

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun, Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Présenté par

M^{lle}. LAZDEK Nour El Houda

Thème

Effet antagoniste de métabolites microbiens sur l'agent du mildiou de la pomme de terre par application racinaire

Soutenu publiquement le :

Devant les membres de jury :

Président	M. BENAÏSSA T.	MAA
Encadreur	Mme. AIT ABDERRAHIM L.	MCB
Co-encadreur	M. TAÏBI K.	MCA
Examineur	Mme MEDJEBER N.	MCB

Année universitaire 2018-2019

الملخص

اللفحة المتأخرة مرض فطري خطير للغاية يسبب أضراراً جسيمة للنباتات وخاصة البطاطا والطماطم. يصيب هذا المرض جميع أعضاء النبات مما يسبب تأخر نموها. العامل المسبب لللفحة المتأخرة هو بعض الفطريات الدنيا، الأوميسيت، وبالأخص فيتوفثورا إنفستنس والذي ينتشر في ظل ظروف مناخية مواتية من حيث درجة الحرارة والرطوبة. تهدف هذه الدراسة إلى استخدام الكائنات الحية الدقيقة أو الأيضيات المستخلصة منها للتحكم بيولوجياً في العامل المسبب لللفحة المتأخرة من خلال المواجهة المباشرة بين الأيضيات والعامل الممرض للنباتات في طبق بتري في المختبر والمواجهة على نباتات البطاطا عن طريق رش الأيضيات على الجزء السفلي للنبات الذي تم إصابته بالعفن الفطري. تم الحصول على الأيضيات البكتيرية عن طريق الطرد المركزي. تم تلقيح نباتات البطاطا بالمرض ثم رشها بالأيضيات للتحقق من تأثيرها المضاد. أظهرت النتائج أن جميع أبيضيات السلالات البكتيرية المختلفة ومخاليطها لها تأثير معاكس على المسبب الفطري فيتوفثورا إنفستنس في المواجهة على طبق بتري. تعتبر هذه الدراسة مساهمة فعالة في العمل على استخدام المستقلبات البكتيرية ضد العوامل المسببة للأمراض النباتية.

الكلمات المفتاحية

العفن الفطري، البطاطا، فيتوفثورا إنفستنس، الأيضات البكتيرية، اللفحة المتأخرة، التحكم البيولوجي، الرقابة البيولوجية

Abstract

Potato late blight is one of the most devastating diseases of this crop. It is caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. When environmental conditions are suitable, the disease spreads rapidly and can affect all parts of the plant (leaf, stems and tubers).

The aim of this work is to study the antagonistic effect of suspensions containing metabolites from bacterial strains on the agent of late blight *P. infestans*. This was performed through a direct confrontation between the suspensions and the phytopathogenic agent in Petri dish (*in vitro*) and a confrontation on potato plants by the irrigation of the root part of the plant inoculated by the phytopathogen agent (*in vivo*).

Six bacterial strains were selected and grown on nutrient broth in the presence of the pathogen. Suspensions containing the bacterial metabolites are obtained by centrifugation of the bacterial cultures and recovery of the supernatant.

A direct confrontation is carried out on a Petri dish between the metabolites and *P. infestans*. In addition, potato plants were inoculated with the pathogen and then irrigated with the suspensions of metabolites to evaluate the antagonistic effect.

Results demonstrated that all the suspensions of the different bacterial strains as well as their mixtures have an antagonistic effect against *P. Infestans* when confronted on Petri dish.

Unfortunately, the *in vivo* test did not succeed however the *in vitro* results were very promising.

This work constitutes an addition to other works concerning the use of bacterial metabolites on phytopathogenic agents in a possible perspective of their use *in situ*.

Key words

Potato late bight, *Phytophthora infestans*, antagonism, bacterial metabolites, biological control.

Résumé

Le mildiou est une maladie cryptogamique très redoutable qui provoque des dégâts importants sur les plantes de la famille des solanacées principalement la pomme de terre et la tomate. Cette maladie affecte tous les organes de la plante en provoquant leur nécrose. L'agent phytopathogène est un oomycète *Phytophthora infestans* qui se propage rapidement sous les conditions climatiques favorables en termes de température et d'humidité.

L'objectif de cette étude est basé sur l'utilisation des microorganismes ou de leurs métabolites dérivés pour lutter biologiquement contre l'agent phytopathogène *P. infestans*. La démarche du travail consiste en une confrontation directe entre les suspensions de métabolites et l'agent phytopathogène en boîte de Petri (*in vitro*) et une confrontation sur des plantes de pomme de terre par irrigation de la partie racinaire de la plante inoculée par l'agent du mildiou (*in vivo*). Les métabolites bactériens ont été obtenues par centrifugation des cultures bactériennes puis récupération du surnageant. Les plants de pomme de terre ont été inoculés par l'agent pathogène puis irrigués par les suspensions de métabolites pour vérifier l'effet antagoniste.

Les résultats obtenus ont démontré que toutes les suspensions des différentes souches bactériennes ainsi que leurs mélanges présentent un effet antagoniste vis-à-vis de *P. infestans* en confrontation sur boîte de Petri. Cependant, l'essai *in vivo* n'a pas réussi.

Ce travail constitue une contribution efficace aux travaux qui visent l'utilisation des métabolites bactériens sur les agents phytopathogènes pour une éventuelle d'utilisation *in situ*.

Mots clés

Mildiou, pomme de terre, *Phytophthora infestans*, antagoniste, lutte biologique.

Remerciements

Avant tout

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Au terme de ce travail je tiens à remercier tout d'abord mes encadreurs **Mme AIT ABDERRAHIM L.** et **M. TAIBI K.** pour leur encadrement, leur précieuse aide, leur appui et leurs conseils.

Je remercie également **M. BENAÏSSA T.** d'avoir accepté de présider le jury et **Mme MEDJEBER N.** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont :

A tout le corps enseignant de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret et particulièrement aux enseignants de la spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Aux étudiants de la promotion "2018-2019" Biologie Moléculaire et Cellulaire.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents que j'aime tout au monde, Lazdek Fatma et Mohamad

Mes soeurs et frères ; Khaled, Belkacem...

Mes amies Malika, Hayat, Nawel

En reconnaissance de leur aide, gentillesse et leur agréable compagnie.

Sommaire

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Table des matières

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

1. Pomme de terre.....	2
1.1. Description morphologique.....	2
1.2. Variétés de pomme de terre.....	3
1.3. Importance de la culture de la pomme de terre.....	3
2. Mildiou.....	3
2.1. Mildiou de la pomme de terre.....	3
2.2. <i>Phytophthora infestans</i>	5
2.2.1. Transmission.....	5
2.2.2. Cycle biologique.....	5
3. Lutte contre le mildiou	6
3.1. Lutte prophylactique.....	6
3.2. Lutte chimique.....	6
3.3. Lutte biologique.....	6
3.4. Lutte génétique	7

Méthodologie

1. Objectif du travail.....	8
2. Méthodologie.....	8
2.1. Matériel.....	8

2.1.1. Matériel biologique.....	9
2.2. Méthodes.....	9
2.2.1. Protocole expérimental.....	9
2.2.2. Préparation de la suspension contenant les métabolites bactériens.....	10
2.2.3. Evaluation de l'activité antagoniste entre <i>P. infestans</i> et les suspensions de métabolites bactériens	11
3. Analyse statistique.....	13

