l'environnement. Les cycles de vie des champignons et les différentes étapes produisant des spores se font souvent par le biais de processus complexes et varient beaucoup entre les espèces [84].

## 2.4. Maladies fongiques dues aux champignons phytopathogènes et impact économique

Le nombre d'espèces fongiques est estimé à 1,5 millions dont environ  $10^5$  sont décrites [90]. Parmi ces espèces connues, plus de 15 000 (soit 15% de toutes les espèces connues) sont responsables de maladies chez les plantes dont la majorité appartient à la classe des *Ascomycota* et *Basidiomycota* et seulement une centaine est pathogène pour l'homme et les animaux [94; 84 ; 95]. Les symptômes pouvant apparaître après attaque de champignons sont très variés : des pourritures, des nécroses, des flétrissements ou des Chloroses... [96; 97] (figure 2.1 ).



pourriture des fruits de la tomate  
causée par *Rhizoctonia solani* [98]

pourriture sèche causée par  
*Fusarium solani* [90].



Nécroses causé par *Alternaria alternata* [90]

**Figure 2.1.** Principaux symptômes causés par les champignons phytopathogènes

En agriculture, les pertes annuelles mondiales de récoltes dues aux maladies fongiques de pré et post récolte dépassent 200 milliards d'euros, et aux

Etats-Unis seulement, plus de 600 millions de dollars sont annuellement dépensés aux fongicides pour les traitements des cultures attaquées [99].

Le piétin échaudage (take-all disease) causé par le champignon tellurique *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Ggt), contamine les racines et produit des symptômes de nécroses avec noircissement des plants [100]. Il est spécifique des graminées ; le blé, l'orge et moins fréquemment chez l'avoine et peut être observé au cours de la montaison en envahissant les vaisseaux conducteurs de la plante (xylème et phloème) [101]. A la fin du cycle végétatif, le Ggt conduit à un échaudage des plantes atteintes [102]. Les dégâts provoqués peuvent être importants, jusqu'à 50 % de pertes de rendement [100; 102].

La maladie de la pourriture racinaire, appelée aussi le rhizoctone noir ou encore la maladie des manchettes est causée par le champignon tellurique *Rhizoctonia solani* [103]. Ce pathogène possède une large gamme de plantes hôtes, à savoir les cultures maraîchères, graminées, plantes ornementales et les espèces adventices [103]. Le champignon pénètre dans la plante directement à travers la cuticule ou par les stomates. Les attaques sont favorisées par des dégâts préalables causés par des ravageurs racinaires comme les nématodes, ou par des outils. Les conditions optimales pour son développement sont des températures du sol de 15-18°C. et une humidité élevée.

*R. solani* survit dans le sol sous forme de mycélium dormant ou de sclérotites de 1-3 mm fixés à des résidus végétaux à partir desquels il se disperse [103].

Le chancre phomopsien (Phomopsis canker ,viscid rot) est causé par le champignon *Phomopsis vaccinii* (Ascomycètes, *Diaporthales*). Les principales plantes-hôtes de ce champignon sont des plantes ligneuses. Pour les cultivars sensibles, la brûlure des tiges ligneuses âgées d'un an et des bourgeons floraux constituent le symptôme prédominant en Caroline du Nord. On a aussi décrit une invasion systémique dans le cas de cette maladie [104]. Les tiges succulentes de l'année en cours, infectées, se flétrissent en 4 jours et se couvrent de petites lésions. Le champignon continue à se déplacer vers le bas à une vitesse moyenne de 5,5 cm en 2 mois, tuant toutes les branches principales et souvent la plante



entière [105 ; 106]. Les pertes de rendement aussi élevé que 70% ont été enregistrées sur les variétés sensibles [107].

Les fusarioses causées par les espèces du genre *Fusarium* qui présente actuellement plus de 50 espèces dont les plus communes sont *Fusarium oxysporum*, et *Fusarium solani* [108]. Chez *Fusarium oxysporum*, 120 formes spéciales différentes peuvent être rencontrées, parmi lesquelles; une centaine est basée sur la spécificité d'espèces hôtes appartenant à des familles botaniques différentes telle que la fusariose des racines et du collet *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* [17].

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler est un champignon cosmopolite et a été isolé dans le monde entier [109 ;110]. *Alternaria alternata* est présent chez une large gamme de plantes hôtes (plus de 380 espèces), à savoir les *Citrus*, la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), le coton, le poivre, le dahlia et le géranium [111 ; 112]. Le champignon provoque principalement des symptômes de la maladie (des tâches et des lésions), sur les feuilles et moins sévèrement sur les stolons et conduit finalement à la mort complète de la plante [113].

Les champignons appartenant essentiellement aux genres : *Fusarium*, *Alternaria* et *Aspergillus*, peuvent produire des mycotoxines et ils sont impliqués dans des infections opportunistes de l'homme [114].

Le champignon *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare et Gams est un champignon activement étudié pour l'application comme agent de lutte biologique d'importantes espèces phytoparasites (œufs de nématodes) [115]. Ce champignon est une composante commune des communautés microbiennes du sol et peut jouer un rôle clé dans la régulation des nématodes dans la rhizosphère de la plante [116].

## **CHAPITRE 3**

### **LES NEMATODES PHYTOPARASITES**

#### 3.1 Généralités

Les nématodes sont des vers ronds, classés parmi les ecdysozoaires, à section circulaire, non segmentés protégés par une épaisse cuticule de nature chitinoïde qui leur confère une grande résistance aux agressions extérieures. Ils mènent une vie libre ou parasitaire. Ce groupe contient des vers dont le cycle ne nécessite pas d'hôte intermédiaire [117].

Ils ont une croissance discontinue (on parle d'ecdysozoaires) par augmentation de la matrice cellulaire, car les nématodes ont la caractéristique d'avoir toujours le même nombre de cellules pour une espèce donnée. Ils sont dioïques et comportent lors de leur cycle de développement 4 stades juvéniles [117].

A l'origine vivant dans l'eau, les nématodes ont colonisé tous les milieux. Actuellement, 25 000 espèces sont décrites [118 ; 119]. Ils se situent au deuxième rang après les insectes en termes de nombre d'espèces différentes. Dans le sol, les nématodes constituent la partie la plus importante de la biomasse. Le peuplement normal d'un sol agricole en formes libres est de l'ordre de 20 à 30 000 individus par kg de sol [120].

A l'inverse des zooparasites connus depuis très longtemps, les nématodes phytoparasites, sont passés longtemps inaperçus et le sont souvent encore, en raison de leur taille microscopique et du fait qu'ils se trouvent toujours cachés dans le sol ou à l'intérieur des tissus végétaux [121].

Les nématodes phytoparasites, également appelés anguillules sont des vers ronds allongés en fuseau, non segmentés. Cependant, chez certaines espèces, le corps de la femelle adulte peut se renfler et devenir plus ou moins globuleux

[122]. Ce sont des parasites obligatoires, pourvus d'un stylet, leur permettant de parasiter les plantes en s'attaquant aux parties aériennes ou aux parties souterraines. Ils réalisent tout ou une partie de leur cycle de développement dans le sol provoquant des dommages importants aux cultures (tableau 3.1).

### 3.2. Importance économique des nématodes phytoparasites

Les problèmes phytosanitaires causés par les nématodes phytoparasites ont une incidence économique très importante à l'échelle mondiale car ils s'attaquent aussi bien aux grandes cultures (céréales, pommes de terre, betterave) qu'aux cultures maraîchères, florales et fruitières [121].

Selon la relation établie entre le nématode et la plante-hôte, différents groupes de nématodes phytoparasites sont distingués [123]. Ils peuvent se comporter comme endoparasites sédentaires induisant des transformations racinaires importantes au niveau des tissus conducteurs, ou migrateurs s'alimentant aux dépens de cellules corticales ou parenchymateuses et ouvrant des voies de pénétration à d'autres organismes pathogènes. Les nématodes ectoparasites vivent libres dans le sol, ils ne pénètrent jamais à l'intérieur de la racine et se nourrissent de cellules épidermiques par leur stylet et sont vecteurs de nombreuses maladies virales telles que le virus du court-noué de la vigne [119 ;121]. Ces différentes adaptations écologiques, leurs ont permis de développer des stratégies parasitaires variées en provoquant de sévères dommages et empêchant dans certains cas, toute culture économiquement viable [120].

Les dégâts causés par les nématodes sont cependant difficilement chiffrables en raison des nombreuses interactions les liant à d'autres pathogènes fongiques ou bactériens, favorisés par les lésions induites par leur entrée dans les tissus végétaux. Des études ont montré que les nématodes provoquent 10% de pertes de production dans le monde, soit, un tiers des pertes attribuées aux parasites et maladies [124].

**Tableau 3.1 :** Principaux nématodes phytoparasites et principales cultures attaquées [121]

Type de parasitisme	Etat dans le sol	Etat dans la plante	Nématodes		Principales plantes parasitées
			Genres	Familles	
Parasites de tiges, feuilles et bulbes		ecto- et endoparasites	<i>Aphelenchoides</i>	<i>Aphelenchoidae</i>	Riz, fraisiers, chrysanthèmes
		endoparasites	<i>Bursaphelenchus</i>	<i>Aphelenchoidae</i>	Pins
			<i>Ditylenchus</i>	<i>Anguinidae</i>	Céréales, betteraves, ail, pommes de terre, fraisiers
			<i>Anguina</i>	<i>Anguinidae</i>	Blé (agent de la nielle) et autres graminés
Parasites des racines	Migrateurs	ectoparasites	<i>Xiphinema, Longidorus</i>	<i>Dorylaimidae</i>	Vignes, arbres fruitiers, betteraves
			<i>Trichodorus</i>	<i>Diphtherophoridae</i>	Pommes de terre
			<i>Belonolaimus, Telotylenchus</i>	<i>Belonolaimidae</i>	Coton, maïs, soja
		endoparasites	<i>Pratylenchus, Radopholus, Hirschmaniella</i>	<i>Pratylenchidae</i>	arbres fruitiers, citrus, bananiers, fleurs, vignes, céréales
		ecto-, semi-endoparasites	<i>Rotylenchus, Hoplolaimus, Helicotylenchus</i>	<i>Hoplolaimidae</i>	arbres fruitiers, cultures maraîchères
			<i>Tylenchorhynchus</i>	<i>Dolichodoridae</i>	
	Sédentaires	semi-ectoparasites	<i>Tylenchulus</i>	<i>Tylenchulidae</i>	citrus, vignes
		semi-endoparasites	<i>Rotylenchulus</i>	<i>Hoplolaimidae</i>	cultures maraîchères, bananiers, vignes, Coton
		endoparasites	<i>Nacobbus, Heterodera, Globodera, Meloidogyne</i>	<i>Pratylenchidae, Heteroderidae</i>	Céréales, pommes de terre, arbres fruitiers, fleurs cultures maraîchères

Les nématodes phytoparasites les plus dommageables appartiennent au type endoparasite sédentaire. Les deux principaux genres de ce groupe sont les nématodes à kystes (*Heterodera* et *Globodera*) et les nématodes à galles (*Meloidogyne*) [125]. Chez ces nématodes, la larve du deuxième stade pénètre derrière l'apex de la racine et migre vers les cellules vasculaires en développement. Au cours des premiers stades de développement, les nématodes sont complètement enchâssés dans la racine mais plus tard font saillie sur la racine [125]. Les espèces du genre *Meloidogyne* endoparasites sédentaires, appelées nématodes à galles des racines parasitent à elles seules plus de 2000 espèces végétales et sont largement répandues dans le globe [126; 127].

### 3.3. Position systématique des nématodes à galles

Les nématodes à galles parasites de plantes rencontrés majoritairement dans les sols, sont des vers microscopiques responsables de dégâts estimés à plusieurs dizaines de milliards d'euros par an à travers le monde [120].

Les galles sur les racines sont connues depuis 1805 en Floride, USA. Plus tard, en 1855, BERKELEY a fait la première description des Helminthes causant ces galles sur les racines de concombre en Angleterre. Plus tard, mais de manière indépendante, les descriptions de NEAL [128] sont apparues aux USA. Jusqu'en 1949, toutes les espèces étaient connues comme *Heterodera radicola* et *H marioni*. Sur la base des investigations morphologiques détaillées, Chitwood [129] a séparé les nématodes à galles dans un groupe spécifique et les a inclus dans le genre *Meloidogyne* érigé pour la première fois par GOLEDI en 1887 et caractérisé par CORNU en 1879 [130 ; 131].

La classification des *Meloidogyne* établie par REDDY [132] :

Règne	<i>Animal</i>
Sous-règne	<i>Métazoaires</i>
Embranchement	<i>Némathelminthes</i>
Classe	<i>Nematoda</i>
Sous-classe	<i>Secernenta</i>
Ordre	<i>Tylenchida</i>
Super-famille	<i>Tylenchoidea</i>
Famille	<i>Meloidogynidea</i>
Sous-famille	<i>Meloidogynae</i>
Genre	<i>Meloidogyne</i>

### 3.4. Morphologie des nématodes à galle

Le genre *Meloidogyne* est caractérisé par un dimorphisme sexuel très remarquable. Le mâle est filiforme et long variant de 0,8 à 2 mm. A l'extrémité antérieure s'ouvre la bouche, elle est pourvue d'un stylet de 2 fois la largeur des lèvres, mince avec des boutons [133]. C'est grâce à ce stylet que le nématode se nourrit. Il possède 1 ou 2 testicules débouchant, avec l'intestin, dans un cloaque où se trouvent deux spicules, ou organes copulateurs qui font saillie à l'extérieur [134], (appendice B).

La femelle est globuleuse et mesure 0,44 à 1,3 / $\mu\text{m}$  (appendice C). Deux ovaires débouchant dans le vagin, occupent la majeure partie du corps. Dans la partie postérieure se développent six glandes qui s'ouvrent dans le rectum. Ces glandes rectales produisent une substance gélatineuse dans laquelle les œufs sont englobés [134]. TYLER [135] affirme que le nombre des œufs pondus par une femelle, environ deux mois après l'inoculation, pouvait varier de 1.400 à près de 3.000 selon l'hôte.

Les larves de 2<sup>ème</sup> stade sont vermiformes, pointues à l'extrémité postérieure. Elles ont une longueur variant de 0,3 à 0,5 mm et un diamètre d'environ 10  $\mu\text{m}$ . Leur cavité générale est occupée par le système digestif qui comprend la bouche s'ouvrant à l'extrémité antérieure et qui contient un stylet creux et protractile, l'oesophage, puis l'intestin qui débouche dans le rectum [136].

### 3.5. Variabilité interspécifique chez les nématodes à galles

Le nombre de nouvelles espèces de *Meloidogyne* décrites est en augmentation permanente. Selon EISENBACK et HIRSCHMANN [137], plus de soixante espèces ont été décrites. Certains d'entre eux : *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* et *M. hapla*, présentent une importance économique particulière et représentent 95% de toutes les infestations causées par les nématodes à galle sur les cultures [138]. Actuellement, un total de 80 espèces de *Meloidogyne* a été décrit [139].

Malgré leur reproduction par parthénogenèse mitotique qui devrait, par la stabilité du génome, leur assurer une grande uniformité, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* et *M. javanica* montrent une variabilité importante sur les plans biométrique, morphologique et physiologique. Il en est ainsi, notamment de

l'éventail des plantes hôtes qui, bien qu'étant extrêmement large (2.000 environ pour chaque espèce), diffère parfois, selon les souches appartenant à une même espèce [140].

### 3.6. Séquençage du génome de nématode à galles

Le premier génome d'un nématode à galles, *Meloidogyne incognita* a récemment été séquencé et analysé par un consortium européen coordonné par une équipe de chercheurs français de l'INRA. Cette espèce a été choisie parce qu'elle est la plus largement distribuée à travers le monde et celle qui cause le plus de dégâts au sein du genre *Meloidogyne* [141].

L'analyse du génome a montré que la majorité du matériel génétique de cette espèce était présente sous forme de paires de régions similaires mais dont le pourcentage de divergence moyen atteint 8% au niveau nucléotidique. Cette forte divergence entre les deux copies du génome est à relier au mode de reproduction asexué de ce nématode [141].

La publication de la séquence du génome du nématode à galles *Meloidogyne incognita* fournit les bases de la compréhension des relations hôte-pathogène. Elle constitue à la fois le premier séquençage de génome d'un animal parasite de plantes et celui du premier métazoaire à mode de reproduction parthénogénétique (se reproduisant sans sexualité). Ce génome, constitué de la juxtaposition d'au moins deux génomes, pourrait conférer au nématode sa grande capacité d'adaptation. A travers le séquençage du génome de *Meloidogyne incognita*, un large éventail enzymatique permettant la dégradation de la paroi cellulaire, adapté au parasitisme des plantes a été identifié [142].

### 3.7. Biologie et cycle de développement

Les nématodes à galles sont des endoparasites sédentaires et biotrophes. La femelle adulte pond ses oeufs dans une gangue gélatineuse composée d'une matrice de glycoprotéines fixée à l'arrière de celle-ci et appelée "masse d'oeufs". Cette substance est produite par des glandes débouchant dans le rectum et permettant de maintenir les oeufs rassemblés afin de les protéger contre les contraintes environnementales et la prédation. Les masses d'oeufs se trouvent

localisées à la surface ou intégrées dans la galle en même tant que les femelles [143] (figure 3.1).

Le cycle biologique des nématodes à galle comporte 4 stades juvéniles (J1 à J4), séparés par des mues et un stade adulte [119]. Les juvéniles de deuxième stade (J2) éclosent puis migrent vers les racines et y pénètrent soit par l'apex, soit dans les zones de pénétration antérieure, soit encore là où existent déjà de petites lésions [144].

Le juvénile (J2) est le stade infestant, la larve oriente ses déplacements par rapport à un gradient de substances émises par les plantes ; substances pour la plupart hydrosolubles et rémanentes [145].

Les larves J2 envahissent l'endoderme des racines et, en pénétrant dans le cylindre central, provoquent l'apparition de cellules polynuclées géantes, métaboliquement hyperactives provenant du parenchyme vasculaire ou des cellules vasculaires différenciées du cylindre central [144].

Ce site nourricier indispensable au développement des nématodes et induit par ses sécrétions salivaires est constitué de 5 à 7 cellules hypertrophiées (cellules géantes) suite à des mitoses sans division cellulaire et plusieurs cycles d'endoreduplication [146]. Ces structures néoformées permettent au nématode d'accomplir son cycle sans avoir à se déplacer ; le nématode n'aura en effet qu'à ponctionner avec son stylet buccal dans ces cellules géantes pour pouvoir se nourrir [147]. La formation de ces cellules géantes perturbe ou bloque les vaisseaux du xylème et la multiplication parallèle des cellules corticales entraîne la formation de galles [136].

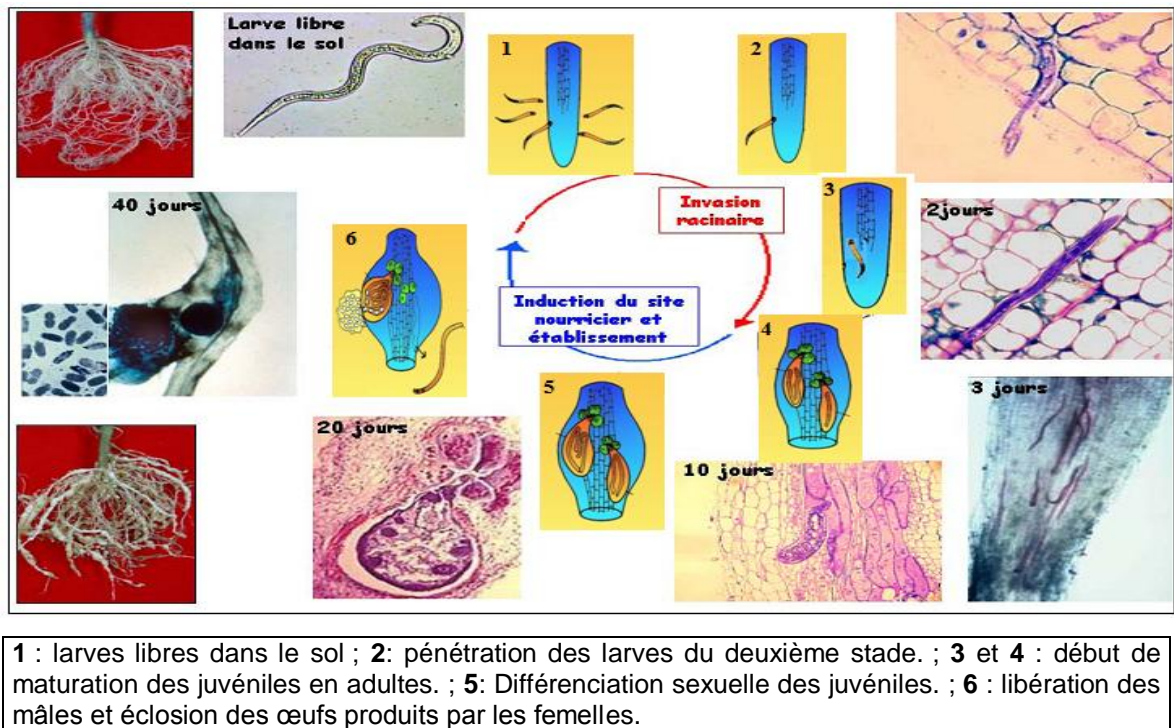
Les juvéniles J2 se nourrissent de ces cellules géantes et muent trois fois avant de parvenir au stade de femelles adultes qui se développent rapidement [144]. La dissection des galles met en évidence des femelles typiques renflées à divers stades de maturation. Les femelles matures sont sacciformes [144].

Les œufs sont pondus dans une matrice gélatineuse formant une masse d'œufs [119]. Une seule masse peut contenir plusieurs centaines d'œufs, DE GUIRAN [127] dénombre 300 à 3000 œufs. Dans les racines primaires épaisses et charnues, les masses d'œufs peuvent demeurer à l'intérieur des racines [144].



Les mâles, absents ou rares quittent les racines et se déplacent librement dans le sol. Ils ne sont pas fonctionnels la reproduction est donc parthénogénétique [134].

Tous les œufs n'éclosent pas en même temps et peuvent résister au froid et à la sécheresse pendant plusieurs années (jusqu'à 5-6 ans). Néanmoins lorsque les températures sont basses, l'infestation se développe lentement [147].



**Figure 3.1.** Cycle de développement des nématodes à galles [148 ; 147].

### 3.8. Importance économique des nématodes à galle

Les nématodes à galles se caractérisent par la formation de nodosités (les galles) sur les racines en forme de boule ou de fuseau irrégulier qui peuvent prendre des dimensions importantes (figure 3.2), dépassant la grosseur d'une noix et le renflement des racines primaires et secondaires [144]. Autour des femelles avec leurs petites masses d'œufs, peuvent se développer des tâches nécrotiques brunes [149].

Ces manifestations provoquées par la sécrétion salivaire du nématode qui induit des modifications anatomiques entraînant une déformation du tissu vasculaire provoquent la formation de cellules géantes polynuclées et une

hypertrophie des cellules corticales [150]. Ces déformations constituent les galles qui deviennent visibles 2 à 3 jours après la pénétration des J2 [134 ; 119].

Les *Meloidogyne* parasitent plus de 5500 espèces de plantes [151] et sont largement répandues sur le globe. Ils s'attaquent aussi bien aux grandes cultures (céréales, pommes de terre, betterave...), qu'aux cultures maraîchères, florales et fruitières [147].

Les espèces les plus couramment rencontrées en région méditerranéenne sont *M. incognita* et *M. arenaria*. Elles se multiplient très rapidement par parthénogénèse (reproduction asexuée). Leur température optimale de croissance se situe entre 15°C et 33°C. Elles sont particulièrement préoccupantes dans les systèmes maraîchers méditerranéens où les conditions optimales de leur développement sont réunies : températures élevées et successions de plantes sensibles (salades, cucurbitacées, solanacées...). Les cultures les plus sensibles sont la tomate, l'aubergine, le poivron, la pomme de terre, melons, le concombre, la laitue, la chicorée, le haricot et la carotte. Les attaques sont plus fortes en sols sableux légers et pauvres en matières organiques [147].

Une enquête effectuée par l'ILVO (*Instituut voor Landbouw-en Visserijonderzoek*) en 1996-1997 a démontré que *M. chitwoodi* tout comme *M. fallax* étaient présents en Belgique. Depuis 1998, ces deux organismes ont un statut d'organisme de quarantaine au sein de l'UE (Directive 2000/29/CE, annexe I) et de l'EPPO (Liste A2) [152].

Le nématode *Meloidogyne naasi* Franklin 1965 est un nématode à galle des graminées rencontré dans les régions tempérées. Il est un facteur limitant du rendement de l'orge dans l'Europe de l'Ouest [153 ;154 ;155] et aux États-Unis [156].

Au niveau mondial, on estime les pertes à 100 milliards de dollars par an [157]. En Europe, ils sont responsables de dégâts atteignant 10% de la production céréalière et entraînent des diminutions de récoltes de 20 à 30% dans les vergers d'agrumes méditerranéens [158].

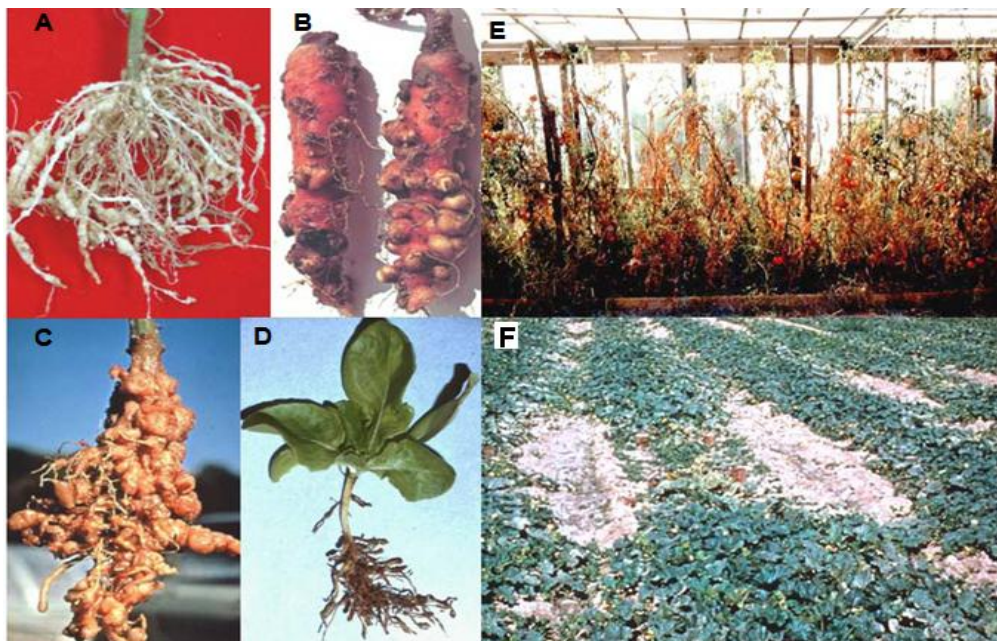
En Algérie ces ravageurs se distinguent comme étant de redoutables ennemis et constituent un facteur limitant de production maraîchère aussi bien sous abri plastique qu'en plein champ [159]. IGHILI [160] signale 100 p.cent des serres prospectées sont infestées dans une palmeraie à Ouargla. MOKABLI [161], montre que sur 1976 serres, 65 p.cent sont attaquées dans différentes

wilayas du pays. Dans les zones littorales centres comme Staouéli et Bordj-El-Bahri toutes les cultures sont infestées (100%) [162]. La fréquence et la gravité de l'infestation des serres varient d'une année à une autre, en effet les travaux de NEBIH HADJ SADOK [163] ont montré que le pourcentage de serres infestées durant l'année 1993 est plus élevé (82.59%) que durant l'année 1994 (53.13%).

### 3.9. Notion d'indice de galle

Ces symptômes sont à l'origine de la conception d'échelles d'indices de galles définis par une note affectée à un état du système racinaire. Plusieurs échelles ont ainsi été établies et utilisées afin d'évaluer la gravité des dégâts, et par conséquent estimer les niveaux des populations de *Meloidogyne* spp. qui infestent les racines (appendice D). Ces indices sont très utilisés en fin de végétation pour estimer l'infestation globale de la plante et comparer l'effet de diverses méthodes de lutte contre les nématodes à galles [164].

Au point de vue analytique, ils ont l'avantage de représenter fidèlement l'infestation racinaire réelle d'une plante. D'un point de vue statistique, ils permettent un « écrasement » de la forte hétérogénéité spatiale (distribution agrégée) caractéristique des infestations en nématodes phytoparasites [164].



**Figure 3.2.** Dégâts sur racines de tomate (A), carotte (B), concombre (C), laitue (D) et sur tomates en serre (E) et melons en plein champ (F) [147].

## **CHAPITRE 4**

### **LUTTE CONTRE LES MALADIES ET LES DEGATS CHEZ LES PLANTES**

La protection des cultures de leurs ennemis constitue une question d'intérêt général qui requiert une organisation phytosanitaire supranationale capable de surveiller l'état des cultures. Le concept de lutte intégrée se réfère principalement à l'écologie, aux rapports existant entre les organismes vivants et leur environnement ainsi qu'à leur espace vital [165].

Les agriculteurs font appel à une lutte intégrée en combinant entre différentes techniques: prophylactiques, physiques, chimiques, génétiques, biologiques et l'utilisation de biopesticides [166 ; 167].

#### 4.1. La lutte préventive

En agriculture, la lutte contre les maladies et les ravageurs des cultures se fait de manière préventive plutôt que curative [168].

Les mesures préventives assurent une réduction importante de la dissémination de la maladie. La lutte prophylactique exige l'application de mesures prévenant l'introduction dans un pays ou une zone déterminée, de maladies ou de ravageurs nouveaux (la quarantaine) et de délivrer les certificats exigés pour la commercialisation des produits, après inspection des plantes [18]. Les mesures préventives s'appuient aussi sur les techniques agronomiques éprouvées qui visent à créer simultanément des conditions défavorables pour les ennemis des cultures, telles que la rotation des cultures, l'hygiène, les pratiques culturales, la fertilisation raisonnée et le travail du sol [169].

##### 4.1.1. Les mesures de certification et de quarantaine

Les états peuvent mettre en place différentes mesures de protection phytosanitaire visant à empêcher l'introduction ou la dissémination de nouveaux agents pathogènes. Ces mesures sont établies par le pays importateur [170]. Les règlements phytosanitaires peuvent notamment interdire les importations de

plantes ou de produits végétaux appartenant à certaines espèces botaniques en provenance d'une zone géographique où un agent bioagresseur est présent [18]. Un organisme de quarantaine est un organisme nuisible qui présente une importance potentielle pour l'économie de la zone menacée. Cet organisme peut ne pas être présent dans cette zone ou bien qui y est présent mais n'y est pas largement disséminé et fait l'objet d'une lutte officielle sous forme de mesures phytosanitaires en vue de son éradication et/ou enrayerment [171].

La réglementation phytosanitaire de l'Organisation Euroméditerranéenne de Protection des Plantes (OEPP) détient deux listes des organismes de quarantaine, en l'occurrence, la liste A1 et la liste A2. La liste A1 comprend les organismes nuisibles absents dans une région, et la liste A2 contient des organismes nuisibles localement présents dans une zone et officiellement contrôlés [171].

Parmi les bactéries phytopathogènes, l'espèce : *Ralstonia solanacearum* est listée organisme de quarantaine en Europe. Cet organisme est inscrit à l'annexe I, chapitre II (organismes nuisibles présents) de la Directive 2000/29/CE du 8 mai 2000 modifiée sous le nom de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) [35]. Chez les nématodes à galle du genre *Meloidogyne*, les espèces *Meloidogyne fallax* et *Meloidogyne chitwoodii* ont un statut d'organismes de quarantaine depuis 1998 au sein de l'Union Européenne (Directive 2000/29/CE, annexe I) et de l'EPPO (Liste A2) [171]. Parmi les champignons phytopathogènes, *Phomopsis vaccinii* agent de la maladie du chancre phomopsien, est un organisme de quarantaine A1 de l'OEPP [172; 171].

D'autre part, Les certificats phytosanitaires aident à s'assurer que le matériel végétal est exempt de parasites nocifs des plantes après une inspection dans le pays d'origine [170].

Les certificats phytosanitaires sont émis par une autorité qualifiée disposant d'un membre de l'organisme chargé de la protection des plantes et compétent pour garantir que le produit est indemne de toutes les maladies couvertes par les lois de quarantaine [173; 170]. Les certificats phytosanitaires sont délivrés afin d'indiquer que les envois de végétaux, produits végétaux ou autres articles réglementés satisfont à des prescriptions phytosanitaires déterminées des pays importateurs et sont conformes à la déclaration de certification du modèle de certificat phytosanitaire correspondant.

#### 4.1.2. L'hygiène

L'hygiène des cultures est extrêmement importante pour la lutte contre la plupart des maladies et ravageurs. Elle peut impliquer l'élimination et la destruction des résidus de culture, des plantes fortement infestées, des repousses provenant d'une récolte précédente et les plantes adventices [174].

Sous serre, l'irrigation des plants doit être assurée au système de la goutte à goutte [175]. Ainsi, La qualité de l'eau est assurée par le biais des différents traitements (UV, chimiques ou thermiques) [176]. Les systèmes d'irrigation doivent être nettoyés par des composés d'ammonium, de l'acide nitrique ou une solution d'hypochlorite [176]. Les serres doivent être nettoyées à la fin de la saison par l'hypochlorite ou l'ammonium quaternaire et par un formaldéhyde [175].

Les agents pathogènes peuvent être transmis au matériel sain par les couteaux ou greffoirs contaminés et sécateurs lors de la préparation de matériel pour la multiplication végétative [177]. Les sécateurs et les outils de taille sont désinfectés entre les plantes, soit avec l'ammonium quaternaire, l'hypochlorite de sodium afin de prévenir la transmission d'agents pathogènes notamment les maladies vasculaires [175].

#### 4.1.3. La rotation

La rotation culturale est une succession culturale correspondant à une alternance de cultures se suivant régulièrement, dans un ordre toujours identique, sur une parcelle [178]. La rotation des cultures en alternance avec des plantes résistantes à un agent pathogène, permet de limiter les épidémies [179 ; 70].

Pour des parcelles cultivées en permanence, la rotation constitue une bonne prévention contre certaines mauvaises herbes et maladies des racines, certains insectes et nématodes du sol. Par exemple, la rotation concourt à contrôler les adventices en faisant alterner des cultures à développement rapide et dense (pomme de terre) avec d'autres à développement spécial réduit. Les rotations de longue durée de céréales/cultures maraîchères diminuent l'effet des nématodes à galles sur les Solanacées, ces nématodes n'attaquant pas les céréales. La rotation sorgho/tomate selon le schéma sorgho-sorgho-sorgho-tomate permet une réduction sensible des attaques de *Meloidogyne* sur la tomate. De même, une rotation arachide/tomate permet de bien contrôler ce genre de nématodes [180].

#### 4.1.4. Le travail du sol

L'enfouissement des débris végétaux permet de lutter contre les organismes telluriques comme *Rhizoctonia solani*, *Ventura inaequalis*, *Plasmopara viticola* et *Pseudomonas solanacearum* [181].

Certains travaux du sol représentent un risque, car ils peuvent agir par la dissémination de l'inoculum le long des lignes de passage des engins agricoles et par la création de portes d'entrée aux parasites c'est le cas de *Clavibacter michiganense* et *Pseudomonas solanacearum* [182].

Le labour de fin de cycle est une pratique utile là où une population d'insectes, importante pour la réinfestation de la culture suivante, subsiste dans la sole récoltée, tels les vers blancs (larves de scarabéides) et les vers gris (larves de noctuidés) ce qui permet d'exposer les larves et pupes à l'air libre et aux prédateurs [183].

### 4.2. La lutte curative

#### 4.2.1. La lutte physique

##### 4.2.1.1. Effet de la température sur les organismes vivants

Le traitement thermique est un facteur qui permet de causer des blessures internes suffisamment sérieuses pour entraîner la mort de l'organisme cible [184]. Pour la plupart des traitements à la chaleur, une augmentation de la température interne des organismes nuisibles de l'ordre de 50 à 100°C. ou plus pendant au moins 0.1 seconde, est suffisante pour provoquer un éclatement des cellules dû à la dilatation thermique du matériel intracellulaire ou encore à une congélation de certaines protéines cellulaires à des températures inférieures à 0°C. [185 ; 186].

De façon analogue, une diminution de la température de ces organismes sous le point de congélation provoquera des blessures similaires causées par la cristallisation du matériel intracellulaire [187]. Plusieurs méthodes physiques sont utilisées en protection des plantes dont les plus pratiquées sont la solarisation et la thérapie thermique.

#### 4.2.1.2. La solarisation

La solarisation consiste à augmenter la température du sol en couvrant le sol avec une feuille de poly-éthylène transparente (0.1 mm d'épaisseur) pendant la saison chaude [188;147]. La solarisation est un phénomène hydrothermique, qui signifie que la teneur en eau du sol doit être élevée d'au moins 70% de la capacité d'hydrothermie, afin d'avoir un bon transfert de la chaleur aux organismes à contrôler. La solarisation est une pratique largement utilisée pour la lutte contre un spectre important d'agents pathogènes d'origine tellurique ainsi que des ravageurs [189].

Cette méthodes s'est avérée très efficace pour lutter contre les nématodes à galles, (*Meloidogyne* spp), les champignons phytopathogènes tels que :*Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* et *Fusarium solani*. D'autre part, il a été montré que pour les bactéries phytopathogènes, la solarisation a permis de réduire de plus de 72 % la population des espèces d'*Agrobacterium* spp.. Parallèlement, des graines de mauvaises herbes et de plantes parasites comme l'*Orobanche* ont été par la même réduites par cette pratique [190; 70 ; 189 ; 147].

#### 4.2.1.3. La thermothérapie

La thermothérapie peut être effectuée par un traitement à l'eau chaude [191]. Généralement des températures de 50 à 54 °C. pendant 5 à 30 minutes, à la vapeur humide à 50°C. pendant 1 heure ou à la chaleur sèche à 70°C. pendant 3 à 7 jours sont utilisées [192 ; 193]. Cette technique a été appliquée avec succès sur de nombreuses maladies en particulier les maladies bactériennes transmises par semences, les nématodes, les insectes et acariens et sur différentes parties de la plante telles que les semences, les rhizomes, les bulbes et les boutures [194; 191] Dans la lutte contre les insectes, la lutte physique peut avoir recours à plusieurs technologies dont certaines mettent en oeuvre des méthodes actives; les chocs thermiques (chaleur), les radiations électromagnétiques (micro-ondes, radio-fréquences, l'infrarouge), les chocs mécaniques et la lutte pneumatique (soufflage/aspiration) [166].

#### 4.2.2. La lutte chimique

Les traitements chimiques sont largement utilisés pour le contrôle des ennemis des cultures [166]. Le chiffre d'affaire mondial des produits phytosanitaires avoisine les 23 milliards d'euros ; les parts respectives des



herbicides, des insecticides-acaricides, et fongicides s'élèvent à 47%, 29% et 18% respectivement ; tandis que les antibiotiques antibactériens représentent moins de 1% [18].

Dans un programme de protection intégrée, la lutte chimique raisonnée doit être appliquée seulement quand les populations d'un ravageur ou d'un agent pathogène deviennent très importantes ainsi que par le choix de pesticides les plus inoffensifs possibles pour les auxiliaires. Il convient également de respecter les doses prescrites, le mouillage pour une surface donnée, les délais d'emploi des produits avant récolte et d'alterner les familles chimiques de pesticides pour éviter les phénomènes d'accoutumance [195].

#### 4.2.3. La lutte génétique

L'amélioration des plantes en matière phytopathologique vise l'obtention de génotypes de végétaux qui présentent, avec l'agent considéré, un rapport d'incompatibilité (résistance) ou qui produisent adéquatement nonobstant, l'infection par l'agent concerné (tolérance) [18].

Une des bases de l'agronomie moderne est la sélection des caractères d'intérêt pour améliorer la qualité des plantes cultivées. La sélection variétale peut s'effectuer par les méthodes classiques en tirant profit des lois de Mendel ou par marquage en utilisant l'outil moléculaire [196].

