

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA
Institut des Sciences et de Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



En vue de l'obtention du **diplôme de MASTER (Académique)**

En : **Science Biologique**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présenté Par : **Mlle. ALLAOUI BELLA yamina**

Mlle. GHELLOUS Karima

Intitulé

Etude des activités antifongiques de trois souches de *Bacillus subtilis* et de deux huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et *Artimisia judaica* contre quelques champignons phytopatogènes de la pomme de terre *Solanum tuberosum*

Soutenu, devant le jury composé de :

Président	Mr. Amrouche Abdelilah	M.C.A	Centre Université Naama
Encadreur	Mr. Kebdani mohammed	M.C.B	Centre Université Naama
Examineur	Mr .Gherib Mohammed	M.C.A	Centre Université Naama

Session : (Juillet 2021)
Promotion : 2016 / 2021



Remerciements

*On remercie **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu Avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr. KEBDANI Mohammed**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent à **Mr. Gherib Mohammed** pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.*

Nous remercions également les membres du jury qui nous ont fait un grand honneur en acceptant de participer à l'évolution de notre travail de mémoire.

*Nous tenons à remercier également **Mr. Amrouche Abdelileh**, pour leur générosité et leur disponibilité.*

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

*Merci à tous nos ingénieurs de **laboratoires de département des sciences de la nature et de la vie** pour leurs efforts puissants au cours de tous ces moments de ce travail et nous leur expriment toute notre gratitude pour leur aide. Nous saluons également toutes leurs qualités Humaines si rares de nos jours.*

Un grand merci chaleureux pour toutes les personnes qui nous ont aidés et contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous N'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail...

A celui qui m'a toujours nourrit d'amour et de tendresse, qui grâce à ses encouragements, son soutien et son compréhension et Surtout son affection j'ai pu avancer dans la vie. L'être le plus cher à mon cœur, mon très cher papa.

A celle qui m'a toujours encouragé « à sa manière », et qui m'a appris de ne jamais me contenter du minimum et que dans les études comme dans la vie il faut persévérer pour atteindre ses buts, m'a appris la soif scientifique et l'amour de la patrie, la prunelle de mes yeux ma très chère maman.

A mes chers soeurs: Fatma, Om kalthoum, Nor

A mes chers frères : Mohammed et Houcin

A mes tantest, oncles, cousins et cousines

A mes très chères amies, celles qui m'ont aidé et soutenu et Prit soin de moi : Karima, Houda, Khadidja, Hanane, Mounira, Salima ...

A la mémoire de ma chère Asmaa, que dieu la bénisse

A tous ceux qui m'aiment et a tout la promotion de Microbiologie

Appliquée 2020/2021.

Yamina



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon très cher père, que dieu le protège

A l'être le plus cher au monde, ma mère qui a été toujours présente pour moi et pour l'affection dont elle m'a fait preuve.

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance, mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis. Mon instruction et mon bien être. Puisse dieu le tout puissant vous accorde sante et longue vie.

A ma très cher grande mère ; que dieu la garde.

A mes chers frères : Hamza ; Mohamed, en leurs souhaitant que du bonheur.

A mes chers sœurs : Saida ; Fatima zohra ; Djawhar, en leurs souhaitant beaucoup de succès dans sa vie scolaire.

A tous les membres de la famille.

Je dédie également ce modeste travail à mon binôme yamina et cher amie Khadidja ; Hanan ; Nour elhouda.

A tous mes enseignants, depuis mes premières années d'études.

Enfin je tien à dédier aussi ce mémoire à tous mes m'aines, et puis à tous mes collègues de la promotion 2020/2021.

KARIMA

Résumé

L'objectif de ce travail consiste à étudier *in vitro* l'activité antifongique des deux huiles essentielles extraites par hydrodistillation de type Clevenger de deux plantes aromatiques et médicinales (*Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica*) qui présentent des rendement relativement importants et qui sont à l'ordre de 0,90% et 0,60% respectivement, contre quatre souches fongiques isolées et identifiées à partir des plantes malades de la pomme de terre *Solanum tuberosum L.* à savoir : *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp*) d'une part, et d'autre par l'évaluation de l'activité antagonistes des souches bactériennes locales de *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DCP*) par trois méthodes différentes : confrontation directe, confrontation indirecte et méthode de filtrat bactériennes sur trois champignons phytopathogènes parmi ceux cités précédemment et qui sont : *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*.

L'activité des deux huiles essentielles a été mise en évidence par la méthode de contact direct vis-à-vis les quatre souches fongiques. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* présente une activité inhibitrice plus importante par rapport à celle d'*Artemisia judaica*, dont la CMI de la première était est 0.25 µl/mL pour les quatre champignons traités. Alors que la CMI de la deuxième était de 3 µl/mL pour *Rhizopus sp* et de 4 µl/mL pour les deux genres *Fusarium* (*Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*)

Aussi, nos essais préliminaires d'antagonisme *in vitro* ont montrés que les souches bactériennes utilisées exercent des pouvoirs inhibiteurs considérables sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogène de la pomme de terre et qui varient entre (le plus petit pourcentage est 0.48%– 62.39% est le plus haut pourcentage) en fonction du champignon traité.

Mots Clés : Pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), *Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*, les huiles essentielles, Hydrodistillation, antagonisme, *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DCP*).

Summary

the objective of this work is to study the antifungal activity in vitro of the two oil essentials extracted by Clevenger type Hydrodistillation from two plants aromatic and medicinal (*Ammoides verticillata* and *Artemisia judaica*) which exhibit relatively high yields which are of the order of 0.90% and 0.60% respectively, against four fungal strains isolated and identified from diseased plants of the potato *Solanum tuberosum* L. namely *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp*) on the one hand, and other by evaluating the antagonistic effects of local bacterial strains of *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP) by three different methods direct confrontation, indirect confrontation and bacterial filtration methods of tree phytopathogenic fungi among those mentioned above and which are: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*).

The activity of the two essential oils was demonstrated by the method of direct contact with the four fungal strains. The obtained results show that the essential oil of *Ammoides verticillata* exhibits greater inhibitory effect compared to that of *Artemisia judaica*, including the MIC of first was 0.25 µl/mL for the four fungi treated. While the *Artemisia judaica* of the second was 3 µl/mL for *Rhizopus sp* and 4 µl/mL for both genera *Fusarium* (*Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*).

Also, our preliminary tests of antagonism in vitro showed that the bacterial strains used exert considerable inhibitory powers on the mycelia growth of phytopathogenic fungi of potato and that vary between (the smallest percentage is 0.48% - 62.39% is the higher percentage) depending on the fungus being treated.

Key words: potato (*Solanum tuberosum* L), *Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*, the essential oils, Hydrodistillation, antagonism, *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DCP).

الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط المضاد للفطريات في المخبر لكلا الزيوت الطيارة المستخرجة بواسطة التقطير المائي من نبتتين عطريتين وطببتين (*Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*) والتي تظهر عوائد عالية نسبيا تصل إلى 0.90 بالمئة و 0.60 بالمئة على التوالي مقابل أربع سلالات فطرية معزولة و محددة من النباتات المريضة من البطاطا (*Solanum tuberosum L*) وهي (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*) من ناحية وغيرها من خلال تقييم الأثار العدائية للسلالات البكتيرية المحلية (*B2C, BM14, S2DSP*) بثلاث طرق مختلفة: التماس المباشر و التماس الغير مباشر و طرق الترشيح البكتيري على ثلاث فطريات ممرضة للنبات من بين تلك المذكورة أعلاه و التي هي: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*

تم توضيح نشاط الزيتين الأساسيين من خلال طريقة الاتصال المباشر مع السلالات الفطرية الأربعة. النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن معروضات الزيت العطري من (*Ammoides verticillata*) لها تأثير مثبط أكبر مقارنة بتأثير (*Artemisia judaica*)، بما في ذلك قيم التركيز المنخفض المثبط الأول كان 0.25 ميكرو لتر/ملي لتر للفطريات الأربعة. في حين أن قيم التركيز المنخفض المثبط ل *Artemisia judaica* كانت 3 ميكرو لتر/ملي لتر *Rhizopus sp* و 4 ميكرو لتر/ملي لتر (*Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*) الجنسين:

أيضا، أظهرت اختباراتنا الأولية للعداء في المختبر أن تمارس السلالات البكتيرية المستخدمة قوى مثبطة كبيرة على النمو الفطري للفطريات الممرضة للنبات من البطاطا و التي تتفاوت بين (أصغر نسبة هي 0.48 بالمئة و أعلى نسبة هي 62.39 بالمئة) اعتمادا على الفطريات التي يتم علاجها.

الكلمات المفتاحية : البطاطا, (*Solanum tuberosum L*), *Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*, (*Bacillus subtilis* (*B2C, BM14, S2DCP*)). الزيوت الطيارة, التقطير المائي بالبخار, العداء البكتيري.

Liste des abréviations

ABREVIATIONS	Signification
%	Pourcent
C°	Degrés Celsius
PDA	Milieu de potato dextrose agar
GN	Gélose Nutritif
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire et de produits de santé
HE	Huile essentielle
MM	Millimètre
CM	Centimètres
ORL	oto-rhino-laryngologie
F.A.O	Organisation des Nation unies pour l'alimentation et l'agriculture
pH	Potentiel hydrogène
PCR	Polymérase Chain reaction
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	The National Center for Biotechnology
rpm	Rotation par minute

Listes des figures

Figure 1 : Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre.....	6
Figure 2: Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre et cycle végétatif.....	8
Figure 3 : Symptômes sur les différents organes du plant de pomme de terre.....	12
Figure 4 : Symptomes de l'alternariose sur feuilles de la pomme de terre.....	12
Figure 5 : Symptomes de Rhizoctone brune (noire) sur tubercules.....	13
Figure 6 : Symptomes de fusariose sur tubercules.....	14
Figure 7 : (A) poudre blanc typique de l'oïdium sur des feuilles de pomme de terre, (B) zone nécrotique sur tige.....	15
Figure 8 : Observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i>	18
Figure 9 : <i>Artemisia judaica</i> L ssp. <i>Sahariensis</i>	25
Figure 10 : <i>Ammonoïdes verticillata</i>	28
Figure 11: Situation géographique de la wilaya de Tlemcen.....	33
Figure 12 : Le verger de la plantes de pomme de terre étudié	34
Figure 13 : schéma présentent l'isolement des champignons phytopathogène par méthode de dilution.....	35
Figure 14 : confrontation directe entre <i>Bacillus subtilis</i> et les champignons phytopathogène sur milieu PDA.....	38
Figure 15 : confrontation indirecte entre <i>Bacillus subtilis</i> et les champignons phytopathogène sur milieu PDA.....	39
Figure 16 : schéma représente la méthode d'antagonisme par filtrat bactérienne	40
Figure 17 : Situation géographique de Djebel Aissa.....	41
Figure 18 : situation géographique la commune de Terni Béni Hdiel	42
Figure 19 : séchage et conservation des plantes aromatiques.....	43
Figure 20 : hydrodistillateur pour l'extraction de l'huile essentielle.....	44
Figure 21 : symptômes des maladies fongiques sur la pomme de terre.....	47
Figure 22 : photos des champignons isolées et purifiées.	48
Figure 23 : résultat de la culture monospore.....	49
Figure 24 : Culture pure à partir des monospores.	50
Figure 25 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur <i>Alternaria alternata</i>	56

Figure 26 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur <i>Fusarium oxysporum</i>	56
Figure 27 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur <i>Fusarium solani</i>	56
Figure 28 : activité antagoniste du <i>Bacillus subtilis</i> contre les champignons phytopathogènes de la pomme de terre par confrontation directe.	57
Figure 29 : taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur <i>Alternaria alternata</i>	60
Figure 30: taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur <i>Fusarium oxysporum</i> ...	60
Figure 31 : taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur <i>Fusarium solani</i>	60
Figure 32 : activité antagoniste de <i>Bacillus subtilis</i> contre les champignons phytopathogènes de pomme de terre par confrontation indirect.	61
Figure 33 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur <i>Alternaria alternata</i>	64
Figure 34 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur <i>Fusarium oxysporum</i>	64
Figure 35 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur <i>Fusarium solani</i>	64
Figure 36 : Activité antagoniste de <i>Bacillus subtilis</i> contre les champignons phytopathogènes de pomme de terre par méthode de filtrat bactérienne	65
Figure 37: huile essentielle d' <i>A. Verticillata</i>	67
Figure 38: huile essentielle d' <i>A. Judaica</i>	67
Figure 39 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	68
Figure 40 : Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	69
Figure 41 : Pourcentage d'inhibition de <i>Rhizopus sp</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	70
Figure 42 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Alternaria alternata</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	71
Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de <i>Fusarium solani</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	72
Figure 44 : Pourcentage d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	72
Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de <i>Rhizopus sp</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	73

Figure 46 : Pourcentage d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	74
Figure 47 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Alternaria alternata</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	74
Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de <i>Fusarium solani</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Artemisia judaica</i>	74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques de <i>Bacillus subtilis</i>	P18
Tableau 2 : composition chimique des huiles essentielles d' <i>Artemisia judaica</i>	P27
Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles.....	P29
Tableau 4 : Résultat du traitement des séquences des souches bactériennes (B2C- S2DSP-BM14) obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI.....	P37
Tableau 5 : Photos illustrent le résultat de l'isolement des champignons phytopathogènes à partir des plantes malades de la pomme de terre.....	P48
Tableau 6 : Identification macro-microscopique des isolats.....	P51
Tableau 7 : L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par confrontation directe....	P53
Tableau 8 : Pourcentages d'inhibition (par confrontation direct) de la croissance mycélienne des champignons en présence de trois bactéries de <i>Bacillus subtilis</i>	P55
Tableau 9 : l'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par confrontation indirecte.....	P57
Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons en présence de trois bactéries de <i>Bacillus subtilis</i> par confrontation indirect.....	P58
Tableau 11 : L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par filtrat bactérienne.....	P60
Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon en présence de filtrat bactérienne dans le milieu PDA.....	P61
Tableau 13 : Rendement des deux plantes aromatiques.	P63
Tableau 14 : Caractéristique des huiles essentielles.....	P63
Tableau 15 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Rhizopus sp</i> induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	P67