Résultats

1. Isolement de <i>P. infestans</i>	14
2. Evaluation de l'activité antagoniste entre <i>P. infestans</i> et les suspensions de métabolites bactériens.....	15

Discussion	19
-------------------------	----

Conclusion et perspectives	21
---	----

Références bibliographiques	22
--	----

Liste des figures

Figure 1. Différentes parties de la pomme de terre	2
Figure 2. Symptômes du mildiou sur les différents organes de la pomme de terre	4
Figure 3. Fragments de feuilles de pomme de terre sur la gélose PDA/ Sabouraud	9
Figure 4. Tubercules de pomme de terre utilisés	9
Figure 5. Protocole expérimentale	10
Figure 6. Suspension de métabolites bactériens obtenus	10
Figure 7. Confrontation directe entre <i>P. infestans</i> et la suspension de métabolites	11
Figure 8. Plant de pomme de terre ayant développé des feuilles.....	12
Figure 9. Inoculations de <i>P. infestans</i> sur le plant de pomme de terre	12
Figure 10. Mycélium obtenu à partir des feuilles de pomme de terre	14
Figure 11. Culture pure de <i>P. infestans</i>	14
Figure 12. Observation microscopique de <i>Phytophthora infestans</i> (Gx100)	15
Figure 13. Confrontation directe entre les suspensions de métabolites bactériens et <i>P. infestans</i>	16
Figure 14. Taux d'inhibition (%) de <i>P. infestans</i> par les métabolites bactériens testés	17
Figure 15. Absence des symptômes du mildiou après inoculation par <i>P. infestans</i>	18

Introduction

Introduction

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une plante vivace originaire d'Amérique du Sud appartenant à la famille des solanacées. C'est une plante herbacée, vivace par ses tubercules, cultivée comme une plante annelle (Daoud et al. 2017). Du point de vue commercial, cette plante est très appréciée par la population et elle constitue une culture de rente pour de nombreux agriculteurs.

En Algérie, la filière pomme de terre dans tous ses volets semences et consommation occupe aujourd'hui une place stratégique dans la nouvelle politique du renouveau agricole et rural ou sa culture reste considérée parmi les espèces maraichères les plus importantes dans l'alimentation (Boufares 2011).

Malheureusement, la pomme de terre peut être la cible de plus de 200 maladies qui peuvent être d'origine fongique, bactérienne ou virale. Parmi les maladies les plus connues et les plus fréquentes est le mildiou dû à l'oomycète *Phytophthora infestans* (Chebbah 2016). Cette maladie cause des dégâts importants dans les champs et provoque jusqu'à 80% de pertes de rendement lorsque les conditions deviennent favorables à l'agent phytopathogène en matière de température (entre 10 et 25°C) et d'humidité relative (plus de 90 %) qui favorisent la propagation rapide même à de longues distances via le vent et la pluie (Mariette 2017).

De multiples tactiques ont été instaurées pour lutter contre cet agent phytopathogène. Des produits à base de cuivre ont été utilisés d'abord (Heinz et al. 2013). Ensuite, ces produits ont été remplacés par des fongicides de contact, des fongicides pénétrants ou des fongicides systémiques ayant un effet préventif au moment de la première inoculation de l'agent pathogène quoique ces derniers ont des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine (Jamar et al. 2014).

La présente étude est basée sur l'utilisation des microorganismes ou de leurs métabolites produits pour lutter biologiquement contre l'agent phytopathogène *P. infestans*.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Pomme de terre

La pomme de terre "*Solanum tuberosum*" est une plante vivace, herbacée, dicotylédone appartenant à la famille des Solanacée. C'est une plante à fleurs gamopétales et dont le tubercule, riche en amidon, à une valeur nutritive importante (Boufares 2012 ; Daoud et al. 2017).

La pomme de terre est originaire de la cordillère des Andes dans le sud-ouest de l'Amérique du Sud. Elle fut introduite en Europe à la suite de la découverte de l'Amérique par les conquistadors espagnols. En Algérie, son introduction a été faite par les français en 1856 (Beninal 2011).

1.1. Description morphologique

Le système aérien est constitué de tiges au nombre de 2 à 10 de port plus ou moins dressé et portant des feuilles alternes disposées en spirale. Le nombre et la couleur des fleurs caractérisent les variétés. Les fruits sont des baies sphériques contenant des graines.

Le système souterrain comprend les tubercules, des racines nombreuses fines et fasciculées pouvant pénétrer dans le sol. Les tiges souterraines ou rhizomes sont courtes et leurs extrémités se renflent en tubercules. Ces derniers sont les organes de conservation (Fig. 1) (Daoud et al. 2017).

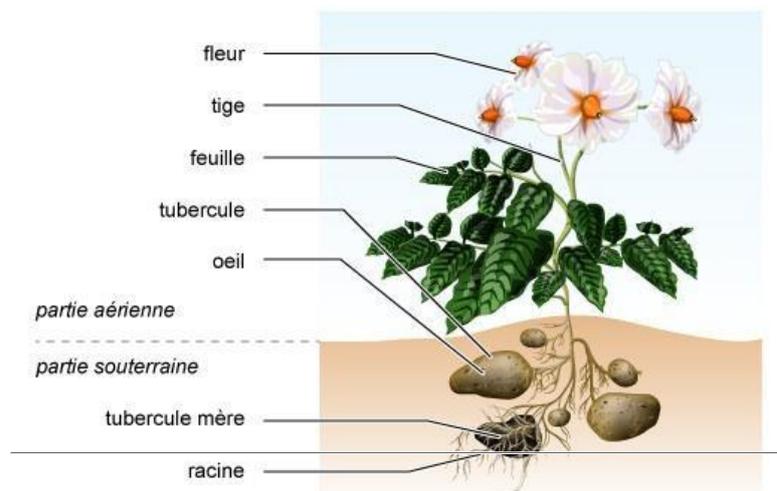


Figure 1. Différentes parties de la pomme de terre.

1.2. Variétés de pomme de terre

Les variétés de pomme de terre cultivées en Algérie et les plus demandées en production sont :

- La pomme de terre à peau rouge: Désirée, Kondor, Bartina et Amorosa.
- La pomme de terre à peau blanche: Timate, Spunta, Diamant, Nicolas et Atlas (DSA 2014).

Cette gamme variétale concilie les habitudes de consommation de chaque région en fonction de facteurs souvent subjectifs de couleur de la peau, de la productivité et la rusticité (Daoud et al. 2017).

1.3. Importance de la culture de la pomme de terre

A l'échelle mondiale, la culture de la pomme de terre se classe quatrième dans les productions vivrières après le riz, le blé et le maïs, cependant, elle est classée première production non céréalière. La pomme de terre s'adapte à des situations très diverses ; du cercle polaire à l'équateur en jouant sur les saisons, les variétés et l'altitude (Boufares 2012). En Algérie, la pomme de terre est la première culture maraîchère de point de vue superficie et production.

2. Mildiou

Le mildiou est une maladie cryptogamique causée par différents agents appartenant à différents genres (*Peronospora*, *Plasmopara*, *Bremia*, *Phytophthora*...) (Pierre 2016).

Elle touche à de nombreuses espèces de plantes y compris certaines cultures de grande importance économique, telles que la vigne, la tomate, la pomme de terre, la laitue ou les courges (Al-Mughrabi 2011).