Le développement de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis des interventions efficaces dans le domaine de la résistance des plantes aux organismes pathogènes [197]. Le génie génétique autorise la modification du génome d'un organisme par l'introduction de gènes provenant d'un autre organisme, conduisant à la biosynthèse de molécules (OGM) provoquant la résistance des plantes aux champignons, bactéries, insectes et nématodes [197]. La technique de gestion principale pour la plupart des maladies des plantes est de développer des cultivars ou des hybrides qui possèdent une résistance génétique ou une tolérance à l'infection [198]. A titre d'exemples, chez les champignons, le gène *pm3b* provenant du blé, confère la résistance à l'oïdium (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) [199].

Dans le cas des nématodes, ce sont des variétés d'une espèce normalement sensible aux nématodes qui vont attirer ces derniers des couches profondes grâce à leurs exsudats racinaires puis les bloquent à l'intérieur de la racine par une réaction d'hypersensibilité caractérisée par une mort rapide et

localisée des cellules végétales autour du nématode due à l'expression d'un gène de résistance. Cette réaction peut être précoce en empêchant la migration des larves jusqu'au cylindre central de la racine, le privant ainsi de nourriture, ou tardive en empêchant le développement du site nourricier indispensable au développement des nématodes [200]. A ce jour, seulement quelques espèces de plantes ont montré des potentialités de résistance totale aux nématodes à galles: la carotte (gène Mj-1), le coton (gènes MIC-3, rkn-1, Mi1), les *Prunus* (gènes Ma), la tomate (gènes Mi), la pomme de terre (gènes Rmc1, MfaXII), les piments/poivrons (gène N et gènes Me) [201].

Dans le cas des bactéries phytopathogènes, les travaux sur la résistance à la moucheture bactérienne chez la tomate, impliquent des gènes végétaux de résistance à des bactéries dont le fameux gène d'une protéine kinase (Pto) cloné vers 1993 chez la tomate. Ce gène bloque l'expression du gène de virulence de l'agent causal de la maladie ; *Pseudomonas syringae pv. tomato* [202].

#### 4.2.4. La lutte biologique

La lutte biologique contre les maladies des plantes peut se produire grâce à des mécanismes biologiques qui sont généralement considérés comme l'antibiose, la compétition, le parasitisme, la résistance induite, l'hypo virulence et la prédation [203 ; 204].

La lutte biologique est une méthode complémentaire à la lutte chimique qui se base sur l'utilisation de microorganismes bénéfiques ou biopesticides d'origine microbienne permettant d'attaquer et de contrôler les agents phytopathogènes (champignons, bactéries, nématodes) [205].

Un biopesticide d'origine microbienne est un organisme comme une bactérie, un virus, un champignon ou un protozoaire, utilisé pour contrôler une maladie ou un ravageur. La littérature rapporte de nombreux travaux réalisés à travers le monde en plein champ et sous serre pour le contrôle d'un certain nombre de maladies causées par des pathogènes telluriques, foliaires ou de post-récoltes [206]. Chez la plupart de ces organismes biopesticides, l'activité antagoniste a souvent été associée à la production de métabolites secondaires [207].

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique, les *Pseudomonas* spp. fluorescents ainsi que les espèces non phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* [208; 209].

L'utilisation de biopesticides d'origine microbienne à l'égard de bactéries phytopathogènes a également donné des résultats très intéressants à travers le monde. C'est ainsi que la souche *K84 d'Agrobacterium radiobacter* a été utilisée, chez différentes espèces de Rosacées fruitières avec succès comme agent de contrôle biologique contre le crown gall [210; 211]. Cette même bactérie a été testée sous nos conditions sur les plants de pêcher conduits en plein champ apportant des résultats avec succès, soit plus de 94% d'efficacité [212]. Un antibiotique appelé agrocine produit par cette souche, est un facteur essentiel dans le mécanisme de contrôle de la maladie du crown gall causée par *A tumefaciens* [213]. Par ailleurs, les spores de la bactérie mycélienne *Pasteuria penetrans* sont capables de parasiter les nématodes à galles *Meloidogyne* et bloquer leur multiplication [147].

Différents biopesticides à base d'agents microbiens sont à l'origine d'accidents pathologiques dans les populations d'arthropodes ravageurs des cultures. Plusieurs de ces germes entomopathogènes constituent la matière active de bio-préparations dont les propriétés insecticides sont souvent spécifiques d'un groupe de ravageurs d'origine fongique, bactérienne, virale, des protozoaires ou des nématodes [214]. Dans le cas des champignons entomopathogènes, les espèces qui ont été à la base de préparations insecticides sont *Neozygites fresenii* inféodé aux pucerons, en particulier *Aphis gossypii*, *Entomophaga maimaiga* sur le lépidoptère bombyx disparate (*Lymantria dispa*) et *Zoophtora infestans* pathogène de divers groupes d'insectes Lépidoptères et Homoptères [215].

Pour les germes d'origine bactérienne, *Bacillus thuringiensis* (*Bacillaceae*, Gram positif), présente la capacité de synthétiser et excréter pendant la phase de sporulation, une inclusion cristalline composée de protéines spécifique  $\delta$ -endotoxine qui porte une propriété mortellement toxique pour de nombreux ordres d'insectes (*Lepidoptera*, *Coleoptera* et *Diptera*) [215].

En plus des biopesticides microbiens, les pesticides biochimiques sont des substances qui sont synthétisées naturellement pour contrôler les organismes

nuisibles par des mécanismes non toxiques. Ils comprennent des substances telles que les phéromones sexuelles des insectes qui interfèrent dans l'accouplement ainsi que des extraits variés de plantes parfumées qui attirent les insectes nuisibles dans les pièges [216]. Les phéromones sont des composés chimiques volatils. Elles sont de plusieurs types (sexuelles, de défense, d'agrégation) mais les plus couramment utilisées pour la protection des cultures sont les phéromones sexuelles, qui sont impliquées dans la reproduction des insectes [217]. Elles sont le plus souvent émises par les femelles pour attirer les mâles en vue de l'accouplement [214]. Plusieurs familles de molécules sont identifiées comme phéromones, parmi lesquelles, des dérivés d'acides gras, d'alcaloïdes et de terpènes [218; 219].

Un autre volet concernant les méthodes de lutte biologique est souvent l'utilisation de biopesticides d'origine végétale dans un programme de lutte intégrée, pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ennemis des cultures.

#### 4.3. Importance des biopesticides d'origine végétale

En raison de la conjoncture actuelle, les biopesticides d'origine botanique sont appelés à un avenir meilleur, car la demande en produits phytosanitaires sans danger, de faible rémanence et qualifiés de produits verts est actuellement en hausse [197].

Actuellement, on rapporte que 2121 espèces de plantes possèdent des propriétés de lutte antiparasitaire ; un total de 1005 espèces identifiées, présentent des propriétés insecticides, 384 avec des propriétés anti-appétissantes, 297 possédant des propriétés répulsives, 27 avec des propriétés attractives et 31 avec des propriétés de stimulateurs de croissance [216].

Les composés secondaires des plantes sont réputés depuis l'antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques et depuis quelques décades, l'homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques [220]. En particulier, ces composés secondaires sont souvent considérés comme étant un moyen de défense de la plante productrice contre divers organismes comme les pathogènes et les ravageurs. Ces composés sont très nombreux et variés, et certains sont

largement distribués, comme les alcaloïdes, les terpènes et les tanins, tandis que d'autres ont une répartition plus restreinte comme les composés soufrés [220]. Les molécules du métabolisme secondaire des plantes appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes [221].

D'autres substances secondaires des plantes, les phytoecdystéroïdes représentent une classe particulière [222]. On en connaît actuellement plus de 200 représentants différents [223]. Ce sont des analogues des hormones de mue des insectes et ils peuvent participer à la défense de plantes contre les invertébrés et arthropodes phytophages. L'effet toxique du 20-hydroxyecdysone sur les espèces d'insectes est observé à 2-25 ppm [224]. Parmi les 3000 espèces végétales étudiées, 5 à 6 % contiennent des ecdystéroïdes en quantités significatives ce qui signifie plus de 50ng/g de poids sec [225]. L'activité biologique des phytoecdystéroïdes a été testée sur une grande variété d'insectes [226]. Des études ont également démontré que phytoecdystéroïdes ont un effet sur la croissance et la reproduction des insectes [227].

Les substances soufrées des végétaux montrent de multiples activités pesticides qui peuvent les destiner à de nombreuses applications phytosanitaires. Les effets toxiques des *Allium* spp. et de leurs composés soufrés sont connus depuis longtemps chez les bactéries pathogènes à l'homme mais aussi sur les végétaux [220]. Ainsi, les extraits d'*Allium* ont une action sur de nombreux insectes, nématodes, bactéries et champignons [228]. Plusieurs bactéries sont sensibles à divers *Allium* spp. et leurs extraits [229]. En effet, *Erwinia carotovora* et *Agrobacterium tumefaciens* sont sensibles à *Allium tricoccum*, *Allium cernurum* et *Allium sativum*. Par ailleurs, *Allium sativum* agit sur plusieurs espèces de *Pseudomonas* spp. et de *Xanthomonas* spp. [220].

Les effets toxiques des *Allium* sur les champignons ont été étudiés surtout sur les champignons pathogènes à l'homme. Plusieurs travaux se sont intéressés aussi aux champignons phytopathogènes *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, divers *Fusarium*, dont *Fusarium oxysporum*, *Fusarium poae*, ou *Verticillium albo-atrum*, qui sont sensibles à l'oignon et l'ail, alors que *Phytophthora infestans* est sensible à *Allium tuberosum* [220].

#### 4.4. Les pesticides d'origine végétale utilisés actuellement

Le nombre très important de molécules sémiocchimiques existant dans le monde végétal, ainsi que leur facilité de synthèse ; moins compliquée et moins coûteuse à fabriquer que les phéromones, en font des substances largement utilisées en agriculture biologique. Leur utilisation est répandue pour un très grand nombre de cultures certifiées, aussi bien céréalières, légumières, de plantes aromatiques et médicinales et de plantes ornementales [217].

Les extraits végétaux ont surtout été employés pour le contrôle des phytophages ravageurs de cultures. Ainsi, les substances végétales les plus couramment utilisées au cours de ces dernières années sont les suivantes :

4.4.1. Le pyrèthre, composé extrait à partir des fleurs de plantes appartenant à la famille des *Asteraceae* comme les chrysanthèmes et les pyrèthres [217]. Le pyrèthre continue de dominer le marché mondial des insecticides végétaux accaparant à lui seul près de 80% des ventes [230]. Ses avantages ; un large spectre d'activité, un effet choc rapide et une disparition totale dans l'environnement [231]. Les vastes plantations de *Chrysanthemum cinerariaefolium* aménagées en Tasmanie (Australie) devraient parvenir au stade de la récolte comme une nouvelle source d'approvisionnement et devrait contribuer à accroître la disponibilité de la matière première [230].

4.4.2. l'azadirachtine extraite de la noix du margousier ou neem, originaire d'Inde, appartenant à la famille des limonoïdes et qui se révèle être un insecticide puissant, est utilisée sur les noctuelles, les cicadelles, les tordeuses et les doryphores [217]. Bien que l'azadirachtine ait des effets antiappétants chez les insectes, l'efficacité du neem sur terrain comme agent de protection des cultures réside davantage dans la capacité de l'azadirachtine d'inhiber la croissance des insectes cibles en les empêchant de muer [230]. Les extraits du neem ont également des propriétés antifongiques [232]. L'Inde demeure à ce jour la principale source de neem, fournissant à elle seule la quasi-totalité du neem utilisé à des fins antiparasitaires aux Etats-Unis [230].

Par ailleurs, les extraits de neem, d'*Eucalyptus tereticornis*, les crotalaires (*Crotalaria spp.*) ou la tagete (*Tagetes spp.*), constituent une matière efficace pour la lutte contre les nématodes à galles [147].

4.4.3. Les huiles essentielles constituent des substances ayant des spécificités qui les ont fait utiliser depuis longtemps en pharmacie, parfumerie, industrie agroalimentaire et industrie chimique [217].

Plus récemment il a été démontré que de nombreux constituants terpénoïdes d'huiles essentielles végétales sont toxiques au contact, pour un large éventail d'insectes et peuvent être utilisés comme insecticides d'origine végétale [267]. Un nombre important de composés chimiques sont connus. De ce type, les plus puissants figurent le thymol, extrait de thym (*Thymus vulgaris*, Lamiacées), la pulégone, extraite de menthe pouliot (*Mentha pulegium*, Lamiacées) et l'eugénol, extrait du clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*, Myrtacées) [230; 233].

4.4.4. Les glucosinolates de formule (1'-Thio-β-D-glucopyranosyl-alkyl-Z-N-hydroximin sulphate esters), sont des métabolites secondaires des plantes de l'ordre des *Capparales*, en particulier les *Brassicaceae* (*B. napus* var. *oleifera*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. carinata*, *Raphanus sativus* var. *oleifera*, *Sinapis alba* et *Crambe abyssinica*) [234; 235].

Une grande variété de parasites telluriques a été ciblée pour le contrôle par l'utilisation de glucosinolates d'origine végétale (biofumigants), entre autres les insectes, nématodes, champignons pathogènes et les mauvaises herbes, montrant pour l'ensemble une sensibilité à l'inhibition par les produits d'hydrolyse de glucosinolate [236 ; 237].

Les glucosinolates semblent prometteurs pour lutter contre les maladies post-récolte surtout *Penicillium expansum* et *Monilinia laxa*. En particulier, allyl-isothiocyanate (AITC) de *Brassica carinata*, butenyl-isothiocyanate de gluconapine de *Brassica rapa*, le 2-phényléthyl isothiocyanate de gluconasturtine de *Barbarea verna* et le 4-méthyl-thiobutyl isothiocyanate de glucoerucine extrait d'*Eruca sativa* qui ont été testés et inoculés sur les poires et les fruits à noyaux. Les traitements ont été efficaces 24 h et 48 h après l'inoculation de poires [238]. Ainsi, un effet anti-appétant de la sinigrine a été rapporté pour les pucerons, *Aphis fabae*, *Acyrtosiphon solani* et *Aphis pisum*, et même pour un criquet très polyphage comme *Melanopus sanguinipes* qui consomme moins de feuilles de Crucifères en rapport avec leur taux de glucosinolates [220].

## CHAPITRE 5

### MATERIEL ET METHODES

#### 5.1. Introduction

Avec le développement de la chimie, on s'est vite rendu compte qu'il y avait tout un arsenal capable d'éliminer les ennemis de la plante (bactéries, champignons, nématodes, insectes..). Cette approche a conduit à une élimination spectaculaire, du moins à court terme, des organismes nuisibles, et à une détérioration parallèle, mais pas nécessairement visible de la qualité de l'environnement [221]. A cause de leur effet négatif sur l'environnement, l'utilisation des pesticides chimiques est devenue de plus en plus restrictive [239].

Un examen systématique des découvertes phytochimiques répertoriées, en utilisant la base de données NAPRALERT (Natural Products Alert Database), révèle que seulement 2 à 5% des espèces végétales ont été examinées en détail d'un point de vue phytochimique [240]. Une étude réalisée par BALICK et coll. [241], a montré que moins de 1% des plantes tropicales sont étudiées d'un point de vue phytochimique. Par conséquent, la voie reste ouverte vers la découverte de nouvelles plantes et par la même de nouvelles molécules à effet bactéricide, nématicide, insecticide ou fongicide [221].

#### 5.2. Objectifs

Les biopesticides d'origine végétale peuvent constituer une solution alternative au « tout chimique » de ces dernières décennies. Leurs propriétés pesticides et leur relative innocuité environnementale en font des composés très intéressants pour les traitements phytosanitaires à venir [242].

L'intérêt du développement de nouvelles formulations à base d'extraits végétaux est dû à leurs avantages écologiques et environnementaux indéniables [280].

Ce présent travail a pour objectifs d'évaluer l'efficacité nématicide, bactéricide et fongicide *in vitro* de quatre espèces adventices *Calendula arvensis*, *Euphorbia*



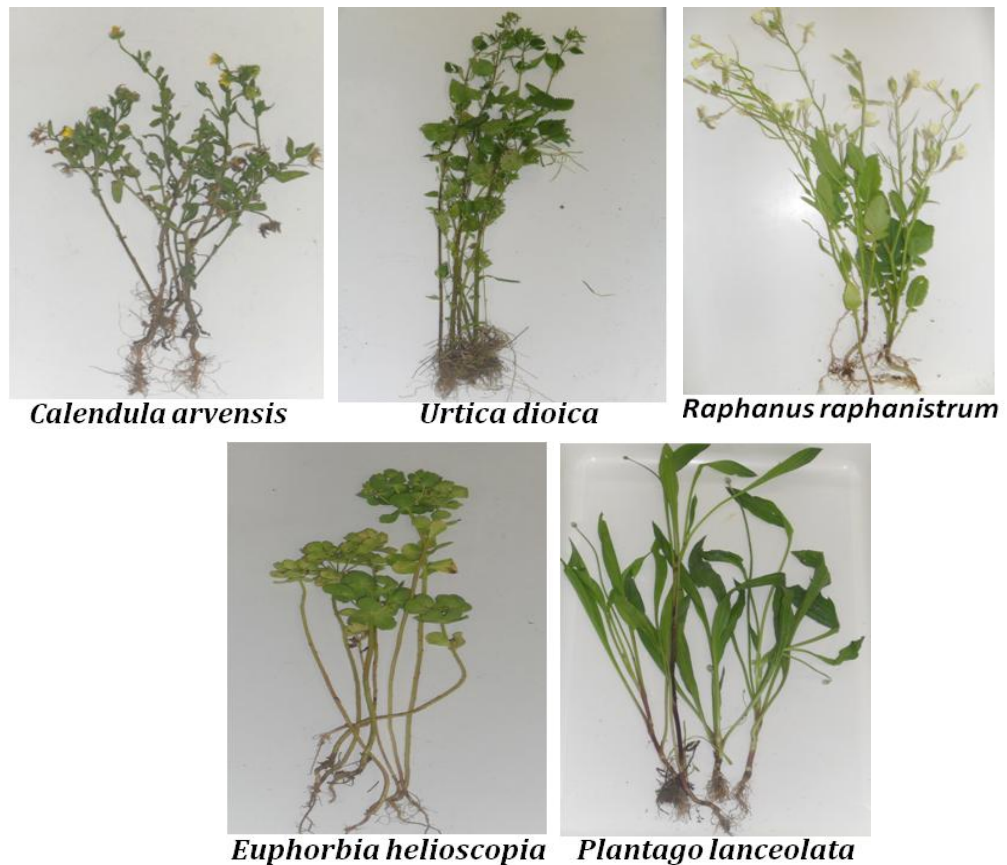
*helioscopia*, *Plantago lanceolata* et *Urtica dioica*. Dans cette partie, sont exposés des problèmes d'ordre méthodologique soulevés par notre approche expérimentale.

### 5.3. Matériel végétal

#### 5.3.1. Espèces végétales étudiées

Nous avons sélectionné un total de cinq plantes spontanées de diverses familles botaniques. Leur identification a été faite par le professeur Krimi Z, puis confirmée par l'utilisation des clés de détermination de la flore de QUEZEL et SANTA [243] (figure 5.1).

Ces espèces et leurs familles botaniques ont été déjà étudiées pour plusieurs activités biologiques incluant leur pouvoir anti-tumoral, anti-leishmanique, antibactérien, anti-inflammatoire, antioxydant et antiviral dans le domaine médical [244; 245].



**Figure 5.1** : Les cinq espèces végétales utilisées dans les activités antagonistes [originale]

### 5.3.2. Description botanique et activités biologiques des espèces choisies

#### 5.3.2.1. *Euphorbia helioscopia* ou Euphorbe réveille-matin (*Euphorbiaceae*)

C'est une plante annuelle à cycle court [246], de 10-50 cm., glabrescente, à racine pivotante; tige épaisse, dressée ou ascendante, ordinairement solitaire ; feuilles éparses, obovales en coin, obtuses, denticulées dans leurs moitiés supérieures, les ombellaires plus grandes, ombelle large, concave, à rayons allongés, trichotomes puis dichotomes ; bractées obovales, inégales ; glandes entières ; capsule de 3-5 mm., glabre et lisse, à coques arrondies ; styles à peine bifides ; graines de 2 mm., ovoïdes, brunes, réticulées-alvéolées, caronculées [1]. Les espèces appartenant au genre *Euphorbia* notamment *Euphorbia helioscopia* sont connues en médecine pour leur activité anti bronchite et anti rhumatoïde, antivirale antitumorale, anti inflammatoire, anti diarrhéique, anti-amibienne [247; 248].

#### 5.3.2.2. *Plantago lanceolata* ou Plantain lancéolé (*Plantaginaceae*)

Plante de 10-60 cm., verte, noircissant, à souche verticale courte; hampes anguleuses, sillonnées, pubescentes ou glabrescentes, dépassant beaucoup les feuilles ; celles-ci presque glabres, parfois un peu laineuses, lancéolées-acuminées, atténuées en long pétiole à 3-7 nervures fortes ; épi ovoïde ou oblong, glabre ; bractées ovales-acuminées, noirâtres sur le dos ; sépales latéraux à carène un peu poilue ; corolle blanchâtre, glabre, à lobes ovales ; anthères blanches ; capsule à 2 graines oblongues, canaliculées à la face interne, lisses [249].

Les espèces de ce genre ont été déjà étudiées pour plusieurs activités biologiques : pouvoir, anti-inflammatoire, antioxydant, antibactérien, antifongique et antiviral dans le domaine médical [244 ; 245].

#### 5.3.2.3. *Calendula arvensis* ou Souci des champs (*Asteraceae* ou *Compositae*)

Plante annuelle de 1-3 dm, dressée, ascendante ou diffuse, à rameaux étalés, pubescente; feuilles caulinaires oblongues-lancéolées, lâchement dentées ou entières, mucronées, sessiles et demi-embrassantes ; involucre à folioles presque égales, oblongues-lancéolées, acuminées, à bords étroitement scarioux ; achaines extérieurs arqués, épineux sur le dos, les intérieurs roulés en anneau,

lisses ou épineux ; capitules assez grands, solitaires, terminant les rameaux ; fleurs jaunes. Espèce polymorphe dans la région méditerranéenne [250].

Les plantes de cette famille ont été largement utilisées dans le passé et sont encore utilisés aujourd'hui pour leurs propriétés médicinales [251]. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, des propriétés digestives, antihelminthiques et antitussifs, antidiabétiques et immunostimulantes [252 ; 253].

#### 5.3.2.4. *Urtica dioica* ou ortie dioïque (*Urticaceae*)

Plante vivace de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, hispide, à souche rampante; tiges robustes, dressées, simples; feuilles grandes, ovales-acuminées, un peu en coeur à la base, dentées, à grosses dents ovales-triangulaires; pétiole 1-2 fois plus court que le limbe, à 2 stipules linéaires-lancéolées; fleurs dioïques, parfois monoïques, en grappes rameuses bien plus longues que le pétiole, les fructifères pendantes ; périanthe pubescent [249].

Cette espèce est reconnue pour ses activités biologiques, anti-inflammatoire antirhumatismal, antivirale, diurétique, anti diarrhéique, révulsif, dépuratif, stomachique, hémostatique, galactogène [244 ; 245].

#### 5.3.2.5. *Raphanus raphanistrum*.L ou la ravenelle (*Brassicaceae*)

Racine annuelle, bisannuelle ou pérenne, grêle, dure, pivotante; tige de 20-60 cm, rameuse; feuilles inférieures lyrées, les supérieures oblongues, dentées; fleurs jaunes, parfois blanchâtres ou violacées; siliques étalées-dressées, bosselées, se divisant par des étranglements en articles transversaux, ovoïdes ou oblongs osseux, striés en long; bec 4-5 fois plus long que le dernier article.

Cette plante est sélectionnée pour cette étude en raison de son utilisation dans la médecine traditionnelle pour son activité anti inflammatoire, antioxydante et anti rhumatismale [254 ; 255].

#### 5.3.3. Récolte et conservation du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude, comprend; *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* *Raphanus raphanistrum* et *Urtica dioica* qui ont été récoltées la matinée, d'une façon aléatoire au stade floraison,

durant la période mi Avril et mi Mai 2009 pour ; *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, *Urtica dioica* et le début de mois de Mars 2010 pour *Raphanus raphanistrum*. Les espèces végétales ont été collectées au niveau de la station expérimentale de l'Université Saad Dahlab de Blida (Soumaa, Blida), à différents emplacements. Ces espèces vivent à l'état spontané sous forme libres ou parfois en petits peuplements accompagnant ou non des cultures. Les échantillons collectés (les plantes entières) sont mis dans des sachets en plastique stériles et traités le jour même de leur arrachage. Un prélavage du matériel végétal est effectué à l'eau courante du robinet pour le débarrasser des débris. Par la suite, une opération de séparation des parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) des parties souterraines (racines) est effectuée.

Les échantillons ont été étalés sur du papier blanc et mis à sécher à l'air libre, à l'abri de lumière et d'humidité et à la température ambiante du laboratoire. Devenus secs, les échantillons sont pilés dans un mortier en porcelaine désinfecté, puis réduits en poudre fine à l'aide d'un mixeur électrique. La poudre obtenue est récupérée et conservée dans des bouteilles stériles hermétiquement fermées, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à son extraction.

#### 5.3.4. Préparation des extraits aqueux

Le procédé d'extraction utilisé au cours de cette expérimentation est la macération aqueuse qui consiste à maintenir la plante en contact avec l'eau à une température ambiante pendant un temps plus ou moins long, dans le but de faire libérer et extraire toutes les molécules actives existantes chez les plantes à étudier.

Vingt grammes de chaque partie du matériel végétal sec est mis en solution avec 250 ml d'eau distillée stérile pendant 72h dans des flacons hermétiques, sous agitation horizontale à la température ambiante du laboratoire [256]. Après 72h, Le mélange est décanté et les surnageants sont filtrés successivement d'abord à l'aide de compresses stériles, puis par le biais du papier Wattman (N°1). Le filtrat est ensuite stérilisé sous vide (ultrafiltration) à l'aide d'un dispositif millipore de 0,45 µm de diamètre [257].

Les dix extraits bruts ont été ensuite préservés aseptiquement dans des bouteilles de Roux stériles de 25 cm<sup>3</sup> [Coster (cell culture flask)], emballées par du

papier aluminium afin d'éviter toute dégradation des molécules par la lumière, puis conservés au réfrigérateur (4°C.) pour une utilisation ultérieure.

#### 5.3.5. Préparation de la gamme de concentration des filtrats végétaux

A partir des extraits aqueux de ces 5 plantes obtenus après ultrafiltration, nous avons choisi d'effectuer la suite des analyses du pouvoir biopesticide avec une gamme de concentrations pour l'évaluation de l'activité potentielle antibactérienne, antifongique et nématocide *in vitro* vis-à-vis de la collection de nos souches bactériennes et fongiques choisies et les nématodes à galles *Meloidogyne spp.* Les concentrations utilisées sont: l'extrait pur, la dilution ½ et la dilution ¼ (1 quart de l'extrait, 3 quarts d'eau distillée stérile).

#### 5.4. Tests biologiques

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et nématocide des extraits aqueux des plantes utilisées, nous avons réalisé des tests biologiques *in vitro*.

##### 5.4.1. Evaluation de l'activité bactéricide des extraits aqueux

###### 5.4.1.1. Souches bactériennes testées

Sept souches bactériennes de référence ont été sélectionnées, elles font partie de la collection des souches phytopathogènes du laboratoire de phytobactériologie. Une partie de ces souches nous a été fournie gracieusement par BOUZAR H. (Californie, USA), l'autre partie de la collection nous a été communiquée par le laboratoire de microbiologie du sol (Université Claude Bernard, Lyon I). Cette collection comprend six bactéries à Gram négatif dont: *Agrobacterium tumefaciens* (C58), *Agrobacterium vitis* (LFBP 5523), *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, *Erwinia amylovora* et *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*; et une à Gram positif *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Le milieu LB enrichi par ajout de glucose (Luria Bertani), a constitué le principal milieu de culture utilisé pour cette étude.

#### 5.4.1.3. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour la réalisation de la suite des tests, il est indispensable de travailler avec des clones purs et une concentration cellulaire (densité bactérienne) connue pour l'ensemble des bactéries. Les suspensions des souches bactériennes à pulvériser ont été préparées à partir de cultures préalablement purifiées.

Sous la hotte, et dans des conditions aseptiques, nous avons préparé la solution mère en raclant à l'aide d'une anse stérile, la culture bactérienne d'une souche âgée de 24h à 48h cultivée sur le milieu LPGA. La souche bactérienne à tester a été par la suite mise en suspension dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile. Après agitation, nous avons réalisé une série de dilutions (suspensions-dilutions), par prélèvement d'un millilitre pour chaque dilution à l'aide d'une micropipette stérile. Le volume prélevé (1 ml) est mis dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile [258].

A l'aide du spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des suspensions bactériennes préparées à la longueur d'onde de 600 nm.

Afin de réaliser le comptage des colonies bactériennes, nous avons prélevé avec une micropipette un volume de 0,1 ml de chaque dilution. Ce volume est étalé en boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA. L'étalement a été réalisé en utilisant des billes en verre préalablement stérilisées. Enfin, nous avons réalisé une étape d'incubation à 30°C. pendant 48h. Après une incubation de 48h à 72h, le comptage des colonies est réalisé sous la loupe binoculaire où apparaissent 30 à 300 colonies suivant la souche bactérienne [258]. Le nombre de colonies dans les boîtes de pétri est dénombré et est rapporté à la dilution choisie pour permettre d'estimer la densité bactérienne exprimée en CFU (colony forming units/ml) à une DO donnée.

Pour les tests antibactériens *in vitro*, les suspensions bactériennes sont préparées à une densité optique variant selon la souche bactérienne de 0,12 à 0,35, ce qui correspond à une concentration cellulaire de  $10^6$  à  $10^8$  bactéries/ml.

Ces valeurs ont été déduites pour chaque souche bactérienne (appendice E<sub>1et 2</sub>), car elles dépendent de la concentration en polysaccharides cellulaires constituant la capsule bactérienne et dont la taille est variable d'une bactérie à une autre.

#### 5.4.1.4 Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait végétal

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux de nos plantes, nous avons effectué deux méthodes de tests biologiques *in vitro*. La première technique est la technique de disque-diffusion et la deuxième est celle du spectrophotomètre.

##### 5.4.1.4.1 Méthode de diffusion sur gélose

L'activité bactérienne de nos extraits aqueux a été testée par la technique de la diffusion de disques de papier whattman en milieu gélosé [259 ;260 ; 261], vis-à-vis de sept souches bactériennes pathogènes citées précédemment. Le test de disque-diffusion a été appliqué pour déterminer l'inhibition de la croissance des bactéries par des extraits végétaux [262].

Des disques de 8 mm de diamètre sont découpés dans du papier Wattman n° 01, stérilisés et imprégnés dans les conditions d'asepsie et pour les différentes concentrations d'extraits aqueux à raison de 50µl par disque [263]. Ces disques ont été déposés stérilement sur la gélose à raison de 3 disques par boîte de Pétri. Les boîtes ont été par la suite conditionnées une nuit dans le noir à la température du laboratoire, pour laisser les molécules actives diffuser dans la gélose. Le témoin correspond à un disque imprégné d'eau distillée stérile.

Une suspension de la souche pathogène à tester de densité cellulaire déterminée, est appliquée par 'spray' à l'aide d'un pulvérisateur sur la surface des boîtes de pétri. L'incubation se fait à 27-28°C. durant 24 à 48 heures. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'œil nu, le diamètre en mm de la zone d'inhibition déterminée par les différentes concentrations, autour des disques imprégnés par le filtrat de l'extrait aqueux. Les valeurs moyennes ont été enregistrées.

#### 5.4.1.4.2 Méthode de spectrophotométrie

Le suivi de la croissance bactérienne sous l'effet de l'extrait végétal par la méthode de la mesure de la densité optique [264 ; 265 ; 266], a pour objectif d'évaluer l'efficacité des extraits aqueux à différentes concentrations, à réduire le taux de la population microbienne par rapport à celle du témoin. Ce test vient compléter les essais antimicrobiens réalisés par la méthode des disques-diffusion.

Dans des tubes à essais contenant 5 ml de bouillon nutritif du milieu LB modifié, stérilisés à 110°C. pendant 20 min, les extraits avec leurs dilutions (eau distillée stérile pour le témoin) sont réalisés par l'ajout de 100 µl à l'aide d'une micropipette. Après 2 heures, un volume de 100 µl de la suspension bactérienne à la densité optique calculée [267 ; 268] estensemencé dans chaque tube à essai préalablement injecté par nos extraits. L'essai est répété trois fois.

La mesure de la croissance bactérienne est réalisée par la lecture de l'absorbance avant incubation pour enregistrer la densité optique du mélange à l'état initial, et après 24h et 48h d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm.

#### 5.4.2. Etude du pouvoir antifongique *in vitro* des extraits aqueux

##### 5.4.2.1. Les souches fongiques et milieux de culture

Les dix champignons utilisés dans cette étude ont été fournis gracieusement par le laboratoire de phytopathologie (Université d'Alicante, Espagne). Ces espèces fongiques sont choisies pour leur pathogénicité pour les plantes et leur pouvoir de contaminer les denrées alimentaires (*Aspergillus fumigatus*).

La collection d'isolats fongiques comprend: *Alternaria alternata*, *Alternaria chlamydosporia*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis vaccinii*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Aspergillus fumigatus*, qui sont des agents phytopathogènes causant des dégâts aussi bien au champ qu'en conservation [269 ; 270].



En plus de ces huit champignons, nous avons testé les extraits aqueux sur *Pochonia chlamydosporia* et *Paecilomyces sp.* qui sont des espèces nématophages utilisés en lutte biologique [271 ; 272].

Les isolats fongiques sont entretenus par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) à pH=6.5 à 7, favorable à leur croissance [273], à l'exception du *Gaeumannomyces graminis var. tritici* qui a été cultivé sur le milieu CMA (Corn Meal Agar) à pH=5.5 à 6.

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 115°C.) et refroidis au bain Marie à 45°C., ensuite coulés sous forme d'une couche plus ou moins épaisse en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre [274].

Les isolats fongiques sont purifiés afin de s'assurer de la pureté des souches à ensemercer. Les clones purs sont par la suite mis en culture à l'incubateur à 27°C. La durée de croissance est de 3 jours pour *Aspergillus fumigatus* en raison de sa croissance très rapide [275] et de 7 jours au maximum pour les autres champignons à croissance plus au moins lente.

#### 5.4.2.2. Activité antifongique *in vitro*

L'activité antifongique vis-à-vis des dix souches de champignons cités précédemment a été déterminée par le test d'activité volatile ou 'volatile activity' [276 ; 277 ; 278].

Cette méthode consiste à déposer au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu de culture, un disque mycélien issu d'une culture fongique jeune découpé à l'aide d'un emporte pièces de 8 mm de diamètre. Les disques mycéliens sont récupérés d'une culture âgée de 4 jours pour *Aspergillus fumigatus* en raison de sa croissance très rapide et une semaine pour les autres champignons.

Des disques de papier Wattman de 8 mm de diamètre, préalablement stérilisés à l'autoclave (115°C. pendant 20 min), sont d'abord imprégnés et saturés avec 30 µl de chaque extrait végétal filtré ou de sa dilution, puis déposés sur le couvercle de la boîte de Pétri retourné, à raison de 1 disque imprégné par couvercle [279 ; 275]. Le témoin consiste en des disques imprégnés avec le même volume d'eau distillée stérile. Chaque test est répété 3 fois.

La lecture de l'activité antifongique des extraits bruts vis-à-vis des dix champignons a été enregistrée en mesurant à l'œil nu le diamètre en mm. Les souches fongiques traitées présentant une faible croissance par rapport au témoin sont des isolats sensibles aux extraits aqueux.

La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en utilisant la formule décrite par PANDEY et coll. [280] :

$$PI = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

**PI** : Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés (%). **DC** : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité (eau distillée stérile) (mm). **CT** : Le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon traité (extrait pur ou dilutions) (mm).

#### 5.4.2.3. Test de sporulation

Afin de distinguer entre l'effet fongistatique et l'effet fongicide de l'extrait sur l'organisme cible, la technique modifiée de MAHANTA et coll. [281], a été utilisée. L'objectif de cette méthode est d'évaluer la viabilité du champignon après une exposition au traitement par l'extrait végétal.

Après avoir obtenu des effets antifongiques, nous avons choisi de revitaliser l'isolat fongique présentant la plus forte inhibition par nos extraits bruts. Il s'est avéré alors que *Fusarium oxysporum* a montré une croissance mycélienne très réduite suite au traitement par l'extrait de *Raphanus raphanistrum*.

Les spores des colonies de *Fusarium oxysporum* préalablement exposées au traitement, ont été collectées en ajoutant 5 ml d'eau distillée stérile contenant 0.1ml /100 ml de Tween 80 à chaque boîte de Pétri et en frottant la surface trois fois avec un écarteur en forme L (Pipette Pasteur stérile). La suspension des spores a fait l'objet d'une centrifugation. Nous avons effectué la même procédure avec le témoin de *F. oxysporum*. La suspension collectée à partir du champignon traité a été utilisée pour la détermination de la concentration des spores par le dénombrement des conidies et par comparaison avec celle du témoin [282 ; 283].

A cet effet, nous avons procédé à un comptage du nombre total des spores en suspensions à l'aide de la cellule de Malassez ; qui est une lame spéciale quadrillée (hématimètre) permettant le comptage de différents types de cellules végétales, animales ou microbiennes.

La sporulation est exprimée en nombre de conidies par unité de volume (spores/ml ou mm<sup>3</sup>). Le pourcentage d'inhibition de la sporulation par rapport au témoin est calculé selon la formule de LEROUX et CREDET [284] :

$$I (\%) = \frac{Nt - Nf}{Nt} \times 100$$

**I** : pourcentage d'inhibition de la sporulation. **Nt** : nombre de conidies estimées chez le témoin.

**Nf** : nombre de conidies estimées en présence du traitement.

### 5.4.3. Evaluation de l'efficacité nématocide des extraits aqueux

#### 5.4.3.1 Extraction et préparation des larves (L2) de *Meloidogyne*

Les échantillons de racines de la tomate infestées par les nématodes à galles *Meloidogyne spp.* ont été collectés au niveau de l'institut technique de cultures maraîchères et industrielles (ITCMI) de Staoueli.

Les racines sont lavées à l'eau courante. Ces dernières sont mises dans une boîte de Pétri en verre en vue d'extraction de masses d'œufs.

L'extraction des masses d'œufs à partir des racines fines et jeunes est réalisée sous une loupe binoculaire (grossissement x25), par la méthode de forceps en utilisant deux aiguilles stériles.

Chaque masse d'œuf est mise dans une goutte d'eau distillée stérile contenue dans une boîte de Pétri (7 à 8 masses par boîte), ces dernières sont mis à l'étuve à 25°C. pendant 24h à 48h en vue d'éclosion massive. Après éclosion, les larves (L<sub>2</sub>) libérées progressivement dans l'eau sont récupérées et comptées quotidiennement à l'aide d'une loupe binoculaire.

#### 5.4.3.2 Test in vitro de l'efficacité nématocide sur les larves

Un nombre de 20±1 juvéniles de nématodes à galles du deuxième stade (J2) sont comptés puis aspirés à l'aide d'une seringue stérile et mis en solution dans 50 µl d'eau distillée stérile [285], cette suspension de larves est déposée dans un

puits de microplaques de culture cellulaire (Costar, cell culture cluster dish) renfermant 12 puits.

Les extraits et leurs dilutions sont alors additionnés à la suspension de larves à raison de 1 ml chacun [286]. Pour comparer l'efficacité des extraits, nous avons préparé deux témoins ; un à l'eau distillée stérile sert pour témoin négatif et l'autre au produit chimique nématocide le Vydate (appendice F) comme témoin positif qui est utilisé à la concentration de 15ul/ml par puits. L'essai est répété quatre fois.

Le comptage de nématodes morts est effectué 24h, 48h et 72h après incubation à 25°C. L'effet choc (après 6h de traitement) est réalisé pour l'extrait de l'espèce végétale présentant un effet nématocide élevé.

Pour évaluer l'effet irréversible des extraits végétaux, après 72h les juvéniles sont lavés trois fois à l'eau distillée pour éliminer le traitement et remis à l'étuve à 25°C pendant 24h en vu de la revitalisation [287].