Tableau 16 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.....**P67**

Tableau 17 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.....**P68**

Tableau 18 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.....**P68**

Table des matieres

Remerciment	I
Dédicace	II
<hr/>	
Résumé	IV
Summary	V
ملخص	VI
<hr/>	
Liste des abréviations	VII
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	XI
Table des matieres	
<hr/>	
Introduction générale	1
Problématique	3
<hr/>	
Partie bibliographique	4
Chapitre I : La phytopathologie d'origine fongique de la pomme de terre	5
I.1. Généralités sur la plante hôte <i>Solanum tuberosum L.</i>	5
I.2. Caractéristiques de la plante	5
I.2.1. Taxonomie	5
I.3. Description Botanique	6
I.3.1. Le système aérien	6
I.3.2. Le système souterrain	7
	XIII

Table des matieres

I.4. Cycle de développement	7
I.4.1. Le cycle sexué	7
I.4.2. Le cycle végétative	7
I.5. Exigences pédo-climatiques de la pomme de terre	9
I.5.1. Exigence climatiques	9
I.5.1.1. Température	9
I.5.1.2. Lumière	9
1.5.1.3. Humidité	9
I.5.2. Exigence édaphiques	9
I.6. L'importance économique de la pomme de terre	10
I.6.1. L'importance économique de la pomme de terre au niveau de l'Algérie	10
I.6.2. L'importance économique de la pomme de terre au niveau mondial	10
I.7. Maladies et pertes de rendement causées par les champignons	11
I.7.1. Les principales maladies fongiques de la pomme de terre	11
I.7.1.1. Mildiou de la pomme de terre	11
I.7.1.2. Alternariose	12
I.7.1.3. Rhizoctone noir	13
I.7.1.4. Fusariose (la pourriture sèche)	14
I.7.1.5. Les oïdiums	14
Chapitre II: Présentation des agents de lute	
II.1. Présentation de l'agent antagoniste « la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> »	16
II.1.1. Généralités	16
II.1.2. Le genre <i>Bacillus</i>	16

Table des matieres

II.1.2.1. Définition	16
II.1.3. La bactérie <i>Bacillus subtilis</i>	17
II.13.1. Caractères de <i>Bacillus subtilis</i>	17
II.1.3.2. Classification	17
II.1.3.3. Caractères biochimiques	18
II.1.3.4. Intérêt de <i>Bacillus subtilis</i>	19
II.1.3.5. <i>Bacillus subtilis</i> dans la lutte biologique	19
II.2. Présentation des deux huiles essentielles des deux plants aromatiques « <i>Artemisia judaica</i>, <i>Ammoides verticillata</i> »	21
II.2.1. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales	21
II.2.2. Définition des huiles essentielles	21
II.2.3. Répartition des huiles essentielles dans la plante	22
II.2.4. Caractéristique physico-chimique de l'huile essentielle	22
II.2.4.1. Caractéristiques physiques des huiles essentielles	22
II.2.4.2. Composition chimique	22
II.2.5. Mode d'action contre les champignons	23
II.2.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	23
II.2.6.1. Par entraînement à la vapeur	23
II.2.6.2. Hydrodistillation simple	23
II.2.6.3. Distillation à vapeur saturée	24
II.2.6.4. Hydrodiffusion	24
II.2.6.5. Distillation assisté par micro-ondes	24
II.2.6.6. Distillation par des solvants volatils	24
II.2.7. <i>Artemisia judaica</i> L ssp. <i>Sahariensis</i>	24
	XV

Table des matieres

II.2.7.1.Présentation de la plante	24
II.2.7.2. Description Botanique	25
II.2.7.3. Systématique d' <i>Artemisia judaica L ssp sahariensis</i>	26
II.2.7.4. Les compositions chimiques	26
II.2.7.5. Propriétés thérapeutiques d' <i>Artemisia judaica L ssp</i>	27
II.2.8. <i>Ammoïdes verticillata</i>	27
II.2.8.1. Présentation de la plante	27
II.2.8.2. Description Botanique	28
II.2.8.3. Systématique d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	28
II.2.8.4. La composition chimique	29
II.2.8.5. Propriétés thérapeutiques	30
Chapitre III : Matériel et méthodes	
III.1. Sortie sur terrain et prospection des symptômes des maladies fongiques	33
III.2. Présentations du verger d'étude	33
III.3. Isolement et identification	34
III.3.1.Méthode direct	34
III.3.2.Méthode de dilution	34
III.4.Purification des souches fongique	35
III.5.Caractérisation et identification des isolats	36
III.5.1.L'aspect macroscopique	36
III.5.2.L'aspect microscopique	36
III.5.2.1.La technique de scotch	36
III.5.2.2.Culture monospore	36

III.6. Essais de lutte par trois souches de <i>Bacillus subtilis</i> et deux plantes (<i>Ammoïdes verticillata</i>, <i>Artemisia judaica</i>) contre les champignons phytopathogène isolés	37
III.6.1. Evaluation de l'activité antagoniste des souches de <i>Bacillus subtilis</i> contre les champignons phytopathogène isolés	37
III.6.1.1. Présentations des souches bactériennes utilisées	37
III.6.1.2. Repiquage et revivification des souches bactériennes	38
✓ Méthode de confrontation directe entre bactérie et champignon phytopathogène	38
✓ Méthode de confrontation indirecte entre bactérie et champignon phytopathogène	39
✓ Méthode de filtrat bactérienne	39
III.6.2. Etude des potentialités antifongiques des huiles essentielles de deux plantes aromatiques <i>Ammoïdes verticillata</i> et <i>Artemisia judaica</i> contre les champignons phytopathogène isolés	41
III.6.3. Matériel végétale	41
III.6.3.1. Récolte de matériel végétale	41
III.6.3.2. Identification botanique	42
III.6.3.3. Préparation des échantillons	42
III.6.4. Méthode d'extraction de l'huile essentielle	43
III.6.5. Conservation des huiles essentielles	44
III.6.6. Détermination du rendement en huile essentielle	44
III.7. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles obtenues	45
III.7.1. Préparation des suspensions fongiques	45
III.7.2. Méthode de diffusion par disque	45
III.7.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition	45
III.8. Les analyses statistiques	45

Table des matieres

Chapitre IV: résultats et discussions	
IV.1. Prospection	47
IV.2. Isolement et identification des champignons	47
IV.2.1. Isolement des champignons	47
IV.2.2. Purification des isolats	48
IV.2.3. Identification des isolats	49
IV.3. Evaluation de l'activité antifongique	53
IV.3.1. Activité antifongique des souches bactériennes (<i>Bacillus subtilis</i>)	53
IV.3.1.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste de <i>Bacillus subtilis</i> in vitro	53
IV.3.1.1.1. Résultats des essais de la confrontation directe	53
IV.3.1.1.2. Résultats des essais de la confrontation indirecte	58
IV.3.1.1.3. Résultats des essais de la méthode d'antagonisme par filtrat bactérienne	62
IV.4. Evaluation de l'activité antifongique des deux huiles essentielles d'<i>Artemisia judaica</i> et <i>Ammoïdes verticillata</i>	66
IV.4.1. Extraction des huiles essentielle	66
IV.4.2. Caractéristique des huiles essentielles	66
IV.4.3. Activité antifongique des deux huiles essentielles	67
IV.4.3.1. Cas d'HE d'<i>Ammoïdes Verticillata</i>	67
IV.4.3.2. Cas d'HE d'<i>Artemisia judaica</i>	69
IV.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	69
Discussion générale	75
Conclusion	81
Référence bibliographiques	84
Annexe	

Introduction générale

Introduction générale :

La pomme de terre est la quatrième culture la plus importante dans le monde après le riz, le maïs et le blé. Elle est largement répandue dans le monde. La production mondiale est de 360.886.519 tonnes métriques réparties entre 152 pays producteurs de la pomme de terre dans une surface de 20 millions d'hectares (F.A.O., 2013). La diminution de la culture agricole causées par la présence des agents pathogènes tels que les champignons ; les bactéries ; les ravageurs ; les virus...

Les microorganismes pathogènes sont difficiles à contrôler car ils peuvent survivre dans le sol pour de longues périodes (Tschen, 1985). Les champignons sont les principaux agents infectieux des plantes, responsables des altérations au cours des stades de développement, et sont les principaux micro-organismes responsables de pertes en agriculture (Kacemi et al., 2017). Pour lutter contre ces agents pathogènes, l'application illimitée de pesticides, peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines et l'apparition de souches pathogènes résistantes. Pour cela, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et sont plus respectueuses de l'environnement et la santé humaine (Prapagdee et al., 2008).

La lutte biologique est limitée à l'utilisation des organismes antagonistes (généralement des microorganismes). Les effets d'antagonistes sont directs ou indirectes et peuvent être dus aux organismes introduits ou à la manipulation des organismes existants (Nasraoui, 2006).

Les agents de lutte biologique peuvent être de plusieurs types : des virus (*Cydia pomonella*, *Pandemis heparana*...), des bactéries (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*...) et des Champignons (*Metarhizium anisopliae*, *Coniothyrium minitans*...). Comme ils peuvent être aussi des molécules bioactives des plantes telle que celles présentes dans leurs huiles essentielles.

Parmi les bactéries de genre *Bacillus*, les *Bacillus subtilis* forment un important groupe d'antagoniste.

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont fréquemment utilisées dans le processus de la lutte contre ces phytopathogènes, ce moyen alternatif de protection des plantes par des antagonistes bactériens semble être une solution à la fois élégante et respectueuse de l'environnement, elle répond aux exigences économiques et écologiques. Cette forme de bio-

protection permet de réduire et ou d'inhiber la croissance et le développement des champignons phytopathogène. (Saidi *et al*, 2009).

Aussi, plusieurs huiles essentielles possèdent des activités antimicrobiennes. Certaines entre eux sont déjà classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Gachkar *et al*, 2007; Rasooli *et al*, 2008).

Les huiles essentielles des plantes sont obtenues a partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (burt, 2004), mais également a partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres.

L'objectifs de notre travail c'est l'étude de l'effet antifongique in vitro des huiles essentielles des deux plantes aromatiques (*Ammoides verticillata et Artemisia judaica*), et les potentialités antagonistes de trois souches bactériennes du genre *Bacillus subtilis* (B2C ; BM14 ; S2DSP), isolées à partir des sols des vergers agrumicoles situés dans le nord de l'Algérie, sur des quatre souches fongiques phytopathogène de la pomme de terre (*Alternaria alternata, Rhizopus sp, Fusarium solani, Fusarium oxysporum*), et ceci par des différents modes de confrontations in vitro.

Problématique :

La présence des agents phytopathogène dans les exploitations agricoles peuvent causer des dommages sévères, il s'agisse des bactéries, des champignons ou des virus.

Pour la pomme de terre qui est une culture d'importance économique majeure dans l'Algérie, les dégâts peuvent atteindre la destruction totale des cultures, à l'instar des maladies cryptogamies, causée par plusieurs champignons phytopathogène à savoir : *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizopus sp.*

La lutte biologique par l'utilisation des antagonistes ou des substances naturelles connaît un regain d'intérêt grandissant en raison des risques potentiels de la lutte chimique sur l'environnement et sur la qualité et les perspectives nouvelles qu'offre cette approche pour la culture biologique.

L'objectif de notre travail c'est l'étude des maladies d'origine fongique de la pomme de terre qui ont des répercussions sur le rendement de cette culture et de proposer des moyens de la lutte biologique par l'utilisation de bactérie *Bacillus subtilis* et les huiles essentielles de deux plantes aromatique (*Ammoïdes verticillata*. *Artemisia judaica*).

Synthèse
Bibliographique

Chapitre I : La phytopathologie d'origine fongique de la pomme de terre.

I.1. Généralités sur la plante hôte *Solanum tuberosum* L. :

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante vivace dicotylédone tubéreuse, herbacée, cultivée pour ses tubercules riches en amidon et possédant des qualités nutritives, originaire d'Amérique du Sud. Elle appartient à la famille des Solanacées, qui sont des plantes à fleurs, et partage le genre *Solanum* avec au moins 2 000 autres espèces, entre autres la tomate, l'aubergine, le tabac, le piment, et le pétunia (Boufares, 2012).

La pomme de terre est originaire de l'Amérique du sud, elle est apparue sur les hauts plateaux des Andes péruviennes et colombiennes, en suite elle arrivé en Europe en sixième siècle, elle à été cultivé en Algérie en dix-neuvième siècle. (Ministère du commerce Agence nationale de promotion du commerce extérieur, 2013).

I.2. Caractéristiques de la plante :

I.2.1. Taxonomie :

La pomme de terre (*S. tuberosum* L.) appartient à la famille des Solanacées. Le genre *Solanum* est très vaste, dont 200 espèces sont tubéreuses (Rousselle et al, 1996).