Sur les plantes appartenant à la famille des Solanacée, le mildiou provoque l'apparition de taches verts-pâles à brunes sur les feuilles qui s'étendent peu à peu. Ces lésions affectent ensuite les pétioles des feuilles puis les tiges. Les plantes atteintes très tôt par le mildiou peuvent produire des fruits déformés avec des marbrures marron (Pierre et Romuald 2015).

2.1. Mildiou de la pomme de terre

Le mildiou de la pomme de terre est une maladie redoutable pouvant provoquer jusqu'à 100 % de pertes de rendement, elle est provoquée par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Glais et al. 2005). Les symptômes (Fig. 2) apparaissent sur les feuilles sous forme de larges taches brunes huileuses auréolées de vert pâle à la face supérieure des feuilles et au duvet blanc sur leur face inférieure (Farjaoui et al. 2010). Sur les pétioles et les tiges la maladie se manifeste par des taches brunes à différents niveaux qui peuvent entraîner la

destruction des jeunes plants ou la cassure des tiges des plantes adultes (Leaute 2014). Sur les tubercules apparaissent des taches brunes sur l'épiderme et des zones marbrées de couleur rouille et fibreuses, à l'intérieur, sous la forme d'une pourriture sèche (Rakotonindraina 2012).

Les dégâts causés par le mildiou diffèrent selon la durée de l'attaque ; l'attaque précoce induit une diminution de la photosynthèse qui empêche la formation ou grossissement de tubercules. Alors que l'attaque tardive induit la diminution de la qualité des tubercules (Rakotonindraina 2012).

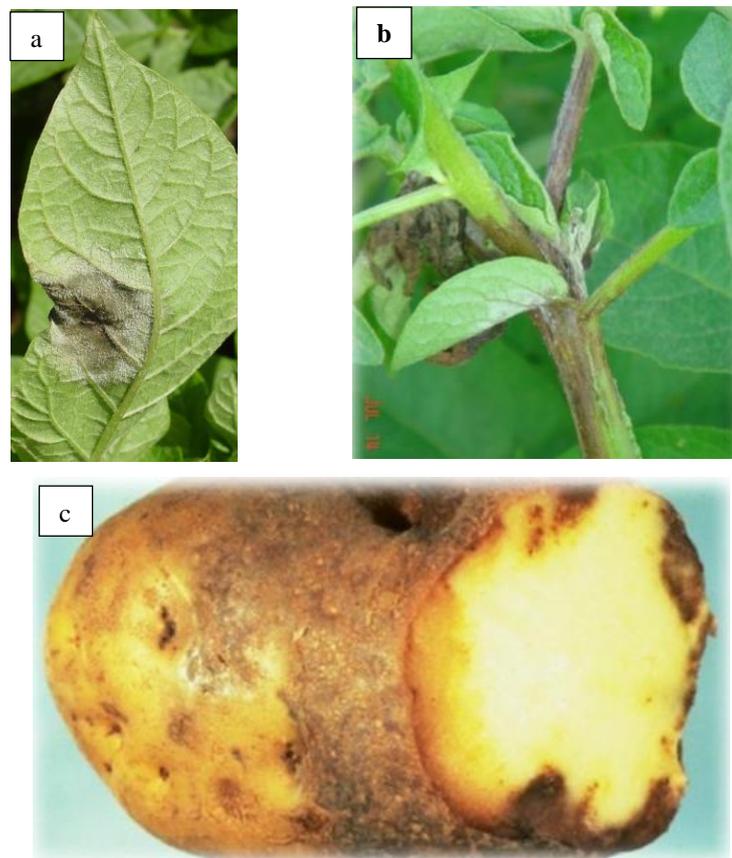


Figure 2. Symptômes du mildiou sur les différents organes de la pomme de terre.

a: feuilles, b: tige, c: tubercule.

2.2. *Phytophthora infestans*

Montagne en 1845, a donné pour la première fois le nom de *Botrytis infestans* à l'agent pathogène responsable de la maladie du mildiou puis le botaniste allemand Anton de Baryen 1863, l'a transféré au genre *Peronospora* d'où le nom de *Peronospora infestans* de Bary. Ce n'est que vers 1876, qu'on le transféra au genre *Phytophthora*, signifiant destructeur des plantes (Benninal 2011).

P. infestans est un oomycète de la famille des *Pythiaceae*. Il appartient au royaume des *Chromista* ou *Straminopila* et est donc phylogénétiquement plus proches des algues brunes que des champignons supérieurs (Montarry 2007). Les oomycètes sont caractérisés par leur capacité de libérer des zoospores asexués hétérokontes formées dans les sporanges (Bennani 2004). Les oomycètes se différencient des vrais champignons par l'absence de la chitine au niveau de paroi, la nature de leur membrane plasmique (le fucostérol au lieu de l'ergostérol) ainsi que par la nature de leur substance de réserve (les mycolaminarines au lieu du glycogène) (Beninal 2011).

2.2.1. Transmission

L'inoculation de *P. infestans* peut se faire par le biais des zoospores qui se conservent sur les débris de pommes de terre soit provenir des semences infectées, soit d'oospores ou mycélium conservés dans le sol ou encore par le biais du vent qui transporte les sporanges sur de longues distances (Montarry 2007). Les périodes prolongées d'humidité (pluies, irrigation par aspersion, brouillards, rosée, ...) favorisent cette maladie (Bekker 2014).

2.2.2. Cycle biologique

Le cycle biologique de *P. infestans* comprend deux phases, la phase sexuée et asexuée.

- **La phase asexuée**

Cette phase est assurée par les sporanges qui une fois sur les feuilles libèrent des zoospores. Ces dernières perdent leurs flagelles et produisent un tube germinatif qui pénètre dans le tissu foliaire qui se verra colonisé par le mycélium du pathogène. Dans les conditions de température modérée (~20 °C) et d'humidité relative élevée (RH > 90 %) le mycélium émet des sporangiophores sur la face inférieure des folioles, ceux-ci produisent de nombreux sporanges (Agrios 2005). Les sporanges sont aisément entraînés par le vent et la pluie, parfois sur des longues distances et gagnent de nouvelles plantes encore saines, assurant des contaminations secondaires (Belkhiter 2013 ; Bennani 2004).

- **Phase sexuée**

P. infestans est un organisme hétérothallique possédant deux types de compatibilité sexuelles A1 et A2 (souche A1 et A2). La reproduction sexuelle se déroule lorsque les deux types se rencontrent résultant dans la formation d'une oospore. Cette dernière, persiste longtemps dans le sol ou les tissus morts du végétal cependant lorsque les conditions sont favorables, les oospores germent et donnent des sporangiophores capables d'infecter de nouveaux hôtes (Dannan 2009).

3. Lutte contre le mildiou

La lutte contre mildiou de la pomme de terre est obligatoire et préventive pour protéger la plante mise en contact avec le pathogène (Milliard 2018). Différentes techniques sont utilisées afin de lutter contre les agents phytopathogènes :

3.1. Lutte prophylactique

La lutte prophylactique est effectuée par la réduction maximale des sources d'inoculum primaire du pathogène et élimination des tas de déchets issus de la récolte par des traitements thermique, mécanique ou chimique pour réduire le risque d'infection des cultures ou retarder leur développement (Cochennec 2012). D'autres mesures sont prises pour réduire le risque d'infection des cultures à savoir :

- Eviter de cultiver les variétés de pomme de terre sensibles dans les zones reconnues favorables au mildiou (Leaute et al. 2014).
- Afin de préserver les tubercules des contaminations, pratiquer un buttage soigné (Leblanc et al. 1998).