La moyenne des résultats obtenus avec l'extrait est comparée à celle obtenue pour le témoin eau.

Le pourcentage de larves mortes dans chaque boîte est estimé après 24 heures, 48h et 72h d'incubation selon JOURAND et coll. [288]:

**% de mortalité= (nombre de larves immobiles/nombre total de larves) × 100**

#### 5.5. Calcul des concentrations létales 50

L'efficacité d'un toxique se mesure par la CL50 qui représente la quantité de substance toxique qui entraînant la mort de 50% d'individus traités. Elle est déduite à partir de tracer la droite de régression. Pour cela les pourcentages d'inhibition et de mortalité sont transformés en probits [289].

Ces probits sont représentés graphiquement en fonction du logarithme népérien de la concentration afin d'évaluer la CL50 correspondant à un probits de 5 (50% de mortalité) pour chaque compartiment des extraits aqueux étudiés. Ces concentrations sont déterminées à partir de l'équation d'une droite obtenue théoriquement.

## 5.6. Analyse statistique des résultats

Tous les essais ont été répétés au moins trois fois, par la suite un calcul des moyennes a été réalisé.

Les résultats recueillis sur les tests du pouvoir antibactérien, antifongique et nématocide des extraits aqueux issus des plantes adventices ont fait l'objet d'analyses statistiques.

Afin de vérifier une éventuelle efficacité des extraits vis-à-vis des souches bactériennes, des isolats fongiques, et des nématodes à galles testés et la comparaison entre les extraits aqueux, des analyses ont été faites en utilisant la procédure décrite par le SYSTAT vers. 12, SPSS 2009.

Dans les conditions paramétriques (ANOVA pour *ANalysis Of VAriance*), la distribution de la variable quantitative doit être normale. Afin de tester les interactions entre les facteurs (dose, compartiment), nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.).

Afin de vérifier une éventuelle efficacité des extraits vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques testées et la comparaison entre les extraits, nous avons utilisé la procédure décrite dans PAST vers 1.81 [290]. Les analyses de covariance ont été conduites en considérant les diamètres des zones d'inhibition comme moyennes et les souches à testées comme les variances

Les corrélations existantes entre les différents extraits et leurs dilutions et les souches bactériennes et fongiques sont mises en évidence par une analyse en composantes principales (ACP). Dans ce type de test, les différents extraits et leurs dilutions ont des coordonnées comprises entre - 1 et + 1 et appartiennent à un cercle de corrélation. L'interprétation de l'ACP se fait à partir de l'examen du cercle des corrélations et de la position du statut des variables sur les axes factoriels [291].

L'hypothèse de l'efficacité antibactérienne des extraits est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé, par utilisation du logiciel PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.81.

## CHAPITRE 6

### RESULTATS

#### 6.1. Résultats de l'effet bactéricide des biopesticides étudiés

##### 6.1.1. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits végétaux par la méthode du spray

L'activité antibactérienne des huit extraits issus des quatre plantes étudiées ; (*Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis* et *Urtica dioica*) a été évaluée *in vitro* sur sept souches bactériennes.

D'après le tableau (6.1), il apparaît que les extraits totaux utilisés se sont révélés qualitativement et quantitativement actifs sur les souches testées se traduisant par la formation de zones d'inhibition claires, comparées au témoin.

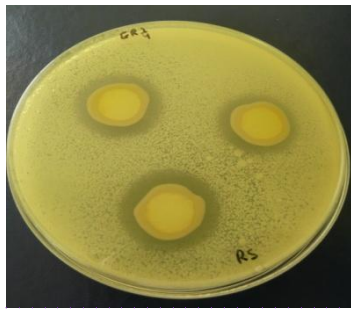
Les extraits des espèces végétales non actives n'ont montré la formation d'aucune auréole d'inhibition ; par contre les extraits des espèces actives ont abouti à l'apparition d'un halo d'inhibition (figure 6.1). Les résultats présentés sur le tableau (6.1) ont montré que les différents extraits avec les différentes dilutions présentent un pouvoir antibactérien contre les souches bactériennes testées. Il est à noter que l'extrait de la partie aérienne de l'espèce *Urtica dioica* avec ses différentes dilutions n'a pas montré d'effet sur la bactérie *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* et que l'extrait de la partie souterraine avec les dilutions (1/2 et 1/4) de cette même espèce spontanée n'a pas montré d'effet sur *Ralstonia solanacearum*. Le diamètre d'inhibition varie d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm [292].

Parmi les huit extraits, celui de l'espèce *Euphorbia helioscopia* a montré l'activité antibactérienne la plus élevée sur les sept souches bactériennes avec des diamètres de zones d'inhibitions variant entre 30 à 40 mm.

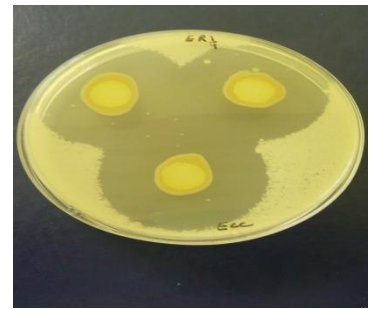
**Tableau 6.1.** Résultats des tests de sensibilité des sept souches aux extraits purs et à leurs différentes dilutions (Diamètres des zones d'inhibition en mm).

Espèces végétale	Origine	Dilution	Les souches bactériennes						
			At	Av	Rs	Xc	Cm	Eam	Ecc
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Partie aérienne	P	34,67	41	30,33	23,67	28,67	21	40
		D1	25,67	37	29	21,33	38	18,33	38,33
		D2	26,33	23,33	24,33	16,67	35,67	23,33	32,33
	Partie souterraine	P	31,33	38	31,67	21,67	45	37,67	40,67
		D1	27	22,33	28	15,67	39,33	30,33	33,33
		D2	27	23,67	25	13	36,67	29	43
<i>Calendula arvensis</i>	Partie aérienne	P	21	35,33	25,33	25,33	42,33	41	31,67
		D1	21,33	28,67	19,67	21,00	31,67	38,67	23,33
		D2	12,33	21,67	18,33	12,33	26,67	14,00	15,67
	Partie souterraine	P	22,67	36,67	21,67	29,67	34,67	34,67	27,67
		D1	32,67	34,33	15,33	25,33	31,67	35,67	28
		D2	21,67	20	14	23	32,33	31,67	26,33
<i>Plantago lanceolata</i>	Partie aérienne	P	30,33	36	26,33	38,33	22,67	38	31,33
		D1	25,67	21,67	22,67	23,67	18	38,67	32,67
		D2	23	21,33	20,67	13,67	11,67	23,67	31
	Partie souterraine	P	36,33	31,33	19,33	29,67	25,67	36,67	20,33
		D1	25,67	26	19,33	27,33	24,33	32,67	15,33
		D2	24,33	23,67	17,33	27,33	21,33	21,67	13,33
<i>Urtica dioica</i>	Partie aérienne	P	32,33	29,33	12,67	20,33	45	17,33	0
		D1	28,67	22,67	10,67	17,67	23	18,33	0
		D2	23,33	16	10,33	11,33	30	14,67	0
	Partie souterraine	P	12,67	26,33	3,33	19,33	21,33	22,67	22
		D1	14	24,33	0	15	31,67	15,67	20
		D2	10,67	22,67	0	13,33	26	12,67	11

**At:** *Agrobacterium tumefaciens* ; **Av:** *Agronacterium vitis* ; **Rs:** *Ralstonia solanacearum*, **Xc:** *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, et **Cm** : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ; **Eam** : *Erwinia amylovora*, **Ecc** : *Erwinia carotocora* pv. *carotovora* ; **P** : extrait aqueux pur ; **D1** :dose1/2 ; **D2** :dose1/4.



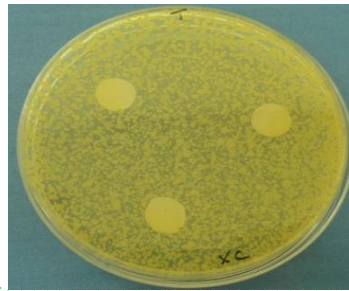
*Euphorbia helioscopia*  
(PA)- *Ralstonia solanacearum*



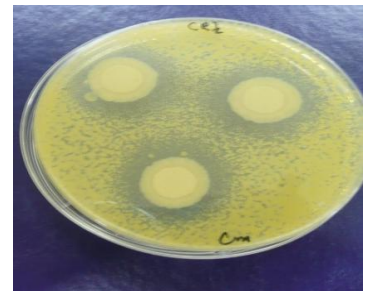
*Euphorbia helioscopia*  
(PS)- *Erwinia carotovora*  
pv. *Carotovora*



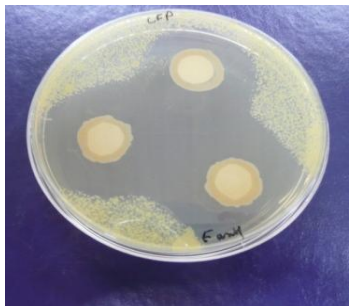
*Urtica dioica*(PA)  
*Xanthomonas campestris*  
pv. *citri*.



Témoin



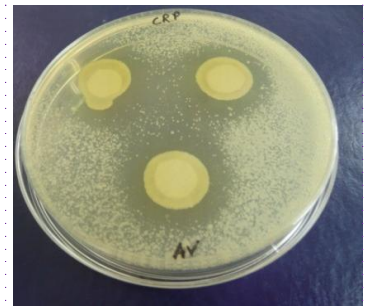
*Urtica dioica*(PS)-  
*Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis*



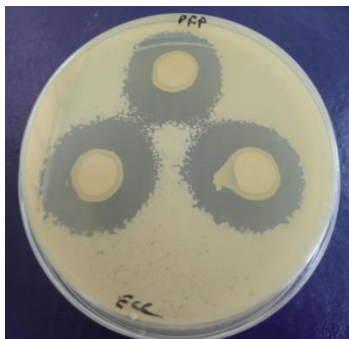
*Calendula arvensis* (PA)-  
*Erwinia amylovora*



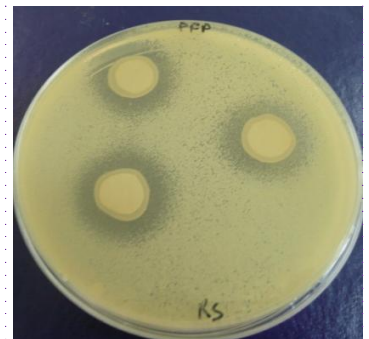
Témoin



*Calendula arvensis* (PS)-  
*Agrobacterium vitis*



*Plantago lanceolata* (PA)-  
*Erwinia carotovora* pv.  
*Carotovora*



*Plantago lanceolata* (PS)-  
*Ralstonia solanacearum*

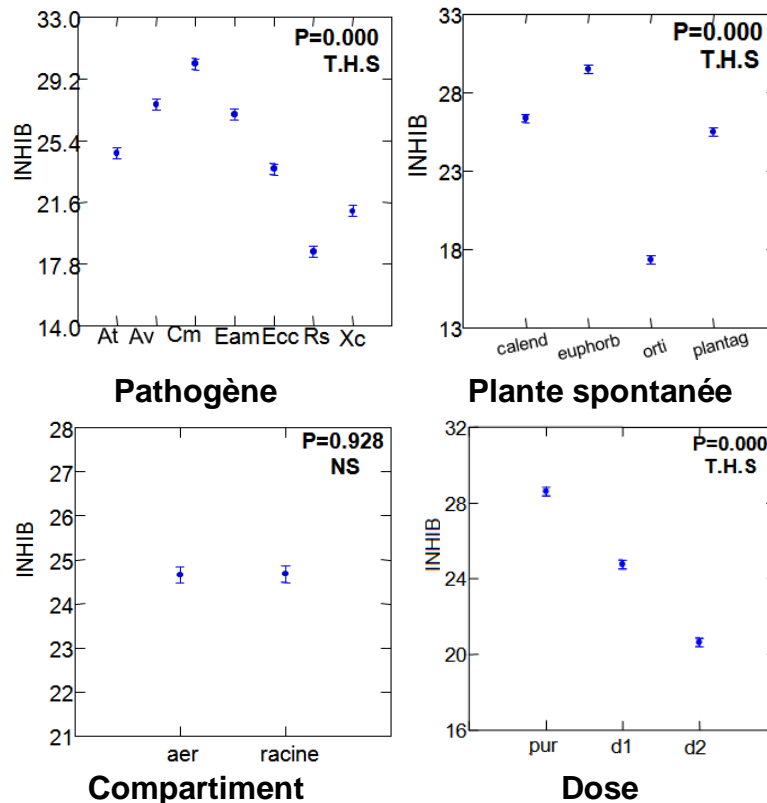
**Figure 6.1:** Pouvoir antibactérien des extraits aqueux représentés par des zones d'inhibition [originale].



L'application du modèle G.L.M pour les 504 données (tableau 6.2, figure 6.2), a permis de déduire que les effets antibactériens des extraits sont hautement significatifs selon l'espèce spontanée, la concentration de l'extrait et la souche testée ( $P=0.000$ ). Par ailleurs, l'origine de l'extrait (la partie aérienne ou la partie souterraine) n'a montré aucune différence significative ( $P=0.928$ ).

**Tableau 6.2.** Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiments et doses des extraits sur le diamètre d'inhibition des bactéries.

Facteur	somme des carrés	d.d.l.	carrés moyens	F-ratio	P
Pathogène	6878.917	6	1146.486	132.865	0.000
Spontanée	10137.825	3	3379.275	391.620	0.000
Compartiment	0.071	1	0.071	0.008	0.928
Dose	5338.083	2	2669.042	309.312	0.000



**Figure 6.2 :** effet des extraits des plantes spontanées, compartiments de plante, dose d'extrait ; sur les sept souches bactériennes

L'application du modèle G.L.M. pour les 126 données (tableau 6.3 et figure 6.3) des extraits de chaque espèce spontanée vis-à-vis des souches bactériennes, nous permet de déduire que l'espèce *Euphorbia helioscopia*

présente une activité antibactérienne la plus élevée ( $P=0.000$ ) vis-à-vis des souches *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* et *Erwinia carotovora* pv. *Carotovora* ( $D \geq 30\text{mm}$ ).

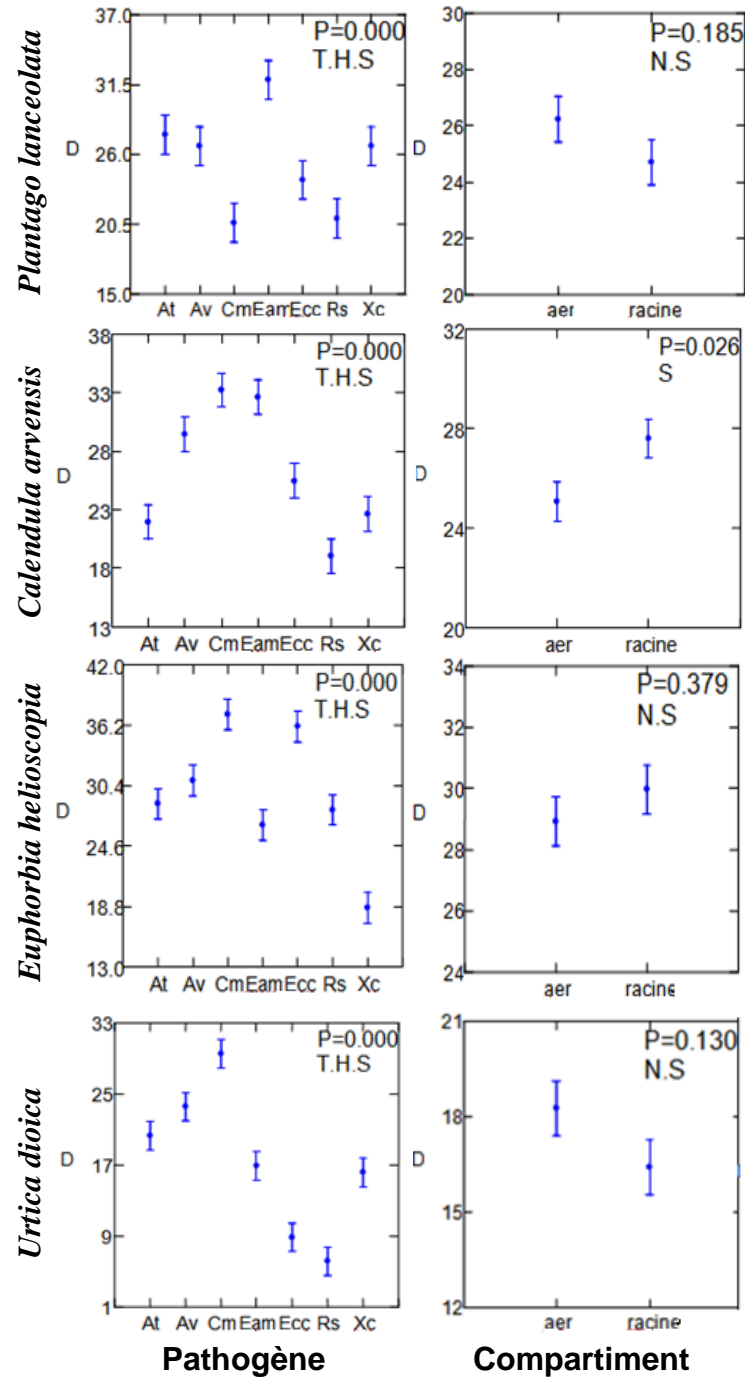
Par ailleurs, les extraits de l'espèce *Plantago lanceolata* montre une activité antibactérienne très élevée sur les souches *Erwinia amylovora* ( $D=31.5\text{ mm}$ ), *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, *Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium tumefaciens* ( $D \geq 25\text{ mm}$ ). D'autre part, *Calendula arvensis* a montré un effet élevé sur les souches *Agrobacterium vitis*, *Erwinia amylovora* et *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* ( $D>30\text{mm}$ ).

L'extrait d'*Urtica dioica* a montré un effet significatif sur *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensi* ( $D>30\text{mm}$ ), *Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium tumefaciens* ( $D \geq 20\text{mm}$ ).

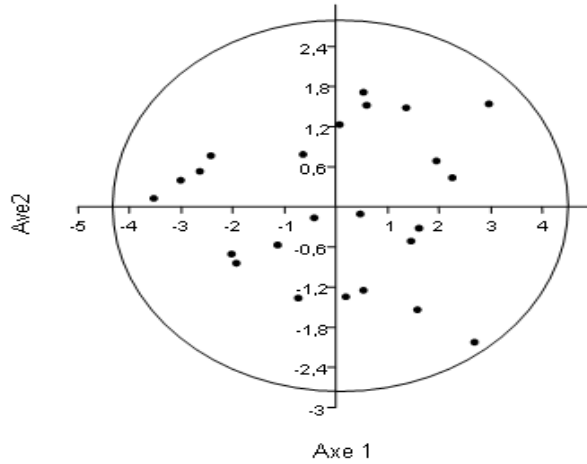
**Tableau 6.3.** Modèle G.L.M. appliqué au pouvoir antibactérien de chaque espèce spontanée (N: 126)

<b>Espèce spontanée</b>	<b>Facteur</b>	<b>Somme des carrés</b>	<b>d.d.l.</b>	<b>Carrés moyens</b>	<b>F-ratio</b>	<b>P</b>
<b><i>Plantago lanceolata</i></b>	Pathogène	1703.984	6	283.997	6.906	0.000
	Compartiment	73.143	1	73.143	1.779	0.185
<b><i>Calendula arvensis</i></b>	Pathogène	3279.651	6	546.608	14.214	0.000
	Compartiment	195.627	1	195.627	5.087	0.026
<b><i>Euphorbia helioscopia</i></b>	Pathogène	4261.381	6	710.230	18.173	0.000
	Compartiment	30.508	1	30.508	0.781	0.379
<b><i>Urtica dioica</i></b>	Pathogène	7090.492	6	1181.749	25.293	0.000
	Compartiment	108.643	1	108.643	2.325	0.130

D'autre part, une étude complémentaire basée sur l'Analyse en Composantes Principales (ACP), effectuée sur les huit extraits aqueux à l'égard des sept souches bactériennes (figure 6.4), montre la présence d'une corrélation positive entre les valeurs constituant la matrice des données, ceci, qui est vérifié par le cercle de corrélation.



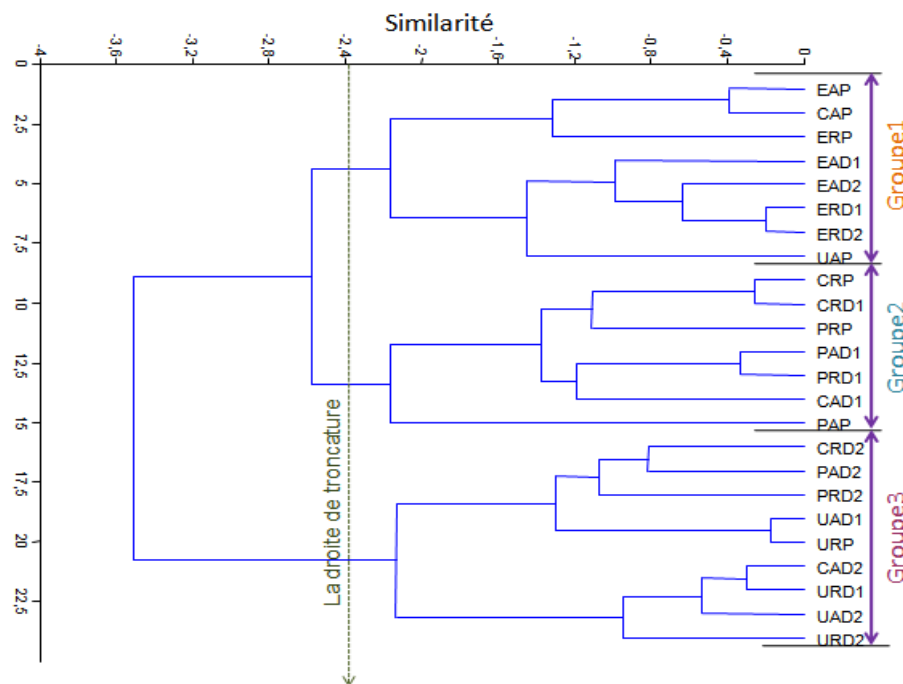
**Figure 6.3.** Sensibilité des bactéries à chaque espèce spontanée et ses compartiments



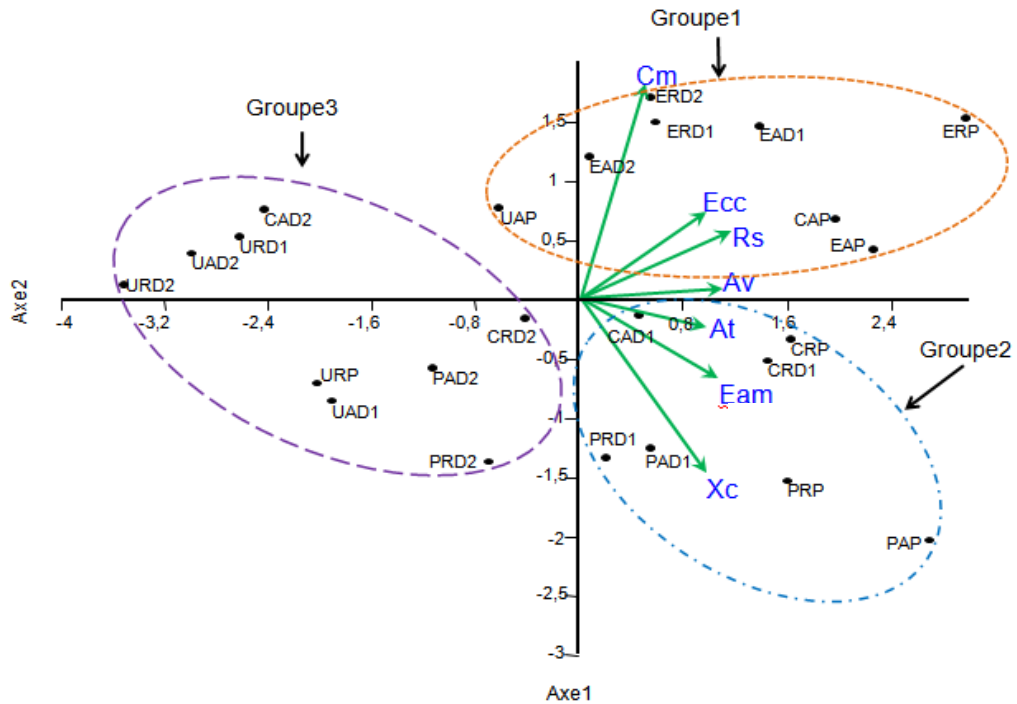
**Figure 6.4 :** Cercle de corrélation des huit extraits avec leurs différentes dilutions.

L'étude des corrélations a été réalisée sur le plan 1, 2, du moment qu'ils présentent une forte contribution à l'identification des nuages avec les valeurs respectives de 49,397 et 16,812. L'axe 1 est représenté par la catégorie des extraits des espèces étudiées, où les extraits efficaces présentent les fortes contributions. À l'opposé de cet axe, les plus faibles contributions sont représentées par les extraits de faible efficacité.

L'axe 2 est représenté par la variable des différentes dilutions. Les calculs de la distance euclidienne et sur la base d'une similarité de -24, le cercle de corrélation (fig.6.5 et 6.6) montre la présence de trois groupes d'extraits.



**Figure 6.5 :** Classification hiérarchique ascendante des différents extraits avec leurs dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes).



**P** : *Plantago lanceolata*; **U** : *Urtica dioica*; **E** : *Euphorbia helioscopia*; **C** : *Calendula arvensis*; **A** : partie aérienne ; **R** : partie racinaire ; **D1** : dose 1/2 ; **D2** : dose 1/4, **P** : pur.

**Figure 6.6** : Analyse en Composantes Principales (ACP) des sept souches bactériennes.

Le premier groupe prend en compte principalement : EAP, CAP, ERP, EAD1, ERD1, ERD2, UAP et qui correspond aux extraits d'*Euphorbia helioscopia* (partie aérienne et partie souterraine) avec leurs dilutions et aussi l'extrait pur de la partie aérienne de *Calendula arvensis*. Ce groupe est corrélé positivement avec les vecteurs (les souches bactériennes) caractérisé par une forte action antibactérienne.

Le deuxième groupe, est corrélé positivement avec les différents vecteurs. Il est représenté par les extraits des deux espèces *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata* avec leurs fortes concentrations (pur et 1/2).

Le troisième groupe inclut les extraits de l'espèce *Urtica dioica*. Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs (les souches bactériennes) car n'induisant aucun effet toxique même à forte concentration sur la bactérie *E. carotovora* subsp. *carotovora* et *Ralstonia solanacearum*.

Tous les vecteurs occupent une zone assez restreinte à l'intérieur du cercle de corrélation. L'angle maximum entre les deux vecteurs est inférieur à 90°. Ceci suggère que tous les vecteurs sont corrélés positivement entre eux, ce qui confirme que toutes ces souches sont sensibles aux extraits et leurs dilutions.

Les vecteurs Rs, Av, Cm et Ecc sont corrélés positivement à l'axe 1 et 2 ainsi que l'angle entre ces différents vecteurs est inférieur à 45° ce qui signifie que les bactéries sont toutes sensibles aux extraits. Les vecteurs At, Eam et Xc sont corrélés positivement à l'axe 1 et négativement à l'axe 2.

#### 6.1.2. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits végétaux par la méthode de spectrophotométrie

Les méthodes utilisant des disques imprégnés sont intensivement employées pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles et les extraits des plantes. Ces tests sont basés sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner. Dans le cas des solutions avec une basse activité, une grande concentration ou volume est nécessaire, cependant la capacité des disques est limitée, c'est pourquoi le test des disques a été limité seulement au criblage des activités antimicrobiennes, qui ensuite complété par un autre test biologique pour une mesure de la sensibilité des bactéries à l'augmentation de la dose de l'extrait naturel.

Les mesures de densité microbienne sont lues à 600 nm contre des blancs sans inoculum, ces mesures sont transformées en densité cellulaire de la population microbienne et en pourcentages d'inhibition. La croissance des différentes souches de bactéries a été largement influencée et une réduction très significative proportionnelle à la dose des extraits naturels a été observée et avec l'augmentation de temps de traitement. Les souches qui se sont révélées sensibles aux extraits aqueux se sont exprimées par des densités optiques et cellulaires très faibles se traduisant par une croissance bactérienne réduite accentuée par l'effet toxique des extraits et de leurs dilutions (appendices G<sub>1,2,3et4</sub>). D'après le tableau (6.4), les extraits des trois plantes *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis* se sont révélés très toxiques sur toutes les souches bactériennes en particulier *Xanthomonas campestris* pv. *citri* et *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* et *Clavibacter michiganensis* subsp.

*michiganensis* dont les pourcentages d'inhibition ont dépassé 61%. Cependant l'espèce *Urtica dioica* a montré une faible activité biopesticide comparée aux autres plantes étudiées.

**Tableau 6.4.** Résultats des tests de sensibilité des souches bactériennes aux extraits végétaux après 48h de traitement exprimés en pourcentages d'inhibition

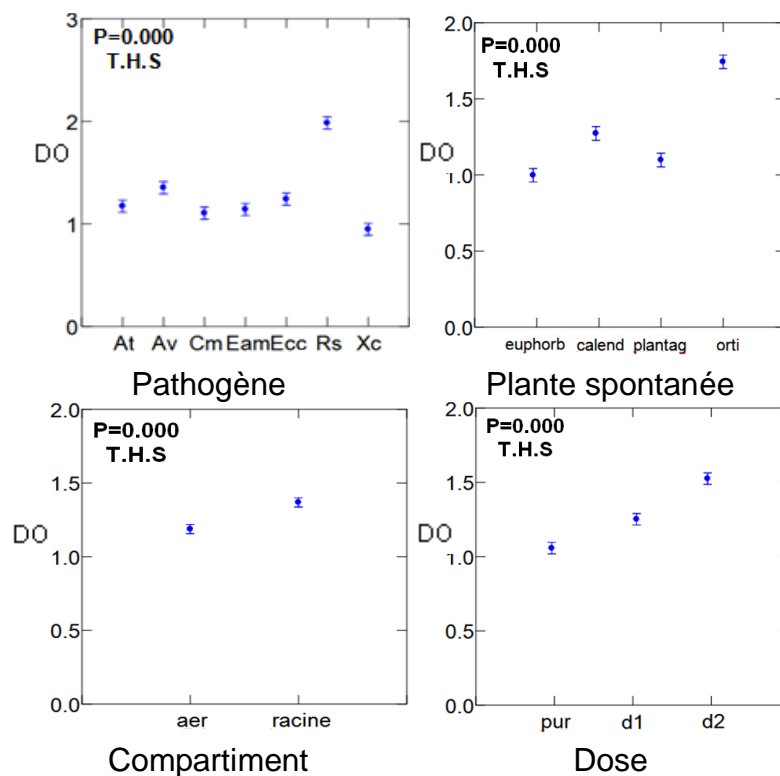
Extrait végétal	Bactérie	Dilution					
		Pure	½	¼	Pure	½	¼
		Partie aérienne			Partie souterraine		
<i>Euphorbia helioscopia</i>	At	29,777	27,881	31,825	31,825	30,816	36,166
	Av	32,449	25,189	24,937	22,633	29,388	30,461
	Rs	18,807	21,947	21,144	23,831	19,749	21,005
	Xc	61,638	69,376	11,704	64,954	62,224	58,778
	Cm	73,284	73,836	35,662	67,402	62,439	49,939
	Eam	27,352	21,833	27,560	33,530	35,751	24,297
	Ecc	49,952	39,702	18,912	48,893	46,583	20,982
<i>Calendula arvensis</i>	At	50,924	49,780	50,616	30,458	15,757	3,829
	Av	52,587	40,530	14,868	16,130	14,908	1,548
	Rs	13,886	10,165	25,892	5,754	3,989	11,277
	Xc	61,041	48,825	16,079	15,827	15,197	8,564
	Cm	79,367	74,756	22,888	27,365	23,595	21,373
	Eam	25,543	16,030	13,380	19,592	16,334	13,293
	Ecc	63,490	61,943	59,282	57,983	57,302	56,993
<i>Urtica dioica</i>	At	20,396	15,690	1,528	3,220	5,491	3,592
	Av	9,457	8,753	8,167	17,194	8,949	8,636
	Rs	8,696	5,323	1,016	16,701	10,687	9,752
	Xc	23,858	25,178	25,144	75,635	20,880	17,597
	Cm	23,767	19,857	19,347	22,441	22,305	17,069
	Eam	40,107	24,833	20,956	23,897	16,511	9,626
	Ecc	20,119	17,359	13,203	43,416	20,992	43,381
<i>Plantago lanceolata</i>	At	39,539	38,239	41,368	38,849	40,387	43,781
	Av	44,062	44,168	39,157	45,175	46,050	49,894
	Rs	17,099	13,319	17,999	26,026	27,430	20,914
	Xc	61,551	33,441	18,578	61,470	51,292	15,428
	Cm	33,643	15,971	10,480	31,206	47,100	28,074
	Eam	49,601	34,051	29,400	35,994	30,094	28,983
	Ecc	60,210	52,663	41,525	46,731	31,517	13,761

**At:** *Agrobacterium tumefaciens* ; **Av:** *Agronacterium vitis* ; **Rs:** *Ralstonia solanacearum*, **Xc:** *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, et **Cm** : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ; **Eam** : *Erwinia amylovora*, **Ecc** : *Erwinia carotocora* pv. *carotovora* ; **P** : extrait aqueux pur ; **D1** :dose1/2 ; **D2** :dose1/4.

D'autre part, l'analyse de la variance des résultats des densités optiques obtenus après 24h et 48h (T2 et T3) de traitement par nos extraits aqueux (tableau 6.5, fig 6.7 et tableau 6.6, fig 6.8) nous a montré que l'espèce *Euphorbia helioscopia* a eu un effet antibactérien le plus élevé vis-à-vis des différentes souches bactériennes testées avec l'augmentation de temps de traitement, et en deuxième position les extraits de *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata*, et enfin *Urtica dioica* qui a montré une faible activité antibactérienne. Ainsi, les espèces bactériennes *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*, *Erwinia carotovora* pv. *Carotovora* et *Xanthomonas campestris* pv. *citri* demeurent les plus sensibles à tous les extraits utilisés.

**Tableau 6.5.** Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiments et doses des extraits sur la croissance bactérienne après 24h de traitement.

Facteur	somme des carrés	d.d.l.	carrés moyens	F-ratio	P
Pathogène	57.576	6	9.596	473.925	0.000
Plantes Spontanées	53.007	3	17.669	872.633	0.000
Compartiment	4.476	1	4.476	221.065	0.000
Dose	16.925	2	8.463	417.953	0.000

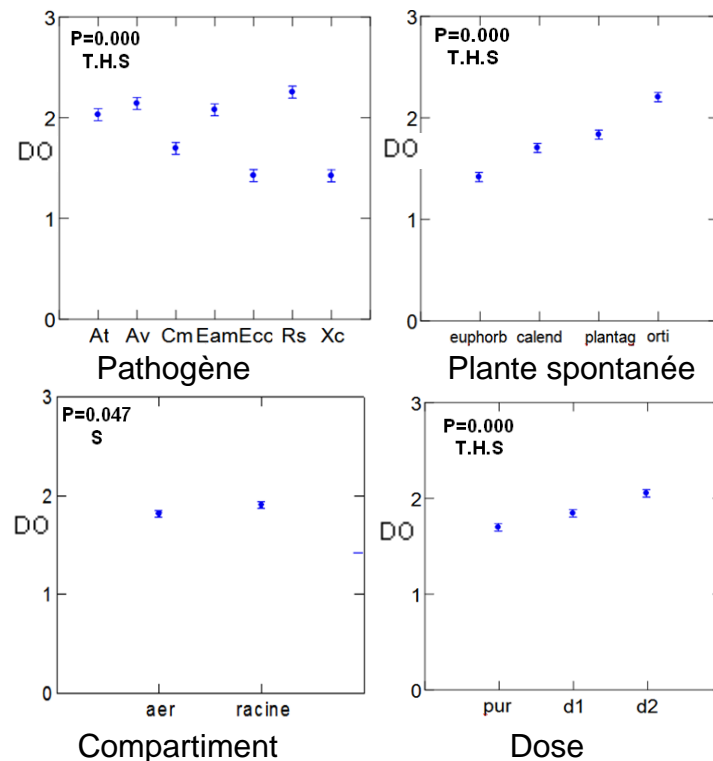


**Figure 6.7 :** Effet des extraits des plantes spontanées (compartiment et dose) sur la croissance des souches bactériennes après 24h d'incubation.



**Tableau 6.6.** Modèle G.L.M appliqué aux effets des plantes, compartiment et dose des extraits sur la croissance bactérienne après 48h de traitement.

Facteur	somme des carrés	d.d.l.	carrés moyens	F-ratio	P
Pathogène	55.787	6	9.298	159.566	0.000
Plantes Spontanées	21.223	3	7.074	121.408	0.000
Compartiment	0.687	1	0.687	11.793	0.047
Dose	9.636	2	4.818	82.684	0.000



**Figure 6.8 :** Effet des extraits des plantes sur la croissance bactérienne après 48H d'incubation

## 6.2. Evaluation du pouvoir antifongique des extraits végétaux sur les 10 isolats fongiques choisis

L'étude du pouvoir antifongique des extraits aqueux issus des cinq plantes adventices (*Raphanus raphanistrum*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* et *Urtica dioïca*) a été évaluée *in vitro* sur dix isolats fongiques en utilisant la méthode d'activité volatile.

Il apparaît d'après les tableaux (6.7, appendices H<sub>1,2,3</sub> et 4), que les extraits des cinq espèces étudiées (*Raphanus raphanistrum*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata*, et *Urtica dioïca*), se sont révélés efficaces qualitativement et quantitativement sur tous les isolats fongiques étudiés se

traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes qui varie d'une espèce fongique à une autre (figure 6.9).

**Tableau 6.7.** Résultats des tests du pouvoir antifongique de l'extrait de *Calendula arvensis* avec les dix souches fongiques.