-Selon la classification de Cronquist (1981), la pomme de terre appartient au:

- ✓ Règne : Plantae
- ✓ Sous-règne : Tracheobionta
- ✓ Division : Magnoliophyta
- ✓ Classe : Magnoliopsida
- ✓ Sous-classe : Asteridae
- ✓ Ordre : Solanales
- ✓ Famille : Solanaceae
- ✓ Sous-famille : Solanoideae
- ✓ Genre : *Solanum*
- ✓ Espèce : *Solanum tuberosum* L

I.3. Description Botanique :

La plante est une espèce herbacée vivace par ces tubercules, mais cultivée aussi en culture annuelle (**Rousselle et al, 1996**). Les différentes espèces et variétés de pomme de terre ont des caractéristiques botaniques différentes et c'est pour cela qu'il est nécessaire de connaître les différentes parties de la plante (**Bamouh, 1999**) (**Fig.01**). Dont elle est constituée essentiellement de deux parties :

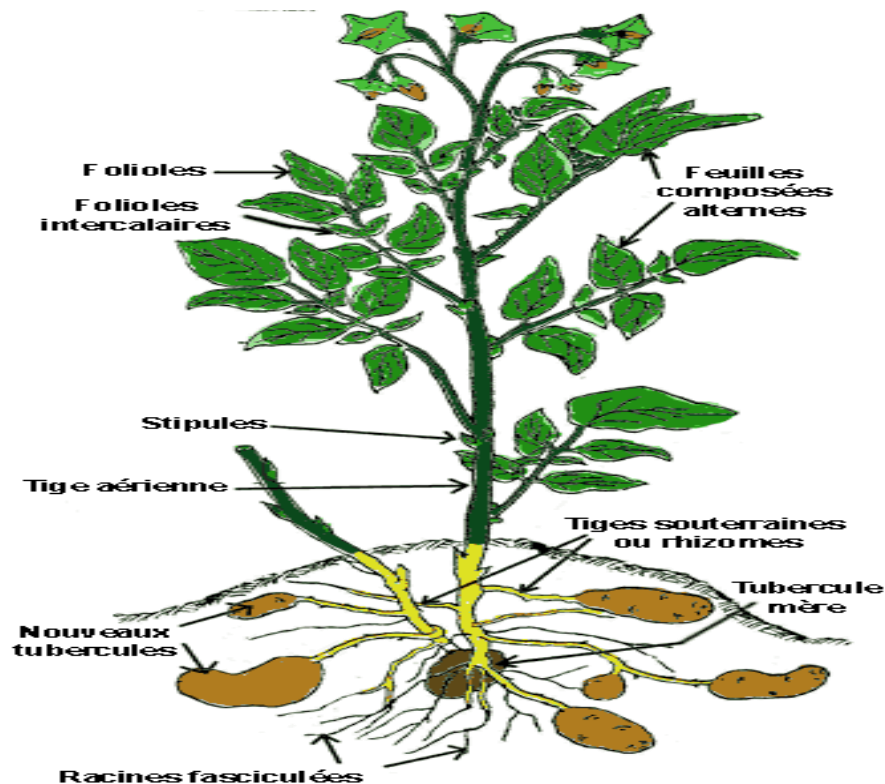


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre (Boufares, 2012).

I.3.1. Le système aérien :

- Les tiges aériennes, au nombre de 2 à 10, parfois plus, et ont un port plus ou moins dressé et une section irrégulière
- les feuilles sont Ovale et pointue, la couleur de la fleur varie du blanc au violet, Les fleurs, dont la couleur et le nombre caractérisent les variétés. Sont généralement autogames, mais souvent stériles.
- Les fruits ou baies qu'elles produisent contiennent des graines dont l'intérêt est nul en culture (**Soltner, 1979**).

I.3.2. Le système souterrain :

Représente la partie la plus intéressante de la plante puisqu'on y trouve les tubercules qui confèrent à la pomme de terre sa valeur alimentaire, L'appareil souterrain comprend le tubercule mère desséché et des tiges souterraines ou stolons (**Bernhards, 1998**).

Le tubercule de pomme de terre ne fait pas partie de la racine, c'est la tige souterraine. Comme toutes les tiges, il est constitué d'entre nœuds, qui dans ce cas sont courts et disposés en ligne, avec des bourgeons appelés «yeux» poussant dans de petites dépressions.

En cours de développement, les bourgeons donnent les germes et les futures tiges aériennes et les racines prennent naissance sur différentes parties : au niveau des nœuds enterrés, au niveau des nœuds des stolons ou encore au niveau des yeux du tubercule (**Boufares, 2012**).

I.4. Cycle de développement :

I.4.1. Le cycle sexué :

Le fruit est une baie sphérique ou ovoïde de 1 à 3 centimètres de diamètre, il contient généralement plusieurs dizaines de graines (**Bernhards, 1998**), et peut contenir jusqu'à 200 graines (**Rousselle et al, 1992**). La germination est épigée et les cotylédons sont portés au-dessus du sol par le développement de l'hypocotyle. En conditions favorables, quand la jeune plante a seulement quelques centimètres de hauteur, les stolons commencent à se développer d'abord au niveau des cotylédons puis aux aisselles situées au-dessus, et s'enfoncent dans le sol pour donner des tubercules (**Bernhards, 1998**).

I.4.2. Le cycle végétatif :

Le tubercule n'est pas seulement un organe de réserve, mais aussi des organes. Pour la reproduction végétative, Le cycle végétatif de la pomme de terre comprend **4 étapes** :

Les tubercules entreront dans un état de dormance même dans des conditions optimales de température et d'humidité, et leurs bourgeons ne pourront pas germer. La durée de cette période dépend de facteurs tels que la variété, le degré de maturité à la récolte et la température pendant le stockage. (**Moule, 1982**). Après une évolution physiologique interne, les tubercules deviennent capables d'émettre des bourgeons (**Soltner, 2005**). Le tubercule en

germination se transforme en une tige feuillée et ses bourgeons axillaires poussent des branches sur le sol et sous la tige. Après un certain temps, l'extrémité du stolon cesse de croître et gonfle pour former un blanc de tubercule en une semaine ou deux. (Fig.02).

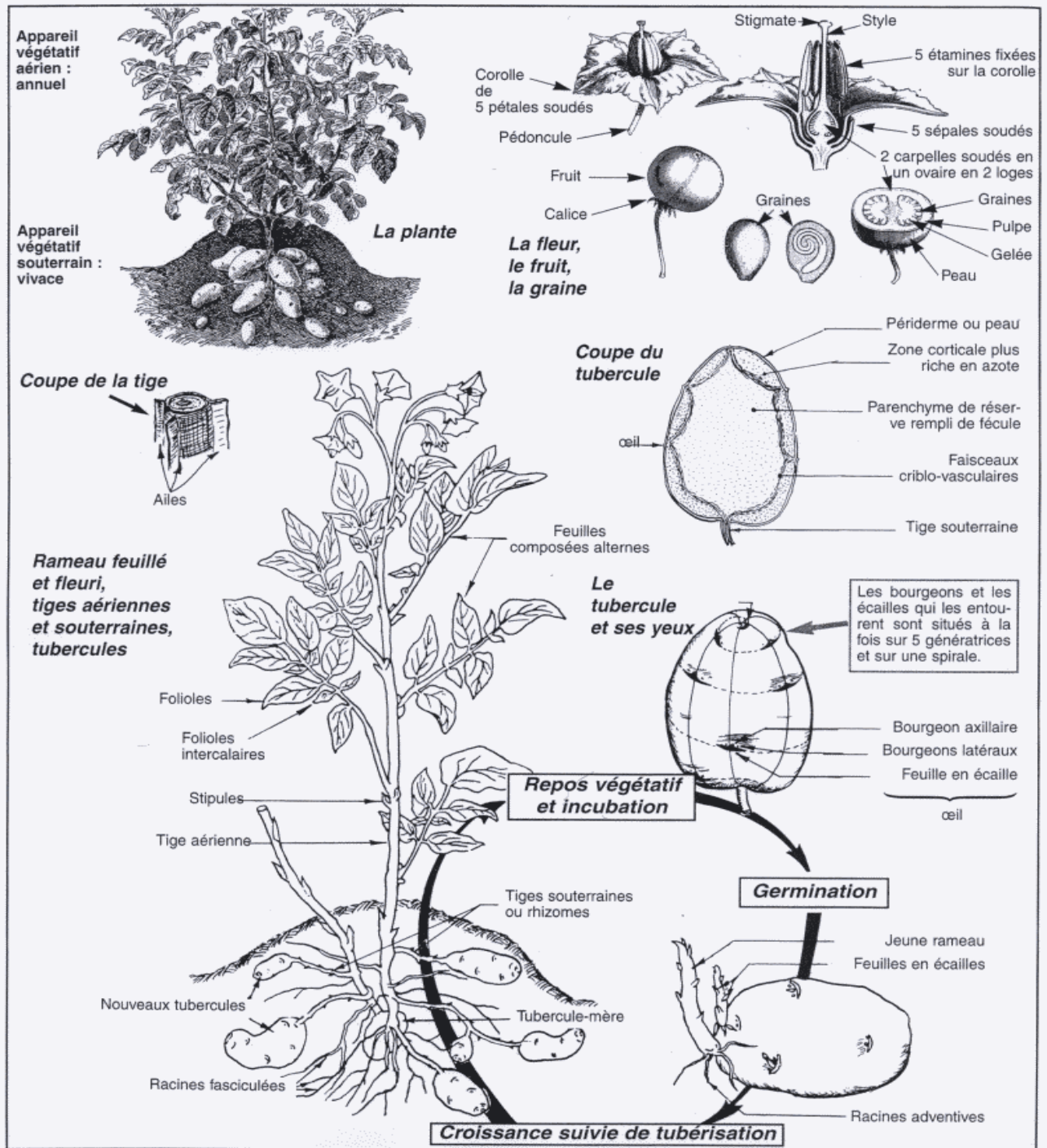


Figure 2: Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre et cycle végétatif. (Soltner, 2005)

I.5. Exigences pédo-climatiques de la pomme de terre :**I.5.1. Exigence climatiques :**

La pomme de terre s'adapte sous tous les climats et se cultive bien dans les pays chauds que les pays froids (**Benniou, 1988**).

I.5.1.1. Température : La température représente un paramètre climatique très important pour le développement et la croissance de la pomme de terre. La croissance est ralentie à moins de 10°C, ses parties foliacées gèlent à moins de 1°C. Les hautes températures stimulent la croissance des tiges, alors que les basses températures favorisent d'avantage la croissance du tubercule (**Mansouri, 2003**).

I.5.1.2. Lumière : A la pré-germination, un éclaircissement suffisant favorise le développement des germes courts et vigoureux (2-3 cm) et bien colorés (**Soltner, 1999**). La croissance végétative de la pomme de terre est favorisée par la longueur du jour élevée (14 à 18 heures), une photopériode inférieure à 12 favorise la tubérisation (**Chibane, 1999**).

I.5.1.3. Humidité : L'humidité optimale du sol doit être maintenir à 80%. Il est important de maintenir cette humidité pendant toute la végétation jusqu'à la pleine formation des tubercules (**Kolev, 1979**).

I.5.2. Exigence édaphiques :

Malgré que la plupart des sols conviennent à la culture de pomme de terre à condition qu'ils soient bien drainés et pas trop pierreux, les sols préférés sont ceux qui sont profonds, fertiles et meubles. (**Benniou, 1988 ; Mansouri, 2003**). Elle est relativement tolérante à la salinité en comparaison aux autres cultures maraichères (**Benniou, 1988**). Cependant, un taux de salinité élevé peut bloquer l'absorption de l'eau par son système racinaire (**Chibane, 1999**).

La culture de la pomme de terre donne de bons rendements dans les sols légèrement acides (pH = 5.5 à 6) (**Cherfi, 1989 ; Bamouh, 1999 ; Lahmissi, 2004 ; Aired, 2007**) et très légèrement calcaires. **Soltner (1988)**.

I.6. L'importance économique de la pomme de terre :**I.6.1. L'importance économique de la pomme de terre au niveau de l'Algérie :**

La pomme de terre *Solanum tuberosum* L est l'un des produits les plus importants pour l'alimentation de la population algérienne: elle occupe la deuxième place après le blé. Du point de vue de sa production et de son importance économique, la pomme de terre reste une culture stratégique en Algérie. Cette culture a pris de l'extension dans les régions du Nord et se développe actuellement dans le Sud algérien. Sa production reste très variable selon les années, allant de 1,5 million de Tonnes à près de 2 millions de tonnes, pour une superficie fluctuant entre 85 000 à 100 000 ha pour les 3 types de production (Primeur, Saison, Arrière-saison) (CNCC, 2013).

En 2013, l'Algérie a occupé la deuxième place, après l'Égypte, dans la production de la pomme de terre en Afrique. La production nationale durant la dernière décennie (2003-2013) à augmenter de **1 879 918** tonnes en 2003 à **4 400 000** tonnes en 2013 pour une augmentation de la surface cultivée de **88 660** hectares en 2003 à **140 000** hectares en 2013. L'accroissement du rendement est aussi très significatif, de 21.20 tonnes par hectare en 2003 à 31.43 tonnes par hectare en 2013 ; c'est en dehors de la production de semences qui montre une nette augmentation durant cette période. (FAO.STAT, 2015).

I.6.2. L'importance économique de la pomme de terre au niveau mondial :

La culture de la pomme de terre est l'une des principales cultures alimentaires dans le monde. Sa production mondiale est passée de 334,0 millions de tonnes en 2009 à 374,4 millions de tonnes en 2011 (FAO stat; 2013). Elle joue un rôle important dans l'économie de nombreux pays, et peut présenter une solution aux problèmes de déficit alimentaire mondial (Rajncapel, 1987). Le secteur de la pomme de terre est en pleine évolution.