3.2. Lutte chimique

A la fin de la seconde guerre mondiale, la lutte contre mildiou s'effectuée par l'utilisation de sels de cuivre (Bennani 2004). De nos jours, ceux-ci sont largement remplacés par des fongicides de synthèse (Radriantsalama et al. 2014). Cependant, aucun produit chimique réellement adapté à la lutte contre ce fléau sans qu'il n'y ait de danger sur l'environnement n'a pu être élaboré (Dannan 2009).

3.3. Lutte biologique

La lutte biologique consiste à combattre un organisme nuisible au moyen d'autres organismes ou de leurs produits (Bouzerida 2016).

L'utilisation de micro-organismes vivants ou de leurs métabolites pour empêcher ou réduire les dommages causés par un organisme pathogène est très utilisée dans divers domaines (Vincent 2016). Plusieurs antagonistes peuvent être utilisés dans la lutte

biologique contre les agents phytopathogènes. L'exemple chez les bactéries est celui de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* qui se trouve naturellement dans les racines de la plante de pomme de terre et secrète un pigment fluorescent (pyoverdine) qui provoque la réduction de *P. infestans* (Barbier 2010). Chez les champignons, l'efficacité des espèces appartenant au genre *Trichoderma* dans l'inhibition des organismes pathogènes repose surtout sur leur capacité à produire plusieurs substances ou antibiotiques. Dernièrement considérés comme des armes contre les organismes phytopathogène, le genre *Trichoderma* produit également des enzymes qui provoque la lyse de *Phytophthora* dans la pomme de terre (Bennani 2004).

3.4. Lutte génétique

Basée sur l'introduction d'un ou plusieurs gènes de résistance spécifique contre l'agent pathogène (Beninal 2011).

Méthodologie

Méthodologie

1. Objectif du travail

Ce travail a eu pour objectif de tester l'effet antagoniste d'une suspension issue de la culture sur bouillon de quelques souches bactériennes, préalablement isolées et purifiées, sur l'agent du mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*. Ceci à travers la confrontation directe sur boîte de Petri (*in vitro*) et par application sur des plants de pomme de terre infectés par *P. infestans* par irrigation de la partie racinaire (*in vivo*).

2. Méthodologie

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

a. Souches bactériennes antagonistes

Dans notre étude, nous avons utilisé des souches bactériennes, isolées lors d'un travail précédent (Kouider et al. 2018), ayant un effet antagoniste contre *Phytophthora* sp. Parmi ces souches, six semblant appartenir au genre *Bacillus* (nommées g6, g1, G1, G2, B3, B4) ont présenté un effet antagoniste contre *P. infestans*. En effet, l'observation macroscopique des cultures sur boîte de Petri montre l'aspect typique des colonies des bactéries du genre *Bacillus*. De plus, l'observation microscopique après coloration de Gram montre des bacilles à Gram positif sporulants.

b. Isolement et purification de *Phytophthora infestans*

P. infestans a été isolé à partir de feuilles de pommes de terre infectées suivant le protocole décrit par Meszka et Michalecka (2016) avec de légères modifications. L'isolement a été réalisé sur les géloses PDA (Potato Dextrose Agar) et Sabouraud additionnées d'antibiotiques (Gentamycine et Rifamycine).

Des feuilles de pomme de terre présentant des symptômes du mildiou ont été prélevées. Celles-ci sont désinfectées dans l'eau de Javel 13° dilué à 30 % pendant 3 min puis rincées dans l'eau distillée stérile 3 fois. Les fragments de feuilles sont ensuite déposés sur les géloses Sabouraud et PDA additionnées d'antibiotiques (Fig. 3). Des repiquages successifs sont réalisés afin d'obtenir des cultures pures du microorganisme recherché.



Figure 3. Fragments de feuilles de pomme de terre sur la gélose PDA/ Sabouraud.

c. Pomme de terre

Notre étude a porté sur la variété de pomme de terre Désirée G1 (Fig. 4). Les tubercules ont été obtenus de l'institut National de la Recherche Agronomique, Sebaine –Tiaret (Algérie). Ceux-ci ont été désinfectés avec de l'eau de Javel 13° puis rincés avec de l'eau distillée stérile puis plantés dans des pots sur un sol préalablement stérilisé, prélevé à partir d'un terrain agricole.



Figure 4. Tubercules de pomme de terre utilisés.

2.2. Méthode

2.2.1. Protocole expérimentale

Afin de réaliser notre expérimentation on a suivi le protocole décrit dans la figure ci-dessous:

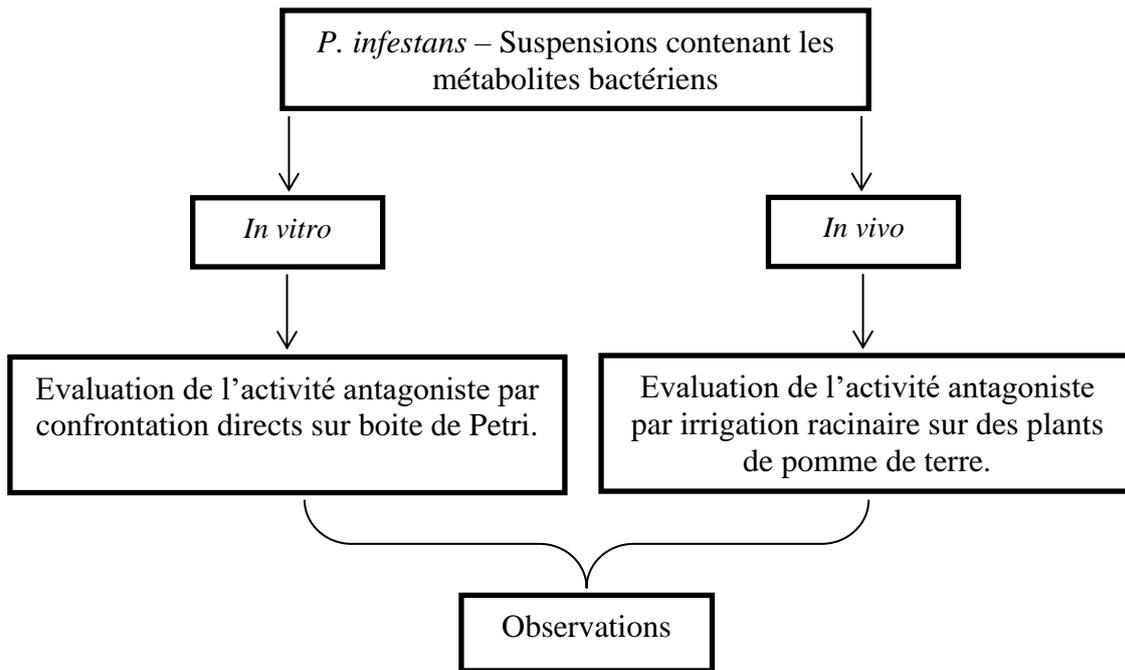


Figure 5. Protocole expérimentale

2.2.2. Préparation de la suspension contenant les métabolites bactériens

Des cultures sur bouillon nutritif ont été préparées à partir des six souches sélectionnées. Celles-ci sont incubées à 30 °C pendant 48 h puis un disque contenant un fragment de la culture de *P. infestans* est ajouté dans chaque tube qui sera ré-incubé pendant 24 h. Après ce temps, les tubes sont centrifugés à 3000 trs/min pendant 10 min (Pierre 2016). Les surnageants sont récupérés (Fig. 6) et testés pour la présence de métabolites ayant un effet antagoniste contre *P. infestans*.