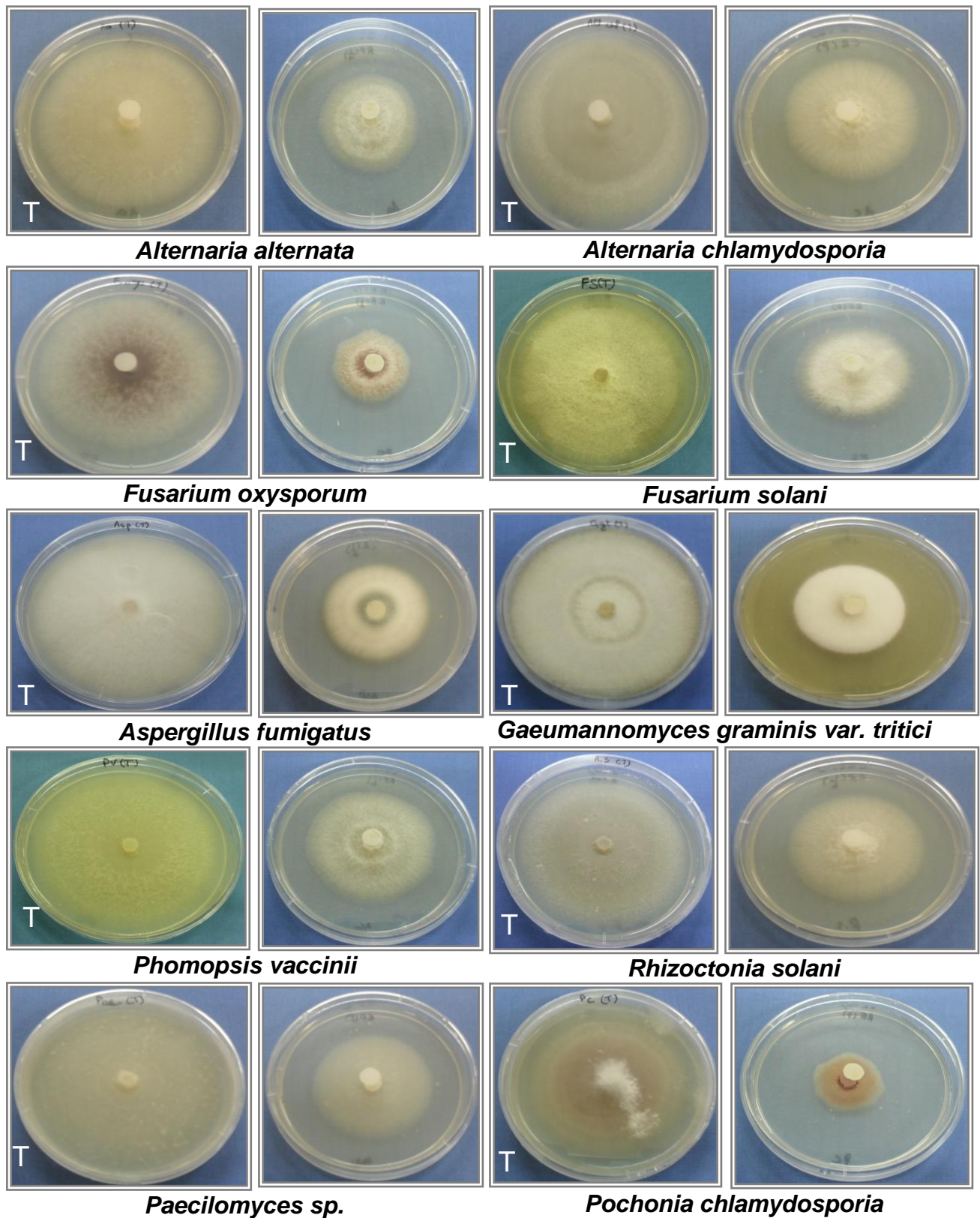
Extrait Champignon		Dilution						Témoin
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
		Partie aérienne			Partie souterraine			
Aa	D (mm)	52,33	55	58	51,33	53,67	53,67	74,67
	P%	29,91	26,34	22,32	31,25	28,13	28,13	100
Ac	D (mm)	54,33	54,33	54,33	53,67	53	53,67	78,33
	P%	30,64	30,64	30,64	31,49	32,34	31,49	100
Af	D (mm)	35,67	39,67	42	38,67	40	42	79,33
	P%	55,04	50	47,06	51,26	49,58	47,06	100
Fo	D (mm)	36,33	39	41,67	34,33	39,33	42	75,33
	P%	51,77	48,23	44,69	54,42	47,79	44,25	100
Fs	D (mm)	30	34,33	38	30,67	34	34	75
	P%	60	54,22	49,33	59,11	54,67	54,67	100
Rs	D (mm)	50	51	50,67	50,67	51,33	52,33	71,67
	P%	30,23	28,84	29,3	29,3	28,37	26,98	100
Pc	D (mm)	37,67	41,33	46	38,67	41	43,67	76,33
	P%	50,66	45,85	39,74	49,34	46,29	42,79	100
Pae	D (mm)	50,33	52,67	55,67	45	50	50,33	72,67
	P%	30,73	27,52	23,39	38,07	31,19	30,73	100
Pv	D (mm)	47	49,67	50	47,67	50,33	50,67	78,67
	P%	40,25	36,86	36,44	39,41	36,02	35,59	100
Ggt	D (mm)	39,67	42,33	44	40	41	43,67	68,67
	P%	42,23	38,35	35,92	41,75	40,29	36,41	100

*Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium solani* (Fs), *Alternaria alternata* (Aa), *Alternaria chlamydosporia* (Ac), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Gaeumannomyces graminis var tritici* (Ggt), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Phomopsis vaccinii* (Pv).

Ces tableaux montrent que parmi les cinq espèces étudiées, les deux espèces *Calendula arvensis* et *Raphanus raphanistrum* présentent des effets antifongiques très élevés dont les pourcentages d'inhibition dépassent les 75% pour les isolats *Alternaria chlamydosporia*, *Aspergillus fumigatus* et *Phomopsis vaccinii*.

L'application du modèle G.L.M (tableau 6.8, figure 6.10), a permis de déduire que les effets antifongiques des extraits sont hautement significatifs selon l'espèce spontanée, la concentration de l'extrait et la souche testée ainsi que les concentrations des extraits (P=0.000). Quant à l'origine de l'extrait (la partie aérienne ou la partie souterraine), l'effet a été non significatif ce qui explique que la plante entière produit le même effet antifongique. Il ressort aussi de la figure (6.10) que les espèces *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Phomopsis vaccinii* et *Pochonia chlamydosporia* présentent une

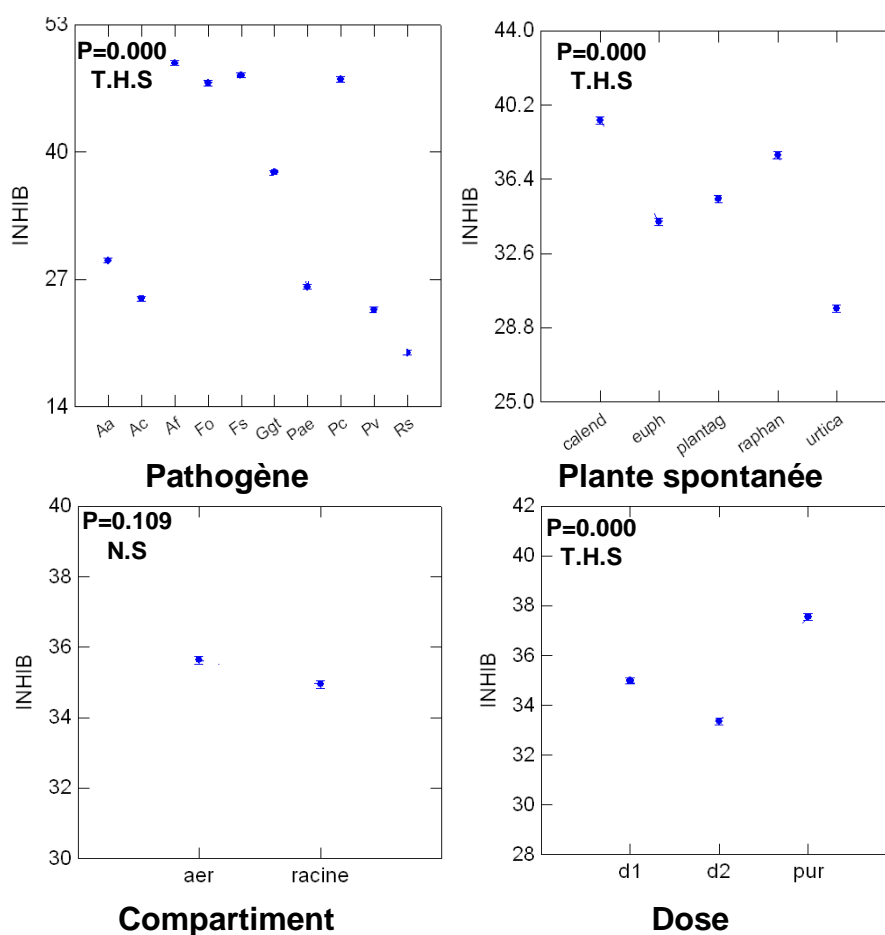
sensibilité importante vis-à-vis des cinq espèces spontanées, se traduisant par un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 50%.



**Figure 6.9.** Pouvoir antifongique des extraits bruts testés représentés par l'inhibition de la croissance mycélienne [originale]. (T : témoin)

**Tableau 6.8** : Tableau d'analyse de la variance des différents paramètres étudiés

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	P
Plantes	9710.437	4	2427.609	57.554	0.000
Pathogènes	112096.714	9	12455.190	295.290	0.000
Compartiments	108.413	1	108.413	2.570	0.109
Doses	2705.040	2	1352.520	32.066	0.000

**Figure 6.10:** Effet des extraits des plantes spontanées (compartiment, dose) sur les isolats fongiques

L'application du modèle G.L.M (appendice I), permet de déduire que les extraits aqueux issus de *Calendula arvensis* et *Raphanus raphanistrum* présentent des effets antifongiques très importants sur *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* en montrant une inhibition significative. L'activité inhibitrice de ces deux espèces est puissante, les pourcentages d'inhibition varient pour *Calendula arvensis* entre 27,68% dans le cas d'*Alternaria alternata* et 55,33% dans le cas de *Fusarium solani*. Quant à l'extrait de *Raphanus*

*raphanistrum*, l'inhibition dépasse 55% pour *Pochonia chlamydosporia* et *Fusarium oxysporum*, comme elle est de 19,30% pour *Rhizoctonia solani*.

L'extrait d'*Euphorbia helioscopia* a montré une activité significativement élevée ( $p=0.000$ ), sur le champignon *Aspergillus fumigatus* par un pourcentage d'inhibition qui dépasse 50%, et sur *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et *Pochonia chlamydosporia* (pourcentage d'inhibition supérieur à 45%).

Ces analyses ont montré aussi que les espèces appartenant au même genre, le cas du genre *Fusarium* avec ses deux espèces ; *F. oxysporum* et *F. solani*, ainsi que le genre *Alternaria* avec ses deux espèces ; *A. alternata* et *A. chlamydosporia*, révèlent une réaction très assemblée et possiblement spécifique au sein du même genre à l'égard des différents extraits, les résultats se présentent alors comme similaires.

Contrairement à tous les isolats fongiques qui ont présenté des pourcentages d'inhibition du mycélium très élevés, l'espèce *Rhizoctonia solani* se révèle la plus résistante avec un pourcentage d'inhibition d'environ 20%.

#### 6.2.1. Etude des corrélations des extraits aqueux et leurs dilutions vis-à-vis des souches fongiques testées

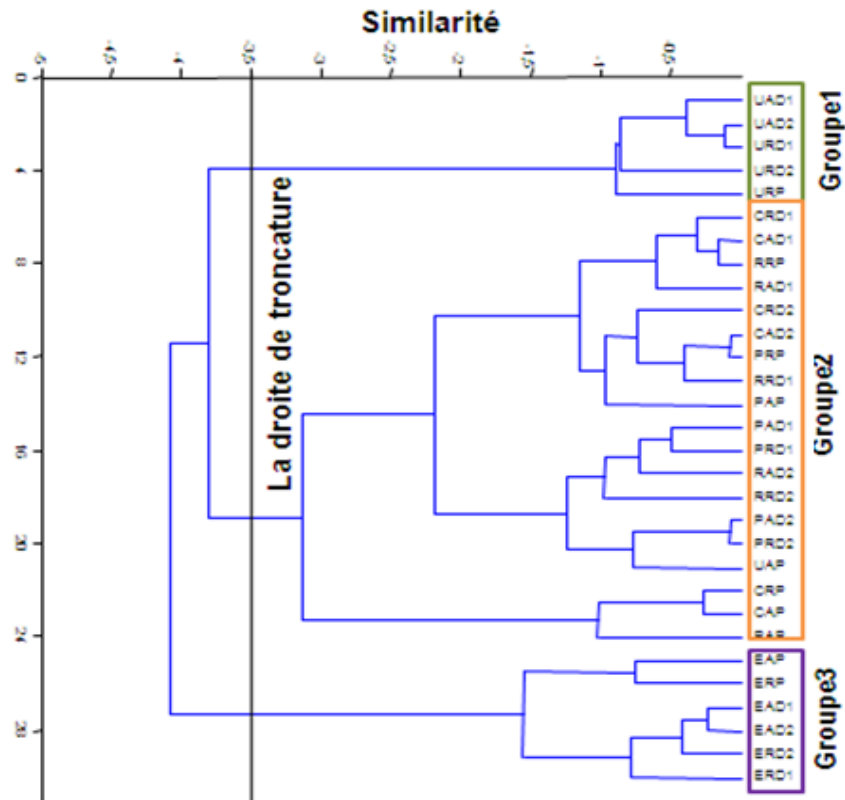
L'étude des corrélations a été réalisée sur les plans 1 et 2 car ces derniers, présentent une forte contribution à l'identification des nuages avec les valeurs respectives 36, 93 et 21,493.

L'axe 1 est représenté par la catégorie des extraits des espèces étudiées où les extraits efficaces présentent les fortes contributions. A l'opposé de cet axe, les plus faibles contributions sont représentées par les extraits de faible efficacité.

L'axe 2 est représenté par la variable des différentes dilutions (P, D1, D2). Les calculs de la distance euclidienne et sur la base d'une similarité -3.5, le cercle de corrélation (Figure 6.11) montre la présence de trois groupes d'extraits (Figure 6.12).

Le premier groupe comprend principalement : UAD1, UAD2, URD1, URD2, URP et qui correspond aux extraits d'*Urtica dioica*, constituant les extraits de la partie aérienne et les extraits de la partie souterraine avec les différentes doses. Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs, c'est-à-dire les souches

fongiques. Il est caractérisé par sa faible activité antifongique représentée par des pourcentages d'inhibition variant de 8,30% à 45,77%.



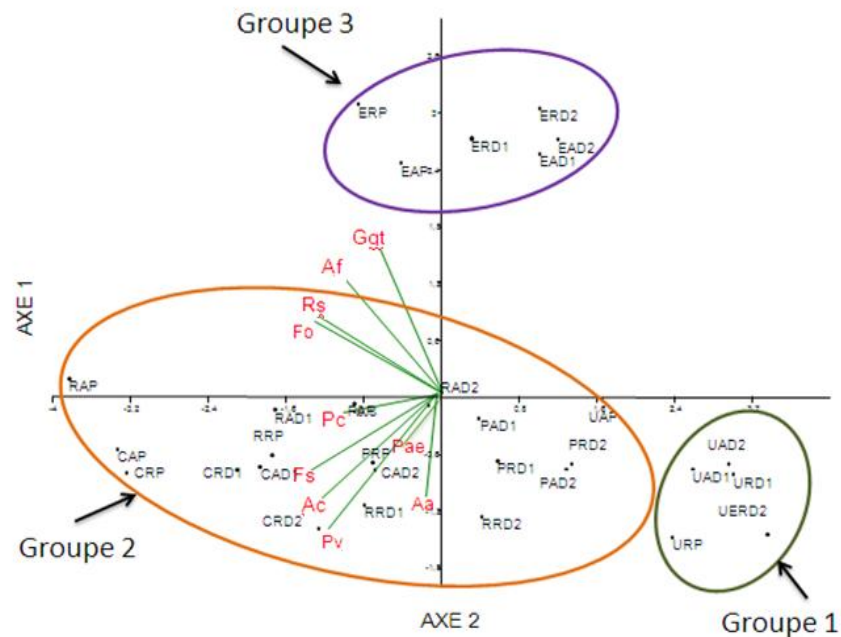
**Figure 6.11** : Classification hiérarchique des différents extraits avec leurs différentes dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes).

Le deuxième groupe représenté par les extraits des trois espèces : *Raphanus raphanistrum*, *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata* avec leurs concentrations, est corrélé positivement avec les espèces fongiques. Ce groupe est défini par les extraits à effet antifongique très élevé contre les champignons testés, induisant une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 40%.

Le troisième groupe inclut les extraits d'*Euphorbia helioscopia* des deux compartiments aériens et souterrains avec toutes les doses. Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs (les espèces fongiques) car il présente un effet antifongique moyen par rapport au deuxième groupe sur les isolats fongiques testés à différentes concentrations. Le pourcentage d'inhibition ne dépasse pas 32%.

Tous les vecteurs occupent une zone assez restreinte à l'intérieur du cercle de corrélation. L'angle maximum entre les deux vecteurs est inférieur à 90°. Ceci

suggère que tous les vecteurs sont corrélés positivement entre eux, ce qui confirme que tous les champignons sont sensibles aux extraits et leurs dilutions.



**Figure 6.12 :** Analyse en Composante Principale (ACP) des dix souches fongiques.

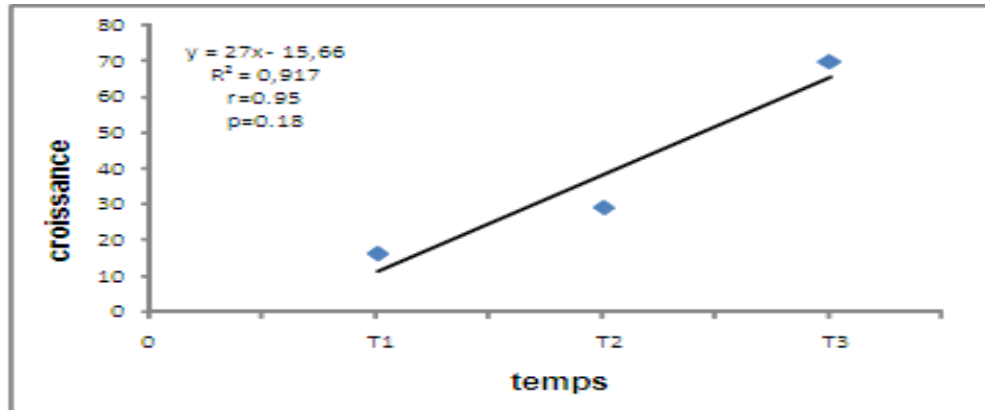
### 6.2.2. Résultats d'étude du test de sporulation

Les extraits purs de *Raphanus raphanistrum* permettent une inhibition de la croissance de 60,62% sur l'espèce fongique *Fusarium oxysporum*. Cependant, il est important de connaître si cette espèce spontannée voire ses composés volatiles possèdent une activité fongistatique réversible ou fongicide irréversible à cette concentration. En effet, le ré-ensemencement du disque mycélien sur le milieu PDA frais a montré une reprise de croissance observée après 3, 6 et 12 jours d'ensemencement (Tableau 6.9, Figure 6.13 et 6.14).

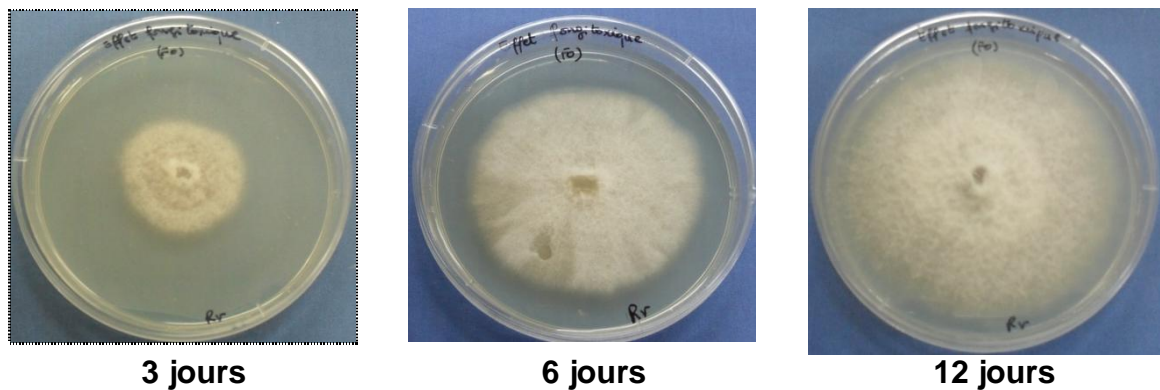
On peut déduire d'après ces résultats que l'extrait pur de *Raphanus raphanistrum* a un effet fongistatique et non fongicide sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*.

**Tableau 6.9:** Croissance mycélienne (mm) de *Fusarium oxysporum* inhibée par l'extrait de *Raphanus raphanistrum* après ré-ensemencement

Période \ Croissance	3jrs	6jrs	12jrs
D1	17	28	71
D2	15	30	69
Moyenne (mm)	16	29	70



**Figure 6.13 :** Suivi de la croissance mycélienne après ré-ensemencement



**Figure 6.14:** Effet fongistatique de l'extrait de *Raphanus raphanistrum* sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* [originale]

D'autre part, le faible pourcentage d'inhibition de la sporulation (12,88%) (appendice J) après dénombrement des conidies sous microscope confirme la reprise de la croissance du champignon au bout de 3 jours. Ce phénomène de relance de la croissance après traitement peut être expliqué par le fait que les molécules bioactives de l'extrait aqueux se sont volatilisées après contact du fait de l'instabilité des métabolites d'origine végétale.

### 6.3. Efficacité nématocide des extraits végétaux testés

#### 6.3. 1. Evaluation de la toxicité des extraits aqueux et du Vydate.

D'après le tableau (6.10), il apparaît que les extraits végétaux et le Vydate utilisés se sont révélés qualitativement et quantitativement actifs sur les nématodes à



galles se traduisant par une augmentation de la mortalité des larves du deuxième stade en fonction de l'augmentation de la période d'exposition au traitement. Comparé au témoin eau, aucune mortalité n'a été enregistrée après 72h.

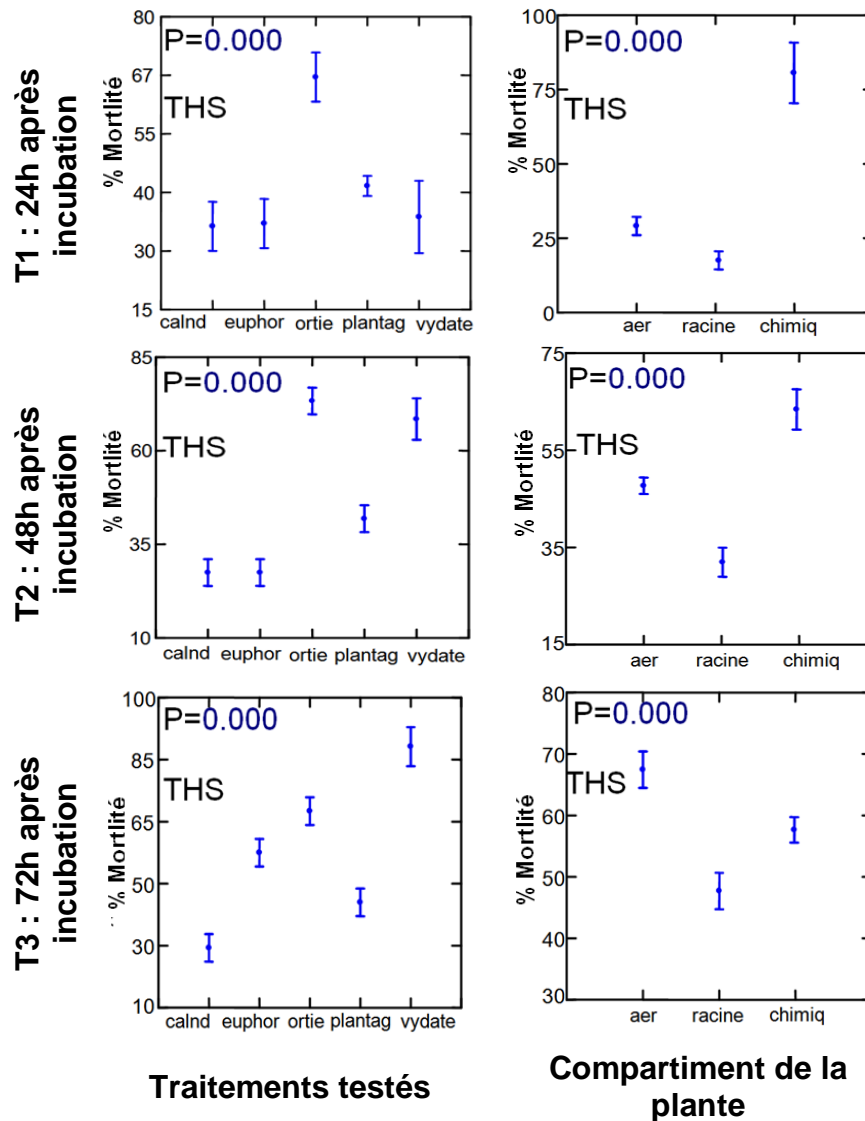
**Tableau 6.10.** Effet des différents extraits des plantes et du Vydate sur les taux moyens de mortalité les larves (L<sub>2</sub>) de *Meloidogyne*.

Traitement	%mort	Dilution						Témoin
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
		Partie aérienne			Partie souterraine			
<i>Euphorbia helioscopia</i>	T1	25	25	5	30	10	5	0
	T2	30	10	5	35	20	10	0
	T3	80	50	30	90	55	30	0
<i>Plantago lanceolata</i>	T1	45	30	15	35	10	5	0
	T2	65	35	20	40	10	5	0
	T3	80	60	40	55	15	5	0
<i>Calendula arvensis</i>	T1	30	35	20	0	0	0	0
	T2	35	40	20	5	10	5	0
	T3	70	45	20	20	10	5	0
<i>Urtica dioica</i>	T0	55	25	5	35	10	0	0
	T1	40	50	45	40	45	40	0
	T2	95	85	45	80	50	35	0
	T3	100	90	50	80	65	40	0
Vydate	%mort	Dose		1/2 dose	1/4 dose		Témoin	
	T0	5		5	0		0	
	T1	80		80	65		0	
	T2	85		85	80		0	
	T3	95		90	85		0	

T0 : % de larves mortes après 6h de traitement ; T1 : % de larves mortes après 24h de traitement ; T2 : % de larves mortes après 48h de traitement ; T3 : % de larves mortes après 72h de traitement.

**Tableau 6.11.** Modèle G.L.M. appliqué au pouvoir nématocide des traitements utilisés (N: 108)

	Facteur	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
T1 : 24h après incubation	Spontanée	693.031	3	231.010	32.373	0.000
	compartiment	278.393	2	139.197	19.506	0.000
T2 : 48h après incubation	Spontanée	1488.552	4	372.138	37.821	0.000
	compartiment	237.510	1	237.510	24.139	0.000
T3 : 72h après incubation	Spontanée	1650.046	4	40.50	24.015	0.000
	compartiment	368.167	1	368.167	21.433	0.000



**Figure 6.15.** Toxicité des extraits aqueux des plantes et du Vydate en fonction du temps

L'application du modèle G.L.M. pour les 108 données (tableau 6.11 et figure 6.15), nous permet de déduire en général que les activités nématocides des extraits aqueux issus des quatre espèces végétales étudiées; *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Plantago lanceolata* et *Urtica dioica* sur les larves de *Meloidogyne spp.* varient significativement selon l'espèce végétale spontanée ( $P=0.000$  ;  $p < 0.05$ ) et le compartiment (la partie aérienne ou la partie souterraine) ( $P=0.000$  ;  $p < 0.05$ ).

L'effet toxique des extraits des quatre espèces varie dans le temps, en effet l'ortie s'avère le plus toxique. Après 24h et 48h de traitement, l'extrait d'ortie

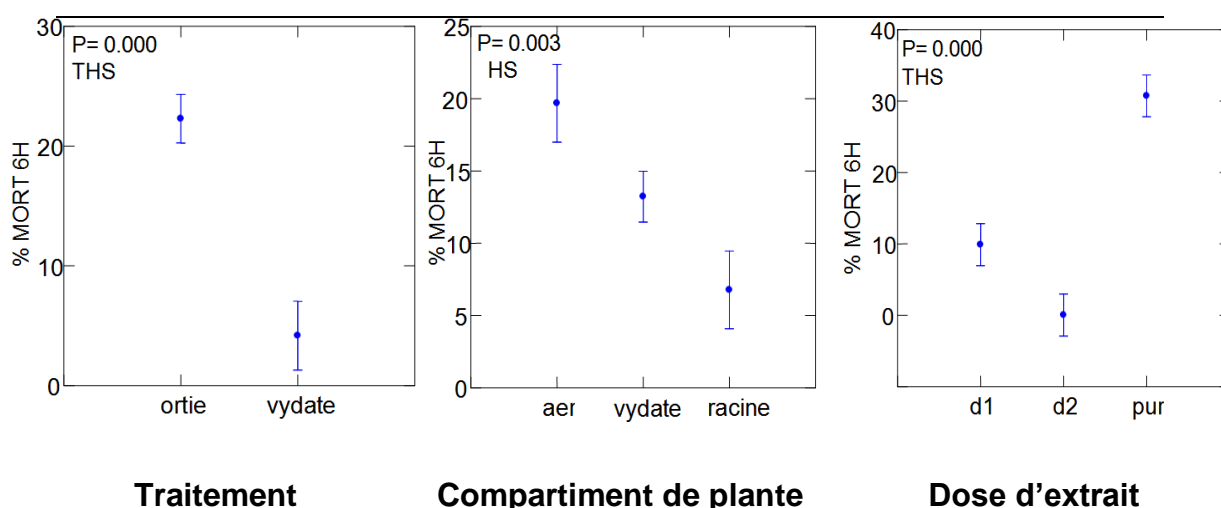
présente une mortalité très élevée (jusqu'à 75%) par rapport aux autres espèces et au Vydate.

Le produit nématicide Vydate agit rapidement et entraîne une forte mortalité dès les 24h (T1) d'exposition des larves de *Meloidogyne* et ceci quelque soit la dose utilisé. D'autre part, l'activité nématicide des extraits des deux espèces *Plantago lanceolata* et *Euphorbia helioscopia* augmente en fonction du temps d'exposition, et présente un pourcentage de mortalité allant jusqu'à 55% après 72h. L'espèce *Calendula arvensis* présente une toxicité plus faible par rapport aux autres espèces végétales (30% de mortalité).

Chez les espèces végétales testées, les extraits de la partie aérienne ont des effets très hautement significatifs ( $P=0.000$ ) se traduisant par une mortalité des nématodes dépassant 70% après 72h de traitement par rapport à la partie souterraine ne dépassant pas 50%.

**Tableau 6.12:** modèle GLM appliqué sur l'effet choc après 6h entre le Vydate et l'extrait aqueux de l'ortie

Facteur	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Traitement	105.125	1	105.125	26.513	0.000
Compartiment	40.042	1	40.042	10.099	0.003
Dose	248.667	2	124.333	31.357	0.000



**Figure 6.16:** comparaison de l'effet choc après 6h entre le Vydate et l'extrait aqueux de l'ortie

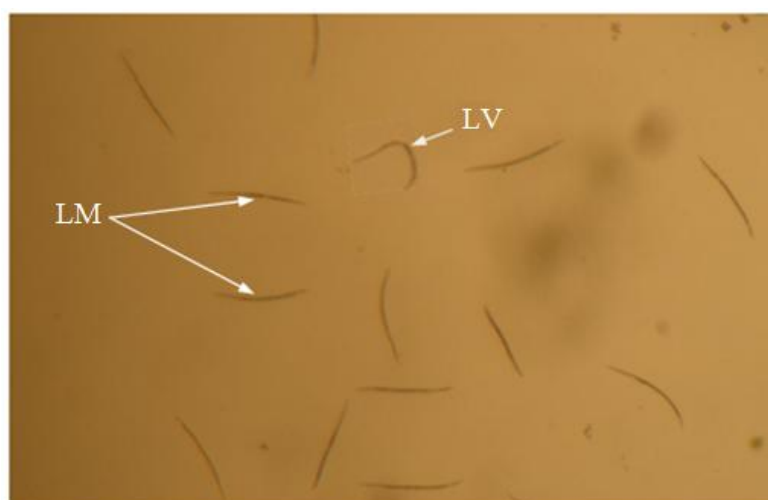
Le modèle G.L.M. appliqué à la comparaison de la toxicité du Vydate et d'*Urtica dioica* après 6h (effet choc) de traitement des larves (tabl 6.12, fig 6.16),

montre des variations significatives entre les deux traitements ( $p=0,000$  ;  $p<0,05$ ), les compartiments des plantes ( $p=0,003$  ;  $p<0,05$ ) et les doses testées ( $p=0,000$  ;  $p<0,05$ ). La comparaison des deux traitements, montre que l'extrait de l'ortie a exercé un effet choc très élevé comparé au Vydate. En effet, un taux de mortalité de plus de 20% est enregistré avec l'ortie, alors que le Vydate n'a présenté que 5%. Toutefois la toxicité de l'extrait d'*Urtica dioica* augmente avec la concentration, l'extrait pur a provoqué un taux de mortalité moyen plus élevé (30 %). Par ailleurs, nous notons que le principe actif toxique varie en fonction des compartiments, l'extrait de la partie aérienne est plus actif. Il a engendré le taux de mortalité le plus élevé comparé à l'extrait racinaire.

Ces résultats sont en grande partie dus au fait que nos extraits de plante possèdent des composés toxiques pour les nématodes à galles.

Selon les observations du comportement des larves effectuées sous la loupe binoculaire, nous avons constaté que les larves traitées aux extraits aqueux sont désorientées les unes par rapport aux autres ; elles se dispersent un peu partout dans la cellule, leur déplacement devient très lent, sont droites et paralysées. Comparées au témoin, les juvéniles sont groupés, actifs et mobiles (fig 6.17).

Chez les larves (I2) traitées avec l'extrait de l'ortie (partie aérienne), nous avons observé que ces dernières sont devenues transparentes ce qui peut être expliqué au fait que les molécules bioactives de l'ortie agissent sur le tube digestif de *Meloidogyne spp.* qui se vide suite au traitement.



LV : Larve Vivante; LM : Larves Mortes.

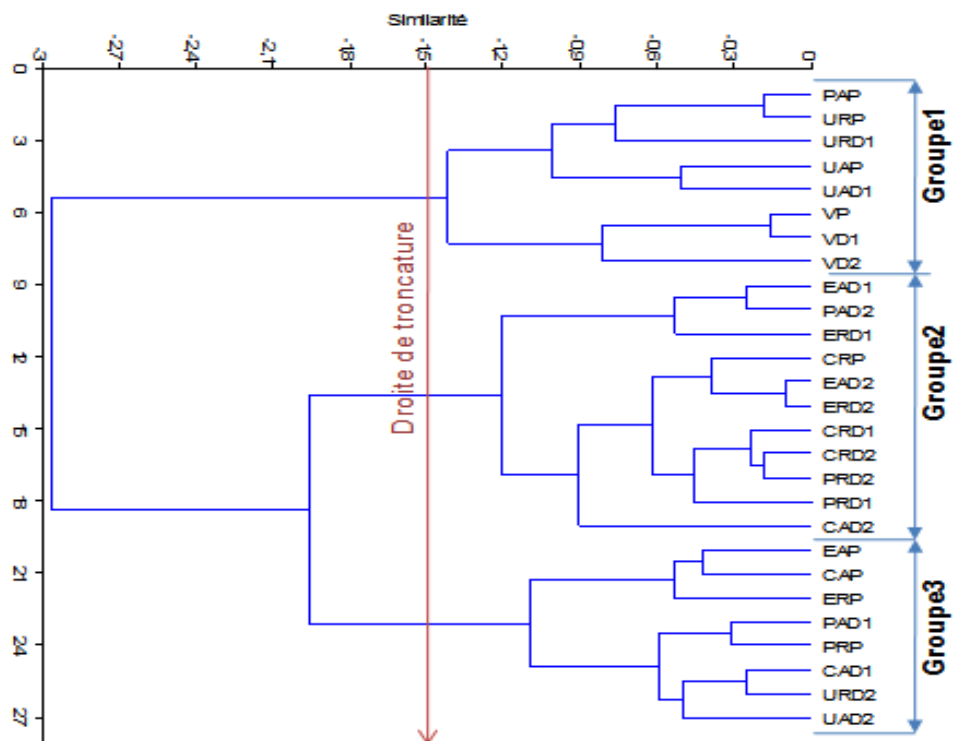
**Figure 6.17.** Activité nématocide des extraits aqueux sur le comportement des larves de *Meloidogyne spp.* [originale]

### 6.3.2. Variations de l'effet des différents traitements (extraits végétaux et produit chimique) sur les larves (J2) de *Meloidogyne* en fonction du temps

Une étude complémentaire basée sur l'Analyse en Composantes Principales (ACP) effectuée afin d'évaluer la toxicité des différents traitements en fonction du temps d'exposition a montré la présence d'une corrélation positive entre les valeurs constituant la matrice des données.

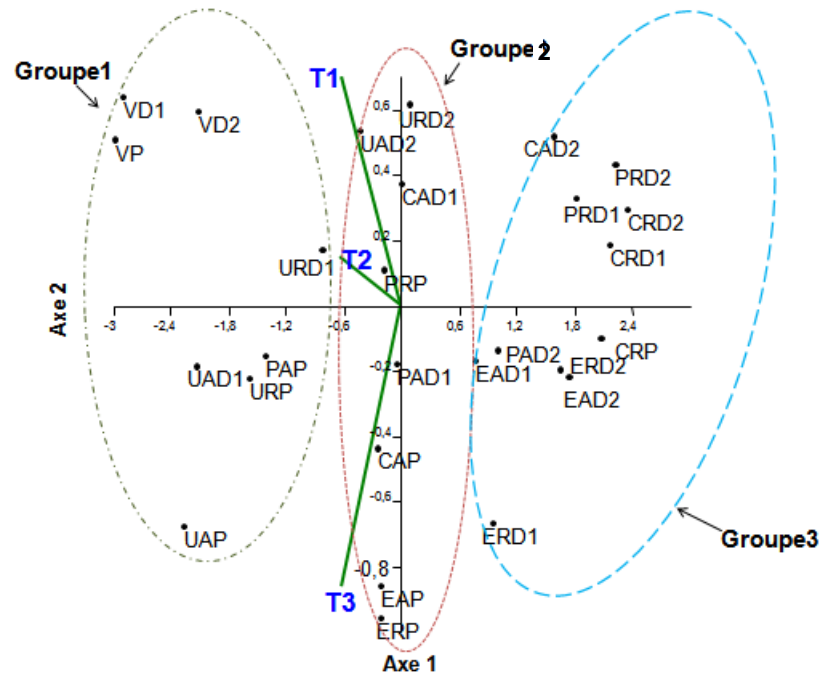
L'étude des corrélations a été réalisée sur le plan 1, 2 du moment qu'ils présentent une forte contribution à l'identification des nuages avec les valeurs respectives de 89,477 et 3,362.

Les calculs de la distance euclidienne et sur la base d'une similarité de -15, le cercle de corrélation (fig.6.18 et 6.19) a montré la présence de trois groupes d'extraits.



**P** : *Plantago lanceolata*; **U** : *Urtica dioica* ; **V** : Vydate; **E** : *Euphorbia helioscopia*; **C** : *Calendula arvensis*; **A** : partie aérienne ; **R** : partie racinaire ; **D1** :dose1/2 ; **D2** :dose1/4 ; **P** : pur ,

**Figure 6.18** : Classification hiérarchique ascendante des différents extraits végétaux et le Vydate avec leurs dilutions (calculée par le biais des distances euclidiennes)



**Figure 6.19** : Analyse en Composantes Principales (ACP) des différents traitements en fonction du temps d'exposition des larves de *Meloidogyne*

Le premier groupe prend en compte principalement le Vydate et l'extrait d'*Urtica dioica*. Ce groupe est corrélé positivement avec les vecteurs (le temps de traitement), caractérisé par une très forte activité nématocide représentée par des pourcentages les plus élevés allant jusqu'à 100% de mortalité.

Le deuxième groupe est représenté par les extraits des espèces *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata* et *Euphorbia helioscopia* avec leurs fortes concentrations. Ce groupe qui se trouve à l'intersection des deux axes, est corrélé positivement avec le temps de traitement et se caractérise par un effet nématocide élevé induisant jusqu'à 80% de mortalité des larves.

Le troisième groupe inclut les extraits aqueux dilués et n'induisant qu'un effet nématocide assez faible par rapport aux deux groupes précédents, représenté par des pourcentages de mortalité variant entre 10 et 40%.

### 6. 3.3. Évaluation de l'effet irréversible des traitements effectués

L'étude de la revitalisation des larves après traitement a permis de déduire que les extraits aqueux ont exercé un effet irréversible même après 6h de traitement (tableau 6.13).