La production et la demande de pommes de terre ont enregistré une forte croissance en Asie, en Afrique et en Amérique latine, où la production est passée de moins de 30 millions de tonnes au début des années 60 à plus de 165 millions de tonnes en 2007. Dans les pays développés, la consommation de pomme de terre a augmenté considérablement et représente plus de la moitié de la récolte mondiale qui a atteint le chiffre record de 324 millions de tonnes en 2007. (FAO.STAT).

Elle est en première ligne dans la lutte contre la faim et la pauvreté dans le monde. La FAO a déclaré l'année 2008 comme étant l'année internationale de la pomme de terre (FAO, 2008).

I.7. Maladies et pertes de rendement causées par les champignons :

La pomme de terre est l'une des cultures, la plus exposée aux agents de maladies et ravageurs appartenant à des groupes taxonomiques les plus divers, occasionnant parfois des dégâts importants.

I.7.1. Les principales maladies fongiques de la pomme de terre :

I.7.1.1. Mildiou de la pomme de terre : l'ennemi juré du tubercule dû à une moisissure aquatique, (*Phytophthora infestans*). Elle reste le principal facteur limitant à l'échelle mondiale (Duvauchelle et Andrivon, 1996). Le mildiou peut détruire une culture entière en moins de deux semaines, les pertes de rendements atteignent alors 100% (Gaucher et al, 1998).

❖ **Les symptômes :** Le mildiou peut attaquer tous les organes aériens de la plante. Il se caractérise par le développement de taches d'abord humides, voire de plages, sur les folioles. Ces attaques confèrent localement aux tissus touchés une teinte vert pâle à vert brun (Agrios, 2005). Lorsque les conditions sont particulièrement favorables, la progression des symptômes sur les folioles est fulgurante ; les feuilles, les rameaux voire les plants entiers, finissent par se nécroser et se dessécher entièrement (Nelson, 2008).

Sur la tige, le symptôme typique est une nécrose brun violacé, s'étendant sur 2 à 10 cm à partir d'un nœud. Par temps humide, cette nécrose se couvre d'une couche poudreuse blanche ou grisâtre (Rousselle et al, 1996). (Fig.03).



Figure 3 : Symptômes sur les différents organes du plant de pomme de terre (Agris, 2005).

- ❖ **La lutte :** La lutte doit être préventive : utilisation des plants sains, bonne buttage et Protection fongicide. Les produits efficaces contre le Mildiou sont les produits à base de Cuivre.

I.7.1.2. Alternariose : L'alternariose est provoquée par les champignons (*Alternaria solani*) et (*A. alternata*). Les *Alternaria* spp. Également appelées moisissures noires sont des agents pathogènes et des saprophytes omniprésents contaminant plusieurs cultures (fruits, légumes, céréales et oléagineux) au stade de pré et post-récolte. Ils peuvent se produire à basses températures entre 20 et 25°C (Paterson et Lima, 2011). Se transmet par le vent et la pluie. La maladie provoque surtout des dégâts en climat continental, chaud et sec, mais est accentuée en culture irriguée.

- ❖ **Les symptômes :** Sur feuilles taches nécrotiques, bien délimitées, de taille variable, situées plutôt sur les feuilles du bas ; présence d'anneaux concentriques sur les taches importantes. Sur tubercules : pourritures brunes à noires, très sèches, assez typiques, avec une dépression. (Fig.04).



Figure 4: Symptômes de l'alternariose sur feuilles de la pomme de terre (Original, 2017).

- ❖ **La lutte** : *Alternaria* sp est un champignon du sol. Lorsque les plantes sont atteintes, il faut enlever l'intégralité de la plante de son système racinaire pour ne pas laisser de tissus végétaux contaminés dans le sol et brûler le tout. L'application de fongicides lutte contre le mildiou, en particulier ceux contenant du mancozèbe. Des traitements spécifiques peuvent être nécessaires pour les variétés sensibles.

I.7.1.3. Rhizoctone noir : Il est provoqué par un champignon (*Rhizoctonia solani*), qui se développe à partir des sclérotés noirs fixés sur le tubercule-mère ou présents dans le sol. Ces sclérotés constituent la forme de conservation du champignon. Le rhizoctone peut entraîner des pertes de rendement jusqu'à 20%. Le calibrage et la qualité des tubercules peuvent être fortement altérés, allant jusqu'à rendre un lot non commercialisable en pommes de terre lavées.

- ❖ **Symptômes** : manque ou retard à la levée (nécroses sur germes) (Anonyme, 1979). Nécroses sèches et bien délimitées sur la partie souterraine des tiges ou les stolons (Soltner, 1979). Les tubercules atteints de rhizoctone en peu décrit, est constituée de petites taches brunâtres arrondies et assez bien délimitées, d'un diamètre qui dépasse rarement 4 à 5mm (Abd El Monaim hassi, 1999). (Fig.05).



Figure 5 : symptômes de rhizoctone brun (noire) sur tubercules

<http://plantdepommedeterre.org/index/>

- ❖ **La lutte** : En raison des possibilités de conservation du champignon dans le sol. Et afin d'éviter son introduction et son maintien, la pomme de terre ne devrait pas être introduite dans la rotation que tous les cinq ans. Les cas de dommages les plus graves s'observent lorsque elle est cultivée sur la même parcelle chaque année (Moule, 1972).

I.7.1.4. Fusariose (la pourriture sèche) : Elle est provoquée par des champignons du genre *Fusarium* (*Fusarium roseum*, *Fusarium solani*...). Cette maladie peut exceptionnellement être observée dès la récolte mais généralement, elle se manifeste en cours de conservation, provoquant la destruction du tubercule. Le tubercule et la terre contaminés véhiculent le champignon et sont ses vecteurs de propagation ; Le champignon à l'origine de la fusariose peut rester dans le sol ou dans les débris végétaux d'une année sur l'autre grâce à sa forme de conservation, les chlamydospores, le champignon peut aussi se conserver dans les locaux de conservation et sur le matériel.

- ❖ **Symptômes :** provoquent généralement un flétrissement des organes. Des coupes transversales dans les rameaux révèlent fréquemment des brunissements des vaisseaux. Des symptômes foliaires asymétriques sont souvent observés, ainsi que des changements de couleurs, des altérations d'organes, des modifications anatomiques et des altérations du métabolisme (**Lepoivre, 2003**). (**Fig.06**).



Figure 6 : symptômes de fusariose sur tubercules. (<http://www.syngenta.fr/>)

- ❖ **La lutte :** La fusariose ne se traite pas bien, d'où l'importance de la prévention car les seules interventions efficaces sont préventives et non curatives. Le traitement de la fusariose s'avère quasiment impossible... Si la maladie se déclare, il faut lutter rapidement, en détruisant sur place les sujets atteints, par arrachage et brûlage intégral, pour enrayer la propagation. Il est donc essentiel de bien respecter les mesures prophylactiques. Utiliser des graines et tubercules traités préventivement par un fongicide. Choisir des variétés résistantes et s'assurer de la qualité sanitaire des plants. Pratiquer une rotation longue des cultures (6 ans au moins).

I.7.1.5. Les oïdiums : L'oïdium ou les blancs représentent un groupe de maladies très répandues qui affectent pratiquement toutes les espèces végétales. L'oïdium provoque des

pertes de production de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) Dans une grande partie du monde. L'agent causal a généralement été signalé comme étant *Erysiphe cichoracearum* (Easton, G. D, and Nagle, M. E. 1990), parfois appelé *Golovinomyces cichoracearum* Les champignons en cause sont réunis dans l'ordre des Erysiphales, sont des parasites obligatoires se développant essentiellement sur les feuilles les boutons et les fruits.

- ❖ **Symptômes** : Cette maladie est caractérisée par la présence d'une poudre blanche à la surface des feuilles et des fruits (Bouquet et al, 2000). (Fig.07).



Figure 7 : (A) poudre blanc typique de l'oïdium sur des feuilles de pomme de terre (Photo de Phil Hamm). (B) : zones nécrotiques sur tige. Photo de Kathy Merrifield, 1990.

- ❖ **La Lutte** : Il est recommandé de traité l'oïdium de manière préventive et curative :
 - ☞ Aérez bien les plantations afin d'éviter que l'humidité ne stagne.
 - ☞ Supprimez immédiatement les parties touchées.
 - ☞ Brûlez les feuilles et les parties infestées de la plante
 - ☞ Evitez les arrosages excessifs.
 - ☞ Pulvérisez éventuellement un fongicide. <https://www.jardiner-malin.fr/>

Chapitre II : Présentation des agents de lutte

II.1. Présentation de l'agent antagoniste « la bactérie *Bacillus subtilis* » :

II.1.1. Généralités :

En raison des effets nocifs de l'utilisation d'insecticides, La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme (Cook, 1993; Benbrook et al, 1996).

La lutte biologique est l'usage d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles (Riba et al, 2008). En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogène (Emmert et Handelsman, 1999). Elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990; Toussaint, 1996).

Les micro-organismes utilisés en lutte microbiologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. À ce jour, plusieurs milliers de micro-organismes entomopathogènes et pathogènes des mauvaises herbes ont été décrits et plus d'une centaine d'espèces sont utilisées en champs (Ignoffo, 1970, 1973). Les formulations de biocides à base de micro-organismes deviennent de plus en plus performantes avec des prix compétitifs (Ahmed et al, 1994; Starnes et al, 1993).

II.1. 2. Le genre *Bacillus* :

II.1.2.1. Définition :

Les espèces du genre *Bacillus* sont des Bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *licheniformis*, *megaterium* et *subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Holt et al., 1994)

Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires. Elles produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiant, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (**Holt et al. 1994**). Le genre *Bacillus* et certaines de ses espèces portent une place importante dans l'histoire de la bactériologie

II.1.3. La bactérie *Bacillus subtilis* :

II.1.3.1. Caractères de *Bacillus subtilis*:

C'est une espèce très répandue dans la nature, elle abonde dans le sol, l'air, les eaux. Les cellules sont des bâtonnets cylindriques à extrémité légèrement arrondies mesurant 4 à 5,5 μ de long sur 0,7 à 0,8 μ de large, ils sont isolés, réunis en chaînes plus ou moins longues. Les chaînes sont mobiles par des cils péritriche comme les bâtonnets isolés, ce bacille y donne en vingt quatre heures, de petites colonies rondes, jaunâtres, discoïdes. Cette espèce ne semble avoir aucune action pathogène (**E. Macé, 1897**).

C'est une bactérie aérobie pouvant se développer en anaérobiose par fermentation en présence de nitrate comme accepteur final d'électrons (**Nakano Mm, Dailly Yp, Zuber P, Clark Dp .1997**). (**Fig.8**).

II.1.3.2. Classification :

Les Bacilles appartiennent à la famille des Bacillaceae à l'ordre des Bacillales, à la classe Bacilles (Bacilli) (**Maughan et Van der Auwera, 2011**).

- **Domaine:** Bacteria
- **Phylum:** Firmicutes
- **Classe:** Bacilli
- **Ordre:** Bacillales
- **Famille:** Bacillaceae

- **Genre:** *Bacillus*
- **Espèce:** *Bacillus Subtilis* (Ehrenberg, 1835) (Cohn, 1872)

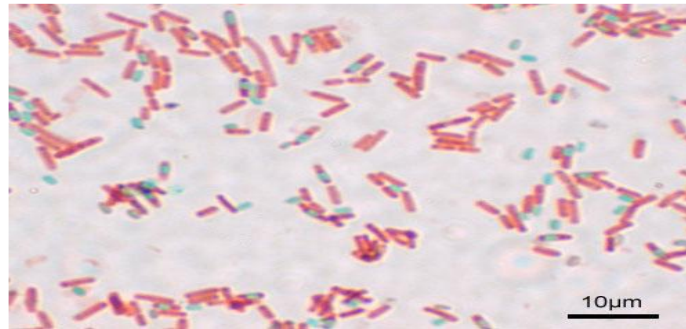


Figure 8: Observation microscopique de *Bacillus subtilis* (Bridier et al ,2010).

II.1.3.3. Caractères biochimiques :

Bacillus subtilis fait partie d'un groupe taxonomique complexe dont les membres sont difficilement différenciables phénotypiquement.

Le tableau suivant résume les caractères biochimiques de *B.subtilis* :

Tableau 1: Caractères biochimiques de *Bacillus subtilis* (Sagar Aryal, 2018)

Catalase	+
Réaction de Voges-Proskauer	+
Gaz	-
Citrate	+
Gélatinase	+
Indole	-
Rouge de méthyle	-
Réduction de nitrate en nitrite	+
Oxydase	<i>Variable</i>
Uréase	-

II.1.3.4. Intérêt de *Bacillus subtilis* :

Sa capacité à croître rapidement, à atteindre de hautes densités cellulaires et à sécréter un grand nombre de molécules en a fait un outil suscitant l'intérêt des industries agroalimentaires et sanitaires. *Bacillus subtilis* est capable de produire des molécules peptidiques qui ne sont pas issues du dogme central de la biologie moléculaire qui est la synthèse peptidique non ribosomale NRPS (**Boston, 2001**).

L'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et biochimique, s'intéresse aussi à *Bacillus subtilis*. Elle est, en effet, source d'enzymes industrielles telles les amylases, utilisées dans l'industrie du pain, ou encore des protéases et cellulases, dans l'industrie des détergents. Sa capacité à produire des antibiotiques, comme la bacitracine en fait un organisme d'intérêt également pour l'industrie pharmaceutique. (**Kunst et al. 1997**).