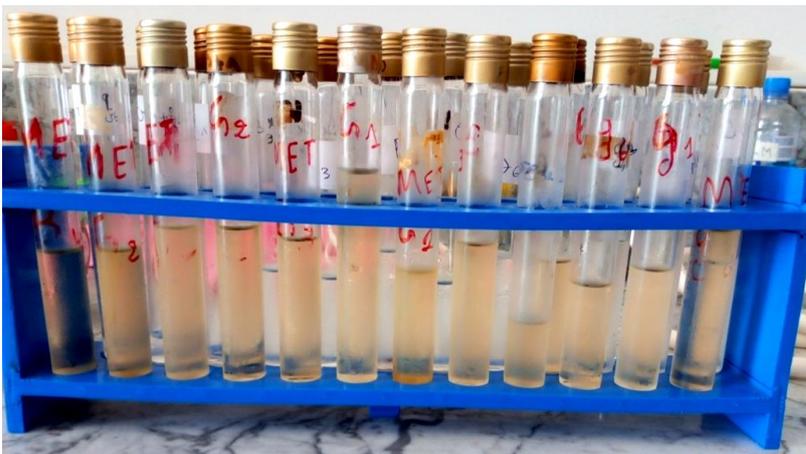


Figure 6. Suspension de métabolites bactériens obtenues.

2.2.3. Evaluation de l'activité antagoniste entre *P. infestans* et les suspensions de métabolites bactériens

a. *In vitro*

- **Confrontation directe en boîte de Petri**

Afin d'évaluer l'interaction antagoniste entre *P. infestans* et les métabolites bactériens, la méthode décrite par Harir (2010) a été adoptée. Brièvement, un disque du phytopathogène est mis au centre de la boîte de Petri préalablement coulée avec la gélose Sabouraud, ensuite deux puits sont réalisés de part et d'autre du disque puis remplis avec 40 µL de la suspension préparée à partir de chaque souche bactérienne antagoniste (Fig. 7). Une boîte de Petri témoin contenant un disque de *P. infestans* au centre est préparée à part. Le tout est incubé à 25°C pendant 5 jours. Les résultats sont exprimés en taux d'inhibition de l'agent phytopathogène calculé par la formule :

$$I (\%) = (R_{\text{Témoin}} - R_{\text{Test}}) / R_{\text{Témoin}} \times 100$$

Où :

- I % : taux d'inhibition en %.
- $R_{\text{Témoin}}$: distance radiale maximale de croissance du phytopathogène témoin.
- R_{Test} : Distance radiale de croissance du phytopathogène sur une ligne en direction de l'antagoniste.

* Il est à noter qu'en plus de tester les suspensions bactériennes à part, une combinaison des différentes suspensions a été testée pour évaluer un éventuel effet synergique entre les composants des suspensions.

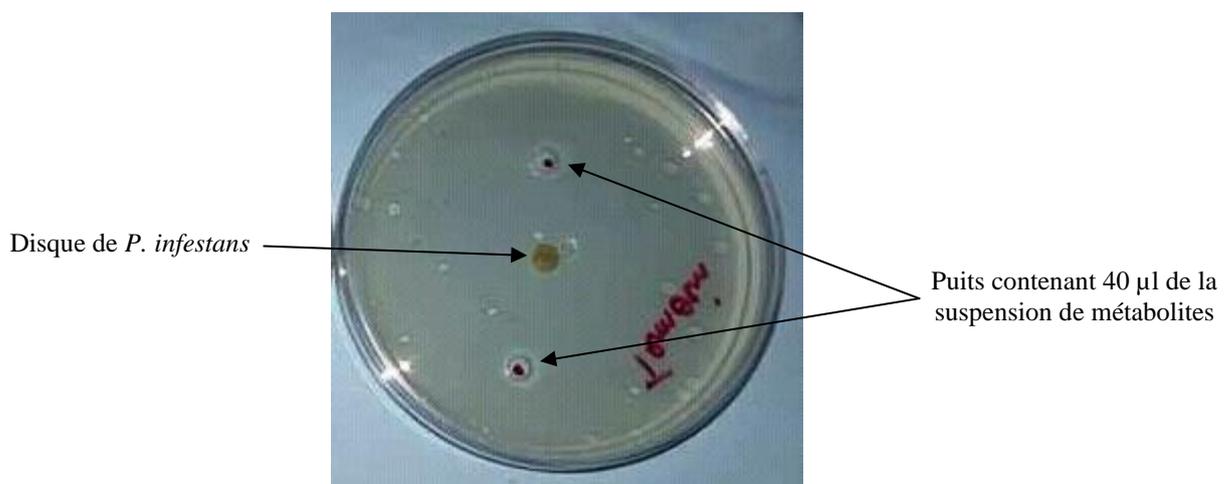


Figure 7. Confrontation directe entre *P. infestans* et la suspension de métabolites.

b. In vivo

- **Préparation de la suspension de *P. infestans***

Une suspension de *P. infestans* a été préparée dans de l'eau distillée stérile et homogénéisée à l'aide d'un vortex.

- **Application par irrigation racinaire sur des plants de pomme de terre**

Les plants de pomme de terre ayant développés des feuilles sont utilisés dans ce travail (Fig.). Les pots contenant ces plants sont divisés en trois groupes, le premier groupe est inoculé avec la suspension de *P. infestans* à part sur la partie aérienne et souterraine (Fig. 8). Le deuxième groupe contient des plants de pomme de terre inoculés chacun avec une de chaque suspension de métabolites bactériens par irrigation sur la partie racinaire (Fig. 9). Le dernier groupe est inoculé par l'agent phytopathogène puis par la suspension de métabolites, par irrigation de la partie racinaire, afin d'évaluer l'effet antagoniste.



Figure 8. Plant de pomme de terre ayant développé des feuilles.



Figure 9. Inoculations de *P. infestans* sur le plant de pomme de terre
a) sur les feuilles, b) sur le tubercule et les racines.

3. Analyse statistique

Tous les essais sont répétés au moins trois fois. Les données ont fait l'objet d'une analyse de la variance afin de déterminer la variation entre les différents antagonistes testés. La comparaison entre les différents groupes est réalisée en utilisant le test Duncan. Les différences significatives entre les moyennes sont déterminées au seuil de sécurité $P < 0.05$. Les résultats sont représentés graphiquement en tant que moyenne \pm écart type.

Résultats

Résultats

1. Isolement de *P. infestans*

Après incubation des boîtes de Petri contenant les fragments des feuilles de pomme de terre atteintes de mildiou sur gélose Sabouraud et PDA, un mycélium s'est développé à partir des feuilles (Fig. 10). Celui-ci a été repiqué sur une autre boîte contenant les mêmes éléments et ainsi de suite jusqu'à l'obtention d'une culture pure (Fig. 11). On remarque que l'agent isolé présente les caractéristiques morphologiques des oomycètes du genre *Phytophthora* à savoir les colonies poussant de façon radiale compacte sans marges nettes, duveteuses et présentant de courts hyphes aériens. Les observations microscopiques ont montré que l'agent isolé présente les caractéristiques morphologiques de l'espèce *P. infestans* (Fig. 12) à savoir des colonies radiales compactes sans marges nettes, le mycélium présente des hyphes courts aériens et les sporanges sont terminaux, rarement intercalaires ils ont une forme ovoïde, ellipsoïdale à limoniforme (Benani 2004).