**Tableau 6.13:** les taux de revitalisation des les larves ( $L_2$ ) de *Meloidogyne*

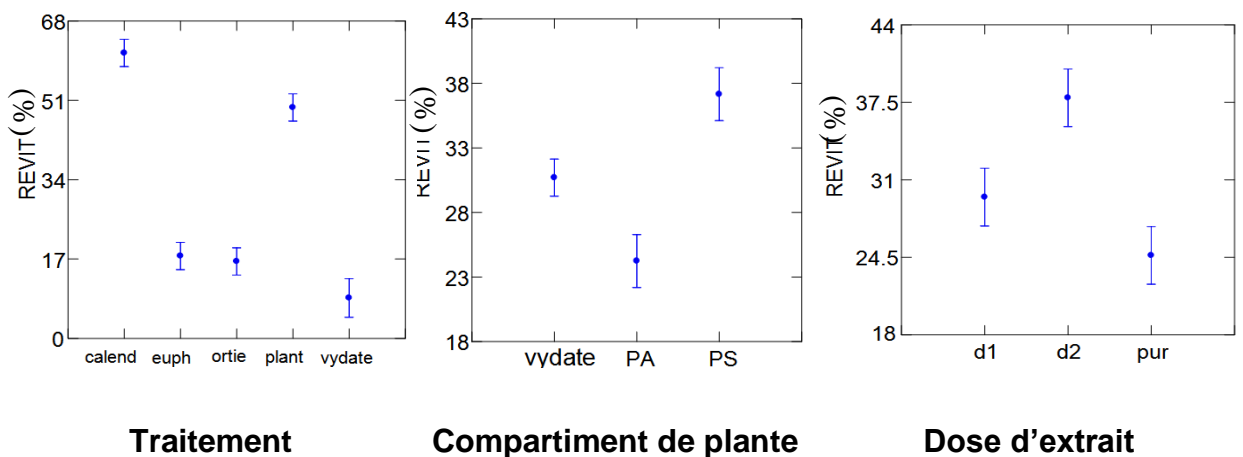
Traitement	(%)	Dilution					
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4
		Partie aérienne			Partie souterraine		
<i>Euphorbia helioscopia</i>	R	15	7	15	23	23	23
<i>Plantago lanceolata</i>	R	38	46	46	53	53	61
<i>Calendula arvensis</i>	R	46	53	61	69	69	69
<i>Urtica dioica</i>	R <sub>0</sub>	23	53	84	30	76	85
	R	0	7	23	0	23	46
Vydate	(%)	Dose	1/2 dose	1/4 dose			
	R <sub>0</sub>	84	84	92			
	R	0	7	19			

R<sub>0</sub>: % de larves revitalisées après effet choc; R: % de larves revitalisées après 72h de traitement.

Le modèle G.L.M. appliqué à l'évaluation de la revitalisation en fonction des traitements effectués, des compartiments et des doses (tabl.6.14 et fig.6.20), montre des variations significatives de la revitalisation des larves des *Meloidogyne* entre les traitements effectués ( $p=0,000$  ;  $p<0,05$ ), les compartiments des plantes ( $p=0,000$  ;  $p<0,05$ ) et les doses testées ( $p=0,003$  ;  $p<0,05$ ).

**tabl.6.14 :** modèle GLM appliqué sur le taux de la revitalisation de *Meloidogyne* après traitement.

Facteurs	Somme des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	F-ratio	P
Traitement	11213.574	4	2803.394	54.559	0.000
Compartiment	1001.042	1	1001.042	19.482	0.000
Dose	804.519	2	402.259	7.829	0.003

**Figure 6.20:** Revitalisation des juvéniles de *Meloidogyne* après 72h de traitement.

Il ressort de la figure (6.19) qu'après 72h d'exposition au Vydate et aux extraits aqueux issus des deux espèces *Urtica dioica* et *Euphorbia helioscopia* ; les nématodes ne revitalisent presque pas (moins de 17%). Cependant, pour les extraits de *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata*, le pourcentage de revitalisation était plus ou moins fort (plus de 50%), mais les nématodes sont immobiles, épuisés et ne parviennent plus à se déplacer et ne s'enroulent plus ; comparés au témoin dont ces derniers sont très actifs et mobiles.

Les extraits végétaux de la partie aérienne montrent une activité nématocide irréversible sur les larves. L'extrait pur a exercé un effet irréversible plus important que les extraits dilués.

#### 6.4. calcul de la CL 50

A partir du tableau de probits on a pu tracer les graphes, et à partir de ces derniers on a déduit à travers l'équation de droite de régression la valeur de CL50 (concentration létale à 50%) pour chaque biopesticide pour les effets nématocides, antifongiques et antibactériens (tableaux 4.15, 4.16 et 4.17).

**Tableau 6.15.** Cl 50 des extraits aqueux et du Vydate pour les tests nématocides (mg/cm<sup>3</sup>)

<b>extrait</b>	<b>compartiment</b>	<b>Cl50</b>
<i>Euphorbia helioscopia</i>	partie aérienne	39,84
	partie souterraine	35,19
<i>Calendula arvensis</i>	partie aérienne	46,61
	partie souterraine	351,80
<i>Plantago lanceolata</i>	partie aérienne	28,06
	partie souterraine	77 ,99
<i>Urtica dioica</i>	partie aérienne	20,80
	partie souterraine	26,43
Vydate	-	0,35



**Tableau 6.16.** CI 50 des extraits aqueux pour les tests antifongiques (mg/cm<sup>3</sup>)

extrait	champignon	Aa	Ac	Af	Fo	Fs	Rs	Pc	Pae	Pv	Ggt
	compartiment										
<i>Raphanus raphanistrum</i>	partie aérienne	868,98	5,10E+05	29,63	25,79	29,96	8,61E+04	24,73	2410	3,07E+04	224,02
	partie racinaire	722,94	6,46E-11	76,19	90,01	-	5,40E+05	40,68	8,65E+16	1,37E-06	403,42
<i>Calendula arvensis</i>	partie aérienne	5,04E-07	-	39,12	57,59	22,83	0,04	75,03	1,34E+05	2,86E+03	449,99
	partie racinaire	3,05E+05	-	50,79	47,43	5,59	2,05E-85	94,88	348	3,59E+03	564,89

*Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium solani* (Fs), *Alternaria alternata* (Aa), *Alternaria chlamydosporia* (Ac), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Gaeumannomyces graminis var tritic* (Ggt), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Phomopsis vaccinii* (Pv).

**Tableau 6.17.** CI 50 des extraits aqueux pour les tests antifongiques (mg/cm<sup>3</sup>)

extrait	bactérie	At	Av	Rs	Xc	Cm	Eam	Ecc
	compartiment							
<i>Euphorbia helioscopia</i>	partie aérienne	2,03	1,95E+03	3,70E-05	45,26	26,55	2,53E-70	73,03
	partie racinaire	0,18	2,05E-04	5,76E+06	3	18,09	506,95	69,82
<i>Calendula arvensis</i>	partie aérienne	7,38	66,65	1,73	52,49	32,18	658,1	0,93
	partie racinaire	142,75	204,26	0,1	2,77E+03	5,05E+03	8,06E+03	6,48E-05
<i>Plantago lanceolata</i>	partie aérienne	0,01	334,68	1,13E-09	59,04	176,4	86,6	36,23
	partie racinaire	3,47	16,55	1,01E+04	51,03	1,99E+04	2,71E+03	86,3

**At:** *Agrobacterium tumefaciens* ; **Av:** *Agronacterium vitis* ; **Rs:** *Ralstonia solanacearum*, **Xc:** *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, et **Cm :** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ; **Eam :** *Erwinia amylovora*, **Ecc :** *Erwinia carotocora* pv. *carotovora*

## CHAPITRE 7

### DISCUSSION GENERALE

Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très variées. En effet, en plus des métabolites primaires classiques (glucides, protéines, lipides, acides nucléiques), elles synthétisent et accumulent perpétuellement des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source immense de molécules exploitables par l'homme dans des domaines aussi distincts que la pharmacologie, l'agroalimentaire ou encore en agriculture dans le cadre de la phytoprotection [220 ; 293].

Actuellement, les extraits bruts des plantes commencent à avoir un intérêt très prometteur comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Les extraits végétaux font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour les traitements insecticides, bactéricides, nématicides et fongicides [294].

Dans le présent travail, l'activité antibactérienne, antifongique et nématicide des espèces végétales étudiées (*Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Raphanus raphanistrum*), constitue une étude préliminaire sur la recherche de nouvelles molécules bioactives à intérêt pesticide.

Les résultats des tests du pouvoir bactéricide, fongicide et nématicide sont intéressants du fait qu'ils constituent une première initiative de recherche sur des plantes spontanées d'intérêt agronomique. Ces résultats ont montré une efficacité élevée entre les différents extraits en relation avec l'origine de l'extrait (partie aérienne ou partie souterraine) et sa concentration (extrait pur, dilué à  $\frac{1}{2}$  et dilué à  $\frac{1}{4}$ ). Ces résultats préliminaires expliquent et confirment que les plantes étudiées possèdent des propriétés biocides appréciées.

Toutefois, il est à signaler une différence d'action entre les extraits considérés qui pourrait être expliquée par une diversité de composition chimique et une dissemblance quantitative et qualitative entre la partie aérienne

représentée par les fleurs, les tiges et les feuilles, et la partie souterraine (les racines) chez certaines espèces végétales.

D'une manière générale, la différence d'action entre la partie aérienne et racinaire a été non significative. Cela peut être expliqué par le fait que ces métabolites secondaires dans la plante sont synthétisés et secrétés par l'intermédiaire des cellules ou d'organes particuliers où elles restent localisées. Elles peuvent être stockées d'une manière équitable dans tous les organes de la plante [293]. Cette différence d'action obtenue dans cette présente étude est expliquée aussi par le fait que les plantes produisent des métabolites secondaires spécifiques qui appartiennent à certaines classes connues pour avoir ce type d'activité telles que; les composés phénoliques et les terpénoïdes [295].

### 7.1. Des plantes spontanées à pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne

Concernant les effets biocides des extraits aqueux sur les bactéries phytopathogènes testées, de nombreux travaux ont mis en évidence le pouvoir antibactérien élevé des composés phénoliques, des tanins et des alcaloïdes [296 ; 297] et qui peuvent être en partie responsables de l'activité antibactérienne obtenue et concordants avec les résultats de notre expérimentation.

L'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* de nos extraits aqueux analysée par la méthode de disques-diffusion et de spectrophotométrie, nous a permis de déduire que l'espèce *Euphorbia helioscopia* présente l'activité antibactérienne la plus remarquable se traduisant par un pourcentage d'inhibition de 73% chez la souche *Clavibacter michiganensis* et de 69% chez *Xanthomonas campestris*. Ces résultats pourraient être expliqués et liés à la composition phytochimique de cette plante.

En effet, des essais phytochimiques ont révélé la présence des classes principales de métabolites secondaires chez *Euphorbia helioscopia*, constituées par les alcaloïdes, les flavonoïdes, en particulier des flavonols, les composés cyanogénétiques, les cyanidines et delphinidines, l'acide ellagique, les saponines, les terpénoïdes, les glycosides et les tanins [298 ; 299].

Plusieurs espèces d'euphorbes (*Euphorbia* spp.) ont été étudiées pour un certain nombre d'activités biologiques incluant des propriétés anti-tumorales, anti-leishmaniques, antibactériennes et insecticides [300]. Un certain nombre de

résultats a été rapporté sur l'effet antiviral des espèces d'*Euphorbia* spp.[301] et par la même voie, beaucoup de composés à potentiel antiviral ont été purifiés [302 ; 303]. Il a été rapporté ainsi que la plante entière d'*Euphorbia helioscopia* présente une grande importance médicinale où les feuilles et les tiges sont employées comme fébrifuges et vermifuges [304]. L'huile des graines présente des propriétés purgatives et les racines sont employées en tant qu'anti-helminthique [305].

D'autre part, les extraits des deux espèces *Plantago lanceolata* et *Calendula arvensis* ont montré des effets élevés sur les souches bactériennes avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 63 et 79% respectivement. Les classes principales des métabolites secondaires présentes chez *Plantago lanceolata* sont très diversifiées allant des alcaloïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des composés volatiles, des glycosides phénylpropaniques, des tannins, des mucilages aux saponosides [306].

Les composés majoritaires rencontrés chez les espèces du genre *Calendula* sont essentiellement ; les acides phénoliques ; les sesquiterpènes, les flavonol glycosides [307 ;308], les triterpénoides saponines(2-10%) [309], les triterpènes alcools ; les flavonoïdes (24-26%), les caroténoïdes(28-30%), et les xanthophylles ainsi que les stérols, les mucilages, les tocopherols et la calenduline [310]. Les huiles essentielles du souci des champs se sont révélées actives *in vitro* sur la bactérie à Gram négatif *Campylobacter jejuni* [311].

La majorité de ces groupes chimiques présents chez le plantain et l'euphorbe à savoir les tannins, les saponosides, les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanosides et les mucilages, sont extractibles par l'eau [312].

Par ailleurs, il a été montré que le plantain (*Plantago lanceolata*) est utilisé en médecine en raison de ses propriétés mucilagineuses [313]. Il présente un effet antibactérien sur les bactéries Gram+ et Gram-. Les espèces bactériennes testées par ces derniers auteurs, sont : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. Coli*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* [314].

La bactérie à Gram positif, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* s'est avérée plus sensible que les souches à Gram négatif avec un diamètre d'inhibition de 30mm. Dans la plupart des études de l'activité antibactérienne des extraits des plantes, les bactéries à Gram positif s'avèrent souvent plus susceptibles aux extraits des plantes que celles à Gram négatif [315 ;316 ;317].

Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram positif possèdent seulement une couche externe de peptidoglycane (murène) qui n'est pas une barrière efficace [318]. En revanche, les bactéries à Gram négatif possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes, composées essentiellement de lipopolysaccharides. Ces derniers composés pariétaux forment une barrière remarquable aux composés hydrophobes en présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, où des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives en présence de composés extrinsèques [294].

Les extraits aqueux testés dans cette étude ont montré une grande action antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram négatif testées, ce qui démontre que ces extraits renferment des molécules bioactives capables de franchir la paroi de ces bactéries.

La bibliographie rapporte de nombreux mécanismes antimicrobiens très complexes des extraits végétaux à base de flavonoïdes, tels que ; l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien [319].

Plusieurs études ont été menées pour comprendre les mécanismes d'action des extraits des plantes, dont plusieurs attribuent cette fonction aux composants phénoliques en interaction avec la membrane plasmique des agents pathogènes [320].

De ce fait, les composés secondaires des plantes, en autres, les huiles essentielles, possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale, leur action se déroule en trois phases : l'attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires, l'acidification de l'intérieur de la cellule bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants structuraux et enfin, la destruction du matériel génétique conduisant à la mort de la bactérie [321].

Les résultats de l'analyse statistique de l'effet antibactérien des extraits végétaux sur les souches bactériennes, ont révélé que la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum* s'est montrée récalcitrante à l'égard des différents traitements des extraits bruts issus des espèces spontanées. Ceci pourrait être

expliqué par le fait que cette bactérie peut développer une grande capacité de résistance intrinsèque vis-à-vis d'une large gamme de biocides. En effet, cette résistance est associée à la nature de la membrane externe gouvernée quant à elle, par des gènes plasmidiques qui peuvent être acquis lors de transferts horizontaux entre les bactéries [293 ; 294]. D'autre part, la résistance de cette même bactérie vis-à-vis d'*Urtica dioica* est expliquée par le fait que l'ortie constitue une plante hôte de la bactérie *Ralstonia solanacearum* et des symptômes maladiques de type flétrissement, peuvent être induits lors d'une infection [322]. Dans le même ordre d'idées, il est à rappeler que *Ralstonia solanacearum* constitue un organisme de quarantaine très redoutable et chaque année de nouvelles plantes sont rangées dans la gamme des plantes sensibles à cette bactérie, ceci s'explique par la plasticité de son génome caractérisé par un mégaplasmide et un chromosome hébergeant tous les deux des gènes de pathogénicité.

Toutefois, les résultats négatifs enregistrés par la méthode de disque-diffusion de l'extrait de la partie aérienne de l'espèce *Urtica dioica* sur la bactérie *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, n'indiquent pas l'absence des molécules bioactives, ni que la plante *Urtica dioica* est inefficace sur ce pathogène ou bien que cette bactérie soit résistante du fait que, des résultats positifs avec la méthode de spectrophotométrie (20%) ont été obtenus. D'autre part, il est possible que les principes actifs puissent être présents en quantité insuffisante dans les extraits aqueux pour montrer l'effet avec les niveaux de doses utilisées au cours de notre expérimentation. Le manque d'activité peut seulement être prouvé ainsi en employant des doses importantes ou d'extraire ces composés bioactifs dans un solvant différent de l'eau. Rappelons à juste titre que ce même extrait, a présenté quand même une activité antibactérienne plus ou moins faible contre les autres espèces bactériennes à Gram négatif examinées.

Les résultats des travaux de GÜLÇİN et coll. [323], ont révélé la présence d'une activité antimicrobienne d'extraits aqueux d'*Urtica dioica* vis-à-vis de neuf microorganismes ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus epidermidis*. En général, les extraits de l'ortie se sont aussi révélés actifs sur les bactéries testées au cours de notre expérimentation, à des effets plus ou moins faibles comparés

aux autres plantes spontanées étudiées à l'exception de la bactérie *Ralstonia solanacearum*.

## 7.2. Activité fongistatique et fongicide des espèces végétales spontanées

Les extraits aqueux de *Calendula arvensis* et *Raphanus raphanistrum* ont montré un fort pouvoir antifongique sur les dix souches étudiées, donnant des résultats en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne compris entre 35% et 40%. Les propriétés antifongiques sont dues sans doute à ses alcools et lactones terpéniques [324]. Cependant, les glucosinolates, autrefois appelés hétérosides soufrés, sont des composés hétérosidiques anioniques responsables des odeurs fortes et caractéristiques dégagées par de nombreuses *Brassicacées* et *Alliaceae*. La composition chimique des Crucifères, essentiellement constituée de glucosinolates et de flavonoïdes, confère à ces plantes des effets antimicrobiens y compris antifongiques. La teneur en glucosinolates varie selon l'espèce, la partie de la plante et les conditions culturales et climatiques [325].

D'autre part, les extraits de l'espèce *Calendula officinalis* ont montré une activité inhibitrice remarquable sur de nombreuses bactéries et champignons cliniques, tels que ; *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veilonella parvula*, *Eikenella corrodens* *Peptostreptococcus micros* et *Actinomyces odontolyticus* [326]. Ainsi, une fraction de flavonoïdes isolée à partir des fleurs de cette même espèce a montré une activité antibactérienne et antifongique *in vitro* vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida monosa*, organismes pathogènes à l'homme [327].

Dans la présente étude, nous avons choisi parmi les souches de la collection, deux champignons *Pochonia chlamydosporia* et *Paecilomyces sp*, considérés comme des champignons nématophages ; le contraste révélé par les résultats obtenus, nous a permis de démontrer que ces agents de lutte biologique peuvent être, tous comme les champignons phytopathogènes, sensibles à l'égard de certains extraits et composés chimiques, c'est le cas de *Pochonia chlamydosporia*, et même résistants le cas de *Paecilomyces sp*. Nos résultats corroborent avec une étude qui a été faite par MARCIANO et coll. [328], et qui révèle l'effet des produits volatiles des *Brassicaceae* sur les deux champignons ;

un phytopathogène *Sclerotinia spp.* et un agent antagoniste utilisé dans la lutte biologique *Trichoderma harzianum*. Cette étude nous indique par ailleurs, que les glucosinolates et les dérivés enzymatiques sont très actifs contre *Sclerotinia spp.* considéré comme champignon phytopathogène cible, par contre aucune activité antifongique n'a été signalée vis-à-vis du champignon non ciblé *Trichoderma harzianum*, qui s'est manifesté résistant.

Plusieurs études sur l'activité antifongique des extraits aqueux, tels que : *Inula viscosa* et *Anacardium occidentale* ont été réalisées sur *Aspergillus fumigatus*, pathogène à l'homme et producteur de mycotoxines. Ces études ont révélé à chaque essai, un pourcentage d'inhibition avoisinant les 80% [279 ; 329 ; 330]. Dans la présente étude, le pourcentage d'inhibition de ce champignon avec tous les extraits testés a été comparable par rapport à ces études, donc l'efficacité des extraits utilisés peut être observée sur une large gamme de champignons pathogènes des végétaux et par la même de l'homme.

Il s'est avéré que le Thym (*Thymus sp.*) riche en groupements phénols a montré une activité inhibitrice particulièrement élevée contre la croissance fongique et la sporulation d'*Aspergillus fumigatus* [279]. Ces effets antifongiques semblent avoir une corrélation avec le développement incomplet des conidiophores d'*Aspergillus fumigatus*. Des modifications morphologiques ont été observées et confirmés par les travaux de DE BILLERBECK [331].

Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont prouvé que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède une activité antifongique contre un certain nombre de mycètes [294]. REDDY et coll. [332], ont montré un potentiel élevé de l'huile volatile comme agent protecteur des fruits de fraise contre la détérioration causée par *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stoloniji*.

Dans le cas du mode d'action de l'ortie sur les champignons, Il est possible que les composés actifs de ces plantes plus particulièrement d'*Urtica dioica*, soient présents en faible quantité dans les extraits bruts pour montrer un pouvoir antifongique. Le manque d'activité peut être prouvé par l'extraction de ces composés bioactifs dans un solvant différent de l'eau. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous car le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés [333].



BAJPAI et coll. [334], signalent que le traitement avec l'extrait de *Metasequoia glyptostroboides* à l'égard d'une collection de champignons phytopathogènes comprenant des souches de *Fusarium* (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*), réduit la croissance mycélienne de ces deux champignons à des pourcentages rapprochés. Ceci concorde avec les résultats obtenus dans cette étude pour les espèces des deux genres *Fusarium* et *Alternaria*, et qui se s'explique par le fait que les espèces appartenant au même genre sont génétiquement proches donc réagissent presque selon le même processus.

Cependant, le test de sporulation réalisé au cours de cette étude, manifeste une relance de croissance avec un faible taux de sporulation qui se traduit par le fait que les composants chimiques de la plante et plus particulièrement les huiles essentielles et volatiles, sont de nature fongistatique plutôt que fongicide [335]. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les huiles essentielles sont des produits généralement peu polaires, volatils, odoriférants et de densité pour la plupart inférieure à celle de l'eau [336].

La littérature rapporte de nombreux mécanismes antifongiques très complexes des extraits aqueux d'origine végétale afin d'expliquer l'action de ces biopesticides appartenant à différentes familles botaniques. C'est ainsi qu'OMIDBEYGI et coll. [337], ont suggéré que les composants de la membrane cellulaire traversent la paroi en interagissant avec les enzymes et les protéines de la membrane, produisant ainsi un flux de protons vers l'extérieur de la cellule qui provoque des changements, et, finalement leur mort. CRISTANI et coll. [338], ont signalé que l'activité antimicrobienne est liée à la capacité des terpènes pour son action non seulement sur la perméabilité, mais aussi d'autres fonctions de la membrane cellulaire. Ces composés peuvent traverser la membrane, pénétrer ainsi à l'intérieur de la cellule et interagir avec les sites intracellulaires critiques. LUCINI et coll. [339], quand à eux, ont indiqué que l'inhibition de la croissance mycélienne est causée par les monoterpènes présents dans des extraits de plantes. Ces composants vont augmenter la concentration des peroxydes lipidiques tels que les radicaux hydroxyle, l'alcoxy et alkoperoxy et provoquer ainsi la mort cellulaire. Pour TRIPATHI et SHARMA [340], les composants des extraits agiraient sur les hyphes du mycélium, provoquant la sortie des composants du cytoplasme, la perte de la rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, ce qui entraîne sa désintégration et la mort du mycélium.

Pour le cas des polyphénols, comme l'acide férulique, ils participent à un réseau moléculaire sous forme de dimères présents dans la paroi des graines de maïs (*Zea mays*) et constituent une barrière mécanique et chimique à l'invasion du champignon phytopathogène *Fusarium graminearum* [341 ;342]. Ces substances phénoliques jouent un rôle très actif dans les mécanismes de résistance de la plante contre les parasites. Elles participent à la résistance constitutive en inhibant des enzymes hydrolytiques parasitaires ou en se polymérisant. Ces polymères phénoliques ne sont pas dégradés par la plupart des agents pathogènes. Ils constituent une barrière à plusieurs niveaux en protégeant les autres constituants de la paroi ou en créant un obstacle à la diffusion des toxines parasitaires et à la dissémination des parasites vasculaires [343]. Les champignons phytopathogènes analysés lors de cette étude constituent des parasites vasculaires pour la plupart, ce qui nous permet d'avancer que l'effet des composés phénoliques des plantes spontanées sur les hyphes mycéliens pourrait être assimilé aux résultats des recherches cités antérieurement, mais des études plus poussées confirmeront.

Les substances phénoliques sont aussi impliquées dans la résistance induite à travers la biosynthèse des phytoalexines. EL MODHAFAR et coll. [344], constatent que l'infection des racines du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) par le champignon pathogène *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, responsable du Bayoud, engendre la synthèse et l'accumulation de phytoalexines identifiées à des coumarines et à des dérivés de l'aesculétine. Le mécanisme de la défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection, qui fonctionnent pour ralentir la croissance du pathogène [345]. La capacité de l'espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [346].

### 7.3. Effet toxique des extraits aqueux sur les nématodes à galles

Certains travaux sommaires à travers le monde ont consisté à tester *in vitro* les extraits aqueux, alcooliques et lipidiques des différents tissus d'espèces nématicides sur les larves et les œufs de divers nématodes, principalement les *Meloidogyne spp.* [230]. Par ailleurs, des investigations plus poussées ont déjà permis l'isolement et la caractérisation d'un certain nombre de principes actifs (ricine, azadirachtine). Il a été mis en évidence par MUNAKATA [347] que la

plupart des substances naturelles nématocides, qui peuvent avoir une activité systémique (véhiculées par la sève de la plante), sont décomposables et non polluantes. Elles pourraient être utilisées comme base pour la synthèse de nouveaux nématocides [121].

L'étude de l'effet toxique des extraits aqueux des racines et des parties aériennes des quatre plantes étudiées a montré que ces derniers présentent des principes actifs létaux pour les larves (L<sub>2</sub>) de *Meloidogyne*. Cependant, les taux de mortalité produits varient en fonctions de l'espèce végétale, de l'organe utilisé, de la concentration de l'extrait et du temps d'immersion.

En effet, le screening phytochimique de deux plantes à pouvoir nématocides (*Acacia gummifera* et *Tagetes patula*) a révélé une teneur relativement importante en flavonoïdes [348]. Les travaux d'OKA et coll. [349]; CHITWOOD [350], signalent que les alcaloïdes, les acides gras, les diterpènes, les glucosides, les polyphénols, les flavonoïdes, les isothiocyanates, les polyacétylènes et les sesquiterpènes sont des substances toxiques à un effet nématocide.

Les résultats du pouvoir nématocide de nos végétaux ont montré une activité très élevée des extraits de l'ortie en particulier ceux de la partie aérienne avec un effet choc remarquable se traduisant par un pourcentage de mortalité de 55% après 6h de traitement des larves et jusqu'à 100% après 72h. L'ortie s'est révélé très efficace, son effet est proche à celui du produit chimique utilisé (Vydate). Selon des études menées par EHWAE et coll. [351] *in vivo*, les plants d'*Urtica dioica* inoculés par des larves et des masses d'œuf des espèces de *Meloidogyne*, n'ont montré aucune formation de galles sur les racines de l'ortie. MENNAN et coll. [352] ont montré l'efficacité *in vitro* des extraits d'*Urtica urens* L. sur l'éclosion des œufs, la pénétration et le développement de *M. incognita*.

En effet, la famille des *Urticaceae* représentée par l'ortie (*Urtica dioica*), constitue par ses nombreuses espèces une gamme de plantes utilisées en agriculture biologique pour tuer ou repousser les insectes et aussi comme fertilisants [353]. Le purin d'ortie constitue un bon fortifiant pour les plantes et stimule la croissance et la résistance naturelle contre les ennemis et les maladies. Il est utilisé en jardinage biologique pour renforcer l'immunité des végétaux et éviter les traitements et les pesticides. Il a été rapporté également comme un excellent accélérateur de compost [353].

Le screening phytochimique d'*Urtica dioïca* réalisé sur les racines et les feuilles a mis en évidence la présence des saponosides, des flavonoïdes, des tanins, des composés réducteurs et les terpénoïdes avec des proportions importantes [354]. De même, des études sur la composition de cette plante ont détecté la présence de 3 flavones (le chryisine, le 7-hydroxyflavone, et 3,6-dihydroxyflavone); et aussi un acide phénolique [354]. Ces substances présentent une activité nématocide importante [355].

Des travaux antérieurs effectués sur la composition d'*Urtica dioïca* ont décelé la présence des composés suivants ; le quercétine-3-O-rutinoside, kaempférol-3-O-rutinoside et isorhamnetin-3-O-glucoside, acide caféique, rutine, quercétine, hyperin, isoquercétine, le Béta-sitostérol, trans-acide ferulique scopoletine, et p-hydroxybenzo-alcool [356 ; 357]. La majorité de ces produits contiennent la quercétine (flavonoïde) qui pourrait avoir un rôle nématocide.

FRANZ et coll. [358] montrent que les parties aériennes de l'ortie sont riches en minéraux inorganiques (environ 18%, exprimé en cendres), y compris le potassium (1,8 à 2%) et la silice (de 0,9 à 1,8%). La plante accumule le nitrate dépendant à partir de l'azote du sol. Les médicaments commercialisés contiennent en moyenne 1,5% nitrate. Selon les mêmes auteurs, les poils urticants contiennent l'acétylcholine, l'histamine, la sérotonine, la choline et de petites quantités de leucotriènes. Ainsi, il est signalé dans la littérature que la partie aérienne d'*Urtica dioïca* en particulier les feuilles, possède une activité remarquable en domaine de médecine et pharmacie (activité anti-inflammatoire, rhumatoïde) [359]. La composition chimique particulière de l'ortie notamment au niveau la partie aérienne pourrait expliquée probablement la forte activité toxique obtenue au cours de notre étude.

Les résultats de l'effet nématocide des extraits d'*Euphorbia helioscopia* ont montré une activité élevée qui augmente en fonction du temps (55%).

MAQBOOL et coll. [360] ont testé le latex des extraits d'*Euphorbia caducifolia* sur *Meloidogyne spp.* en culture de tomate et d'aubergine, une concentration de 10% s'est avérée efficace. Les amendements à base de certaines *Euphorbiaceae* ont été étudiés. En effet, GOSWAMI et VIJAYALAKSHMI [361] affirment que l'utilisation de la poudre des plants de *Phyllanthus niruri* (3g/Kg) contre *M.*

*incognita* a provoqué la mortalité d'au moins 90% des nématodes. De même, les amendements par les feuilles ou le tourteau du ricin (*Ricinus communis*), réduisent 30 à 50% les populations de nématodes à galles [362].

L'espèce végétale *Calendula arvensis* est une plante nématicide plus ou moins efficace présentant un pourcentage de mortalité de 25%. En raison de ses vertus nématicides, le souci des champs constitue une excellente plante compagne pour les *Liliaceae* ainsi que pour les fraisiers et la tomate. Des expériences *in vitro* et *in planta* dans une culture de tomates ont révélé que les extraits de *Calendula arvensis* tuaient les larves et les stades adultes du nématode *Meloidogyne incognita* tout en empêchant l'éclosion des œufs [361 ; 363]. *Calendula arvensis* constitue une plante insectifuge et insecticide : des extraits à l'éthanol des feuilles de souci testées sur les vers à soie, n'empêchaient pas les larves de se nourrir mais elles mourraient après l'ingestion de cet extrait [364]. Par ailleurs, des extraits de fleurs de souci sont efficaces contre les *Trichomonas*, protozoaires responsables des leucorrhées [365].

Chez les *Asteraceae*, les plus connues des plantes nématicides sont sans doute les *Tagetes*. Il a été clairement démontré qu'en introduisant une culture de *Tagetes* (*T. erecta* ou *T. patula*) pendant 2 mois d'assolement, à raison de 4Kg /ha ou 20 plants au m<sup>2</sup>, permettait de réduire près de 90% des populations de *Meloidogyne spp.* Ainsi que d'autres nématodes phytophages comme *Pratylenchus sp.*, *Helicotylenchus sp.* et *Rotylenchus sp.* [366 ; 367] à une température supérieure à 15°C. [368].

Selon QAMAR et coll. [369], *Calendula officinalis* (*Asteraceae*), espèces appartenant au genre et dans la composition chimique est proche de celle de *Calendula arvensis*, a causé 70-80% la mortalité des larves de *Meloidogyne spp.* après 48 heures de traitement.

Le screening chimique du genre *Calendula* a discerné divers composés toxiques à effet nématicide. PIETTA et coll. [307]; AHMED et coll. [308] ont identifiés les acides phénoliques ; les sesquiterpènes et les flavonol glycosides.

En ce qui concerne l'effet de *Plantago lanceolata*, notre étude a révélé une augmentation de son efficacité en fonction du temps d'immersion. En effet, après 72h un pourcentage de mortalité allant jusqu'à 45% est enregistré.

Selon les études de MEYER et coll. [370], les extraits *Plantago* (*P. lanceolata* et *P. rugelii*) se sont révélés toxiques sur les œufs et les larves de *M. incognita*. Les

Composés tels que les glycosides, iridoïdes, aucubine et catalpol, l'aglycone aucubigenine et dérivés de l'acide caféique, y compris plantamajoside et actéoside ont été isolés à partir de différentes espèces de *Plantago* et ont montré une activité antimicrobienne et nématocide [371].

Bien que les extraits de *Plantago lanceolata* sont toxiques pour *M. incognita*, cette espèce est un hôte des nématodes à galles [372 ;373]. Les composés toxiques par conséquent, ne conduisent pas à une protection complète de la plante vis-à-vis des *Meloidogyne*, bien que les symptômes ont été décrits comme mineurs [372].

Les investigations de FERRIS et ZHENG [374] sur les effets des extraits *Plantago* sur *M. javanica* et *Pratylenchus*, sont comparables à nos résultats, les individus sont devenus inactifs, immobiles, paralysés et épuisés et ne parviennent plus à se déplacer. D'après ces deux auteurs, l'effet est mortel plutôt que nématostatique et irréversible. Chez les extraits de *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata* testés durant notre étude, le pourcentage de revitalisation était plus ou moins fort. Toutefois, les nématodes revitalisés sont vivants mais immobiles, paralysés et épuisés et ne parviennent plus à se déplacer et ne sont plus actifs.

La sensibilité et la mortalité des larves de *Meloidogyne* par nos extraits aqueux peuvent être expliquées par le fait que les récepteurs sensoriels des nématodes (amphides) sont riches en acétylcholinestérase. Celles-ci sont facilement accessibles et inhibées par les métabolites nématocides [375].

En effet, Les métabolites chimiques renfermés dans les extraits de plantes ont la capacité d'inhiber la synthèse de l'acétylcholinestérase, le cholinestérase et d'autres estérases. Ces molécules affectent le système nerveux des nématodes en inhibant l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase [376].

Le cholinestérase et l'estérase jouent également un rôle important dans d'autres systèmes métaboliques [377]. Les extraits de plantes possèdent des propriétés anesthésiques nématocides ou nématostatique qui agissent différemment sur les larves, ceci reflète des différences dans la nature des métabolites chimiques et le type du principe actif toxique des espèces végétales [376].

Les substances toxiques chez les extraits végétaux peuvent avoir diverses formes et, par conséquent les larves donneront différentes réponses à savoir un aspect droit et immobile [376]; ceci correspond à la forme observée chez les nématodes à galles traités par nos extraits aqueux durant cette étude.

## CONCLUSION GENERALE

Au cours des dernières décennies, l'attention portée aux effets secondaires des pesticides a profondément modifié la perception à l'égard des pesticides. Ils sont devenus, pour certains, des produits dangereux que l'on devrait bannir ou, au mieux, un mal nécessaire.

Ces conséquences écotoxicologiques plus contraignantes mènent à une augmentation importante des coûts de développement de nouveaux produits phytosanitaires. Le concept de lutte intégrée se réfère principalement à l'écologie, aux rapports existants entre les organismes vivants et leur environnement ou leur espace vital. A l'origine, cette démarche visait la réduction du nombre d'interventions avec des pesticides tout en minimisant leurs effets secondaires. Par conséquent, le développement des futurs biopesticides d'origine végétale, est une méthode plus saine et écologique pour la protection des plantes [378].

De ce fait, le travail entrepris dans ce mémoire avait pour objectifs d'analyser les effets biopesticides de quelques plantes adventices qui abondent nos cultures légumières, l'arboriculture fruitière et les grandes cultures. L'analyse de l'effet biopesticide a porté sur leur action sur les nématodes à galle appartenant au groupe des *Meloidogyne* et sur une collection de bactéries et de champignons phytopathogènes

Les résultats de la présente étude portant sur l'évaluation du pouvoir antibactérien de quatre espèces spontanées (*Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata* et *Euphorbia helioscopia*), révèlent que ces plantes présentent des potentialités et pourraient être utilisées et exploitées avec succès pour la gestion des pathologies végétales. Ces maladies causées pour la plupart par des organismes classés dans la liste de quarantaine, entraînent des pertes considérables sur le rendement et la qualité des cultures et qui sont dans la plupart des cas incurables par voie chimique.

Les résultats ont montré que les différents extraits avec les différentes dilutions présentent un pouvoir antibactérien contre les souches bactériennes testées.

L'extrait de la partie souterraine de l'espèce *Urtica dioica* avec les dilutions (1/2 et 1/4) de cette même espèce spontanée n'a pas montré d'effet sur *Ralstonia solanacearum*.

L'espèce *Euphorbia helioscopia* a montré l'activité antibactérienne la plus élevée sur les sept souches bactériennes avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 73%.

Concernant les activités nématocides, les extraits utilisés se sont révélés qualitativement et quantitativement actifs sur les nématodes à galles se traduisant par une augmentation de la mortalité des larves du deuxième stade en fonction de l'augmentation de temps de traitement.

L'extrait de l'espèce *Urtica dioica* présente des pourcentages de mortalité très élevés (jusqu'à 100%) par rapport à *Euphorbia helioscopia*, *Calendula arvensis* et *Plantago lanceolata*.

L'étude de l'effet choc d'*Urtica dioica* et du Vydate effectuée après 6h de traitement des larves a montré que l'extrait de l'ortie a exercé un effet choc très élevé comparé au Vydate. En effet, un taux de mortalité de plus de 20% est enregistré avec l'ortie, alors que le Vydate n'a présenté que 5%. Ces résultats semblent très prometteurs et nous ouvrent la voie sur la possibilité d'utiliser ces espèces ou leurs extraits en agriculture biologique dans le cadre d'une lutte intégrée. C'est ainsi que les observations du comportement des larves traitées effectuées sous la loupe binoculaire, a permis de constater une désorientation et une dispersion des juvéniles dans tous les sens de la cellule de Mallassez, ainsi qu'un déplacement très lent. Ces mêmes individus traités deviennent droits et paralysés, comparés aux témoins où les juvéniles sont groupés, actifs et mobiles.

Les effets antifongiques des extraits sont hautement significatifs selon l'espèce spontanée, la concentration de l'extrait, la souche testée, l'origine de l'extrait (la partie aérienne ou la partie souterraine), ainsi que leurs concentrations. D'une manière générale, les extraits aqueux issus des espèces végétales



*Raphanus raphanistrum*, *Calendula arvensis*, et *Plantago lanceolata*, ont montré une très forte activité biopesticide, alors qu'une sensibilité modérée pour *Euphorbia helioscopia* à faible dans le cas d'*Urtica dioica* a été enregistrée.

Les champignons, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Phomopsis vaccinii* et *Pochonia chlamydosporia* présentent une sensibilité importante vis-à-vis des cinq espèces spontanées se traduisant par un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 50%.

L'essai de l'effet fongistatique de l'extrait de *Raphanus raphanistrum*, sur le champignon *Fusarium oxysporum* a montré une relance de la croissance mycélienne caractérisée par un faible pourcentage d'inhibition de la sporulation.

Ces résultats prometteurs ouvriront la possibilité de trouver de nouveaux pesticides naturels à base de végétaux, considérés comme mauvaises herbes car elles sont méconnues, mais en vérité peuvent être source efficace dans la lutte contre les champignons et les bactéries phytopathogènes, les nématodes et les insectes très redoutables aux cultures.

Cette étude constitue une première étape dans la recherche de molécules biopesticides d'origine végétale, elle mérite d'être poursuivie par des études *in planta* pour confirmer leur activité.

Il serait intéressant de tester l'activité de ces extraits sur d'autres agents pathogènes et insectes ravageurs en particulier ceux listés de quarantaine qui constituent des organismes très redoutables comme par exemples ; *Phytoplasma ulmi*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Xylella fastidiosa*, *Tilletia indica*, *Radopholus similis*, *Globodera rostochiensis*, *Tuta absoluta* et *Thrips palm*.