Bacillus subtilis a également montré d'autres applications bénéfiques dans la production agricole, l'ingénierie environnementale et les processus industriels. Par exemple, certaines souches peuvent favoriser la croissance des plantes dans les cultures horticoles, de plein champ et fruitières (**Adesemoye et al, 2008 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009**). Elle peut également être utilisée pour la bioremédiation des sols pollués par le pétrole brut et les métaux lourds, ainsi que pour la bioremédiation des effluents industriels textiles.

II.3.5. *Bacillus subtilis* dans la lutte biologique:

La rhizobactérie *B. subtilis* est l'une des bactéries Gram+ les plus étudiées (**Sonenshein et al, 2000a**). Elle dédie environ 5% de son génome à la synthèse d'antibiotiques et produit plus d'une vingtaine de composés antimicrobiens aux structures différentes (**Ongena et Jacques 2008**). La biosynthèse de molécules lipopeptidiques est l'un des mécanismes d'action majeurs de *B. subtilis* lui permettant la colonisation du milieu. Cette bactérie est actuellement utilisée comme agent de biocontrôle et les lipopeptides qu'elle produit font partie ceux les plus connus actuellement (**Jacques et al, 2014**).

La revue de Marc Ongena et Philippe Jacques dans Trends in Microbiology (**Ongena and Jacques, 2008**) a pour la première fois fait le bilan des propriétés de ces molécules à mettre en relation avec l'activité de biocontrôle des *Bacillus sp.* Ces propriétés sont de trois natures :

1) Des lipopeptides (essentiellement les surfactines) favorisent la croissance de la souche qui les produit donc potentiellement la colonisation des racines et des feuilles.

2) Des lipopeptides (essentiellement les fengycines et les iturines) inhibent la croissance et/ou la germination d'un grand nombre de champignons phytopathogènes.

3) Des lipopeptides (essentiellement les surfactines et les fengycines) sont des stimulateurs des défenses naturelles des plantes.

L'antagonisme d'une variété de souches de *B. subtilis*, ou leur surnageant acellulaire ainsi que l'activité directe de lipopeptides isolés ont été évalués sur une large gamme de champignons pathogènes (Touré et al., 2004; Leclère et al., 2005; Romero et al., 2007a; Kim et al., 2010; Dunlap et al., 2011; Tao et al., 2011; Liu et al., 2014; Arroyave-Toro et al., 2017; Mejri et al., 2017; Mihalache)

Les effets antagonistes de *B. subtilis* sont associés à au moins cinq mécanismes :

- 1) le parasitisme direct, où les bactéries se déplacent vers les spores en germination et se fixent à la surface via la polarité (korsten and Jager, 1995).
- 2) production d'antibiotiques extracellulaires, comme la bacilomycine, l'iturine, la mycosubtiline et la zwittermicine (Pal et Gardener, 2006 ; Fickers, 2012).
- 3) production d'enzymes lytiques, comme la chitinase, la protéase, la -1,3 glucanase et la cellulose (Kumar et al, 2012). Qui dégradant la paroi cellulaire.
- 4) la compétition pour les nutriments sur l'hôte, qui provoque un stress nutritionnel et une famine chez le champignon en germination (Janiciewickz et al, 2003).
- 5) la stimulation des défenses de l'hôte par une résistance systémique induite via la voie de l'acide jasmonique (Van Loon, 2007).

II.2. Présentation des deux huiles essentielles des deux plants aromatiques « *Artemisia judaica*, *Ammoïdes verticillata* »

II.2.1. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales :

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al, 1986**). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al, 2007**).

Les vertus de la plus grande partie des plantes médicinales encore utilisées aujourd'hui furent découvertes dès l'antiquité ou le moyen âge. Nombre d'entre elles sont même connues depuis la préhistoire (**Hmamouchi, 1999**). C'est en Inde et surtout en Chine que les plantes médicinales sont les plus utilisées, les plus étudiées et font même l'objet d'une culture réglementée (**Bellakhdar, 1997**).

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique, carminative, hépatoprotecteur, antiviraux, anticancéreux (**Bowles, 2004; Lahlou, 2004**) et antioxydants, et antimicrobienne (**Viuda-Martos et al, 2011**).

II.2.2. Définition des huiles essentielles :

Selon la Pharmacopée européenne l'huile essentielle est définie comme un « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » Cette définition est celle retenue dans les recommandations de l'ANSM relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. (**AFSSAPS. 2008**).

II.2.3. Répartition des huiles essentielles dans la plante :

Dans la plupart des cas, les essences se trouvent toutes formés dans les différents organes, elles sont alors localisées soit dans les glandes des poils sécréteurs, soit dans des réservoirs intracellulaires ayant la forme des canaux (**Danielle huard, 1999**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, des rhizomes, fruits et des graines.

II.2.4. Caractéristique physico-chimique de l'huile essentielle :

II.2.4.1. Caractéristiques physiques des huiles essentielles :

Les HE possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques (**Bardeau, 1976 ; Legrand, 1978 ; Lemberg, 1982 ; Bruneton, 1999**) :

- sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al, 2008**).
- Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes.
- Émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques.
- La densité est généralement inférieure à celle de l'eau.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation.
- Elles sont liquides à température ambiante.
- Elles sont incolores ou de couleur jaune pale.
- Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes (**Roux et Catier, 2007**).

II.2.4.2. Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Le groupe des terpénoïdes (les plus fréquents).

- Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (moins fréquents).

-Les composés d'origines diverses :

- **Alcools** : Menthol, géranol, linalol,...
- **Aldéhydes** : Géranial, citronellal,...

- **Cétones** : Camphre, pipéritone
- **Phénols**: Thymol, carvacrol ...
- **Esters** : Acétate de géranyle,...
- **Acides** : Acide géranique,...
- **Oxydes** : 1,8-cinéole,...
- **Phénylpropanoïdes** ; Eugénol.
- **Terpènes** : Limonène, para-cymène,...
- **Autres** : Ethers, composés soufrés, composés azotés, sesquiterpène,...

II.2.5. Mode d'action contre les champignons:

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux (**Karaman *et al.*, 2001**). L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox *et al.*, 2000**). Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces. (**Karaman *et al.*, 2001**). Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques ont une activité antifongique. (**Knobloch *et al.*, 1989**).

II.2.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles:

L'extraction des huiles essentielles se fait par des procédés divers.

II.2.6.1. Par entraînement à la vapeur:

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, trois variantes sont possibles selon la texture et la fragilité de la matière première à traiter.

II.2.6.2. Hydrodistillation simple:

La plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (**Bruneton, 1999**).

II.2.6.3. Distillation à vapeur saturée:

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont être séparé par décantation du distillat refroidi (**Belaiche, 1979**).

II.2.6.4. Hydrodiffusion:

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeurs d'eau à très faible pression à travers la masse végétal. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes (**Buchbauer, 2000 in Lahlou, 2004**).

II.2.6.5. Distillation assisté par micro-ondes:

Cette technique au même principe que la distillation simple sauf que le chauffage du ballon contenant la matière végétale et le solvant se fait sous l'énergie micro-onde .L'avantage de cette technique est de réduire considérablement le temps de distillation. (**Lahlou, 2004**).

II.2.6.6. Distillation par des solvants volatils:

L'extraction par des solvants volatils consiste à traiter la matière première dans un extracteur au moyen d'un solvant volatil tel l'hexane ou l'éthanol. Celui-ci, chargé du parfum des matières odorantes grâce à des lavages successifs, passe ensuite dans un concentrateur où il est distillé. On obtient alors une concrète qui sera brassée avec de l'alcool dans des batteuses, puis filtrée et glacée afin d'extraire les cires végétales non miscibles dans l'alcool. On obtient ainsi l'essence pure ou absolue après une dernière concentration. Le rendement est souvent supérieur à celui de la distillation et le procédé évite l'action hydrolisante de la vapeur d'eau (**Brunetton, 1999**).

II.2.7. *Artemisia judaica L ssp. Sahariensis* :

II.2.7.1. Présentation de la plante:

Artemisia judaica L ssp. Sahariensis est une plante aromatique, elle appartient à la famille des Astéracées. Elle est utilisée par la population Egyptienne dans le traitement des troubles gastro-intestinaux. (**Fig.9**).

Noms vernaculaires:

En Français: Armoise de Judée

En Arabe: Chouhiya, baatharam

Nom scientifique: *Artemisia judaica* L ssp. *Sahariensis*. (Quezel et Santa, 1963).



Figure 9 : *Artemisia judaica* L ssp. *Sahariensis*

II.2.7.2. Description botanique:

Artemisia judaica L ssp. *Sahariensis* est un arbrisseau vivace, qui a une odeur agréable. Elle se développe largement dans la péninsule de Sinâï de l'Egypte (Tackholm, 1974), dans le Saharo-arabique et dans les oueds sablonneux (Quezel et Santa, 1963).

C'est un semi-arbuste vivace apparaissant parfois comme une herbe, densément ramifié, entre 50 à 80 cm de haut. Il forme de grosses touffes vertes bleutées. Les tiges sont plus ou moins ligneuses. Il a des capitules jaunes bombées, jaunes pâles, assez grosses. Les feuilles sont petites, alternes, sessiles et disséquées, densément couvertes de poils blanchâtres fines qui donnent à la plante un aspect argenté. Les fleurs sont groupées en jaune pâle, discoïdes, têtes hémisphériques 5-10 mm de diamètre, entourées de bractées laineux et contenant 10 à 20 fleurons. Les fruits sont des akènes petits ne dépassant pas 5 mm en taille. Le feuillage de la plante produit une odeur agréable quand on les écrase. Il fleurit au début du printemps. (Quezel et Santa, 1963).

II.2.7.3. Systématique d'*Artemisia judaica* L ssp *sahariensis*:

D'après **Quezel et Santa 1963** et **Dupont 2004** la classification qu'occupe *Artemisia judaica* L ssp *sahariensis* est la suivante:

Embranchement: Phanérogames ou Spermaphytes.

Sous-embranchement: Angiospermes.

Classe: Eudicots.

Sous classe: Asteridées

Ordre: Asterales.

Famille: Astéracées.

Genre: *Artemisia*.

Espèce: *Artemisia judaica* L

Sous espèce: *Artemisia judaica* L ssp. *Sahariensis*

II.2.7.4. Les compositions chimiques :

L'analyse chimique de l'huile d'*Artemisia judaica* L ssp. *Sahariensis* a fait l'objet de quelques travaux permettant d'avancer l'existence de différents types chimiques. **El Gaby et al., (2000)** ont étudié cette huile essentielle dans de Zagazig en Egypte et dont le composé majoritaire est le camphre (37,3 %) suivie par Pipéritone (27,4 %).

D'autres travaux réalisés par **Klialed et al, 2002**, dans le nord de l'Egypte ont permis de détecter 25 composés dont le composé majoritaire est le pipéritone (45,0 %) suivie par transéthyle cinnamate (20,8 %) et éthyle-3-phényle propionate (11,0 %), les autres composés sont Spathulenol (6,27 %), cis éthyle cinnamate (5,64 %), 2,6-diméthyle phénol (1,39 %), méthyle cinnamate (1,06 %) et camphre (0,38 %).

En Algérie, **Dob et al, 2006** ont étudié l'huile essentielle de cette plante dans la région d'Ain Aminas. Ils ont trouvé 62 composés dont le composé majoritaire est le Pipéritone (61,9 %) suivie par terpinen-4-ol (4,6 %) et le bornyl acétate (3 %). (**Tableau 2**).

Tableau 2 : composition chimique des huiles essentielles d'*Artemisia judaica*. (Khaled et al., 2002).

Composés	Teneur en %	Composés	Teneur en %
Pipéritone	45	Cis éthyle cinnarnate	5,64
Trans-éthyle cinnamate	20,8	2,6-diméthyle phénol	1,39
Ethyle-3-phényle Propionate	11	Méthyle cinnamate	1,06
Spathulenol	6,27	Camphre	0,38

II.2.7.5. Propriétés thérapeutiques d'*Artemisia judaica* L ssp :

Les feuilles séchées d'*Artemisia judaica* L ssp. Sahariensis sont avalées avec un verre d'eau pendant les fêtes afin d'éviter les désagréments intestinaux dans la tradition de la population du sud Algérien. Cette plante est utilisée contre les maux intestinaux et diminue le risque de l'athérosclérose. (Abuzarga et al., 1987). Elle a une activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antipyrétique (Al Gaby et al, 2000).

La plante a été utilisée pour traiter les troubles gastro-intestinaux, la mauvaise vue, les maladies cardiovasculaires, les troubles de la peau, le système immunitaire affaibli, l'athérosclérose, le cancer et l'arthrite. (Abdalla et Abu-Zagra, 1987; Khafagy et al., 1988; Khafagy et Tosson, 1968; Saleh, 1985; Saleh et al., 1987).

II.2.8. *Ammoides verticillata* :

II.2.8.1. Présentation de la plante:

Est une plante odorante qui pousse spontanément dans le nord d'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Pakistan, Afghanistan). On la trouve généralement dans les champs, les pelouses les montagnes et dans les forêts (Quezel et Santa, 1963).

Elle appartient à la famille des Apiacees. Son appellation dans notre pays est Nounkha ou Nûnkha tirée du nom Perse «Nankhah» qui est utilisée en Iran, comme aromate dans le

pain. En effet, «Nan» et «Khah » signifient respectivement pain et goût (**Baytop et Sfitlipinar, 1986**). (**Fig.10**).

Noms vernaculaires : Nounkha, Nûnkha, Ajowan ou Ajawain.

En Arabe : Taleb El Koubs (**Abdelouahid Bekhechi, 2004**).