Figure 10. Mycélium obtenu à partir des feuilles de pomme de terre.



Figure 11. Culture pure de *P. infestans*.



Figure 12. Observation microscopique de *Phytophthora infestans* (Gx100).

2. Evaluation de l'activité antagoniste entre *P. infestans* et les suspensions de métabolites bactériens

a. In vitro

- **Confrontation directe en boîte de Petri**

Les résultats obtenus après confrontation sur boîte de Petri entre *P. infestans* et les métabolites issus des souches bactériennes antagonistes ont montré une inhibition de la croissance mycélienne du phytopathogène. La combinaison de l'ensemble des suspensions a été aussi testée pour évaluer son effet antagoniste. Les résultats sont représentés dans les figures 13 et 14.

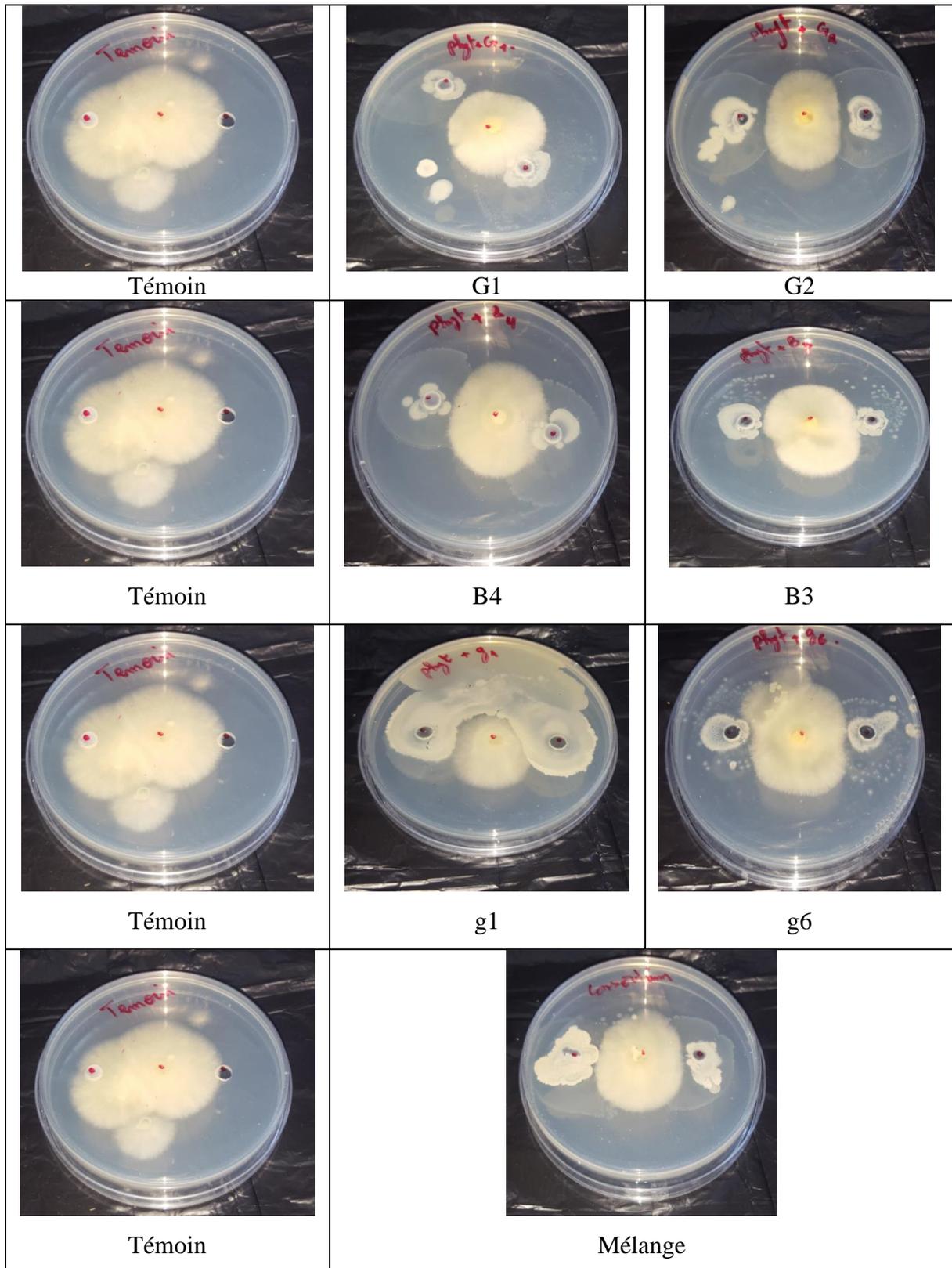


Figure 13. Confrontation directe entre les suspensions de métabolites bactériens et *P. infestans*.

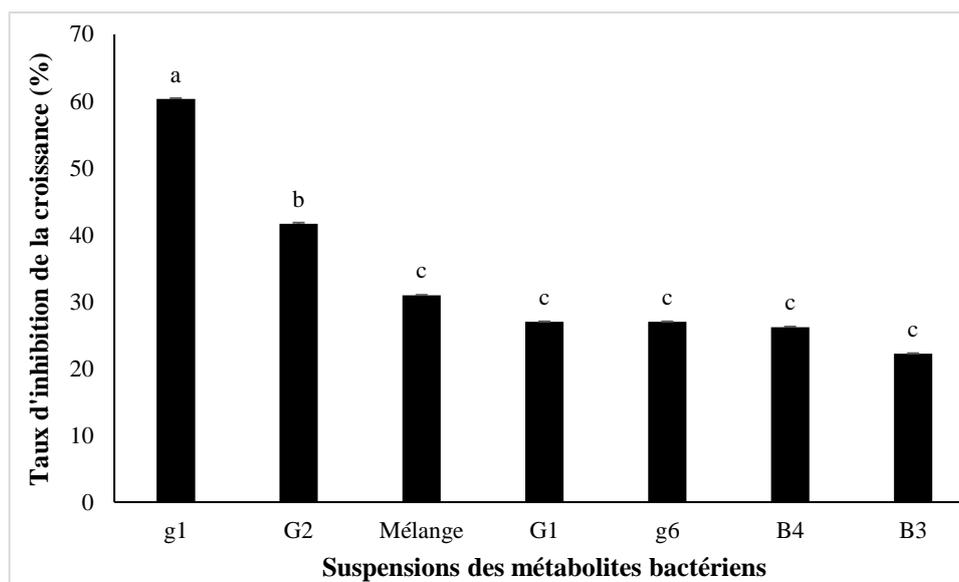


Figure 14. Taux d’inhibition (%) de *P. infestans* par les métabolites bactériens testés.

* Les lettres alphabétiques indiquent les groupes homogènes, ceux comportant les mêmes lettres ne montrent aucune différence significative.