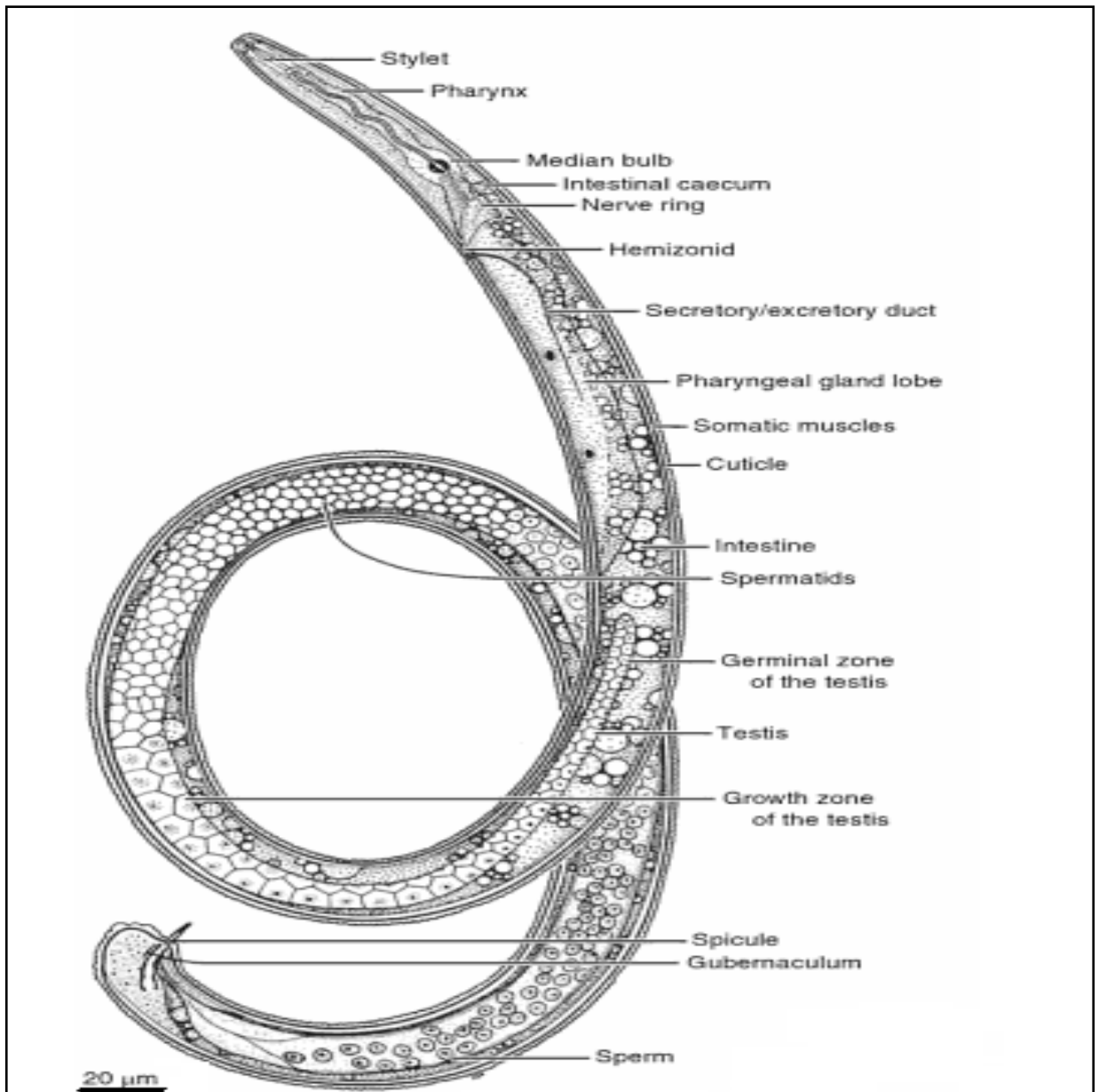
Il serait aussi d'intérêt de rechercher et caractériser les matières actives existantes chez chaque espèce spontanée étudiée afin de les formuler et les utiliser comme produits stables. Ainsi, il va falloir réaliser une étude toxicologique avant l'application des extraits car des résultats de recherches ont montré que certains composés chimiques possèdent des toxicités chroniques, dermiques et des effets cancérigènes [249].

Par ailleurs, il serait judicieux de tester ces espèces spontanées et d'autres par rapport à leur activité clinique sur des organismes pathogènes à l'homme.

**APPENDICE A****LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS**

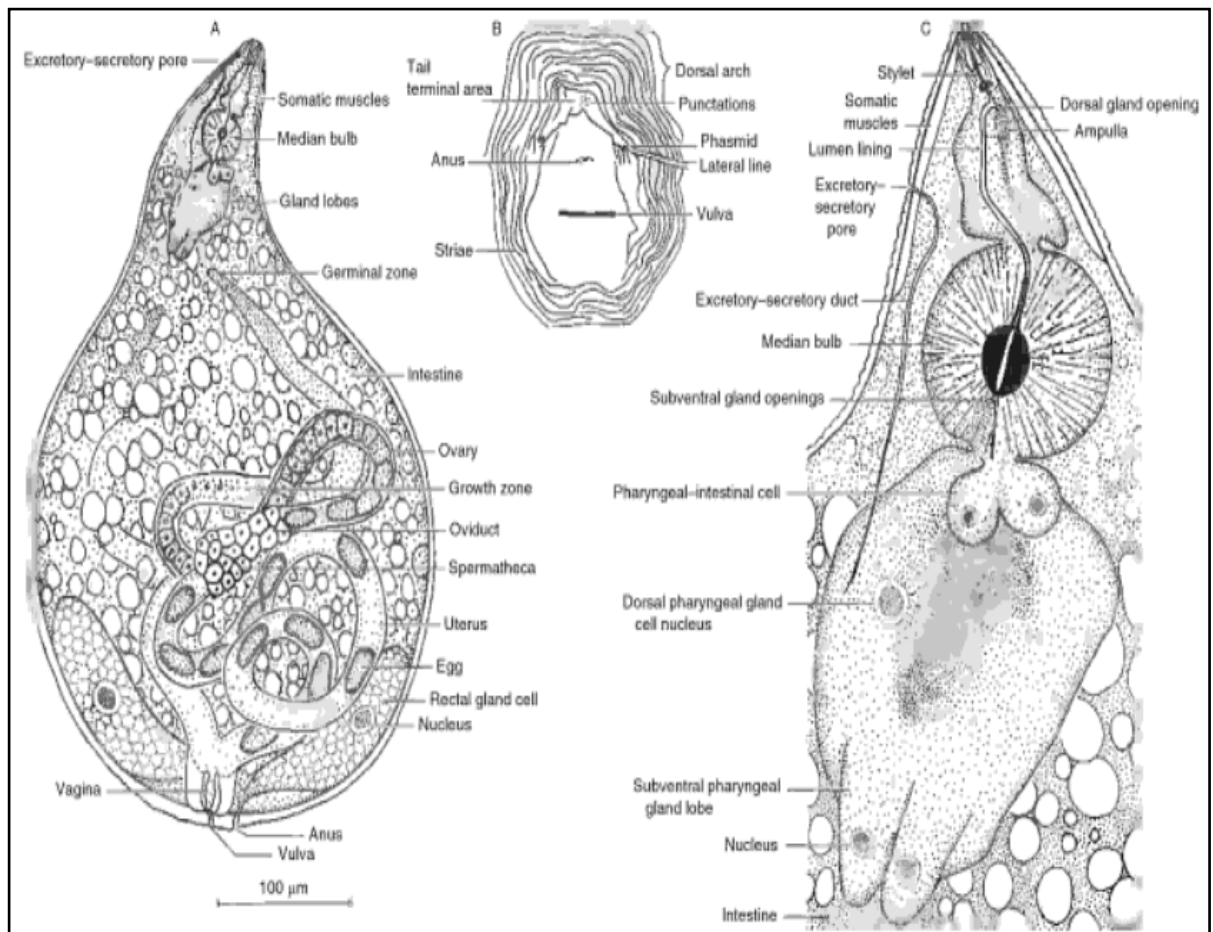
- °C. Degré Celsius.  
cm : Centimètre  
do : Densité optique  
FAO : Organisation  
Fig : Figure  
g : Gramme  
h : Heure  
LB : Luria Bertani  
T : témoin  
ml : Millilitre  
mm : Millimètre  
nm : Nanomètre  
OEPP :Organisation Européenne de la Protection des Plantes  
*ul* : microlitre  
pv. : pathovar  
subsp.Sous espèce  
PA : partie aérienne  
PS : partie souterraine  
Tab : tableau  
Inhib : inhibition

## APPENDICE B



**Figure B:** Schéma représentant la morphologie d'un male de *Meloidogyne* [379]

## APPENDICE C



**Figure C.** Schéma de la femelle de *Meloidogyne* A : nématode entier, B : coupe périnéale, C : l'extrémité antérieure [379].

## APPENDICE D

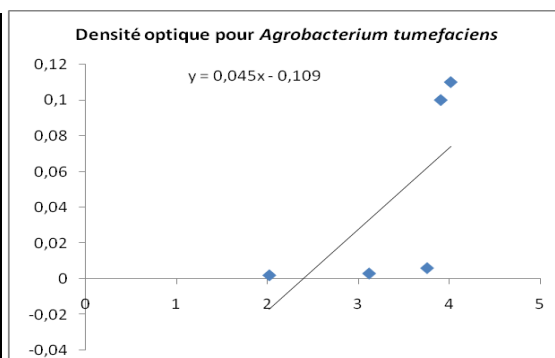
**Tableau G.** Système de notation des indices de galles pour estimer les dégâts dus aux nématodes à galles du genre *Meloidogyne* [380].

0	système racinaire complet et sain; pas d'infestation	1	très peu de galles de petites taille
2	petites galles plus facilement détectables	3	nombreuses petites galles; chevelu racinaire encore complet
4	nombreuses petites galles; quelques grosses galles; système racinaire fonctionnant encore	5	25% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
6	50% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus	7	75% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
8	quasiment plus de radicelles; chapelets de grosses galles sur les racines principales; la plante ne peut plus se nourrir	9	système racinaire réduit et rempli de grosses galles empêchant la plante de se nourrir
10	plante et racines mortes		

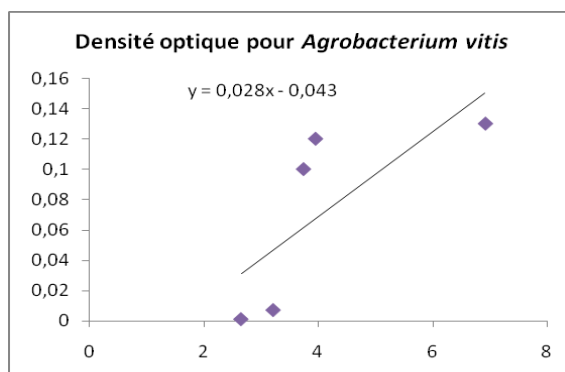
## APPENDICE E (1)

H.1-*Agrobacterium tumefaciens*

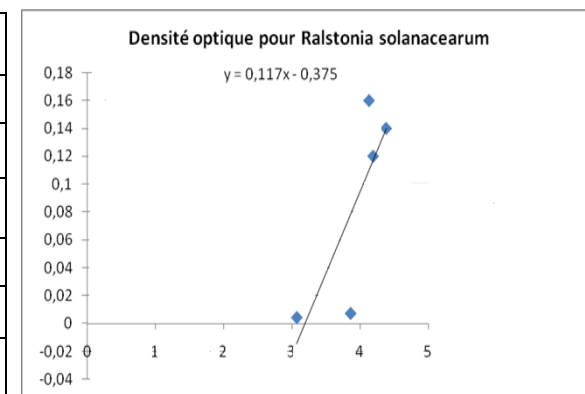
Souche/Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	1041	784	556	212	9
Boite 2	1056	863	598	52	12
Moyenne	1048,5	823,5	577	132	10,5
Moyenne * 10	10485	8235	5770	1320	105
Log 10	4,02	3,91	3,76	3,12	2,02
Densité optique	0,11	0,10	0,006	0,003	0,002

H.2-*Agrobacterium vitis*

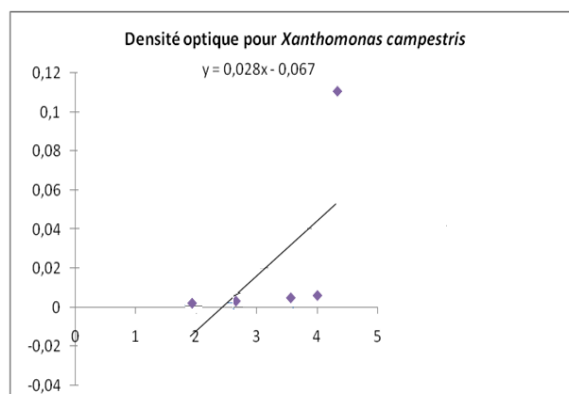
Souche/Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	848	1054	612	174	37
Boite 2	849	786	536	158	56
Moyenne	848,5	920	574	166	46,5
Moyenne * 10	8485	9200	5740	1660	465
Log 10	6,92	3,96	3,75	3,22	2,66
densité optique	0,13	0,12	0,10	0,007	0,001

H.3-*Ralstonia solanacearum*

Souche/Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	2377	1039	1535	727	113
Boite 2	2508	1698	1630	739	125
Moyenne	2442,5	1368,5	1582,5	733	119
Moyenne * 10	24425	13685	15825	7330	1190
Log 10	4,38	4,13	4,19	3,86	3,07
densité optique	0,14	0,16	0,12	0,007	0,004

H.4-*Xanthomonas campestris* pv. *citri*

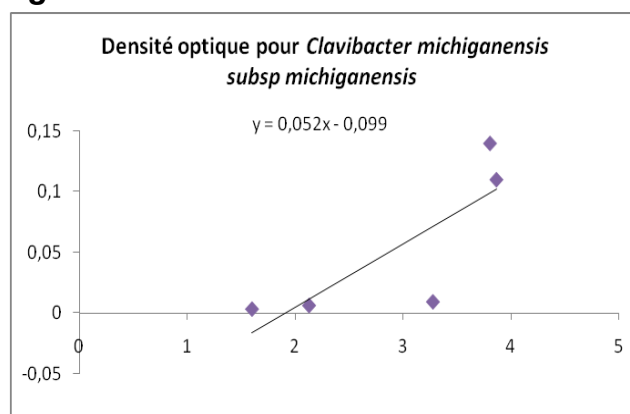
Souche/Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	2054	1127	400	44	7
Boite 2	2043	1111	412	38	9
Moyenne	2048,5	1119	406	41	8
Moyenne * 10	20485	11190	4060	410	80
Log 10	4,31	4,04	3,60	2,61	1,90
Densité optique	0,11	0,006	0,003	0,002	0,001



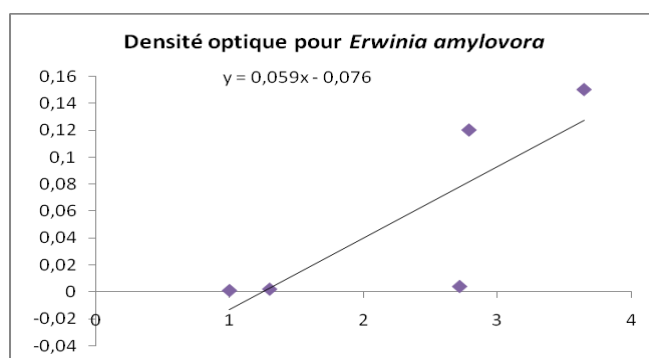
## APPENDICE E (2)

**H.5-Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis**

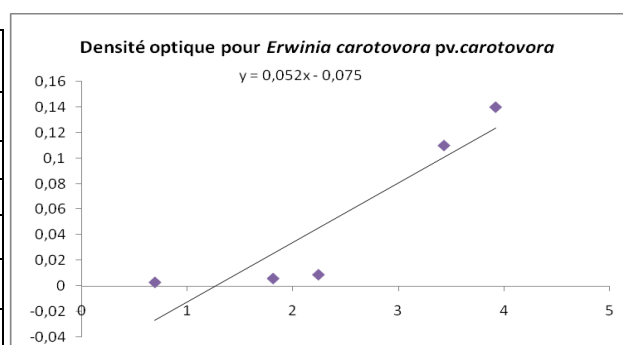
Souche/ Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	1315	820	175	15	6
Boite 2	0	683	211	12	2
Moyenne	657,5	751,5	193	13,5	4
Moyenne * 10	6575	7515	1930	135	40
Log 10	3,81	3,87	3,28	2,13	1,60
Densité optique	0,14	0,11	0,009	0,006	0,003

**H.6- Erwinia amylovora**

souche/ répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	314	74	67	1	1
Boite 2	584	51	40	3	1
Moyenne	499	62,5	53,5	2	1
Moyenne * 10	4990	625	535	20	10
Log 10	3,65	2,79	2,72	1,30	1
Densité optique	0,15	0,12	0,004	0,002	0,001

**H.7-Erwinia carothovora pv. carotovora**

Souche/ Répétition	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Boite 1	859	289	21	11	1
Boite 2	834	250	14	2	0
Moyenne	846,5	269,5	17,5	6,5	0,5
Moyenne * 10	8645	2695	175	65	5
Log 10	3,92	3,43	2,24	1,81	0,69
Densité optique	0,14	0,11	0,009	0,006	0,003



## APPENDICE F

### **Caractéristique du produit nématicide (Vydate)**

Le Vydate utilisé (VYDATE L, produit DUPONT DE NEMOURS, 240 g / l OXAMYL) est un produit chimique nématicide insecticide (utilisé contre les mineuses, pucerons, mouches blanches, thrips et acariens), liquide appartenant à la famille chimique des Carbinols, ce produit est un concentré émulsionnable (E.C) à mode d'action systémique.

Nous avons appliqué le Vydate sur les *Meloidogyne in vitro* à la dose (6l/ha) qui est utilisé pour le contrôle des nématodes à galles en cultures maraichères par le système de goutte à goutte. La dose (6l/ha) rapporté par rapport à la surface des microplaques de culture cellulaire (Costar) à 12 puits.



### APPENDICE G(1)

Tests de sensibilité des sept souches aux extraits purs et à leurs différentes dilutions exprimés en densité optique

Plante	Bactérie	Densité optique	Dilution						Témoin	
			Pure	½	¼	Pure	½	¼	E.D.S	
			Partie aérienne			Partie souterraine				
<i>Euphorbia helioscopia</i>	At	T1	0,077	0,046	0,035	0,06	0,041	0,037	0,035	
		T2	0,646	0,681	1,147	0,567	0,691	0,734	0,683	
		T3	2,297	2,359	2,23	2,23	2,263	2,088	3,271	
	Av	T1	0,058	0,042	0,021	0,05	0,042	0,019	0,012	
		T2	1,287	1,296	1,322	1,149	1,105	1,143	1,174	
		T3	2,14	2,37	2,378	2,451	2,237	2,203	3,168	
	Rs	T1	0,063	0,043	0,037	0,055	0,036	0,023	0,028	
		T2	1,947	1,874	1,911	1,939	1,996	1,911	1,669	
		T3	2,327	2,237	2,26	2,183	2,3	2,264	2,866	
	Xc	T1	0,066	0,046	0,024	0,048	0,042	0,028	0,026	
		T2	0,266	0,282	1,675	0,296	0,264	0,283	0,276	
		T3	0,59	0,471	2,358	0,539	0,581	0,634	1,538	
	Cm	T1	0,074	0,044	0,038	0,066	0,044	0,023	0,018	
		T2	0,233	0,187	1,379	0,182	0,161	0,138	0,175	
		T3	0,436	0,427	1,05	0,532	0,613	0,817	1,632	
	Eam	T1	0,078	0,067	0,035	0,088	0,059	0,047	0,028	
		T2	0,322	0,927	1,614	0,288	0,288	1,681	0,288	
		T3	2,093	2,252	2,087	1,915	1,851	2,181	2,881	
	Ecc	T1	0,09	0,056	0,029	0,069	0,046	0,041	0,03	
		T2	0,961	1,886	1,703	1,071	1,081	1,397	1,133	
		T3	1,04	1,253	1,685	1,062	1,11	1,642	2,078	
	<i>Calendula arvensis</i>	At	T1	0,058	0,049	0,025	0,041	0,032	0,016	0,033
			T2	0,27	0,347	0,509	1,322	1,441	1,523	0,388
			T3	1,115	1,141	1,122	1,58	1,914	2,185	2,272
		Av	T1	0,049	0,034	0,018	0,033	0,019	0,016	0,038
			T2	0,76	0,766	1,216	1,704	1,671	1,921	0,28
			T3	1,164	1,46	2,09	2,059	2,089	2,417	2,455
Rs		T1	0,049	0,034	0,019	0,043	0,028	0,018	0,028	
		T2	2,039	2,001	1,969	2,032	2,095	2,08	1,976	
		T3	2,245	2,342	1,932	2,457	2,503	2,313	2,607	
Xc		T1	0,044	0,033	0,022	0,041	0,029	0,018	0,015	
		T2	0,311	0,268	1,552	1,81	1,976	2,05	0,289	
		T3	0,928	1,219	1,999	2,005	2,02	2,178	2,382	
Cm		T1	0,058	0,028	0,022	0,051	0,033	0,021	0,052	
		T2	0,211	0,229	1,577	0,735	2,097	2,137	1,18	
		T3	0,613	0,75	2,291	2,158	2,27	2,336	2,971	
Eam		T1	0,07	0,06	0,046	0,06	0,046	0,039	0,035	
		T2	0,459	0,496	1,912	2,067	2,117	2,14	0,605	
		T3	1,714	1,933	1,994	1,851	1,926	1,996	2,302	
Ecc		T1	0,036	0,025	0,013	0,04	0,022	0,018	0,019	
		T2	0,585	0,597	0,606	0,604	0,615	0,628	0,587	
		T3	0,59	0,615	0,658	0,679	0,69	0,695	1,616	

## APPENDICE G(2)

Extrait	Bactérie	Densité optique	Dilution						Témoin E.D.S
			Pure	½	¼	Pure	½	¼	
			Partie aérienne			Partie souterraine			
<i>Urtica dioica</i>	At	T1	0,071	0,049	0,032	0,054	0,028	0,012	0,037
		T2	1,393	1,809	1,903	0,823	1,452	2,072	0,969
		T3	1,928	2,042	2,385	2,344	2,289	2,335	2,422
	Av	T1	0,05	0,713	0,024	0,049	0,032	0,02	0,019
		T2	2,132	2,155	2,149	1,596	2,181	2,158	1,918
		T3	2,317	2,335	2,35	2,119	2,33	2,338	2,559
	Rs	T1	0,098	0,062	0,045	0,062	0,048	0,028	0,038
		T2	1,993	2,177	2,292	1,989	2,081	2,096	1,757
		T3	2,247	2,33	2,436	2,05	2,198	2,221	2,461
	Xc	T1	0,06	0,044	0,031	0,067	0,033	0,02	0,021
		T2	1,129	1,887	1,782	0,172	1,339	2,133	1,443
		T3	2,25	2,211	2,212	0,72	2,338	2,435	2,955
	Cm	T1	0,093	0,065	0,05	0,061	0,048	0,03	0,052
		T2	1,43	2,067	2,087	1,886	2,109	2,246	1,249
		T3	2,242	2,357	2,372	2,281	2,285	2,439	2,941
	Eam	T1	0,087	0,055	0,04	0,057	0,043	0,037	0,032
		T2	0,532	0,727	0,688	1,62	2,179	2,188	1,035
		T3	1,792	2,249	2,365	2,277	2,498	2,704	2,992
	Ecc	T1	0,085	0,056	0,038	0,097	0,061	0,032	0,16
		T2	1,95	1,945	2,005	1,247	1,829	1,556	0,553
		T3	2,287	2,366	2,485	1,62	2,262	1,621	2,863
<i>Plantago lanceolata</i>	At	T1	0,048	0,036	0,031	0,037	0,024	0,02	0,035
		T2	1,213	1,417	1,658	1,398	1,427	1,699	0,683
		T3	2,28	2,329	2,211	2,306	2,248	2,12	3,771
	Av	T1	0,059	0,037	0,03	0,065	0,044	0,041	0,019
		T2	0,584	1,149	1,297	0,914	0,411	0,404	0,367
		T3	2,11	2,106	2,295	2,068	2,035	1,89	3,772
	Rs	T1	0,08	0,07	0,052	0,071	0,052	0,04	0,038
		T2	1,871	1,79	1,886	1,846	1,876	1,923	1,953
		T3	2,303	2,408	2,278	2,055	2,016	2,197	2,778
	Xc	T1	0,055	0,064	0,041	0,045	0,038	0,027	0,026
		T2	0,26	0,433	1,084	0,269	0,346	0,848	0,276
		T3	0,476	0,824	1,008	0,477	0,603	1,047	1,238
	Cm	T1	0,09	0,078	0,056	0,084	0,052	0,048	0,018
		T2	0,429	0,507	1,693	1,408	0,881	0,501	1,573
		T3	1,716	2,173	2,315	1,779	1,897	1,86	2,586
	Eam	T1	0,076	0,067	0,042	0,092	0,072	0,036	0,028
		T2	0,509	0,874	0,887	0,518	0,915	1,437	0,288
		T3	1,452	1,9	2,034	1,844	2,014	2,046	2,881
	Ecc	T1	0,063	0,052	0,04	0,06	0,043	0,033	0,03
		T2	0,961	1,011	0,995	1,027	1,659	1,875	1,133
		T3	0,986	1,173	1,449	1,32	1,697	2,137	2,478

**T1** : densité optique avant incubation ; **T2** : densité optique 24h après incubation ; **T3** : densité optique 48h après incubation

## APPENDICE G (3)

Résultats de l'effet antibactérien par la méthode de spectrophotométrie exprimés en densité cellulaire

Extrait	Bactéri e	Densité cellulaire	Dilution						Témoin	
			Pure	½	¼	Pure	½	¼	E.D.S	
			Partie aérienne			Partie souterraine				
<i>Euphorbia helioscopia</i>	At	T1	2,220E+03	8,498E+19	4,416E+16	8,255E+18	3,109E+19	2,999E+57	1,191E+03	
		T2	1,219E+17	1,224E+18	3,507E+31	3,913E+16	2,286E+18	5,990E+19	6,480E+17	
		T3	5,317E+54	6,259E+55	2,228E+55	4,827E+53	1,999E+57	1,200E+51	1,292E+75	
	Av	T1	5,888E+03	1,117E+03	1,935E+02	2,183E+03	1,192E+03	1,684E+02	9,199E+01	
		T2	2,208E+51	8,243E+49	6,002E+49	1,144E+45	2,711E+43	2,207E+49	4,602E+45	
		T3	4,265E+93	7,586E+91	7,882E+86	2,605E+92	9,702E+89	3,342E+84	4,771E+114	
	Rs	T1	5,514E+03	3,762E+03	3,304E+03	4,729E+03	3,256E+03	2,528E+03	2,755E+03	
		T2	3,180E+20	1,138E+20	5,258E+19	1,071E+20	5,361E+20	1,769E+20	3,013E+17	
		T3	2,147E+24	2,079E+25	3,592E+23	4,480E+23	4,471E+23	4,538E+23	5,021E+27	
	Xc	T1	5,676E+04	1,648E+04	1,845E+03	1,319E+04	8,595E+03	2,510E+03	2,150E+03	
		T2	8,780E+11	1,467E+14	3,333E+66	9,731E+12	7,678E+12	8,773E+12	2,287E+12	
		T3	3,585E+23	6,440E+22	2,606E+89	6,990E+24	5,456E+25	2,207E+28	2,096E+57	
	Cm	T1	2,112E+03	6,272E+02	4,592E+02	1,527E+03	5,715E+02	2,263E+02	1,809E+02	
		T2	1,750E+06	1,368E+04	5,916E+28	1,845E+05	1,416E+05	6,412E+04	1,818E+05	
		T3	8,911E+12	1,608E+10	1,0684E+22	2,079E+17	3,532E+17	1,741E+17	1,507E+33	
	Eam	T1	4,203E+02	2,627E+02	8,245E+01	6,255E+02	2,024E+02	1,267E+02	5,709E+01	
		T2	5,646E+06	5,576E+18	1,337E+29	2,739E+06	7,163E+06	5,756E+31	1,655E+06	
		T3	2,638E+37	2,939E+41	3,787E+37	2,636E+36	1,117E+38	2,029E+39	1,314E+50	
	Ecc	T1	1,531E+03	3,489E+02	1,024E+02	5,930E+02	2,173E+02	1,708E+02	1,022E+02	
		T2	1,635E+20	7,725E+41	7,414E+35	3,054E+25	3,192E+24	2,446E+31	9,290E+24	
		T3	2,453E+23	3,482E+44	7,01704E+33	5,431E+25	2,188E+23	2,046E+44	2,534E+41	
	<i>Calendula arvensis</i>	At	T1	5,083E+03	3,372E+03	9,843E+02	2,153E+03	1,422E+03	5,904E+02	1,395E+03
			T2	3,881E+08	2,883E+11	5,916E+13	3,437E+32	1,139E+36	1,207E+39	1,097E+11
			T3	1,261E+37	1,806E+30	2,289E+27	1,329E+40	2,104E+47	9,501E+50	8,149E+52
		Av	T1	2,112E+03	5,763E+02	1,475E+02	5,455E+02	1,616E+02	1,363E+02	7,913E+02
			T2	5,928E+39	1,753E+29	9,344E+49	3,334E+68	5,131E+67	6,457E+71	3,366E+11
			T3	3,927E+48	2,207E+67	9,734E+77	3,333E+88	5,064E+86	7,19686E+87	1,637E+89
Rs		T1	4,384E+03	3,114E+03	2,332E+03	3,743E+03	2,788E+03	2,279E+03	2,755E+03	
		T2	1,162E+21	8,181E+20	2,184E+20	4,272E+20	1,892E+21	1,293E+21	1,302E+20	
		T3	2,141E+23	3,508E+23	4,863E+22	1,294E+25	1,089E+25	3,312E+23	3,070E+25	
Xc		T1	1,165E+04	3,628E+03	1,578E+03	7,491E+03	2,890E+03	1,245E+03	8,510E+02	
		T2	1,100E+14	2,216E+13	3,339E+59	7,584E+70	1,476E+73	1,774E+76	1,048E+14	
		T3	1,465E+49	1,349E+73	1,191E+75	1E+74	3,433E+74	1,145E+86	2,912E+87	
Cm		T1	1,064E+03	2,860E+02	2,235E+02	7,981E+02	3,588E+02	2,167E+02	8,281E+02	
		T2	6,829E+06	1,733E+08	1,764E+37	3,389E+17	2,779E+44	4,273E+43	1,521E+22	
		T3	4,54034E+13	9,428E+17	1,112E+48	1,798E+43	2,5141E+45	8,830E+48	6,753E+58	
Eam		T1	7,603E+02	1,265E+02	1,169E+02	1,726E+02	1,265E+02	8,551E+01	7,533E+01	
		T2	2,145E+09	4,218E+11	5,789E+33	6,517E+36	2,872E+38	4,679E+38	6,111E+15	
		T3	2,344E+34	3,898E+38	2,008E+35	4,5816E+32	8,5547E+33	1,3141E+35	2,018E+40	
Ecc		T1	1,363E+02	8,483E+01	5,054E+01	1,638E+02	7,276E+01	6,059E+01	6,355E+01	
		T2	6,600E+12	8,828E+12	1,486E+13	2,622E+13	3,551E+13	1,078E+14	8,417E+12	
		T3	7,943E+12	2,415E+13	1,478E+14	2,365E+15	3,270E+15	7,595E+14	3,305E+32	

## APPENDICE G (4)

Extrait	Bactérie	Densité cellulaire	Dilution						Témoin	
			Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	E.D.S	
			Partie aérienne			Partie souterraine				
<i>Urtica dioica</i>	At	T1	9,977E+03	3,322E+03	1,418E+03	4,357E+03	1,097E+03	4,819E+02	1,943E+03	
		T2	7,981E+38	2,716E+45	3,940E+45	1,098E+21	2,454E+46	3,699E+50	2,704E+27	
		T3	2,717E+51	9,604E+49	5,557E+60	1,262E+57	1,901E+60	8,373E+59	1,756E+56	
	Av	T1	2,469E+03	5,928E+73	2,927E+02	1,980E+03	5,052E+02	2,051E+02	1,644E+02	
		T2	2,705E+79	3,102E+80	1,178E+79	5,038E+59	6,985E+82	1,070E+80	5,938E+70	
		T3	6,139E+85	1,488E+85	1,768E+87	4,645E+79	3,342E+88	7,363E+85	8,483E+92	
	Rs	T1	1,154E+04	5,543E+03	3,865E+03	5,511E+03	4,168E+03	2,818E+03	3,450E+03	
		T2	1,614E+21	1,944E+23	7,419E+22	7,007E+20	5,348E+21	5,879E+21	4,277E+18	
		T3	2,867E+22	5,557E+23	1,923E+24	8,337E+20	5,598E+22	1,615E+23	1,735E+24	
	Xc	T1	3,718E+04	1,086E+04	3,288E+03	9,396E+04	3,664E+03	1,338E+03	1,395E+03	
		T2	1,257E+44	2,605E+73	1,594E+68	2,026E+09	8,954E+52	2,028E+79	8,510E+53	
		T3	6,440E+90	1,054E+87	1,592E+84	5,936E+29	3,068E+94	1,957E+91	8,483E+107	
	Cm	T1	6,537E+03	1,456E+03	7,799E+02	1,228E+03	6,758E+02	3,159E+02	8,281E+02	
		T2	2,098E+41	8,453E+43	9,664E+43	3,149E+38	8,854E+43	1,228E+46	2,972E+26	
		T3	2,080E+52	1,028E+49	4,419E+49	4,229E+46	3,691E+47	2,736E+51	1,798E+58	
	Eam	T1	8,054E+02	1,645E+02	9,832E+01	1,871E+02	1,061E+02	8,246E+01	6,774E+01	
		T2	2,307E+11	5,840E+13	6,470E+16	1,256E+36	3,726E+39	2,967E+40	2,307E+11	
		T3	7,461E+33	1,932E+42	2,110E+42	6,221E+44	1,511E+46	5,062E+48	1E+52	
	Ecc	T1	1,207E+03	4,834E+02	1,588E+02	3,374E+03	4,181E+02	1,160E+02	8,437E+01	
		T2	8,377E+39	1,725E+40	1,518E+40	3,811E+27	3,631E+37	7,878E+31	1,270E+12	
		T3	3,638E+53	6,193E+51	3,814E+51	1,223E+33	7,495E+47	1,958E+33	3,162E+56	
	<i>Plantago lanceolata</i>	At	T1	3,135E+03	1,697E+03	1,292E+03	1,786E+03	9,183E+02	7,232E+02	1,585E+03
			T2	2,346E+29	8,149E+33	1,817E+39	3,082E+33	1,359E+34	1,532E+40	6,473E+39
			T3	1,206E+53	1,480E+54	3,656E+51	4,563E+53	2,346E+52	3,415E+49	1,668E+86
Av		T1	4,395E+03	7,194E+02	4,046E+02	7,194E+03	1,315E+03	9,727E+02	1,570E+02	
		T2	2,541E+22	3,724E+42	7,396E+47	1,510E+34	1,683E+16	8,954E+15	2,183E+50	
		T3	7,603E+76	5,781E+76	3,251E+83	2,472E+75	1,637E+74	1,086E+69	1,778E+136	
Rs		T1	7,997E+03	6,441E+03	4,472E+03	6,509E+03	4,530E+03	3,579E+03	3,355E+03	
		T2	1,583E+19	3,194E+18	2,112E+19	9,551E+18	1,735E+19	4,404E+19	7,819E+19	
		T3	7,743E+22	6,154E+23	4,765E+22	5,917E+20	2,710E+20	9,677E+21	8,886E+26	
Xc		T1	2,667E+04	1,025E+05	8,189E+03	1,164E+04	6,854E+03	2,536E+03	2,150E+03	
		T2	4,775E+11	7,396E+17	1,279E+41	1,000E+12	5,470E+14	4,775E+32	9,204E+47	
		T3	2,472E+19	6,457E+31	2,4709E+38	2,685E+19	8,492E+23	6,1054E+39	4,047E+46	
Cm		T1	4,492E+03	2,839E+03	1,091E+03	3,297E+03	8,311E+02	7,960E+02	1,829E+02	
		T2	1,337E+10	4,227E+11	2,188E+34	7,816E+28	6,180E+18	3,296E+11	1,091E+32	
		T3	6,124E+34	3,483E+43	1,858E+46	9,863E+35	1,799E+38	3,467E+37	2,844E+51	
Eam		T1	3,829E+02	2,647E+02	1,035E+02	1,027E+03	3,397E+02	8,127E+01	5,709E+01	
		T2	8,337E+09	1,279E+16	2,070E+16	1,183E+10	6,180E+16	4,467E+25	1,288E+23	
		T3	7,816E+25	3,141E+33	5,715E+35	3,532E+32	2,618E+35	9,247E+35	1,314E+50	
Ecc		T1	4,628E+02	2,832E+02	1,721E+02	4,243E+02	1,864E+02	1,257E+02	1,022E+02	
		T2	8,260E+19	7,780E+20	3,776E+20	1,556E+21	2,218E+33	3,206E+37	1,663E+23	
		T3	2,535E+20	9,863E+23	2,000E+29	6,622E+26	1,194E+34	3,451E+42	1,247E+49	

## APPENDICE H(1)

Tests du pouvoir antifongique de l'extrait d'*Euphorbia helioscopia* avec les dix souches fongiques

Extrait		Dilution						Témoin
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
Champignon		Partie aérienne			Partie souterraine			
Aa	D (mm)	50,33	52,67	52,67	65	64,33	64,67	74,67
	P%	32,59	29,46	29,46	12,95	13,84	13,39	100
Ac	D (mm)	63	64,67	64,33	60,67	60,33	60	78,33
	P%	19,57	17,45	17,87	22,55	22,98	23,4	100
Af	D (mm)	28,67	31,33	35	31,33	32,33	34	79,33
	P%	63,87	60,5	55,88	60,5	59,24	57,14	100
Fo	D (mm)	34	38	40,33	36	37,67	39,67	75,33
	P%	54,87	49,56	46,46	52,21	50	47,35	100
Fs	D (mm)	40,33	42	43,33	41,33	42,67	45,33	75
	P%	46,22	44	42,22	44,89	43,11	39,56	100
Rs	D (mm)	54,33	56	52	51,67	54,67	55,67	71,67
	P%	24,19	21,86	27,44	27,91	23,72	22,33	100
Pc	D (mm)	38,67	44,33	46	36	42,33	45,33	76,33
	P%	49,34	41,92	39,74	52,84	44,54	40,61	100
Pae	D (mm)	52,33	55,33	57	49,33	52,33	55	72,67
	P%	27,98	23,85	21,56	32,11	27,98	24,31	100
Pv	D (mm)	72,67	73,67	73,67	69,67	71	72	78,67
	P%	7,63	6,36	6,36	11,44	9,75	8,47	100
Ggt	D (mm)	39,33	40	39,33	38,33	40	38,67	68,67
	P%	42,72	41,75	42,72	44,17	41,75	43,69	100

*Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium solani* (Fs), *Alternaria alternata* (Aa), *Alternaria chlamydosporia* (Ac), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Gaeumannomyces graminis var tritici* (Ggt), *Aspergillus fumigatus*(Af), *Phomopsis vaccinii* (Pv)

## APPENDICE H (2)

Pouvoir antifongique de l'extrait de *Plantago lanceolata* sur les dix souches fongiques