Noms scientifiques : *Ptychotis verticillata*, *Ammoïdes* (ou *Ptychotis*) *verticillata* *Trachyspermum* Boiss (**Quesel et Senta, 1963**).

Carum copticum (**Benth et Hook**) (**Goudarzi et a l, 2011**).



Figure 10 : *Ammoïdes verticillata*

II.2.8.2. Description botanique:

Ammoïdes verticillata est une Plante annuelle grêle à souche filiforme, à tige très ramifiée de 10-40 cm, sans rosette de feuilles basales. Feuilles inférieures pétiolées à nombreux segments multifides verticillés, les supérieures pennatifides à segments linéaires. Ombelles principales à 8-15 rayons. Fruits ovoïdes de moins de 1 mm de long, trouvé généralement dans la nature ; cette plante caractérise les pelouses des montagnes, forêts, surtout les zones arides et semi-arides (**Quesel et santa, 1963**).

II.2.8.3. Systématique d'*Ammoïdes verticillata* :

Ammoïdes (ou *Ptychotis*) *verticillata* est classé selon la clé de détermination botanique, d'après **Quesel et Senta (1963)** et **Guinochet et Vilmorin (1975)** comme suit :

Embranchement : Phanérogames

S.embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

S.classe : Dialypétales

Série : Calciflores

Ordre : Ombellales

Famille : Ombellifères

Genre : Ammoïdes ou Ptychotis

Espèce : *Verticillata*

II.2.8.4. La composition chimique :

Les plantes possèdent des métabolites dits ‘secondaires’ par opposition aux métabolites ‘primaires’ que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (**Krief, 2003**).

Les résultats du screening phytochimique confirment la richesse de cette plante en composés terpéniques (saponosides, stéroïdes, stérols, triterpènes et huiles essentielles), en composés azotés (alcaloïdes), ainsi qu'en antioxydants (caroténoïdes) et en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, flavonoïdes libres (flavones), coumarines, anthocyanes et quinones libres) (**Daira et al, 2016**). (**Tableau 3**).

Tableau 3: Composition chimique des huiles essentielles.

No.a	Composés	<i>IRab</i>	<i>IRac</i>	Pourcentages	Identification ^d
1	Diallyl disulfide	846	847	-	RI, MS
2	Allyl methyl disulfide	908	906	-	RI, MS
3	Methyl trans-propenyl disulfide	926	1536	-	RI, MS
4	α -Thujene	932	925	0,1	RI, MS
5	α -Pinene	931	932	0,6	RI, MS
6	Dimethyl trisulfide	948	953	-	RI, MS
7	Sabinene	964	966	0,1	RI, MS
8	Myrcene	976	982	0,5	RI, MS
9	p-Cymene	1010	1012	25,2	RI, MS
10	Limonene	1020	1021	28,1	RI, MS

11	γ -Terpinene	1047	1049	9,6	RI, MS
12	Terpinen-4-ol	1161	1162	0,8	RI, MS
13	Diallyl disulfide	1079	1070	-	RI, MS
14	Allyl methyl trisulfide	1126	1119	-	RI, MS
15	1,4-Dimethyltetrasulfide	1238	1240	-	RI, MS
16	Thymol	1266	1269	0.2	RI, MS
17	Carvacrol	1282	1278	33,2	RI, MS
18	Diallyl trisulfide	1288	1278	-	RI, MS
19	α -Humulene	1456	1456	0,1	RI, MS
20	γ -Muurolene	1471	1469	0,2	RI, MS
21	Diallyl tetrasulfide	1482	1509	-	RI, MS
22	β -Sesquiphellandrene	1516	1517	-	RI, MS
23	trans-Caryophyllene	1521	1518	-	RI, MS
24	(E)- α -Bisabolene	1532	1536	-	RI, MS
25	cis-Hydrate sesquisabinene	1565	1564	-	RI, MS
26	Germacrene-B	1553	1559	-	RI, MS
27	trans-Sabinene hydrate	1565	1562	-	RI, MS
28	Caryophyllene oxide	1576	1578	-	RI, MS
29	Zingiberenol 1	1599	1599	-	RI, MS
30	Zingiberenol 2	1613	1614	-	RI, MS
31	Ar-Turmerone	1639	1642	-	RI, MS
32	α -Turmerone	1649	1656	-	RI, MS
33	β -Bisabolol	1653	1660	-	RI, MS
34	β -Turmerone	1680	1685	-	RI, MS
Identification %				98,7	RI, MS
Monoterpene hydrocarbons				39.0	RI, MS
Oxygenated monoterpenes				59.4	RI, MS
Oxygenated sesquiterpenes				-	RI, MS
Sesquiterpene hydrocarbons				0,3	RI, MS
Sulfur compounds				-	RI, MS
^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa). ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.					

II.8.5. Propriétés thérapeutiques :

Les plantes appartenant à la famille des Apiacees (ombellifères) ont une vaste utilisation dans les différents domaines (condiments alimentaires, médecine traditionnelle...) à cause de leurs propriétés thérapeutiques, reconnues par les anciens. Mais elle est considérée principalement comme une plante médicinale pour traiter les maladies du tube digestif (Abdoul et al, 1989).

L'enquête réalisée auprès des herboristes a montré que cette espèce aide à guérir de nombreuses maladies. Elle est utilisée en décoction ou en infusion pour la fièvre typhoïde, comme antipyrétique, antispasmodique, dépuratif pour les affections rénales ; aussi, avec le citron pour la migraine et les céphalées. Le mélange de la plante broyée avec du miel traite l'asthme et les douleurs gastriques. L'inhalation de la vapeur dégagée lors de l'ébullition de la plante traite la fièvre, le rhume et la grippe ainsi que les maladies broncho-pulmonaires. Des études antérieures ont montré une forte activité antioxydante de l'huile essentielle de cette plante qui est due à sa teneur en composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol qui servent à traiter les infections bactériennes, virales, cutanées, les infections ORL (oto-rhino-laryngologie) et le rhumatisme (**Knobloch et al, 1989**).

Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* ont un champ d'action à spectre très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries (**Abdelouahid et Bekhechi, 2002**) que celle des levures et des moisissures (**Srivastava et al, 1999; Abdelouahid et Bekhechi, 2002**). D'ailleurs, elle est employée dans la fabrication des bains de bouche et des dentifrices car elle est très riche en thymol. Ce dernier est également très utilisé en médecine contre la toux, l'irritation de la gorge et dans des cas de choléra (**Bhargava et Haksar, 1961 ; Joshi et al, 1963**).

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Sortie sur terrain et prospection des symptômes des maladies fongiques :

Des sorties sur terrain ont été réalisées le mois d'avril 2021 afin de faire une prospection des symptômes des maladies fongiques de la pomme de terre et d'effectuer quelques prélèvements à partir du verger étudié qui servent par la suite d'isoler et d'identifier les germes fongiques responsables sur l'apparition des symptômes décelés. L'échantillonnage a été effectué d'une façon aléatoire qui sert essentiellement à recouvrir la majorité de la superficie de l'exploitation agricole examinée.

III.2. Présentations du verger d'étude :

La commune de Maghnia est située au nord-ouest de la wilaya de Tlemcen. La ville de Maghnia est située 580 km à l'ouest d'Alger, 39 km de Tlemcen, à 137 km au sud-ouest d'Oran, à 30 km au sud de la ville portuaire de Ghazaouet et à 20 km à l'est d'Oujda (Maroc). On y trouve deux postes frontaliers, Akid Abbas et Akid Lotfi.



Figure 11 : Situation géographique de la wilaya de Tlemcen.

<https://www.google.com/maps/place/Wilaya+de+Tlemcen>



Figure 12 : Le verger de la plantes de pomme de terre étudié.

III.3. Isolement et identification :

Les échantillons sont prélevées a partir des organes de la pomme de terre présentant des symptômes (feuille, tige infectés) puis acheminés au laboratoire dans des sachées stériles, pour but d'isolés, purifiés et identifiés les champignons phytopathogène causales altérations observées sur terrain.

L'isolement a été réalisés selon des deux méthodes différentes :

III.3.1.Méthode direct :

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par **(Rapilly,1968)**. Cette méthode consiste à préparer des petits fragments d'environ 1 cm à partir des plantes infectées. Les fragments sont ensuite déposées dans des boîtes de pétri infectées contenant du milieu PDA gélosé à raison de 7 fragment par boîte. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 – 7 jours jusqu'au développement de colonies fongiques **(Leslie, Summerell, 2006)**.

III.3.2.Méthode de dilution :

Cette technique se base sur la préparation de la solution mère des échantillons (feuille, tige de pomme de terre infectées) à partir de 01g du matériels végétal déjà écrasé dans un mortier stérile dans 09 ml d'eau physiologique stérile, puis à partir de la solution mère on prend 1 ml et on le met dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique

stérile, Ainsi de suite des dilutions allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-3} ont été préparé puis homogénéisées à l'aide d'un vortex (**Botton et al, 1990**).

Un volume de 1ml de chaque dilution à été étalé avec un étaloir stérile sur la surface des boites pétries contenant le milieu PDA .les boites ensemencées ont été incubées à 25°C pendant 7 jours (**Fig.13**).

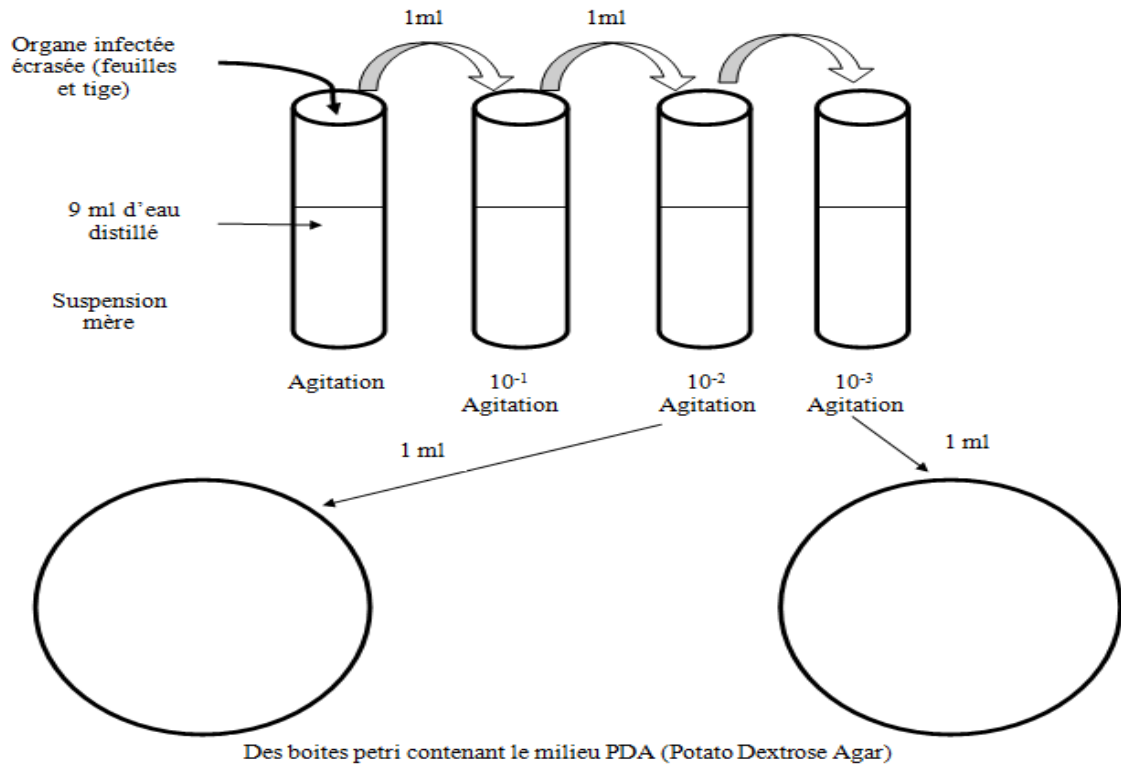


Figure 13 : schéma présentent l'isolement des champignons phytopathogène par méthode de dilution.

III.4.Purification des souches fongique :

Sur la base de l'aspect macroscopique, différentes colonies sont prélevées et repiquées plusieurs fois sur le même milieu (PDA), jusqu'à l'obtention des souches pures.

Le prélèvement se fait en condition stérile près du bec bunsen à l'aide d'une anse de platine un fragment du mycélium est déposer au centre d'une nouvelle boîte de pétri contenant le milieu PDA. Ce dernier se considère comme un milieu favorable de développement (rapide) des champignons, ainsi à la production des spores (**Botton et al, 1990**). L'incubation par la suite à été faite dans une température de 25°C pendant 7 jours. Après nous procédons à faire l'identification des isolats purifiés.

III.5. Caractérisation et identification des isolats :

L'identification d'une espèce fongique repose principalement sur l'analyse de critères culturels (température, vitesse de croissance et milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**).

III.5.1. L'aspect macroscopique :

L'analyse macroscopique est fondée sur la technique de **Pitt et Hoking (1997)** selon les caractéristiques suivantes :

- L'aspect des colonies
- Le relief des colonies
- La taille des colonies
- La couleur des colonies

III.5.2. L'aspect microscopique :

Les moisissures isolées et purifiées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. (**Cahagnier et Richard-Mollard, 1998**). Elles sont identifiées selon des différents caractères :

- Le type de thalle (septé ou non)
- La couleur des hyphes (foncées ou claires)
- La forme des spores
- L'origine des spores (endogène ou exogène),
- La forme des têtes

III.5.2.1. La technique de scotch :

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant une goutte de bleu de méthylène (**Chabasse, 2002**). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$ et $\times 40$ à l'aide d'un microscope

III.5.2.2. Culture monospore :

La culture monospore consiste à obtenir une culture pure à partir d'une spore de champignon (**Rapilly, 1968**).