On remarque que les suspensions préparées à partir des souches bactériennes présentent un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *P. infestans* ce qui confirme la présence de métabolites libérés par ces souches dans le milieu et qui possèdent un effet antagoniste vis-à-vis de *P. infestans*. L’analyse statistique des résultats obtenus montre une hétérogénéité dans les taux d’inhibition. En effet, on remarque que la suspension issue de la souche g1 présente le meilleur taux d’inhibition (60.3 ± 0.1 %) suivie de la suspension G2 (41.6 ± 0.15 %). Cependant, le reste des suspensions y compris le mélange de toutes les suspensions ont présenté des taux d’inhibition qui ne diffèrent pas significativement entre eux (Fig. 23).

a. In vivo

- **Application par irrigation racinaire sur des plants de pomme de terre**

Après la réalisation des tests *in vitro*, les suspensions sont également testées *in vivo*, séparément puis en mélange de l’ensemble, sur des plants de pomme de terre cultivés sous des conditions contrôlées de laboratoire.

Des suspensions de *P. infestans* ont été appliquées sur des plants sains de pomme de terre pour servir comme contrôles aux autres plantes ayant subi un apport exogène des suspensions de souches antagonistes.

Malheureusement, aucun symptôme n’a été observé sur les feuilles ni sur aucune autre partie des plants de pomme de terre malgré avoir essayé de réunir toutes les conditions

favorables à la propagation de ce phytopathogène (Fig. 15). De ce fait, le travail n'a pas été achevé pour permettre l'évaluation de l'activité antagoniste des souches bactériennes et l'agent phytopathogène *in vivo*.



Figure 15. Absence des symptômes du mildiou après inoculation par *P. infestans*.

Discussion

Discussion

Cette étude a eu pour objectif d'évaluer l'effet de suspensions issues de cultures bactériennes sur l'agent du mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*. Ceci à travers une confrontation directe sur boîte de Petri entre la suspension et l'agent phytopathogène (*in vitro*) par la suite une application directe sur des plans de pomme de terre est effectuée (*in vivo*).

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude, à partir desquelles les suspensions ont été préparées, ont été isolées à partir du sol et identifiées comme appartenant au genre *Bacillus* lors d'un travail précédent (Kouider et al. 2018). Elles ont également été démontrées ayant un effet antagoniste contre *Phytophthora infestans* (Anacer et al. 2019).

En effet, la plupart des microorganismes isolés du sol appartiennent au genre *Bacillus*. Etant des organismes sporulant, ceux-ci présentent une forte résistance aux conditions défavorables et constituent une forte proportion de la flore du sol (Bouzerouata 2017).

Les résultats de la confrontation directe *in vitro* entre les suspensions issues des bactéries et *P. infestans* montrent qu'il y a effectivement une inhibition de la croissance du phytopathogène démontrant une interaction antagoniste.

Les *Bacillus* ont de nombreuses propriétés qui intéressent le monde agricole : ils sont à la fois capables de stimuler la croissance et les défenses naturelles des plantes mais aussi d'inhiber ou d'entrer en compétition avec les pathogènes. De plus, ils produisent une large gamme de métabolites secondaires bactéricides et fongicides qui en font un atout précieux dans la lutte contre les phytopathogènes. L'exploitation de ces différents mécanismes d'actions offre une alternative intéressante à l'utilisation des produits chimiques (DRIKS 1999 ; El Hadidy 2016).

Les bactéries présentant une activité antagoniste produisent divers métabolites secondaires de faible poids moléculaire (moins de 2.5 KDa). Ces métabolites agissent comme des agents antimicrobiens, régulateurs de la croissance des plantes, inhibiteurs des enzymes végétales, herbicides, insecticides et antiparasitaires. En raison de leurs activités biologiques remarquables, ils sont largement utilisés dans les domaines de l'agriculture, de la médecine et des sciences vétérinaires (Pathma et al. 2011).

Trois grandes voies de synthèse des métabolites secondaires ont été décrites chez les bactéries du genre *Bacillus*: la voie des peptides ribosomiques (bactériocine), des peptides

non-ribosomiques (lipopeptides, sidérophores) et des polycétides (phytohormone, antibactérien, antifongique, antiparasitaire, antitumoraux). A l'inverse des peptides non-ribosomiques et des polycétides, les composés ribosomiques ont un spectre d'action souvent restreint aux espèces proches de l'antagoniste (Ongena et al. 2012). Par exemple, l'iturine est un métabolite secondaire à action antifongique, il est utilisé contre *Rhizoctonia solani*. Un autre exemple est celui des métabolites de type surfactine (lipopeptide) qui est un biosurfactant qui agit comme un détergent sur les membranes biologiques (Sansinenea et Ortiz 2011), d'ailleurs, des études ont démontré que le *B. subtilis* agit sur *P. infestans* par la production des lipopeptides assurant la solubilité des membranes des zoospores et donc leur destruction (Cauller 2018). D'autres métabolites peuvent agir comme des stimulateurs de la croissance de la plante ce sont des phytohormones telles que les auxines et les cytokinines. La bacilysin 1, un dipeptide non ribosomal, représente l'un des antibiotiques peptidiques les plus simples connus pour leurs activités antifongiques et antibactériennes (Sansinenea et Ortiz 2011).

Lors de cette étude le mélange de toutes les suspensions a également été testé avec un taux d'inhibition du phytopathogène d'à peu près 31 %.

L'application des métabolites se fait généralement de manière individuelle, cependant certains travaux ont prouvé que l'effet antagonistes du mélange de quelques métabolites est plus élevé en comparaison avec l'application individuelle de ceux-ci. Ce phénomène est expliqué par la présence d'une certaine synergie entre les différents composants, à l'inverse on parle d'antagonisme (El Hadidy 2016).

Lors de notre étude l'application de *P. infestans* sur les plants de pomme de terre n'a donné aucun résultat c'est-à-dire qu'aucun des symptômes caractéristiques du mildiou n'est apparu. Cela peut être expliqué par des facteurs liés à la plante tels que la résistance de la variété de pomme de terre étudiée "Désirée" ou par des facteurs liés à l'agent phytopathogène tels que les conditions du laboratoire qui n'ont pas favorisés son développement, soit les deux. Mis à part ces facteurs, lorsque les conditions du milieu sont favorables, l'évolution de l'épidémie dépend de l'agressivité du pathogène et du système de défense de la plante hôte.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le présent travail a été réalisé dans le but d'étudier l'activité antagoniste de quelques métabolites en suspension, issus de six souches du genre *Bacillus*, contre l'agent phytopathogène du mildiou de la pomme de terre *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats obtenus révèlent un effet antagoniste intéressant de ces suspensions vis-à-vis de *P. infestans* lorsqu'elles sont mises en contact directe sur les boîtes de Petri (*in vitro*). En outre, le mélange des suspensions a lui aussi démontré une réduction du développement du phytopathogène.

Malheureusement, l'application directe sur les plants de pomme de terre n'a pas pu être achevée pour nous permettre d'évaluer l'activité antagoniste des suspensions sur *P. infestans in vivo*.

Quoique, l'essai *in vivo* n'a pas abouti, les résultats *in vitro* restent prometteurs pour une éventuelle application directe *in situ*.

Ainsi, une étude approfondie pour identifier les souches bactériennes étudiées ainsi que la détermination des métabolites responsables de l'activité antagoniste doit être entreprise.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Al-Mughrabi K. 2011. Le mildiou de la pomme de terre. Conseil Canadien de l'Horticulture. New Brunswick, Canada. 1-5.

Andrivon D., Bardin M., Bertrand C., Brun L., Daire X., Fabre F., Gary CH., Montarry J., Nicot P., Reignault P., Tamm L. et Savini I. 2018. Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques. INRA, Département Santé des Plantes et Environnement de Rennes, France.