Extrait		Dilution						Témoin
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
Champignon		Partie aérienne			Partie souterraine			
Aa	D (mm)	50	48,33	49,33	45,33	47,67	50,67	74,67
	P%	33,04	35,27	33,93	39,29	36,16	32,14	100
Ac	D (mm)	60	61,33	60	57,67	60,33	59,33	78,33
	P%	23,4	21,7	23,4	26,38	22,98	24,26	100
Af	D (mm)	29,33	35	39	34,33	39	42,33	79,33
	P%	63,03	55,88	50,84	56,72	50,84	46,64	100
Fo	D (mm)	36	43,33	45,67	35,67	36,67	38,33	75,33
	P%	52,21	42,48	39,38	52,65	51,33	49,12	100
Fs	D (mm)	40	42,33	45	40,33	42,67	44,33	75
	P%	46,67	43,56	40	46,22	43,11	40,89	100
Rs	D (mm)	58,33	59,33	59,33	60	60	61	71,67
	P%	18,6	17,21	17,21	16,28	16,28	14,88	100
Pc	D (mm)	35	36,67	41	37	41,33	44	76,33
	P%	54,15	51,97	46,29	51,53	45,85	42,36	100
Pae	D (mm)	54	56,67	57	60,33	60	59,67	72,67
	P%	25,69	22,02	21,56	16,97	17,43	17,89	100
Pv	D (mm)	54,67	55,33	54,33	54,33	55	57,67	78,67
	P%	30,51	29,66	30,93	30,93	30,08	26,69	100
Ggt	D (mm)	44,33	43,33	45,33	44,33	46	46,67	68,67
	P%	35,44	36,89	33,98	35,44	33,01	32,04	100

## APPENDICE H (3)

Tests du pouvoir antifongique de l'extrait *Raphanus raphanistrum* sur les dix souches fongiques

Extrait Champignon		Dilution						Témoïn
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
		Partie aérienne			Partie souterraine			
Aa	D (mm)	50,67	55,33	57,67	45	47	49,67	74,67
	P%	32,14	25,89	22,77	39,73	37,05	33,48	100
Ac	D (mm)	54,33	57,33	59,67	55	57	60	78,33
	P%	30,64	26,81	23,83	29,79	27,23	23,4	100
Af	D (mm)	32	39,67	40	37,67	40,33	39,33	79,33
	P%	59,66	50	49,58	52,52	49,16	50,42	100
Fo	D (mm)	29,67	34,67	36,67	34,67	37,67	40	75,33
	P%	60,62	53,98	51,33	53,98	50	46,9	100
Fs	D (mm)	32,33	34,67	38,67	38,33	37	38,33	75
	P%	56,89	53,78	48,44	48,89	50,67	48,89	100
Rs	D (mm)	55	56,67	58,33	58	58,33	60,67	71,67
	P%	23,26	20,93	18,6	19,07	18,6	15,35	100
Pc	D (mm)	29,33	33,67	39,33	33,67	37,33	41	76,33
	P%	61,57	55,9	48,47	55,9	51,09	46,29	100
Pae	D (mm)	53,67	56,67	59,33	54,33	54,67	55	72,67
	P%	26,15	22,02	18,35	25,23	24,77	24,31	100
Pv	D (mm)	53,67	56,33	55,67	56,33	56	54,33	78,67
	P%	31,78	28,39	29,24	28,39	28,81	30,93	100
Ggt	D (mm)	38,33	42	44,67	41	44	46,67	68,67
	P%	44,17	38,83	34,95	40,29	35,92	32,04	100

## APPENDICE H (4)

Tests du pouvoir antifongique de l'extrait d'*Urtica dioica* sur les dix souches fongiques

Extrait		Dilution						Témoïn
		Pure	1/2	1/4	Pure	1/2	1/4	
		Partie aérienne			Partie souterraine			
Champignon								
Aa	D (mm)	55	52,33	47,67	61	56,67	48,33	74,67
	P%	26,34	29,91	36,16	18,3	24,11	35,27	100
Ac	D (mm)	61	62	63	57,33	60,33	59,67	78,33
	P%	22,13	20,85	19,57	26,81	22,98	23,83	100
Af	D (mm)	55	53,67	53,33	59,67	57,33	54	79,33
	P%	30,67	32,35	32,77	24,79	27,73	31,93	100
Fo	D (mm)	42	45,67	46	50	51,33	54,67	75,33
	P%	44,25	39,38	38,94	33,63	31,86	27,43	100
Fs	D (mm)	38,67	40,33	42	40	41,33	41,67	75
	P%	48,44	46,22	44	46,67	44,89	44,44	100
Rs	D (mm)	65,67	68,33	64,67	65,67	65	65,67	71,67
	P%	8,37	4,65	9,77	8,37	9,3	8,37	100
Pc	D (mm)	41	41,33	44,33	38,67	42,33	46	76,33
	P%	46,29	45,85	41,92	49,34	44,54	39,74	100
Pae	D (mm)	52,33	51	49,33	49,67	48	51	72,67
	P%	27,98	29,82	32,11	31,65	33,94	29,82	100
Pv	D (mm)	66,33	66,67	69	66,33	68,67	67,33	78,67
	P%	15,68	15,25	12,29	15,68	12,71	14,41	100
Ggt	D (mm)	40	43	44	45	43,33	43,67	68,67
	P%	41,75	37,38	35,92	34,47	36,89	36,41	100



APPENDICE I

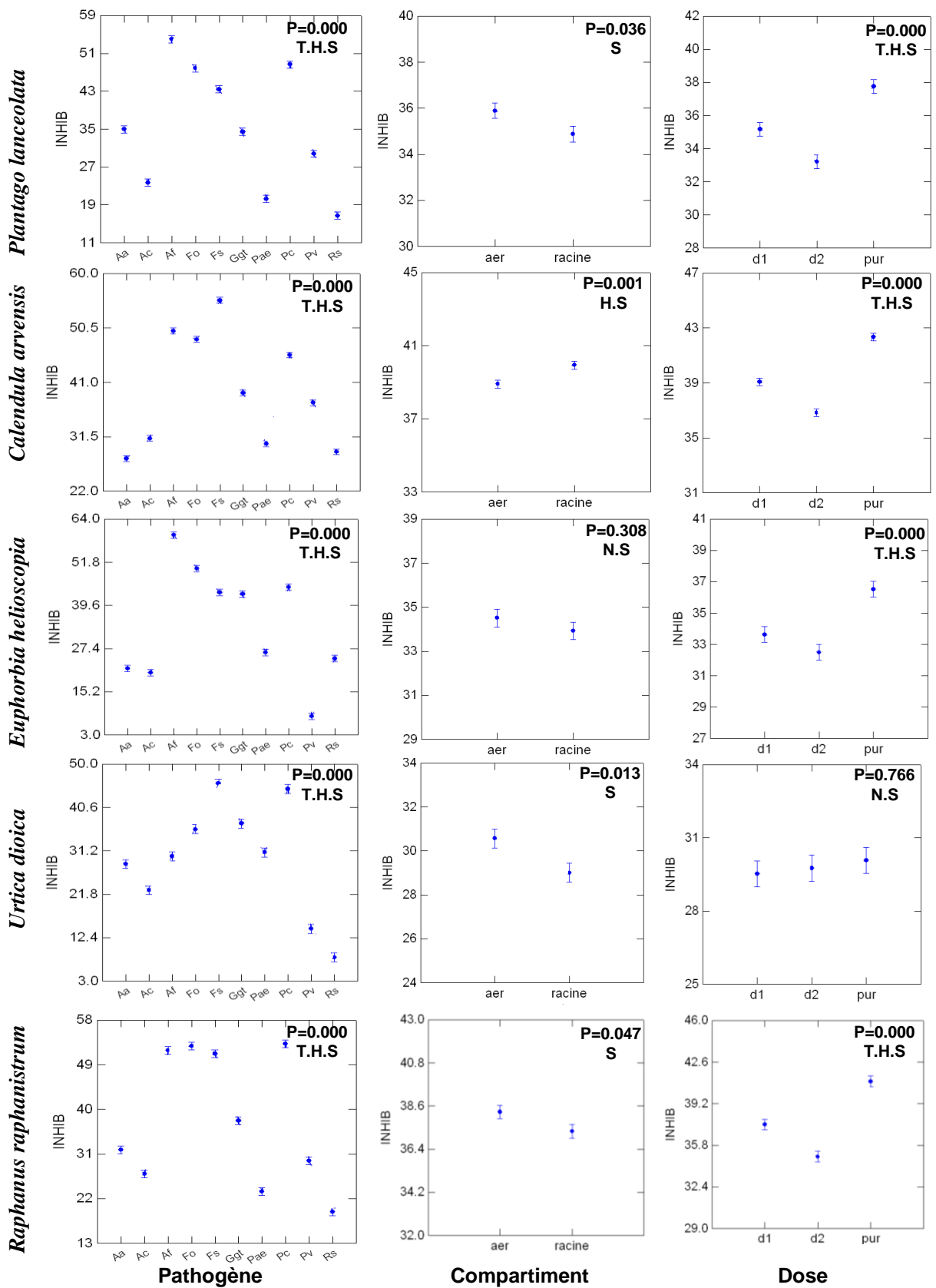


Figure M. effet antifongique de chaque espèce spontanée sur les champignons phytopathogènes testés

## APPENDICE J

**Tableau N.** Inhibition de la sporulation de *Fusarium oxysporum* par l'extrait de *Raphanus raphanistrum*.

Numéro de cadrant	Nombre de conidies pour le champignon traité	Nombre de conidies pour le témoin
C1	220	288
C2	199	263
C3	198	296
C4	270	287
C5	264	260
C6	190	253
C7	285	257
C8	230	260
C9	247	250
Moyenne	233,67	268,22
Nombre de conidies/ml	$2,33 \cdot 10^7$	$2,68 \cdot 10^7$
<b>%de sporulation</b>	<b>12,88</b>	<b>100</b>

## REFERENCES

1. **SPICHIGER R.E., SAVOLAINEN V., VINCENT MURIELLE F.,JEANMONOD D.,2004-** Systematic botany of flowering plants: a new phylogenetic approach to angiosperms of the temperate and tropical regions.2ed. 413 p
2. **BONNEMAIN J-L., CHOLLET J-F., 2003.** Biologie et pathologie végétales. L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales. *C. R. Biologies* 326 : 1–7.
3. **BOUZIANI M., 2007-** L'usage immodéré des pesticides : de graves conséquences sanitaire-Epidemiologiste, Faculté de médecine d'Oran.
4. **REGNAULT-ROGER C., 2002-** De nouveaux phytoinsecticides pour le troisième millénaire ? In : Biopesticides d'origine végétales, ed Tec & doc. Londres-Paris-New York . p. 19-39.
5. **PHILOGENE B.J-R., FABRES G ., REGNAULT-ROGER C.,2005-** Protection des cultures, environnement et développement durable :Enjeux pour le XXI<sup>e</sup> siècle. In Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 1-14.
6. **GIROUX S., CÔTÉ J.C., VINCENT C., MARTEL P., CODERRE D., 1994-** Bacteriological insecticide M-One effects on the mortality and the predation efficiency of adult spotted lady beetle *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 39-43.
7. **ROGER C., VINCENT C., CODERRE D., 1995-** Mortality and predation efficiency of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidae) following application of Neem extracts (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). *J. Appl. Entomol.* 119, 439-443.
8. **JONES OT., 1998-** The commercial exploitation of semiochemicals and others plants derived pest management chemicals. *Pestic Sci*, 54: 293-296.
9. **BAILEY K.L., MUPONDWA E.K., 2006-** Developing microbial weed control products: commercialization, biological, and technological considerations. In: H.P. Singh, D.R. Batish and R.K. Kohli, Editors, *Handbook of Sustainable Weed Management*, The Haworth Press Inc., Binghamton, NY, USA, pp. 431–473.
10. **PANNETON B., VINCENT C., FLEURAT-LESSARD F.,2000-** Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 in C. Vincent, B. Panneton et F.

Fleurat-Lessard (Eds.) La lutte physique en phytoprotection, INRA Editions, Paris, 347 p.

11. **FABRE R., ET DILLEMAN G., 1971-** Histoire de la pharmacie. Presses Universitaires de France, Paris.

12. **NOSTRO A., GERMANÒ M. P., D'ANGELO V., MARINO A. ET CANNATELLI M.A., 2000-** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée*. 30 (5), p379.

13. **CORBAZ R., 1990-** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-1015 Lausanne, ISBN 2-88074-201-3, 286 pp.

14. **BEALE J., BROWN W., CLINE M., COOK J., DESJARDINS A., FLETCHER J., LEACH J., LÉVESQUE A., MADDEN L., AND SCHAAD N. 2002-** Crop biosecurity and countering agricultural bioterrorism: Responses of The American Phytopathological Society. *APSnet* Feature. Published online by The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

15. **YOUNG J. M., ALLEN C., COUTINHO T., DENNY T., ELPHINSTONE J., FEGAN M., GILLINGS M., GOTTWALD T. R., GRAHAM J. H., IACOBELLIS N. S., JANSE J. D., JACQUES M.-A., LOPEZ M. M., MORRIS C. E., PARKINSON N., PRIOR P., PRUVOST O., RODRIGUES NETO J., SCORTICHINI M., TAKIKAWA Y., AND UPPER C. D. 2008-** Plant-Pathogenic Bacteria as Biological Weapons – Real Threats? The American Phytopathological Society. Vol. 98, No. 10, 2008, PP :1060-1065.

16. **PAULIN J-P., RIDE M., AND PRUNIER J-P., 2001-** Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques Discovery of plant pathogenic bacteria: dispute and controversy between America and Europe. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. Volume 324, Issue 10, October 2001, Pages 905-914.

17. **AGRIOS GN., 2005-** Plant pathology. 5ed. Elsevier Academic Press, 922p.

18. **LEPOIVRE P., 2003-** Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. les presses agronomiques de Gembloux. De Boek ed 1, Bruxelles, 427p.

19. **TOTH IK., BELL KS., HOLEVA MC., BIRCH PRJ., 2003-** Soft-rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathology* 4: 17-30.

20. **STACK TP., MOUNT MS., BERMAN PM., HUBBARD JP., 1980-** pectin enzyme complex from *Erwinia carotovora*. A model for degradation and assimilation of host pectic functions. *Phytopathology*. 70:267-272.
21. **HÉLIAS V., 2008-** "*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie." *Cahiers Agricultures* 14(4): 349-354. <http://dx.doi.org/doi:10.1684/agr.2008.0216>.
22. **MOMOL MT., ALDWINCKLE HS., 2000-** Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J.L, (ed.). *Fire Blight, The Disease and its Causative Agent Erwinia amylovora*, pp. 55-72. CABI Publishing, Wallingford, UK.
23. **VAN DER ZWET T., KEIL H.L., 1979-** Fire blight, a bacterial disease of rosaceous plants. United State Department of Agriculture Handbook No. 510. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
24. **ROBERTS RG., HALE CN., VAN DER ZWET T., MILLER CE & REDLIN SC., 1998-** the potential for spread of *Erwinia amylovora* via commercial apple fruit : a critical review and risk assessment. *Crop Protection* 17:18-25.
25. **VENISSE J.-S., MALNOY M., FAIZE M., PAULIN J.-P., AND BRISSET MN. 2002-** Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 15:1204-1212.
26. **LINDGREN PB., 1997-** The role of *hrp* genes during plant– bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol* 35.pp.129–152.
27. **OEPP/EPPO, 1977-** Data sheets on quarantine organisms No. 1, *Xanthomonas citri*. *Bulletin OEPP/EPPO* 9 (2).
28. **PRUVOST O., 2004-** Analyse du Risque Phytosanitaire (ARP). AGR-b1 : *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*, PP : 1-32.
29. **SERIZAWA, S., AND INOUE, K. 1975-** Studies on citrus canker. III. The influence of wind on infection. *Bull. Shizuoka Citrus Exp. Sta.* 11:54-67
30. **VERNIERE C., PRUVOST O., COUTEAU A., AND LUISETTI J. 1992-** Données sur la biologie et l'épidémiologie de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes - exemple de l'île de la Réunion. *Fruits* 47:164-168.
31. **SEMAL J., 1993-** *Traité de pathologie végétale*. faculté des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique. 621p.

32. **COCHET N., AND WIDEHEM P., 2000-** Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. Rev Applied Microbiology and Biotechnology. Département Génie Biologique. Compiègne, France. Vol 54, Number 2. 153-161.
33. **WEI W., PLOVANICH-JONES A., DENG W. L., JIN Q. L., COLLMER A., HUANG H. C., AND HE S. Y., 2000-** The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:2247-2252.
34. **SCHELL M.A., 2000-** Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory array. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: pp.263–92.
35. **OEPP/EPPO, 1978-** Data sheet on quarantine organisms no. 58. *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 8 (2).
36. **HAYWARD A.C. 1991-** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29.pp.65-87.
37. **OEPP/EPPO, 1982-** Data sheets on quarantine organisms No. 50, *Corynebacterium michiganense*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 12 (1).
38. **LEYNS F.; DE CLEENE M. 1983-** Histopathology of the bacteriosis caused by inoculation of *Corynebacterium michiganense* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato stems. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 48 (3), 663-670.
39. **MARTE, M. 1980-** Histological and histochemical observations on tomato stems naturally infected by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathologische Zeitschrift* 97, 252-271.
40. **MIURA L.; ROMEIRO R. DA S., GOMES J.C. 1986-** Production, purification and biological activity of an exotoxin produced *in vitro* by *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. *Fitopatologia Brasileira* 11, 789-794.
41. **ALFANO JR., COLLMER A.,1996-** Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, Ithaca, New York vol 8:1683-1698.
42. **BRISBANE P.G., AND KERR A., 1983-** Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 348-351.
43. **ESCOBAR M.A. AND DANDEKAR A.M. 2003-** *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *TRENDS in Plant Sci.* 8: 380-386.

44. **LA BARRE M., 2006-** Les hémoglobines tronquées d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval. Québec.23p
45. **BURR T.J., BAZZI C., SÜLE S., AND OTTEN L. 1998-** Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*. **82**: pp.1288-1297.
46. **BOUCHER C., GENIN S., ARLAT M., 2001-** Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries Phytopathogènes. Inra–CNRS, BP 27, 31326 Castanet Tolosan cedex, France. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 324 (2001) 915–922.
47. **MATHYSSE A. G., AND MCMAHAN S., 1998-** Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in cell, attB, attD, and attR mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 2341-2345.
48. **AGRIOS GN., 1997-** Plant pathology. 4th ed. San Diego, California: Academic Press. 635 p.
49. **DANGL JL., AND JONES JD., 2001-** Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
50. **DIXON RA.,2001-** Natural produces and plant disease resistance .*Nature* 411,843-847.
51. **GLAZEBROOK J., 2001** g-enes controlling expression of defense responses in Arabidopsis -2001 Status, *Curr, Opin, Plant Biol.*4:301-308.
52. **PIGNOCCHI C., AND FOYER CH., 2003-** Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr, Opin, Plant Biol* .6:379-389.
53. **SANDKVIST M., 2001-** Type II Secretion and Pathogenesis. *American Society for Microbiology*. 69(6): 3523–3535. Holland Laboratory, Department of Biochemistry, American Red Cross, 15601 Crabbs Branch Way, Rockville, MD 20855. Phone: (301) 738-0604. Fax: (301) 738-0794. E-mail: sandkvis@usa.redcross.org
54. **BURNS D L., 1999-** Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol.* 2 :25–29.
55. **CORNELIS GR., VAN GIJSEGEM F., 2000-** Assembly and function of type iii secretory systems. *Annu Rev Microbiol.*; 54 :735–774.
56. **JACOB-DUBUISSON F, KEHOE B, WILLERY E, REVENEAU N, LOCHT C, RELMAN D A., 2000-** Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica*

filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology*; 146 :1211–1221.

57. **PRESTON GM., STUDHOLME DJ., CALDELARI I., 2005-** Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 29 . UK. 331–360

58. **PUKATZKI S., MCAULEY S B., AND MIYATA S T., 2009-** The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin in Microbiol*, 12:11–17

59. **KIPNIS, E., SAWA, T., WIENER-KRONISH, J. 2006.** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*, 36, 78-91.

60. **VON BODMAN S B., BAUER W D., AND COPLIN D L., 2003-** quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:455–82

61. **MILLER MB., BASSLER BL., 2001-** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165–199.

62. **LEIGH J.A., COPLIN D.L., 1992-** Exopolysaccharides in plant bacterial interactions, *Ann, Rev. Microbiol.* 46 307–346

63. **DENNY T.P., AND BAEK, S., 1991-** Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *MOI. Plant-Microbe Interact.* 4, 198-206.

64. **DENNY TP., 1995-** Involvement of bacterial exopolysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:173–97.

65. **PIRHONEN M., ET AL., 1993-** A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12,2467–2476.

66. **BARBER CE., TANG JL., FENG JX., PAN MQ., WILSON TJ., ET AL., 1997-** A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24:555–66

67. **CHUN W., CUI J., POPLAWSKY AR., 1997-** Purification, characterization and biological role of a pheromone produced by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:1–14

68. **FLAVIER AB., CLOUGH SJ., SCHELL MA., DENNY TP., 1997-** Identification of 3- hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 26:251–59



69. **VAN LAREBEKE N., ENGLER G., HOLSTERS M., VAN DEN ELSACKER S., ZAENEN I., SCHILPERRORT R.A., SCHELL J., 1974-** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for Crown Gall-inducing ability. *Nature* 252:169-170.
70. **PORTIER P., 2004-** Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non-pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium* spp. L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1. THESE. DE DOCTORAT. Laboratoire d'Écologie Microbienne - Université Claude Bernard - UMR CNRS 5557 – USC INRA 1193 Bat. Gregor Mendel - 43, Bd du 11 Novembre 1918 - 69622 Villeurbanne Cedex. 123p.
71. **DESSAUX, Y., PETIT, A., AND TEMPE, J. 1992-** in : *Molecular Signals in Plant Microbe Communications* (Verma, D.P.S. ed.) pp 109-136. CRC Press, Boca Raton.
72. **WEI, Z.M., SNEATH, B.J., AND BEER, S.V., 1992-** Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* **174**: 1875-1882.
73. **ARLAT M., VAN GIJSEGEM F., HUET JC., PERNOLLET JC., BOUCHER CA., 1994-** PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Embo J* 13: 543-553.
74. **HOGENHOUT S A., AND LORIA R., 2008-** Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic Bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11:449-456
75. **JAHN H., DREIER D., MELETZUS D., BAHRO R., EICHENLAUB R., 2000-** The endobeta- 1,4 glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, 13:703-714.
76. **ELMHIRST J., 2007-** Profile des Cultures au Champs. P 15.
77. **SALLOUK N-E., 2008-** Agadir - Lutte contre les bactéries phytopathogènes transmissibles par les semences et les plants. Maroc.
78. **NESMES X., BENEDRA T., ET COLLIN E., 1990-** Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula*. L. x *P. alba*. L. en pépinière forestière. *Agronomie* 10: 581-588.

79. **RAIO A., ZOINA A., MOORE LW., 1998-** Loss of *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing plasmid in solarized soil. IOBC Bull. 21: pp. 301-305.
80. **BOIRON P., 2005-** Mycologie. these. Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée aux Biotechnologies Industrielles.
81. **BOUCHET PH., GUIGNARD JL., VILLARD J., 1999-** les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed Masson : Paris. 194p.
82. **ROBERT D., CATESSON A.M., 2000 -** Organisation végétative. vol. 2 .356 p
83. **SABBAGH SK., 2008-** Adaptation à la pénétration racinaire de deux Ustilaginaceae parasites du maïs : *Ustilago maydis* et *Sporisorium reilianum* – Analyse microscopique et transcriptomique . *T h e s e* Doc. L'UNIVERSITE TOULOUSE III.
84. **DICKINSON M., 2003-** Molecular Plant Pathology. *School of Biosciences, University of Nottingham, Nottingham, UK* ed, 273p.
85. **DEISINGH ., NICHOLS RO. LN., HAUGM ., HOWARRD. J., MENEENK. 1992-** Adhesion pad formation and the involvement of cutinases and esterases in the attachment of urediniospores to the host cuticle. *The Plant Cell* 4:1101 -1111.
86. **EMMET R. M., PARBERY D.G., 1975-** Appressoria. *Annu. Rev. phytopathol.* 13: 1 147-167.
87. **HGCH HC., STMS RC., WHITEHEBA D C OMEAUJ , WOLFE. D., 1987-** Signaling for growth orientation and cell differentiation in Uromyces. *Science* **235**: 1665-1669-21
88. **HOCHH . C., STAPLES R . C. 1991.** Signaling for infection structure formation in fungi. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals.* Editors, COLE G. T., and HGCH H. C. New-York : Plenum Press, 25-46.
89. **LEE Y.-H., DEAN R. A. 1993-** cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **5**: 693-700.
90. **ANONYME, 2007-** List of diseases and pests. Economic Commission for Europe. ECE/TRADE/C/WP.7/2007/3. 12p.
91. **WALTOJN D ., PANACCIONE D. G. 1993-** Host-selective toxins and disease specificity: perspectives and progress. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31 : 275-299.
92. **DE WIT P.J.G.M., 1992-** Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence gene in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 391 -418.

93. **OSBOURN A E., 1994.** 7th International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, Edinburgh, U. K. . .
94. **HAWKSWORTH DL., KIRK PM., SUTTON BC., AND PEGLER DN., 2001-** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. International Mycological Institute, Surrey, England, Wallingford, Oxon, UK.
95. **HIBBETT DS, BINDER M, BISCHOFF JF, BLACKWELL M, CANNON PF, ERIKSSON OE, HUHNDORF S, JAMES T, KIRK PM, LUCKING R, THORSTEN LUMBSCH H, LUTZONI F, MATHENY PB, MCLAUGHLIN DJ, POWELL MJ, REDHEAD S, SCHOCH CL, SPATAFORA JW, STALPERS JA, VILGALYS R, et al. 2007-** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111:509-547.
96. **GUPTA G.P., 2004-** Textbook of plant disease, plant pathology. Discovery Publishing House, pp : 39-45.
97. **SAMBAMURTY A.V.S.S., 2006-** A textbook of plant pathology. I. K. International Pvt Ltd, p-p : 114-115.
98. **JONES J.B., JONES J.P., STALL R.E., ZITTER T.A., 1991-** compendium of tomato diseases. isbn 0-89054-120-5. APS PRESS.100 p.
99. **ARORA DK., BRIDGE PD.,BHATNAGAR D., 2004-** Fungal biotechnology in agricultural, food 1316 and environmental applications. Marcel Dekker,.
100. **SARNIGUET A., LUCAS P., LUCAS M., SAMSON R. 1992-** Soil conduciveness to take-all of wheat: Influence of the nitrogen fertilizers on the structure of populations of fluorescent pseudomonads, *Plant Soil* 145; 29-36p.
101. **LACROIX M .,2002-** maladies des céréales et de la luzerne. *Diagnostic, Dépistage, Prévention*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection. Club des sols du Témiscouata .25p
102. **MASSON E., 2009-** Piétin échaudage . *Institut du végétal ,ARVALIS*. 1p
103. **HELLER W E., 2009-** *Rhizoctonia solani* (Kühn), cause de pourritures racinaires sur de nombreuses cultures, Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 8820 Wädenswil Herausgeber: Extension Gemüsebau, 3p
104. **MILHOLLAND R.D., 1982-** Blueberry twig blight caused by *Phomopsis vaccinii*. *Plant Disease* 66, 1034-1036.
105. **WILCOX, M.S., 1939-** Phomopsis twig blight of blueberry. *Phytopathology* **29**, 136-142.

106. **DAYKIN, M.E., MILHOLLAND, R.D., 1990-** Histopathology of blueberry twig blight caused by *Phomopsis vaccinii*. *Phytopathology* **80**, 736-740.
107. **LEMAY A. V., 2000-** Twig Blight of Blueberry. North Carolina State University
108. **DE HOOG GS., GUARRO JGENÉ J., FIGUERAS MJ.,2000-** Atlas Of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> Edn.Utrecht :Centraalbureau voor schimmelcultures.
109. **FARR D.F., BILLS G.F., CHAMURIS G.P., ROSSMAN A.Y., 1989-** Fungi on Plant and Plant Products in the United States. APS Press, St. Paul. MN, USA.
110. **EL-MORSY E.M., SERAG M.S., ZAHRAN J.A.T., RASHED I.G., 2000-** The occurrence of microfungi in the ectorrhizosphere-rhizoplane zone of some selected macrophytes from the Nile Delta of Egypt. Bulletin of the Faculty of Science, Assiut University 2 (2-D): 15-26.
111. **BASHAN Y., LEVANONY H., OR R.,1991-** Wind Dispersal of *Alternaria alternata*, a Cause of Leaf Blight of Cotton. J. Phytopathology 133, 225-238
112. **CHASE A. R., 1998-** *Alternaria* diseases of ornamentals. Western farm service.leaders in horticulture volume 1, issue 3.4p.
113. **EL-MORSY E.M., DOHLOB S.M. AND HYDE K.D., 2006-** Diversity of *Alternaria alternata* a common destructive pathogen of *Eichhornia crassipes* in Egypt and its potential use in biological control. Fungal Diversity 23: 139-158.
114. **TORRES HA., RAAD II., KONTOYIANNIS DP., 2003-** Infections caused by *Fusarium* species. J Chemother ;15(Suppl 2):28–35.
115. **ROSSO, L. C., CIANCIO, A. AND FINETTI-SIALER, M. 2007-** Application of molecular methods for detection of *Pochonia chlamydosporia* from soil. Nematropica 37:1-8.
116. **VIAENE N. M. M., AND G. S. ABAWI., 2000-** *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. Journal of Nematology 32:85-100.
117. **ANSART A, CANARD A, CHARRIER M, CLUZEAU D, CORTESERO AM, DOURLOT S, FRANCEZ A-J, GERARD C, GUEGUEN A, KRESPI L, LE GARFF B, MADEC L, NENON J-P, POINSOT D, RENAULT D, RUSSO J ET SCHRICKE M-T.2004-** bases systematiques et organisation du vivant.les Métazoaires.Université Rennes1.UE Bio 102.60p.
118. **Maggenti A. R., 1991-** Nemata: higher classification. In "Manual of agricultural nematology" (Nickle W. R., Ed), Dekker, New York, pp. 147-187.

119. **NOIR S., 2002-** Diversité des gènes de résistance au sein du génome des caféiers (*Coffea* L.) Analyse génétique de la résistance au nématode à galles, *Meloidogyne exigua* chez *C. arabica*. UNIVERSITE MONTPELLIER II.
120. **REGNAULT-ROGER C., PHILOGÈNE B.JR., VINCENT C., 2002-** Biopesticides d'origine végétale. Paris. 336p.
121. **DIJIAN-CAPRORALINO C., BOURDY G, CARYOL JC., 2002-** Plantes nématicides et plantes résistantes aux nématodes. *In*. Regnault-Roger, C, Philogene, B.J.R., Vincent C 2002. .Biopesticides d'origine végétale. Tec & Doc, Paris, p :187-242.
122. **PROT, J. C., 1984-** Introduction aux nématodes phytoparasites des cultures maraichères. USAID, Dakar 28 p
123. **SIJMONS P. C., ATKINSON H. J., ET WYSS U., 1994-** Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Ann Rev Phytopathol* 32: 235-259
124. **WHITEHEAD AD., 1998-** .plant Nematode Control. Wallingford: CAB International.384p.
125. **GUY B., 2005-** Les nématodes, ces anguillules qui font suer les plantes.par la racine » Phytoprotection, vol. 86, n° 1, p. 65-69.
126. **TAYLOR, A.L., SASSER J.N., 1978-** *Biology, identification and control of root knot nematode (Meloidogyne spp.)*. North California State University graphs, Raleigh, N.C. 111 pp.
127. **DE GUIRAN G., 1983-** Nématodes, les ennemis invisibles. La Littorale S.A. (Ed.), France, 41pp.
128. **NEAL, J.C.,1889-** *The Root-knot Disease of the Peach, Orange and Other Plants in Florida, Due to the Work of Anguillula*. Bulletin 20, Division of Entomology, US Department of Agriculture.
129. **CHITWOOD BG.,1949-** Root knot nematodes-Part 1.A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887.Proceeding of Helminthological Society of Washington 16, 90-104.
130. **DECKER H., 1972-** Phytonematologie (Biologie und Bekämpfung Pflanzenparasitärer Nematoden ( In Russian, Moskva, Kolos,)).

131. **CHEN. Z. X., CHEN. S. Y., DICKSON. D W., 2004-** Nematology: advances and perspectives, Volume 1. Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University press. 4p.
132. **REDDY P., 1983-** plant Nematology. Ed. Agri. Publ. Acad., New-Delhi, p: 287.
133. **JACOB J. J., & MIDDEPIAATS W. C. T., 1988-** Fascicule de détermination des principaux nématodes phytonarases au stéréoscope. Cours de nématologie. TSPV2. DFPV/AGRHYMET/CILSS (Niamey).
134. **MATEILLE.T, 1996-** Initiation à la nématologie : application aux cultures maraichères. département de formation en protection des végétaux, Niamey BP 12625 – Niger. 52p.
135. **TYLER J., 1938-** Proceedings of the root-knot conferences held at Atlanta. Plant Disease Reporter Supplement 109: 133-151.
136. **DE GUIRAN G., NETSCHER C., 1970–** les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites des cultures tropicales., Cah. ORSTOM, sér. Biol., n°11, pp. 152 – 181.
137. **EISENBACK, J.D., HIRSCHMANN H., 1991-** Root knot nematodes: *Meloidogyne* species and 24 races. In: Nickle, W. R. (Ed.). Manual of agricultural nematology, New York, NY, USA, Marcel Dekker, 191-274
138. **HUSSEY & JANSSE N., 2002-** In: CAB International. Plant Resistance to Parasitic Nematodes (eds J. L. Starr, R. Cook and J. Bridge).
139. **CARNEIRO R. M. D. G., LMEIDA M. R. A. A., 2000-** Quénéhervé. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* Spp. populations. Nematology, **2(6)**, , 645-654.
140. **DE GUIRAN G., et VILLEMINE M. A., 1980–** Spécificité de la diapause embryonnaire des œufs de *Meloidogyne* (Nematoda) Rev. Nematol. Vol. 3, (1), pp. 115 – 121.
141. **ABAD.P, GOUZY.J , AURY. J-M, CASTAGNONE-SERENO.P , DANCHIN. E.G.J, DELEURY.E, PERFUS-BARBEOCH.L., 2008-** « *Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode : Meloidogyne incognita* ». *Nature Biotechnology*, vol. 26, pp. 909-915.
142. **GUILLOU M., 2009-** rapport d'activité 2008. **alimentation, agriculture, environnement**. Recherches génériques. INRA - 147 rue de l'Université - 75338 Paris Cedex 07.p-28.

143. **PERRY, R MOENSM., STARR J L., 2009-** Root Knot Nematodes. 480 p.
144. **DIRK DE WAELE ET ROMULO G. DAVIDE., 1998-** nématodes à galle des bananiers et plantains. Parasites et ravageurs des *Musa* : fiche technique n° 3. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Parc Scientifique Agropolis II, 34397 Montpellier Cedex 5, France.4p
145. **PROT, J. C., 1975-** Recherche concernant le déplacement des juvéniles de *Meloidogyne* spp. vers les racines. Cahier ORSTOM, Serie biologique, 10 : 351 p.
146. **WYSS U., GRUNDLER F. M. W., ET MÜNCH A.,1992-** The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38: 98-111.
147. **DJIAN-CAPORALINO C., VEDIE.H., ARRUFAT.A.,2009-** *PHYTOMA*. Gestion des nématodes a galles : lutte conventionnelle et luttés alternatives. L'atout des plantes pièges. INRA UMR Interactions Biotiques et Santé Végétale (IBSV) INRA / UNSA / CNRS 400, Route des Chappes, Les Templiers, BP 167, F-06903 Sophia Antipolis Cedex.18p
148. **NIEBEL, A., GHEYSEN, G., AND VAN MONTAGU, M.,1994-** Plant-cyst nematode and plant-root-knot nematode interactions. *Parasitol. Today* 10, 424-430.
149. **ESMENJAUD,D., 1986-** Les nématodes de la vigne. *Phytoma* 374:24-27.
150. **LOWENBERG J. R., SULLIVAN T., ET SCHUSTER M. L., 1960-** Gall induction by *Meloidogyne incognita* by surface feeding and factors affecting the behaviour pattern of the second-stage larvae. *Phytopathology* 50: 322-333.
151. **BLOK V.C., JONES J.T., PHILLIPS M.S., TRUDGILL D.L., 2008-** Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 30 (3): 249-59.
152. **VIAENE.N.,2008-** Les nématodes à galles (ou cécidogènes) *Meloidogyne chitwoodii* M. fallaxorganismes de quarantaine dans l'UE 2p.
153. **CAUBEL G, RITTER M, RIVOAL R.,1972-** Observations relatives à l'attaque du nématode *Meloidogyne naasi* Franklin sur céréales et graminées fourragères dans l'Ouest de la France en 1970. *CR Acad Agric Fr*, 351-356
154. **GOORIS J, D'HERDE CJ.,1977-** Study on the biology of *Meloidogyne naasi* Franklin 1965, Publication of the Station of Nematology Research, Merelbeke, Belgium 165 pp.

155. **York PA., 1980-** Relationship between cereal root-knot nematode *Meloidogyne naasi* and growth and grain yield of spring barley. *Nematologica* 26, 220-229
156. **ALLEN MW, HART WH, BAGHOTT KV., 1970-** Crop rotation controls barley root-knot nematode at Tulelake. *Calif Agric* 24, 4-5.
157. **SASSER, J.N., HARTMEN, K.M. AND FRECKMAN, D.W., 1987.** Summary of Preliminary Crop Germplasm Evaluation for Resistance to Root-Knot Nematodes, pp. 1–88. Raleigh, NC: North Carolina State. University and US Agency for International Development.
158. **FELDMESSER J., 1971-** Estimated crop losses from plant-parasitic nematodes in the United States. *Soc. Nematol. (USA) Special Publication*, No. 1.
159. **SELLAMI S., LOUNICI M., EDDOUD., ET BENSEGHIR H., 1999-**Distribution et plantes hôtes associées aux *Meloidogyne* sous abri plastique en Algérie. *Nematol. Medit.* 27, 295-301.
160. **IGHILI H., 1986-** Inventaire des nématodes phytophages sur cultures maraîchères et sur palmier dattier dans la région de Ouargla. Thèse Ing. Agro. I.N.A. El Harrach ,52p.
- 161 **MOKABLI A., 1988 -** Principaux facteurs qui déterminent l'importance et l'agrisivité des *Meloidogyne* sous abris serres en Algérie. Thèse Mag. Agro. Inst. Nat. Agro. El Harrach, 69p.
162. **SMAHA D., 1991 -** Essai de mise au point d'une méthode de lutte intégrée contre les *Meloidogyne* (Nematoda, *Meloidogynidae*) sous serres dans l'Algerois. Thèse Ing. A gro. INA, Alger, p:65
163. **NEBIH HADJ- SADOK D., 2000 -** Etude de la bio écologie *des Meloidogyne spp* dans quelques régions du littorale Algérien. Thèse Mag., Biol. animal, U.S.T.H.B., Alger, 176p.
164. **MATEILLE T, SCHWEY D ET AMAZOUZ S. 2005.** *La Défense des Végétaux* PHYTOMA N°584. végétaux du soleil p:40-43.
165. **VINCENT C., PANNETON B., 2001-** Les méthodes de lutte physiques comme alternatives aux pesticides. *VertigO- la revue en sciences de l'environnement*, Vol 2, N° 2, Octobre 2001. 24p.
166. **PANNETON, B., C. VINCENT ET F. FLEURAT-LESSARD .,2000-** Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 *in* C. Vincent, B. Panneton et F.



Fleurat-Lessard (Eds.) La lutte physique en phytoprotection, INRA Editions, Paris, 347 p.

167. **BAUDOIN.J.P, DEMOL.J, LOUANT B.P, MARECHAT.R, MERGEAI.G, OTOUL. E.,2002-** Amelioration des plantes.Application aux principales especes cultivées en regions tropicales.les presses agronomiques de Gembloux.Belgique. 581p.

168. **BRUST, G., D.S. EGEL ET E.T. MAYNARD., 2003-** Organic vegetable production. Purdue University Cooperative Extension Service, ID-316. p. 1-19.

169. **DEGUINE.J-P, FERRON.P,2005-** Gestion agroécologique des populations d'insectes piqueurs suceurs en culture cotonnière. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 367-384.

170. **RAO, N.K.,HANSON, J.,DULLOO, M.E.,GHOSH,K, NOWELL, D. LARINDE,M. 2006-** Manuel de manipulation des semences dans les banques de genes. No. 8.ed. Bioversity International. Via dei Tre Denari 472/a 00057 Maccarese Rome, Italie.166p.

171. **OEPP/EPPO , 2009-** EPPO Standards. EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests , European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 1/2(18) English.

172. **OEPP/EPPO , 2008-** EPPO Standards. EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests, European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 1/2(17) English.