A partir des cultures pures âgées de 7 à 10 jours, des isolats obtenus, un fragment de mycélium de chaque isolat est introduit dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile. Puis agitation du tube à essai avec le vortex est effectuée. La suspension obtenue

est dilué jusqu'à 10^{-4} . Ensuite 1ml de deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) est prélevé et étalé à l'aide d'une pipette pasteur (recourbée) sur les boîtes de petri contenant le milieu Agar 2%. Les boîtes sont par la suite incubées à 25°C pendant 24h à 48h, Les spores germées sont repérées, prélevées et remises en culture sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PDA (Johnston et al, 1983). Lesquelles sont mises en incubation à 25°C pendant 7jours.

Cette technique a été utilisée seulement pour les isolats que l'étude corrélatif entre leurs caractères microscopiques et macroscopiques nous a pas permis à arriver jusqu'à l'espèce.

III.6. Essais de lutte par trois souches de *Bacillus subtilis* et deux plantes (*Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*) contre les champignons phytopathogène isolés :

III.6.1.Evaluation de l'activité antagoniste des souches de *Bacillus subtilis* contre les champignons phytopathogène isolés :

Dans cette partie, notre objectif c'est l'étude in vitro (par différentes méthodes) de l'activité antifongique des trois souches bactériennes de *Bacillus subtilis* (BM14, S2DCp, B2C) contre les champignons phytopathogènes isolés.

III.6.1.1. Présentations des souches bactériennes utilisées :

Les souches bactériennes (B2C- S2DSP- BM14) nous ont été fournies par le laboratoire d'écologie et gestion d'écosystèmes naturels (Université de Tlemcen), Le tableau ci-dessous illustre leur affiliation à l'espèce *Bacillus subtilis* suite à un traitement de leurs séquences obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI.

Tableau 4 : Résultat du traitement des séquences des souches bactériennes (B2C- S2DSP- BM14) obtenues après la technique de PCR16S par l'outil BLAST du NCBI.

Strain	Homology (%)	Closest relative	Acc. N.	Phylogenetic group
B2C	99	<i>Bacillus subtilis</i>	KM492825.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.
BM14	100	<i>Bacillus subtilis</i>	KM492825.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.
S2DSP	99	<i>Bacillus subtilis</i>	KU821696.1	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.

III.6.1.2. Repiquage et revivification des souches bactériennes :

Consiste à prélever une colonie isolée représentative de la souche bactérienne à l'aide d'une anse de platine ou pipette pasteur et l'étaler en stries sur une nouvelle boîte de milieu de culture (gélose nutritif). Incubation se fait à 37°C pendant 24 h .

Si les nouvelles cultures obtenues sont pures et représentatives de celle reçues initialement, il est possible de poursuivre la culture et le repiquage des souches à partir de ces boîtes fraîchement obtenues.

➤ Méthode de confrontation directe entre bactérie et champignon phytopathogène :

Principe :

La confrontation directe (ou test des métabolites diffusibles) est réalisée selon la technique décrite par **Lundberg et Unestan (1971)**, et **Dennis et Webster (1980)**. Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu (PDA), une pastille gélosées d'environ 6 mm de l'agent pathogène impliqué et l'autre coté de la boîte est ensemencé par la souche antagoniste (*Bacillus subtilis*), L'incubation est réalisée à la température $25 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une semaine, le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance des champignons est mesuré Après trois jours d'incubation (**Fig.14**).

Dans les cultures témoins, les boîtes contenant seulement les pastilles de l'agent pathogène (champignon). 03 répétitions ont été réalisées pour chaque test.

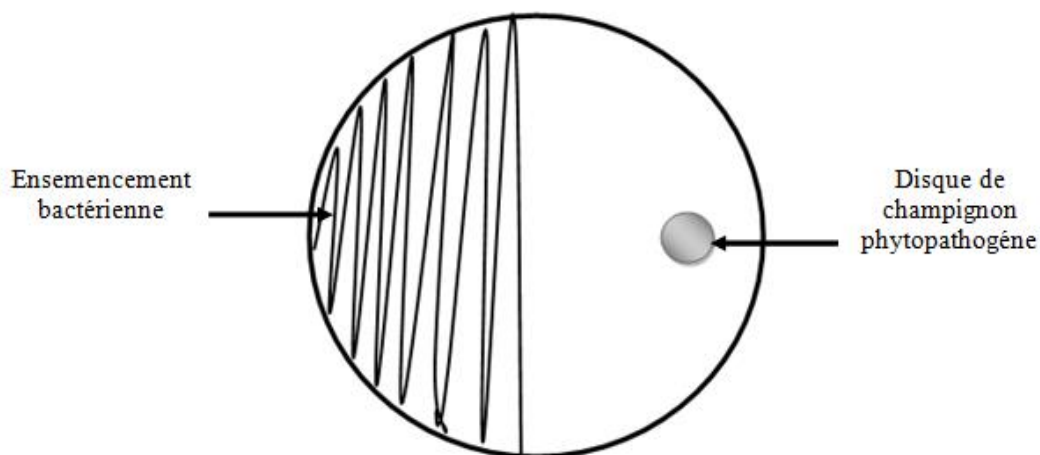


Figure 14 : confrontation directe entre *Bacillus subtilis* et les champignons phytopathogène sur milieu PDA

➤ **Méthode de confrontation indirecte entre bactérie et champignon phytopathogène:**

Principe :

Le principe utilisé dans cette méthode repose sur la technique utilisée par **Comporta (1985)**. Cette méthode est appelée également technique des « métabolites volatiles ». Elle consiste à déposer une pastille gélosée de l'agent pathogène et l'ensemencement de la souche antagoniste dans deux boîtes de Pétri différentes, contenant chacune 15 mL du milieu PDA (boîte de l'agent pathogène). et 15ml de milieu GN (boîte de l'agent antagoniste) Les deux boîtes sont ensuite reliées de manière superposée par un Para film afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles dans des conditions aseptiques (**Fig.15**).

Les boîtes témoins sont formées par superposition des deux boîtes, celle de milieu PDA contenant une pastille de l'agent pathogène alors que celle de milieu GN ne contient pas de l'agent antagoniste.

L'incubation se fait à $25 \pm 2^\circ$, et l'évaluation de l'activité antifongique des *Bacillus subtilis* se fait par la mesure de croissance mycélienne à partir de la troisième journée. 03 répétitions ont été réalisées pour chaque test.

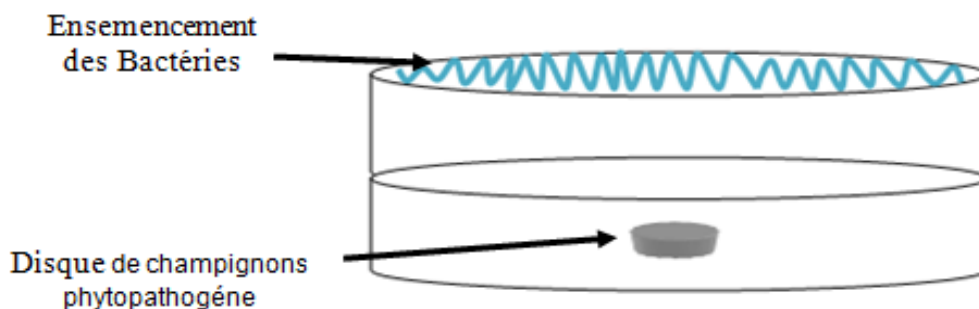


Figure 15 : confrontation indirecte entre *Bacillus subtilis* et les champignons phytopathogène sur milieu PDA

➤ **Méthode de filtrat bactérienne :**

Préparation du milieu PDA+ filtrat bactérienne :

- Les pré-cultures des souches antagonistes (les 03 souches de *Bacillus subtilis*) ont été obtenues par inoculation des flacons de milieu Bouillon nutritif de 250 ml par une culture de 24 h sur gélose nutritive à 37°C. Les flacons sont incubés dans un incubateur sous agitation de 180 rpm et à 37 °C pendant 18 h.
- Après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min le surnageant est récupéré puis filtré sur membrane millipore stérile de 0,22 µm de diamètre à l'aide d'une seringue stérile.

- L'incorporation du filtrat bactérienne dans des 3 flacons stérile contenant 80 ml de milieu PDA, et faite a une concentration de 25% (Cheffi et al, 2020).

Inoculation :

- Des pastilles de 6 mm de diamètre sont prélevées à la périphérie des cultures fongiques phytopathogène isolées, sont déposées au centre des boites pétri contenant le milieu PDA+ filtrat bactérienne, puis incubation à 25°C pendant une semaine.

La croissance mycélienne des champignons phytopathogène est évaluée par la mesure de diamètre moyen des colonies à partir de troisième jour d'incubation. (Sedra et Maslouhy, 1995). (Fig.16) 03 répétitions ont été réalisées pour chaque test.

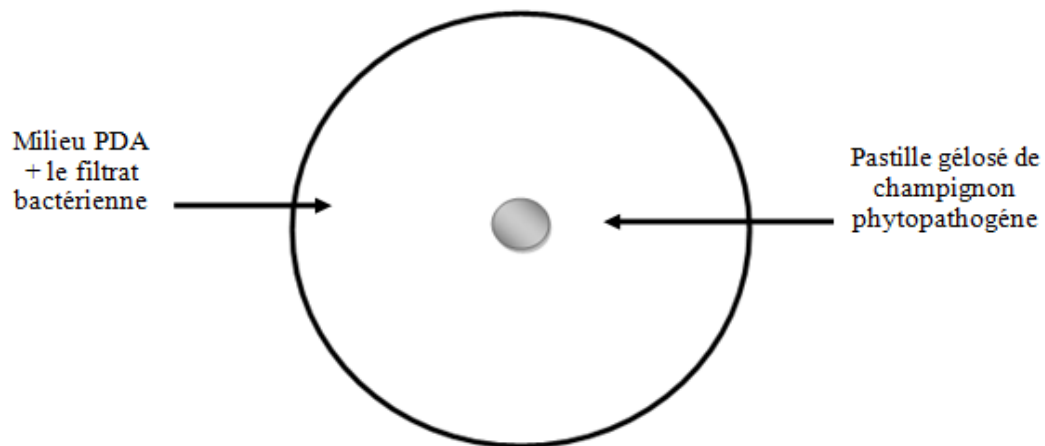


Figure 16 : schéma représente la méthode d'antagonisme par filtrat bactérienne.

III.6.2. Etude des potentialités antifongiques des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Ammoïdes verticillata* et *Artemisia judaica* contre les champignons phytopathogène isolés

III.6.3. Matériel végétale :

III.6.3.1. Récolte de matériel végétale :

Le matériel végétal qui est à l'origine des deux huiles essentielles utilisées dans le présent travail a été récolté pendant le mois de mai 2021, dans deux régions différentes :

- Djebel Aissa la wilaya de Naama pour *Artemisia judaica*,
- La région de Terni –commune de Sebdu la wilaya de Tlemcen pour *Ammoïdes verticillata*.

- **Djebel Aissa :** est situé au nord de la ville d'Ain Sefra à 2 236 m d'altitude, limité par Dir El Hairach et Garet Debba au SW et Djebel Tifkirt au NE. C'est un grand anticlinal orienté SW-NE à faciès essentiellement gréso-argileux et d'âge Jurassique supérieur

(Bouguelfda, 2013). Il est déclaré parc national depuis 2003 dans la province de Naâma en Algérie, il couvre une superficie d'environ 24400 hectares. Le parc offre des conditions particulièrement favorables pour le développement d'une diversité floristique importante avec des taxons endémiques et / ou rares (Benaïssa et al, 2018). Le parc est soumis à un climat méditerranéen semi-aride, très froid en hiver avec une pluviométrie annuelle moyenne de 483 mm / an et une température moyenne d'environ 8,14 °(Fig.17).

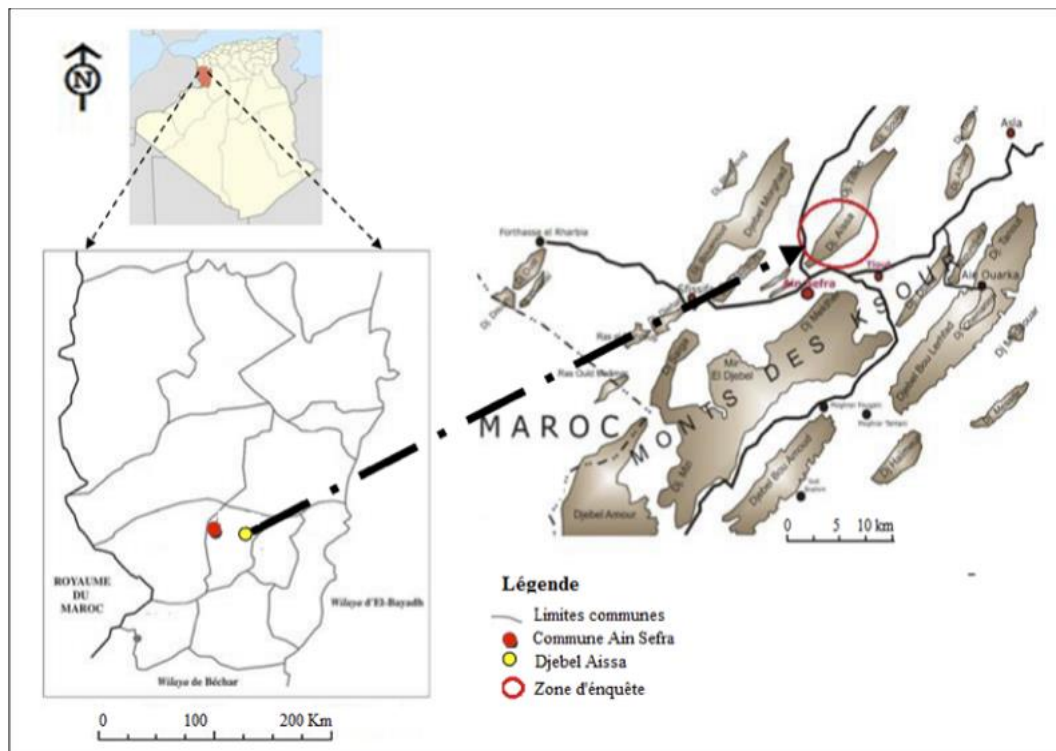


Figure 17 : Situation géographique de Djebel Aïssa.