Anacer J., Samet NH et Souid M. 2019. Effet antagoniste de quelques souches bactériennes sur l'agent du mildiou de la pomme de terre. Mémoire de Master. Université Ibn Khaldoun, Tiaret, Algérie.

Bekker K. 2014. Etude de l'effet des facteurs abiotiques et nutritionnels sur la production d'oospores chez *Phytophthora infestans*. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger.

Belkhiter S. 2013. Evaluation de la résistance de la pomme de terre à l'égard du *Phytophthora infestans* agent du mildiou. Mémoire de Master. Ecole Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger.

Beninal L. 2011. Diversité génétique de *Phytophthora infestans* agent de mildiou de pomme de terre en Algérie. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. EL Harrach. Alger.

Bennani Y. 2004. Le mildiou de la pomme de terre. Mémoire de Magister. Université Farhat Abbas, Sétif, Algérie.

Blanchard A. et Limachea F. 2018. Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). Rapport bibliographie. Institut National Agronomique. Paris.

Boufares K. 2012. Comportement de trois variétés de pomme de terre (spanta, desire, chubaek) entre deux milieux de culture substrat et hydroponique. Mémoire de Master. Université Abou-Bakr Belkaid. Tlemcen. Algérie.

Bouzerouata a. 2017. Application de *Bacillus spp*, mésophile dans la lutte biologique. Mémoire de Master. Université Abou-Bakr-Belkaid, Tlemcen, Algérie.

Caulier S., Gillis A., Legrève A., Bragard C. Et Mahillon J. 2015. Les *Bacillus spp*. au service de la culture de pommes de terre. Metadata.

Cauller S., Gillis A., Colau G., Licciardi F., Liépin M., Desoignies N., Modrie P., Légrève A., Mahillon J. and Bragard C. 2018. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 9:14.

Changey F. 2011. Etude de l'évolution du potentiel génétique de populations bactériennes dégradant l'atrazine. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. France.

Chebbah A. 2016. Contribution à l'étude de la production de quelque variété de pomme de terre dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master. Université Tlemcen. Algérie.

Christoph L., Leucienne R., Luzia G. et Franziska O. 2018. De nouvelles approches pour la protection des pommes de terre contre mildiou. *Swiss Académies Actsheets* .13(1). Doi 10581/zenodo.1168422.

Cochennec M. 2012. Le mildiou de l'artichaut, modèle épidémiologique et moyens de lutte. Mémoire d'Ingénieur. Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Angers, France.

Danan S. 2009. Diversité structurale des locus de résistance à *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre et syntonie chez les solanacées. Thèse de Doctorat. Centre Internationale d'Etudes Supérieures En Sciences Agronomiques de Montpellier, France.

Daoud H. et Doudou O. 2017. Etude comparative de 14 variétés de pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.) dans la région de Mostaganem. Mémoire de Master. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. Algérie.

Darpoux H. 2014. Les antagonismes microbiens et les substances antibiotiques en pathologie végétale. *Bulletin de la Société Botanique*. 1: 140-144.

Driks A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology*. 63(1).

EL-Hadidy AEA. 2016. Biocontrol activities of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Phytophthora* blight and growth promotion of sweet pepper. *Middle East Journal of Applied Sciences*. 6(4): 1138-1149.

Farjaoui S., Amassi N., M'hamdi M. et Romdhanim E. 2010. Evaluation de la résistance de certaines variétés de pomme de terre biologique au mildiou (*Phytophthora infestans*). *Tropicultura*. 44 – 49.

Glais I., Corbiere R. 2005. Immaculation en condition contrôlées de folioles détachées de pomme de terre pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *Phytophthora*

infestans. Cahier des techniques. Méthode d'Appréciation du Comportement variétal vis-à-vis des bioagresseurs. 143-147.

Harir M. 2010. Effets antagonistes entre les souches d'actinomycètes et *Verticillium dahliae* Kleb agent de la verticilliose de l'olivier. Mémoire de Magistère. Université'Oran, Algérie.

Houidih A. 2007. Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation azotée- potassique sur pomme de terre (*Solanum tuberosum* condor) dans la région de Souf. Mémoire de Master. Université Kasdi- Merbah, Ouargla, Algérie.

Jamar L., César V., Bataille C. 2014. Réduction de cuivre -focus pomme de terre et arboriculture fruitière. Itinéraire bio. 20-24.

Jo K. 2015. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. BMC biotechnology. 14-15.

Kechid M. 2005. Physiologie et biotechnologie de la microtubérisation de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. Mémoire de Master. Université des Frères Montouri, Constantine, Algérie.

Kloepper J., Ryu C. et Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion.

Kouider DH. Ladad H. Lakehal A. 2018. Screening de quelques souches microbiennes antagonistes de l'agent du mildiou « *Phytophthora* sp. ». Mémoire de Master. Université Ibn Khaldoun, Tiaret, Algérie.

Leaute J. 2014. Mildiou de pomme de terre (*Phytophthora infestans*). Réduire et Améliorer l'Utilisation des phytos. 44.

Lemanceau P.1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple Mariemilliard J. 2018. *Phytophthora infestans* tout est dit dans le nom du mildiou de pomme de terre. L'Agriculteur Normand. [Www.agriculteur-normand.Com /actualites /phytophthora infestans](http://www.agriculteur-normand.Com/actualites/phytophthora_infestans).

Mariette N. 2017. Trait de vie, adaptation et pouvoir invasif de lignées clonales de *phytophthora infestans*, agent de mildiou de pomme de terre. Thèse de Doctorat. Agrocampus, Ouest. France.

Mathieu P. 2016. Utilisation d'effecteurs de *phytophthora* sp pour aider à la recherche de géniteurs résistants chez solanacées. Equipe résistances durables chez solanacées (RDS). Centre INRA-Provence –Alpes-Cotes d'Azur, France.

Montarry J. 2007. Réponse adaptative des populations de *phytophthora infestans*, agent de mildiou de pomme de terre, au déploiement en culture de son hôte *solanum tuberosum*, Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie de Rennes, France.

of plant growth by *Bacillus* spp. *The Nature and Application of Biocontrol Microbes*. 94(11).

Ongena M., Jacques P. 2012. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16 (3).

Pathma J. Rahul GR. Kamaraj Kennedy R. Subashri R. and Sakthivel N. 2011. Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *Journal of Biological Control*. 25(3): 165-181.

Patrice T., Loure B. 2015. Mildiou de pomme de terre mesure de la lutte préventive. Réseau d'Avertissement Phytosanitaire. Page 06.

Pierre T., Romuald F. 2015. Mildiou de la tomate et de la pomme de terre. Réduire et Améliorer l'Utilisation des Phytos.

Rakotonindraina TF. 2012. Analyse et modélisation des effets des pratiques culturales sur les épidémies de mildiou de la pomme de terre. Adaptation du modèle SIPPOM au pathosystème. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, France.

Randriantsalama A., Randrianaivoarivony J. et Ramalanjaona V. 2014. L'utilisation de la lutte chimique et de la résistance variétales contre le mildiou de la pomme de terre à Madagascar. *African Crop Science*. 22: 959-968.

Sansinenea E. and Ortiz A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. 33: 1523–1538.

Vincent S. 2016. La lutte biologique avec *Bacillus thuringiensis*. Jardins de France.