173. **OEPP/EPPO. 2006-** Certification à l'exportation et vérification de conformité à l'importation pour les tubercules de pommes de terre. PM 3/70 (1).Bulletin **36**, 1-4.

174. **EZZAHIRI B, M , BOUHACHE, M. MIHI ET I.ERRAKI.,2004-**Index phytosanitaire du Maroc.ed. 2004.AMPP.257p.

175. **KLOPMEYER M., 2002-** Geranium Industry-USDA Meeting, April 2. Riverdale, MD.

176. **LEMAY,A. , REDLIN,S., FOWLER G., DIRANI M. 2003-** Pest Data Sheet *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2.USDA/APHIS/PPQ. Center for Plant Health Science and Technology. Plant Epidemiology and Risk Analysis Laboratory Raleigh, NC. 9p.

177. **PALTI J., 1981-** Cultural practices and infectious crop diseases. Springer-Verlag, Berlin.

178. **MAZOYER M., AUBINEAU M., 2002** - *Larousse agricole*. Paris, Larousse, 767 p.
179. **RAIO A., ZOINA A., MOORE L.W.,1997**- The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathol.* 46:320-328.
180. **PIERRARD G., 1993**- Les méthodes alternatives à la lutte contre les ennemis des cultures. Communication présentée au séminaire national sur l'impact de l'utilisation des pesticides sur l'environnement et la santé humaine : cas du Niger. Niamey, 21-25 juin 1993.
181. **N'DEYE, N., 1995**- Caractérisation des peuplements nématologiques dans les systèmes de culture à jachères au sud du bassin arachidier du Sénégal. Communication présentée à l'atelier du Gis- Linné , tenu le 4 mai 1995 à Thiès au Sénégal.
182. **JACKAI, L.E.N. and ADALLA, C.B., 1997**- Pest management practices in cowpea : a review. Pp. 240-258 in SING, B.B., D.R. MOHAN RAJ, K.E. DASHIELL, and L.E.N. JACKAI (eds). *Advances in cowpea research*. IITA/JIRCAS. IITA, Ibadan, Nigeria.
183. **NDIAYE, M ET DABO,M., 2007**- guide pratique de lutte contre les mouches des fruits dans les vergers de mangue au Senegal. *1ere éd.* International Resources Group.Senegal.26p.
184. **LAGUË C, GILL J, PÉLOQUIN G. 2001**.thermal control in plant protection.*In* Vincent C, PannetonB, Fleurat-Lessard F. physical control methods in plant protection, Springer 35-61.
185. **PELLETIER Y, MCLEOD CD, BERNARD G.,1995**- description of sublethal injuries caused to the Colorado Potato Beetle by propane flamer treatment. *J. Econ. Entomol*, 88,1203-1205.
186. **MORELLE B., 1993**- Le désherbage thermique et ses applications en agriculture et en horticulture.*In*.JM Thomas(ed). *Proceeding of the fourth IFOAM*. International conference,p :109-115.
187. **FERGEDAL S.,1993**- weed control by freezing with liquid nitrogen and carbon dioxide snow : A comparison between flaming and freezing. *In*.JM Thomas(ed). *Proceeding of the fourth IFOAM*. International conference,p :153-156.
188. **MAISONNEUVE, J-C, RAT-MORRIS.E, JOHNSON, S.2005**- Différents aspects de la protection biologique intégrée sous serre en France .*In* Regnault-

Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris, p607-621.

189. **PARTHASARATHY, V.A.,2008-** Organic Spices. New India Publishing.ed. 740 p

190. **STAPLETON, J.J., DEVAY, J.E. 1982-** Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 323-326

191. **FLEURAT LESSARD, F., 2005-** Bases écophysiologicals de la lutte physique contre les insectes. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 787-804.

192. **SHIOMI T., 1992-** Black rot of cabbage seeds and its disinfection under a hot air treatment. *Japan Agricultural Research Quarterly* **26**,pp.13–8.

193. **DHANVANTARI, B.N., BROWN, R.J. 1993-** Improved seed treatments for the control of bacterial canker of tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 201–5.

194. **JANSE, J. D., ET WENNEKER, M. 2002-** Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or-treated planting material. BReview. *Section Bacteriology, Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, the Netherlands. Plant Pathology* (2002) 51 , pp.523–536.

195 **Philippe Ryckewaert et Frédéric Fabre.2001.** Lutte intégrée contre les ravageurs des cultures maraîchères à la Réunion.. **CIRAD-3P, Saint Pierre,La Réunion.pp ;99-103**

196. REGNAULT-ROGER, C. 2005a- Molécules allélochimique et extraits végétaux : Quelles perspectives en phytoprotection ? *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 651-662.

197. **PHILOGENE, B.J-R , FABRES , G, REGNAULT-ROGER, C.2005-** Protection des cultures, environnement et développement durable :Enjeux pour le XXI<sup>e</sup> siècle. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 1-14.

198. **ELLIS S.D. , BOEHM M.J., AND COPLIN D.2008** - Bacterial Diseases of Plants. Agriculture and Natural Resources PP401.06 Department of Plant Pathology. The Ohio State University.
199. **SCHORI A ET MASCHER F.2007-** Essais sur blés modifiés pour une tolérance accrue aux maladies foliaires. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW.16p
200. **PEGARD A., BRIZZARD G., FAZARI A., SOUCAZE O., ABAD P., DJIAN-CAPORALINO C., 2005-** Histological Characterization of Resistance to Different Root-knot Nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum* L. *Phytopathology* 95 (2): 158-165.
201. **DJIAN-CAPORALINO C., BOURDY G. ET CAYROL J.C., 2008-** Plantes nématicides et plantes résistantes aux nématodes, p. 125-185. In: Biopesticides d'origine végétale : potentialités phytosanitaires. C. Regnault-Roger et al, Editions Tec & doc, Lavoisier, Paris, 546 pp.
202. **RIOUX S, VOLDENG.H. 1999.** Des plantes transgéniques résistantes aux maladies.No 99.01 Québec inc., St-Hyacinthe.9p.
203. **PAL, K. K. AND B. MCSPADDEN GARDENER, 2006-** Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
204. **HAGGAG WM., MOHAMED H A-L A., 2007-** Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. Egypt. *World J.Agric.Sci.*3(6):711-776.
205. **FRAVEL, D. R., 2005-** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*43 :337-359.
206. **SARAVANAKUMAR, D., VIJAYAKUMAR, C., KUMAR, N. AND SAMIYAPPAN, R., 2007-** PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* **26**(4):556-565.
207. **SILVA G, H., COSTA J.N , CAMPOS V.P, OLINIERA D.F., PFENNING L.H,2001-** Fungal metabolites wilt-activity against nematodes.Bioactive Fungal Metabolites. Impact and Exploitation, Internationala symposium.Br. Mycolog.Soc., Wales Swansea, UK, pp:95.
208. **ARMSTRONG, G.M., ARMSTRONG, J.K. 1981-** "Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases", in: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. (Eds.) *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA, 391-399.

209. **BENCHABANE, M., 2005-** “Caractérisation des effets d’antagonisme Microbienne et De promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents”, Thèse Doctorat d’état, FSB-UTHB, Alger, 235p.
210. **PENYALVER, R., B. VICEDO AND M.M. LOPEZ, 2000-** Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *European J. Plant Pathol.*, 106: 801-810.
211. **ALABOUVETTE, C, OLIVAIN. C, STEINBERG, C.2005-** Maitrise des communautés microbiennes pour lutter contre les maladies d’origine tellurique. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l’agriculture et l’environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 571-588.
212. **BOUZAR, H., DAOUZLI, N., KRIMI, Z., ALIM, A., AND KHEMICI, E. 1991-** Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie* 11: 901-908.
213. **KERR A. , TATE M.E., 1984.** Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiological Sciences*1:1-4
214. **MILAIRE H G.1987-** Les méthodes alternatives en protection des cultures cas des ravageurs phytophages. Cercles des Naturalistes de Belgique, extrait *Érable* 4/1987, p : 5 -13
215. **FARGUES.J , BOURGUET.D.2005-** La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures :Contraintes, bilan et perspectives. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l’agriculture et l’environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris,p 549-570.
216. **RANASINGH NIRAKAR, 2007-** Biopesticides: an Economic Approach for Pest Management. Orissa Review. April 2007. Plant Protection, KVK, Rayagada, Gunupur.
217. **ROYAL J., 2000-**. Utilisation des substances sémi chimique en agriculture- Master 2ERE
218. **STREBLER G., 1989-** Les médiateurs chimiques. Leur incidence sur la bioécologie des animaux. Lavoisier Tec & Doc.
219. **HOWSE PE, STEVENS IDR & JONES OT .1998-** Insect Pheromones and their Use in Pest Management. Chapman & Hall, London/ New York.

220. **AUGER J , THIBOUT E, 2002-** substances soufrées des Allium et des Crucifères et leurs potentialités phytosanitaires. *In* Regnault-Roger, C, Philogène , B J.R , Vincent C .Biopesticides d'origine végétale . Tec & Doc, Paris, p 77-96.
221. **BENAYAD N., 2008-** Les huiles essentielles extraites des Plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair Département de Chimie Faculté des Sciences de Rabat.Maroc.61p.
222. **MARION-POLL, F., DINAN, L., LAFONT, R., 2002-** La place des phytoecdystéroïdes dans la lutte contre les insectes phytophages. Biopesticides d'origine végétale. Regnault-Roger, C., Philogène, B. et Vincent, C. Paris, Editions Tech & Doc: 97-114.
223. **DINAN, L., SAVCHENKO, T., WHITING, P. 2001-** On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(8): 1121-32.
224. **BLACKFORD, M.J.P., DINAN, L., 1997-** The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Insect Physiology* 43, 315–327.
225. **DINAN, L., 2001-** Phytoecdysteroids: biological aspects. Review. Department of Biological Sciences, University of Exeter, Hatherly Laboratories, Prince of Wales Road, Exeter, Devon, EX4 4PS, UK. *Phytochemistry* 57 (2001) 325–339.
226. **DINAN, L., 1989-** Ecdysteroid structure and hormonal activity. In: Koolman, J. (Ed.), *Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 345–354.
227. **MONDY, N., CAI'SSA, C., PITOIZET, N., DELBECQUE, J.-P., CORIO-COSTET, M.-F., 1997-** Effects of the ingestion of *Serratula tinctoria* extracts, a plant containing phytoecdysteroids, on the development of the vineyard pest *Lobesia botrana* (Lepidoptera. Tortricidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35, 227–235.
228. **CABIDOUCHE Y-M. BENOÎT M, BLANCHART É, FOURNET J, LHOSTE P, GAUTRONNEAU Y, LANGLAIS C, TAUPIER-LETAGE B, TORIBIO A.2005-** Faisabilité technique de l'agriculture biologique en Martinique : aspects généraux. IRD éd, p 81-148

229. **GRAINGE M. AND AHMED S. 1988-** Handbook of Plants with Pest-control Properties, Wiley-Interscience, New York
230. **ISMAN MB., 2002-** problèmes et perspectives de commercialisation des insecticides d'origine botanique. *In*. **Regnault-Roger, C, Philogène , B J.R , Vincent C 2002.** Biopesticides d'origine végétale . Tec & Doc, Paris, p :301-312.
231. **CASIDA, J. E., G. B. QUISTAD, eds. 1995-** Pyrethrum Flowers—Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. Oxford University Press, Oxford.
- 232 **SINGH E, AHYI MRA, AKE-ASSI L, ELEWUDE JA, FADOJU SO, GBILE ZO, GOUDOLE E, JOHNSON CLA, KEITA A, MORAKINYO O, OJEWOLE JAO, OLATUNJI AO, SOFOWORA EA., 1980-** Contribution to ethnobotanical floristic studies in Western Nig. Pub. Organization of African Unity: Lagos, Nigeria p.420.
233. **REGNAULT-ROGER, 2005b-** molécules allelochimiques et extraits végétaux dans la protection des plantes : nature, rôle et bilan de leur utilisation au XX<sup>e</sup> siècle. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp 625-650.
234. **AVATO P., ARGENTIERI M. P., DE MASTRO G. 2008-** Combined methods for the analysis of total content of glucosinolates in some brassica oilseeds. Italy. P87
235. **BELLOSTAS N., SØRENSEN J. C., SØRENSEN H. 2008-** Glucosinolates qualitative and quantitative evaluation of cruciferous plants during their life cycles. Chemistry Department, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C, Denmark.
236. **MORRA M. J., 2008-** Controlling soil-borne plant pests using glucosinolate-containing tissues, p 7.
237. **BLAZ'EVIC', I. RADONIC', A. MASTELIC', ZEKIC', M. SKOC'IBUŠIC', M. MARAVIC', A., 2010-** Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). Food Chemistry 121. Croatia, p 1020–1028
238. **BERNARDI R., MARI M., LEONI O., CASALINI L., CINTI S., PALMIERI S. 2008-** Biofumigation for controlling post-harvest fruit pathogens. Italy.

239. **WMO, 1965-** Scientific assessment of ozone depletion: World Metrological Organisation global ozone research and monitoring project. Report No. 37, WMO, Geneva, Switzerland.
240. **SOEJARTO, D., FARNSWORTH, N.R., 1989-** Tropical rainforsts: potential sources of new drugs. *Perspectives in Biology and Medicine* 32, 244-258.
241. **BALICK, M.J;, ELISABETSKY, E., LAIRD, S.A., 1995-** Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press: New York.
242. **REGNAULT-ROGER C. PHILOGENE B.J.R., FABRES G., 2005-** Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Lavoisier Tec and Doc, Paris. p: 1013.
243. **QUEZEL P ET SANTA S 1963-** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales : tome I.PARIS. 558 P.
244. **BETANEUR-GALVIS, L.A., G. E. MORALES, J.E FERERO AND J. ROLDAN, 2002-** Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97: 541-546.
245. **KHAN, M.T.H., A. ATHER, K. D. THOMPSON and R. GAMBARI, 2005-** Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.*, 67: 107- 119.
246. **PRODAN I. ,1953.** *Euphorbia* L. În *Flora R. P. Române*, 2, Ed. Acad. R. P. R., București, pp. 296-367.
247. **BANI S, KAUL A, JAGGI BS, SURI KA, SURI OP AND SHARMA OP ,.2000.** Anti-inflammatory activity of the hydrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. *Fitoterapia* 71(6): 655-662.
248. **TONA L, KAMBU, NGIMBI N, MEISA K, PENGE O, LUSAKIBANZA M, CIMANGA K, DE BRUYNE T, APERS S, TOTTÉ J, PIETERS L AND VLIETINCK A ,.2000-** Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*, 7: 31-38.
249. **BRUNETON J., 1999-** Pharmacognosie et phytochimie-plantes médicinales .Ed Lavoisier, Paris.



250. **BOCK B., 2009-** Tela Botanica. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France par Benoît Bock BDNFF v4.02. <http://www.tela-botanica.org>
251. **ATTARD E. AND CUSCHIERI A., 2009-** *In vitro* immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. *Full Length Research Paper*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(6), pp. 457-461
252. **PIERONI A, GIUSTI AM, MÜNZ H, LENZARINI C, TURKOVI\_ G, TURKOVI\_ A.,2003-** Ethnobotanical knowledge of the Istro-Romanians of Žejane in Croatia. *Fitoterapia* 75: 710-719.
253. **VAJS V, TRIFUNOVI\_ S, JANA\_KOVI\_ PT, SOKOVI\_ M, MILOSAVLJEVI\_ S, TEŠEVI\_ V .2004-** Antifungal activity of davanone-type sesquiterpenes from *Artemisia lobelli* var. *conescens*. *J. Serb. Chem. Soc.* 69: 969-972.
254. **LI R.W., MYERS S.P., LEACH D.N., LIN G.D. AND LEACH G.,2003-** A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants, *Journal of Ethnopharmacology* **85**, pp. 25–32
255. **LEE H.J., HYUN E.A., YOON W.J., KIM B.H., RHEE M.H., KANG H.K., CHO J.Y. AND YOO E.S., 2006-** *In vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts, *Journal of Ethnopharmacology* **103**, pp. 208–216..
256. **DJELLOUT H., 2009-** Evaluation du pouvoir antibactérien de quatre plantes spontanées. *thes ing phytopathol* . Univ Blida. 60 p .
257. **DE SOUZA, C.,KOU MAGLO, K.,GBEASSOR, M., 1995-** Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales. UNIVERSITE DU BENIN, LOME – TOG .Pharm. Méd. tra. afro, pp 103-112 O.
258. **KOCH, A. L., 1981-** Growth measurement. In. Gerhardt, P. et *al.*, eds. *Manual of Methods for General Bacteriology*. A.Z. M., pp 179-207
259. **NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS), 2003-** Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests, Approves Standards, 8 . Ed., M2- A8, Wayne, p A.
260. **MIMICA-DUKIĆ, N.; BOŽIN, B.; SOKOVIĆ, M.; SIMIN, N. 2004-** Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2485-2489.

261. **PAREKH J, NAIR R, CHANDA S. 2005.** Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. *Indian J Pharmacol* 37: 408-409.
262. **HINDLER, J., 1995-** Special Antimicrobial Susceptibility Tests. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, (Ed. Connie C. Mahon), George Manuvelis, 89-96.
263. **ALI H. ,. KO'NIG G.M , KHALID S.A. WRIGHT, A.D. , KAMINSKY.R. 2002.** Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 83 219-228.
264. **DEVIEENNE KARINA F. ET RADDI MARIA STELLA G. 2002-** Screening for Antimicrobial Activity of Natural Products Using a Microplate Photometer. *Braz. J. Microbiol.* 33 (2). São Paulo.
265. **MENDOZA L., TAPIA L., WILKENS M. ET URZUA A. 2002-** Antibacterial Activity of 13-Epi- Sclareol, Alabdane Type Diterpene Isolated from *Pseudognaphalium heterotrichium* and *P. Cheiranthifolium* (Asteraceae). *Bol.Soc.Chil.Quím.* 47 (2), 91-98.
266. **ATWAL R., 2003-** In vitro Antimicrobial Activity Assessment of Zymox Otic Solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Int. J. Res. Veterinary Medicine.* Rancho Dominguez. California
267. **MUHANNAD J., FRANZ H., FURKERTB, MILLER W., 2002-** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 115–123.
268. **MOHY ELDIN. M.S ,. SOLIMAN E.A., HASHEM A.I., TAMER T.M. 2008-** Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified with New Technique. *Trends Biomater. Artif. Organs, Vol 22(3), pp 125-137*
269. **SELMAOUI K., DOUIRA A., 1999-** Microsclerotia in *Alternaria alternata*. *Phytopathol. Médit.*, 38(1), 43-46.
270. **MAOUNI A., LAMARTI A., DOUIRA A., BADO A., 2001-** Effet des dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 140(1-4), 79-88.
271. **SIDDIQUI, Z.A., MAHMOOD, I., 1995-** Role of plant symbionts in nematode management: a review. *Bioresour. Technol.* 54 (3), 217–226.
272. **CAYROL J.C. et al., 1992** – la lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. *Labo. de Biol. des Invert. INRA*, pp. 1 – 15.
273. **JOHNSTON, A., BOOTH C. 1983-** *Plant Pathologist's Pocket Book.* Eds.CMI

274. **SATRANI B., GHANMI M., FARAH A., AAFI A., FOUGRACH H., BOUKHRISS B., BOUSTA D., TALBI M., 2007-** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146 : 85-96.
275. **CHUTIA M., DEKA BHUYAN P., PATHAK M.G., SARMA T.C., BORUAH P., 2009-** Antifungal ion of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT- Food Science and Technology, 42 : 777-780.
276. **SHARMA N., TRIPATHI A., 2006-** Fungitoxicity of the essential oil of *Cinensis citrus* on post-harvest pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(6) : 587-593.
277. **BAJPAI V.K., RAHMAN A., AHMED Y., KANG S.G., 2007-** Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Industrial Crops and Products 26 : 28–35.
278. **AL-REZA S.M., RAHMAN A., AHMED Y., KANG S.G., 2010-** Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology 96 : 86–92.
279. **INOUE S., UCHIDA K., MARUYAMA N., YAMAGUCHI H., ABE S., 2006-** A novel method to estimate the contribution of the vapour activity of the essential oil in agar diffusion assay. Jpn. J. Med. Mycol, '47 : 91-98.
280. **PANDEY D.K., TRIPATHI N.N., TRIPATHI R.D., DIXIT S.N., 1982-** Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. (Compositae). Angerwandte Botanik, 56 : 256-257.
281. **MAHANTA J.J., CHUTIA M., BORDOLOI M., ADHIKARY R.K., PATHAK M.G., SARMA T.C., 2007-** *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. Spawns. Flavour and Fragrance Journal, 22 : 525-530.
282. **BAHOUS M., OUAZZANI TOUHAMI A., BADO C A., DOUIRA A, 2006-** Persistance d'action et effet translaminaire de l'azoxystrobine sur les feuilles de riz. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 145 : 19-30.
283. **ATTRASSI K., BENKIRANE R., ATTRASSI B., BADO C A., DOUIRA A., 2007-** Efficacité de deux fongicides Benzimidazolés et de l'Anilinopyrimidine sur la

pourriture des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146 :195-210.

284. **LEROUX P., CREDET A., 1978-** Document sur l'étude de l'activité des fongicides. - INRA, Versailles, France.

285. **AMER-ZAREEN M, JAVED Z, JAVED N. 2003-** Nematicidal activity of ginger and its effect on the efficacy of *Pasteuria penetrans* for the control of Root knot nematodes on tomato, Asian Journal of plant Sci 2(11): 858-860.

286. **AGBENIN N. O, EMECHEBE MARLEY A. M, P. S., AKPA A. D., 2005- Evaluation of Nematicidal Action of Some Botanicals on *Meloidogyne incognita* In Vivo and In Vitro.** Journ of Agri and Rural Development in the Tropics and Subtropics, Volume 106, No.1, 2005, pages 29–39

287. **COX CL J., LAMBERT B. MCCARTY,\* JOE E. TOLER, STEPHEN A. LEWIS, AND S. BRUCE MARTIN. 2006-** Suppressing Sting Nematodes with Brassica sp., Poinsettia, and Spotted Spurge Extracts

288. **JOURAND, P., S. RAPIOR, M. FARGETTE AND T. MATEILLE. 2004 -** Nematostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. *Nemat.*, 6(5): 765-771.

289. **FINNEY, D. J., ED., 1952-** Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press.

290 **HAMMER O., HARPER D.A.T., et RYAN P. D., 2001-** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

291. **PHILIPPEAU, G., 1986-** Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. I.T.C.F., Paris, 63 pp.

292. **SAĞDIÇ O., 2003-** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss.U.-Technol.*36:467-473.

293. **HADDOUCHI F., BENMANSOUR A., 2008-** huiles essentielles, utilisations et activités biologiques.Application à deux plates aromatiques.article de synthese, Université de Tlemcen.les techniques de laboratoire N°8.8p

294. **YAKHLEF G., 2010-** Etude de l'activité biologiques de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*. Thes mag. Univ Batna. 110P.

295. **STAVRIANAKOU S., LIAKOPOULOS G. & KARABOURNIOTIS G., 2005-** Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of

phenolics of *Dittrichia viscosa* (*Asteraceae*). *Environmental and Experimental Botany* (Elsevier). p : 293-300.

296. **ELEGAMI A.A., EL-NIMA E.I., EL TOHAMI M.S. ET MUDDATHIR A.K.-2002-** Antibacterial activity of some species of family Combretaceae. *Phytotherapy Research*; 16 : 555-61.

297. **MUSTER D., LOTFI BEN SLAMA, 2004-** Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes Publié par Elsevier Masson, 2004 ISBN 2842995651, 9782842995652, 290 pages.

298. **BEN MOHAMED L., A. JELASSI, I. HASSEN, 2008-** Total phenolics, Flavonoids and antioxidant activity in stems and flowers of *Euphorbia helioscopia* L. Yasmine Hammamet, 21-24 Décembre 2008. 15èmes Journées Nationales de Chimie, Organisées par la Société Chimique de Tunisie.

299. **AL-YOUNIS N K.. ABDULLAH AF., 2009-** isolation and antibacterial evaluation of plant extracts from some medicinal plants in kurdistan region. the 2nd Kurdistan Conference on Biological Sciences J. Duhok Univ. Vol.12, No.1 (Special Issue),, Pp 250-255,

300. **KINGHORN AD AND EVANS FJ-1975-** A biological screen of selected species of the genus *Euphorbia* for skin irritant effects. *Planta Medica.*, **28**: 325-

301. **SEMPLE SJ, REYNOLDS GD, O'LEARY MC, FLOWER RL, 1998.** Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.*, 60(2): 163-172.

302. **TANAKA, T., K. KASUBUCHI, S. KITA, H. TOKUDA, H. NISHINO AND S. MATSUNAGA , 2000-** Bioactive Steroids from the Whole Herb of *Euphorbia chamaesyce*. *J. Nat. Prod.*, 63: 99-103.

303. **MADUREIRA, A.M., J. R. ASCENSO, L. VALDEIRA, A. DUARTE, J. P. FRADE, G. FREITAS AND M.J.U. FERREIRA, 2003-** Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Nat. Prod. Res.*, 17: 375-380.

304. **WU TS, LIN YM, HARUNA M, PAN DJ, SHINGU T, CHEN YP, HSU HY, NAKANO T AND LEE KH.1991-** Antitumor agents, 119. Kansuiphorins A and B, two novel antileukemic diterpene esters *Euphorbia kansui*. *J. Nat. Prod.*, **54**(3): 823-829.

305. **PANDA H., 2004-** Hand book of *Medicina herb* with uses. P.512.

306. **FONS F., RAPIOR S., GARGADENNEC A., ANDRY C. AND BESSIÈRE J.M., 1998-** Volatile components of *Plantago lanceolata* (*Plantaginaceae*), *Acta Bot. Gall.* 145 (1998) 265-269.
307. **PIETTA P, BRUNO AMP, RAVA A.** Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr* 1992; 593:165-170.
308. **AHMED AA, JAKUPOVIC J, MABRY TJ., 1993-** Sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J Nat Prod*; 56:1821-4.
309. **VIDAL-OLLIVIER, E., DIAZ-LANZA, A. M., BALANSARD, G., MAILLARD, C., VAILLANT, J. 1990-** Determination of saponins of *Calendula officinalis* L. in relation to cultivar and harvesting date. *Pharm. Acta Helv.*, 65, 236-238
310. **KEMPER KATHI J., MD, MPH. 1999-** *Calendula* (*Calendula officinalis*). Longwood Herbal Task Force.13p.
311. **MENDEL, F., HENIKA, P. R., MANDRELL, R. E. 2002-** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prod.*, 65, 1545-1560
312. **EKOUMOU, C., 2003-** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie; Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, FMPOS, Université de Bamako, Mali; 2003.
- 313 **SIMON, J.E., A.F. CHADWICK and L.E. CRAKER. 1984-** Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, 770 pp.,Hamden, CT.
314. **SHARIFA A.A., NEOH Y.L., ISWADI M.I., KHAIRUL O., ABDUL HALIM M., JAMALUDIN M., MOHAMED AZMAN A.B AND H.L. HING.2008-** Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago major* on Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Vol 8, Malaysia.*3p
315. **KELMANSON GE, JÄGER AK, VAN STADEN J., 2000-** Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 241-246
316. **MASSIKA PJ, AFOLAYAN AJ., 2002-** Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock diseases in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 129-134

317. **PAREKH J, CHANDA, S. 2006-** .In-vitro antimicrobial activities of extracts of *launaea procumbens* roxb. (labiateae), *vitis vinifera* l. (vitaceae) and *cyperus rotundus* l. (cyperaceae). *Afr J Biomed Res*;9:89-93.
318. **SCHERRER R, GERHARDT P., 1971.** Molecular sieving by the *Bacillum megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology* **107**, 718-735
319. **HARAGUCHI H., TANIMOTO K., TAMURA Y., MIZUTANI K., KINOSHITA T. 1998-** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*.48:125-129.
320. **VELDHUIZEN, E.J., J.L. TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, C. ZWEIJTZER, S.A. BURT AND H.P. HAAGSMAN, 2006-** Structural requirements for the *Antimicrobial activity* of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 1874-1879.
321. **OUSSALAH M., S. CAILLET, L. SAUCIER and M. LACROIX. 2007-** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420.
322. **WENNEKER, M., VERDEL, M. S. W., GROENEVELD, R. M. W., KEMPENAAR, C., VAN BEUNINGEN, A. R., AND JANES, J. D. 1999.** *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105:307-315.
323. **GÜLÇİN Đ., UĞUZ M. T., OKTAY M., BEYDEMİR Ş. ET KÜFREVIÖĞLU Ö. Đ. 2004-** Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric*. 28, 25-33.
324. **JAUZEIN P., 1995-** Flore des champs cultivés. INRA. P : 238.
- 325 **Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talatay P., 2001.** The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56 : 5-51.
326. **IAUK L, LO BUE AM, MILAZZO I, RAPISARDA A, BLANDINO G., 2003-** Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytotherapy Res*; 17: 599-604
327. **TARLE D, DVORZAK I. 1990-** Antimicrobial substances in Flos Calendulae. *Farm Vestn (Ljubljana)* 1989; 40:117–120, zit. nach: CA (1990) 112:42317v cited in Blaschek W et al (2006)

328. **MARCIANO P., ODORIZZI S., MALAGUTI L., LAZZERI L., 2005-** Effect of volatiles produced by hydrolysis of *Brassicaceae* seed meals towards *Sclerotinia* spp. and antagonistic fungi. Press Univ Padova, p: 61.
329. **BENHAMOU N., 2006-** Contribution à l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*. thèse de magister en biologie Université de Tlemcen.
330. **RAJESH K.V., SUMATHI C.S., BALASUBRAMANIAN V., RAMESH N., 2009-** Elementary chemical profiling and antifungal properties of cashew (*Anacardium occidentale L*) nuts. Bot Reash Int. 2(4) : 253-257.
331. **DE BILLERBECK V.G., 2000-** Activité antifongique de l'huile essentielle *Cymbopogon nardus* sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioreacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur de substances volatiles en phase vapeur. Thèse de Doctorat de l'INPT.
332. **REDDY M.V.B., RAGHAVAN G.S.V., KUSHALAPPA A.C., PAULITZ T.C., 1996-** Effect of microwave treatment on survival of *Fusarium graminearum* in wheat seed and seed quality. Symposium : *Lutte physique en phytoprotection*, 88e Assemblée annuelle de la Société de protection des plantes du Québec. 6-7 juin 1996. Québec.
333. **YRJÖNEN T., 2004-** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at Viikki infocentre. Faculty of pharmacy of the university of Helsinki. p: 64.
334. **BAJPAI V.K., KANG S.G., 2010-** Anti-fungal activity of the essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. J Am Oil Chem Soc, 87 : 327–336.
335. **MOTIEJŪNAITĖ O., PEČIULYTĖ D. 2004-** *Pinus sylvestris* L. fungicidai – patalpų oro kokybei gerinti. Medicina, 40(8): 787–794.
336. **VALNET J., 2005-** L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5.
337. **OMIDBEYGI M., BARZEGAR M., HAMIDI Z., 2007-** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control 18: 1518-1523.
338. **CRISTANI M., D'ARRIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETRO M.G., MICIELI D., 2007-** Interaction of four monoterpenes contained in essential



oils with model membranes: application for their antibacterial activity. *J. Agric Food Chem*, 55: 6300-6308.

339. **LUCINI E.I., ZUNINO M.P., LOPEZ M.L., ZYGADLO J.A., 2006-** Effect of monoterpenes on liquid composition and sclerotial development. *J. Phytopat*, 154: 441-446.

340. **TRIPATHI A., SHARMA N., 2006-** Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus cinensis* on post-harvest pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 587-593.

341. **BERGVINSON D.J., ARNASON J.T., HAMILTON R.I., TACHIBANA S., TOWERS G.H., N., 1994-** Putative role of photodimerized phenolics acids in maize resistance to *Ostrinia nubilalis* (L. lepidopterae : pyralidea). *Physiol Chem Ecology*, 23, 1516-1523.

342. **BILY A., REID L.M., TAYLOR J.H., JOHNSTON D., MALOUIN C., BURT A.J., BAKAN B., REGNAULT-ROGER C., PHILOGÉNE B., J., R., ARNASON J., T., 2003-** Dehydrodimers of ferulic acid in Maize Grain Pericarp : Resistance factors to *Fusarium graminearum*, *phytopathology*. 93 : 712-791.

343. **EL MODAFAR C., EL BOUSTANI E., 2002-** Contribution des polyphénols aux mécanismes d'action des plantes. In Regnault-roger C., Philogéne B., J., R., Vincent C., biopesticides d'origines végétale. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 196-185.

344. **EL MODAFAR, C., A. TANTAOUI AND E. EL BOUSTANI, 1999.** Time course accumulation and fungitoxicity of date palm phytoalexins towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *J. Phytopathol.*, 147: 477–484

345. **MISIRLI A., KUDEN A., DEMIR G., GULCAN R., 2001-** Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *Pseudomonas amigdalii*. In Ak B.E. (ed) 11 GREMPA Seminar on Pistachious and almond 11 colloque du GREMPA sur le Pistachier et l'amandier, ZARAGOZA. Ciheam- IAMZ. P : 71-90.

346. **REES S. B., HRABORNE J.B., 1985-** The role of sesquiterpenes lactone and phenolics in the chemicals defense of the chicory plant, *Phytochem.* 24: 2225-2231.

347. **MUNAKATA K., 1979-** Nematocidal Natural Products. In D.L. Whitehead & W.S. Bowers : Natural products for innovative pest management . Pergamon Press Oxford.

348. **ELALLAGUI.N,2005-** Effet des extraits vegetaux sur les nematodes a galles de la tomate. *Memoire de DESA, Univ Ibn Zohr, faculté des sci Agadir.35P.*

349. **OKA Y, NACAR S, PUTIEVSKY E, RAVID U, YANIV Z, SPIEGEL Y, 2000-** Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* **90**, 710–5.
350. **CHITWOOD DJ, 2002-** Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 221–49.
351. **EHWAE A. KELEŞ, A. IMALI, E. OGUN, A. KAYA .1999-** Antimicrobial activity of *Urtica dioica* L. and *Rheum ribes* L. *Bio-Science Research Bulletin*, 18: 43-50.
352. **MENNAN, S., O. ECEVIT AND H. MENNAN. 2000-** Investigation of some plant extracts on root knot nematodes (*M. incognita*). *Turkeye Herboloji*. 3(1):1-9.
353. **BERTRAND B, J-P. COLLAERT, E. PETIOT, 2007-** *Purin d'ortie et compagnie*, Terran Eds De, 2007 (ISBN 2913288650).
354. **BELARBI M, BEGHADAD CH, SOUR S, SOUALEM, Z, BOUALI S, BOUSSEDI S , 2008-** étude de l'activité antioxydante des polyphenols d'*Urtica dioica*.
355. **GOMMERS F.J. AND BARKER J., 1988-** Physiological diseases induced by plant response or products. In: G.O. Poiner and H.B. Jansson, Editors, *Diseases of Nematodes vol. 1*, Boca Raton, CRC Press Inc., Florida, USA, pp. 3–22.
356. **KAVTRADZE N.SH., ALANIYA M.D. ET ANELI J.N., 2001 -** Chemical components *Urtica dioica* in Georgia. Vol .37, p287
357. **YANG J.B.,SU YL.,YUAN L.,FENQ XZ.,JI TF.,2007-** Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibt Autonomous region ;Zhongq Yao Cai ;36(6): 662-4.
358. **FRANZ CH ., BAUER R., CARLE R. TEDESCO D., TUBARO, A. ZITTERL- EGLSEER K., .2005-** study on the assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production CFT/EFSA/FEEDAP/2005/01.297p
359. **WICHTL, M. (Ed.), 2002-** Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsges.m.b.H., Stuttgart, pp. 617-619
360. **MAQBOOL, M.A., S. HASHMI AND A. GHAFAR. 1987.** Effect of latex extracts from *Euphorbia caducifolia* and *Calotropis procera* on root knot nematodes *Meloidogyne spp.* infecting tomato and egg plant. *Pak. J. Nematol.* 9(10):43-45.

361. **GOSWAMI, B.K. ET K. VIJAYALAKSHMI. 1986.** Nematicidal properties of some indigenous plant materials against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* on tomato. Indian Journal of Nematology, 16(1):65-68.
362. **BERTRAND C ET LIZOT,J.F 2000.** Root knot control in organic farming-a method based on oil seed cakes. Groupe de Recherche en Agriculture Biologique.In:Of 13<sup>th</sup> IFOAM Scientific Conf.,Hochschulverlag,ETH Zuerch ,pp.123.
363. **NDREEVA, V.I. 1983.** Results of the testing of some agrotechnical strategies for the control of the strawberry stem nematode. Materialy Symposium, Voronezh, URSS.
364. **MURAKOSHI, S., C.F. CHANG, T. KAMIKADO ET S. TAMURA. 1975-** Effects of the extract from leaves of various plants on the growth of silkworm larvae, *Bombyx mori*. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 19:208.
365. **GRAZCA, L. 1987-** Oxygen-containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. Planta Medica, 53(2):227.
366. **IJANI, A.S.M., R. B. MABAGALA, AND S. NCHIMBI-MSOLLA. 2000-** Root-knot nematode species associated with beans and weeds in the Morogoro region, Tanzania. Afr. Plant Prot. 6:37–41.
367. **REYNOLDS, BL, POTTER, JW ET BALL-COELHO, BR 2000-** Crop rotation with *Tagetes* sp is an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes *Agronomy Journal* , 92: 957-966.
368. **PLOEG, A. T. AND P. C. MARIS. 1999-** Effect of temperature on suppression of *Meloidogyne incognita* by *Tagetes* cultivars. Journal of Nematology 31(4S): 709-714
369. **QAMAR, F.A., M.A. KALHERO AND Y. BADAR. 1998-** Antihelmenthetic properties of some indigenous plants. Hamdard Medicos. 14(1): 115-117.
370. **MEYER SUSAN L. F., ZASADA INGA A., ROBERTS1 DANIEL P., VINYARD BRYAN T., LAKSHMAN DILIP K., LEE JAE-KOOK, CHITWOOD DAVID J.,. CARTA1 LYNN K.2006-** *Plantago lanceolata* and *Plantago rugelii* Extracts are Toxic to *Meloidogyne incognita* but not to Certain Microbes. Journal of Nematology 38(3):333–338.

371. **SAMUELSEN, A. B. 2000-** The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 71:1–21
372. **NOOIJ, M. P., AND MOOK, J. H. 1992-** Interactions with organisms other than plants. Pp. 52–68 in P. J. C. Kuiper and M. Bos, eds. *Plantago: a multidisciplinary study*. Ecological Studies 89. New York: Springer-Verlag.
373. **KNIGHT, K. W. L., HILL, C. F., AND STURHAN, D. 2002-** Further records of *Aphelenchoides fragariae* and *A. ritzemabosi* (Nematoda: Aphelenchida) from New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 31:93–94.
374. **FERRIS, H., AND ZHENG, L. 1999-** Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 31:241–263.
375. **CUANY, A., BERGE, J-B, BRIDE, J-M & HAMADENE-SELLAMI S, 1984 -** Inhibition et réactivation des acétylcholinestérases amphidiales de *Meloidogyne javanica* par l'éthoprophos et l'aldicarbe: tentative de corrélation avec une réaction comportementale. *Revue Nématol.* (2): 173-176.
376. **KHAN S.A .,2009-** Screening of tomato cultivars against root knot nematodes and their biological management. Thes Doc.Univ of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.152P.
377. **RHODE, R.A. 1960-** Acetyle cholinesterase in plant parasitic nematodes and an antiacetyle cholinesterase from *Asparagus*. *Proc. Helminthol. Soc.Wash.* 27:121-123.
378. **GOTTLIEB, O. R., BORIN, M. R. AND BRITO, N. R.,2002-** Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality?. *Phytochemistry* 60: 145-152.
379. **EISENBACK,J.D.1985.** Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne spp.*).p:95-112. In: an Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol;1,Biology and Control.J.N.Sasser and C.C. Carter, eds.North Carolina State University Graphics, Raleigh.
380. **NETSCHER C. ET SIKORA R.A., 1990-** Nematode parasites of vegetable in plant-parasitic nematodes in subtropical agriculture. In : Luc M, Sikora RA, Bridge J. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical Agriculture*. CAB International, London, 237-258.