- **Terni :** Le territoire de la commune de Terni Beni Hdiel est situé au centre de la wilaya de Tlemcen. Son chef-lieu est situé à environ 11 km au sud de Tlemcen (Fig.18). Avec des données géographiques :

Latitude: 34.7958, **Longitude:** -1.35812, 34° 47' 45" Nord, 1° 21' 29" Ouest

Altitude : 1 187 m

Climat : Climat méditerranéen avec été chaud (**Classification de Köppen: Csa**)

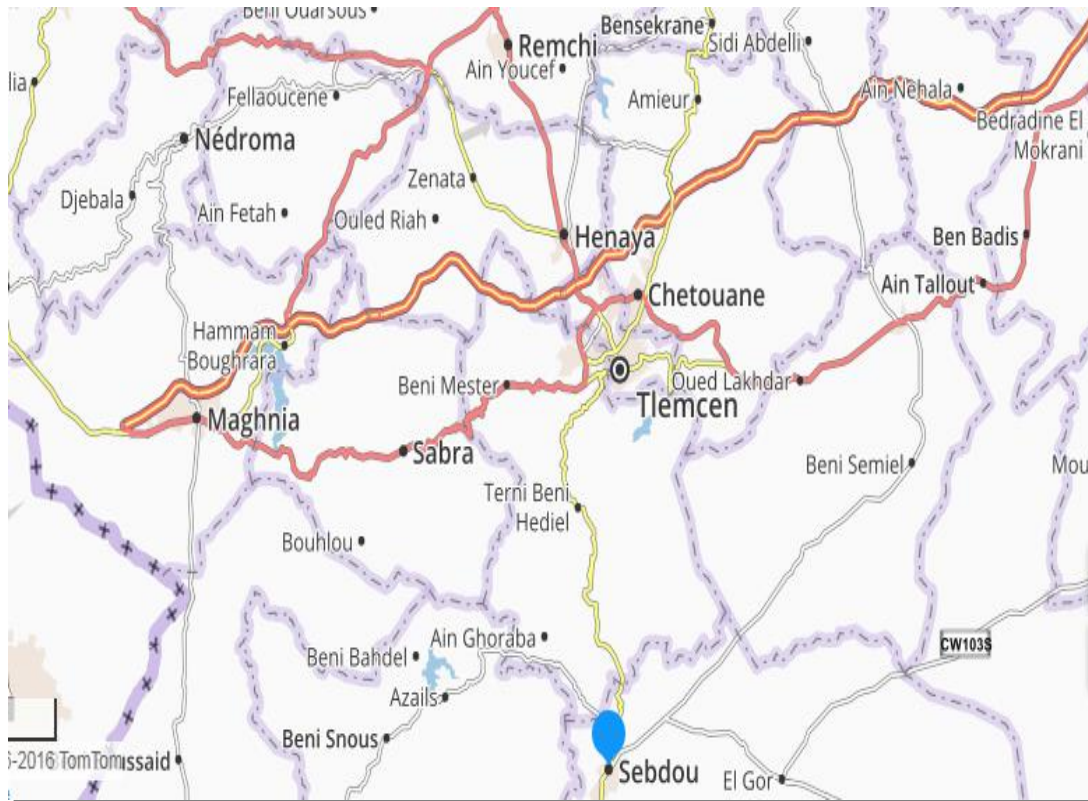


Figure 18 : situation géographique la commune de Terni Béni Hdiel
<http://www.viamichelin.fr/>

III.6.3.2. Identification botanique :

- *L'Artemisia judaica* : est un arbrisseau vivace, formant de grosses touffes vert bleuté. Les tiges sont plus ou moins ligneuses. Elle a des capitules jaunes bombés, jaune pâle, assez gros. Les petites feuilles très divisées sont couvertes d'un duvet argenté (Quezel et Santa, 196).
- *A. verticillata* : est une plante odorante qui pousse dans le nord de l'Afrique ainsi qu'en Asie. On la trouve généralement dans les pelouses, les montagnes et dans les forêts (Quezel et Santa, 2017). Il s'agit d'une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des Apiaceae. Espèce annuelle grêle, à tiges très ramifiées de 10 à 40cm de haut (Figure 14), elle connaît un cycle dynamique tardif allant de mai à juillet (Felidj et al, 2010).

III.6.3.3. Préparation des échantillons Les plantes aromatiques (*Ammoïdes verticillata*, *Artemisia judaica*) récoltées sont séchées à l'abri pendant 8 jours en moyenne. Après l'opération de séchage, les parties destinées à l'extraction particulièrement (tige, feuille) sont ensuite conservées dans des sacs en papier (**Fig.19**).



Figure 19 : séchage et conservation des plantes aromatiques.

III.6.4. Méthode d'extraction de l'huile essentielle :

L'extraction a été réalisée par Hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type **Clevenger (Clevenger, 1928) (Fig.11)**. Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de plante (*Artemisia judaica*, *Ammoïdes verticillata*) pendant 2 à 3h, Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans une ampoule à décanté (**Bruneton., 1999**), l'huile essentielles surmontant l'eau est séparée par décantation.

Après extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un tube en verre bien bouché. Le tube a été couvert d'un papier aluminium à l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur jusqu'à son usage pour les tests biologiques.



Figure 20 : hydrodistillateur pour l'extraction de l'huile essentielle.

III.6.5. Conservation des huiles essentielles :

Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusque vingt degrés. (Raynaud ,2006). Pour éviter tout risque de dégradation de l'huile essentielle.

III.6.6. Détermination du rendement en huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt HE} = (\text{MHE} / \text{MVG}) \times 100$$

Rdt HE: Rendement en HE en (%)

MHE : Masse de l'huile essentielle

MVG : Masse végétale sec

III.7.Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles obtenues :

III.7.1. Préparation des suspensions fongiques :

Les tests antifongiques doivent être réalisés à partir des cultures jeunes, de 4 à 5 jours pour les champignons. Sur des cultures fraîches, cultivé sur milieu PDA à 25°C pendant 5 jours, 10 ml d'eau physiologie sont versés, le contenu de la boîte a été mélangé à l'aide

d'une pipette pasteur courbée et la suspension était récupérée par une micropipette dans des tubes stériles.

La détermination et l'ajustement de la concentration de la suspension fongique ont été faits par la cellule de Malassez et le colorimètre, afin d'aboutir à une concentration de 10^6 spores/ml.

III.7.2. Méthode de diffusion par disque :

L'activité antifongique des huiles essentielles a été réalisée selon la méthode de diffusion de disque selon les normes du Comité National pour les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 2001), en utilisant 100 µl contenant $1-5 \times 10^6$ UFC / ml, la gélose PDA stérile a été distribuée dans des boîtes de Pétri stériles, après solidification elles ont été inoculées avec les suspensions fongiques déjà préparées.

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 15 µl d'huile essentielle vont être ensuite placés sur les géloses, Les boîtes de Pétri ont été maintenues à 25°C pendant 5 – 7 jours.

La mesure de la zone d'inhibition des champignons par les huiles essentielles est effectuée chaque jour à partir du 3^{ème} jour jusqu'au 10^{ème} jour d'incubation.

III.7.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition :

La concentration minimale d'inhibition (CMI) C'est la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance des champignons.

La technique utilisée c'est la méthode de diffusion en milieu gélosé (Wang *et al...* 2005).

Qui consiste à préparer le milieu PDA dans des tubes à essai stériles chacun contient 15ml à différentes concentrations d'huile essentielle (HE/Tween 20) (v/v). Ce mélange est coulé dans des boîtes Pétri. L'ensemble des boîtes Pétri préparées ont été inoculées au centre par des disques mycéliens de 6 mm de diamètre pris à partir d'une culture de 5 à 7 jours de chaque moisissure isolée.

Pour les boîtes témoins, l'huile essentielle est remplacée seulement par le Tween20. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 10 jours.

III.8. Les analyses statistiques :

Les analyses statistiques des données des différents tests effectuées dans le présent travail, ont été réalisées par logiciel SPSS.

Résultat et discussion

Chapitre IV: résultats et discussions

IV.1. Prospection :

Les échantillons explorés dans cette étude sont prélevés à partir d'un verger de pomme de terre, la plupart des symptômes qui apparaissent sur les plantes sont révélateurs des maladies fongiques comme les taches jaunes et nécrotiques sur feuilles, le dépérissement des feuilles, flétrissement des plants, brunissement des racines. (Fig.21).



Figure 21 : symptômes des maladies fongiques sur la pomme de terre.


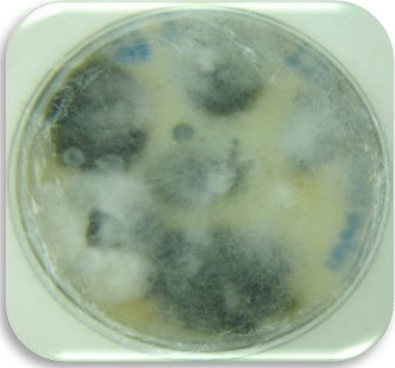
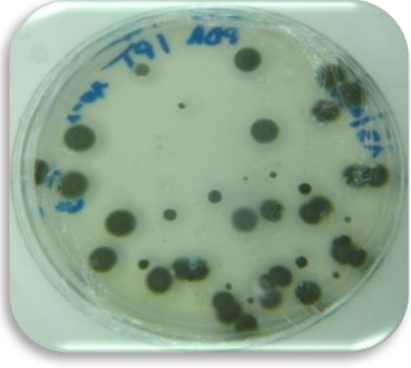
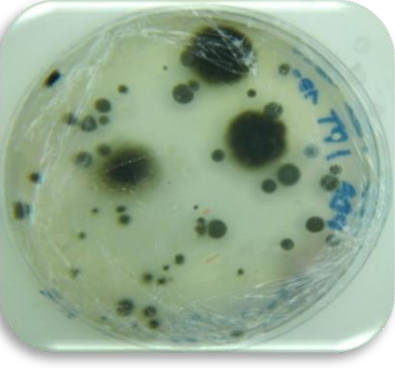
IV.2. Isolement et identification des champignons :

IV.2.1. Isolement des champignons :

L'isolement à partir des organes infectés de pomme de terre par les deux méthodes a permis d'observer plusieurs formes de colonies qui se différencient par la couleur, la taille, et l'aspect du mycélium, avec une croissance élevée sur les boîtes ensemencées par les fragments des plants et moins chargées pour les boîtes ensemencées par les différentes dilutions (10^{-2} et 10^{-3}).

Les résultats obtenus montrent la présence d'une variation de souches fongiques avec différents aspects. (Tableau 5).

Tableau 5 : Photos illustrent le résultat de l'isolement des champignons phytopathogènes à partir des plantes malades de la pomme de terre.

<p>Méthode directe</p>		
<p>Méthode de dilution</p>		

IV.2.2. Purification des isolats :

Les analyses effectuées sur tous nos échantillons de pomme de terre ont révélé la présence de plusieurs aspects macroscopiques de champignons. Pour purifier ces isolats, nous avons procédé à un repiquage successif chaque fois pour l'obtention des cultures pures.

Les résultats obtenus montrent la présence de quatre genres de champignons (**Fig.22**) :

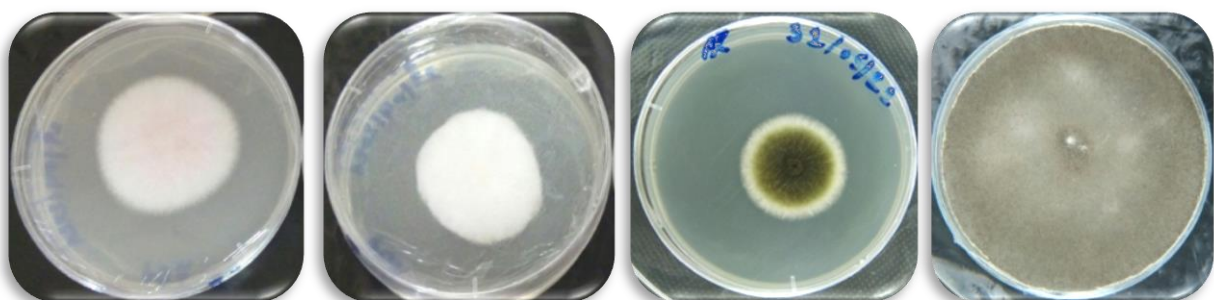


Figure 22 : photos des champignons isolées et purifiées.

IV.2.3. Identification des isolats :

La méthode de la culture monospore a été réalisée pour identifier les quatre isolats fongiques purifiés. Malheureusement cette technique n'a pas marché avec tous les isolats dont elle nous a amené à l'identification de trois champignons seulement qui sont *Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata*. Pour *Rhizopus sp* l'identification a été faite par une simple étude corrélative entre ses aspects microscopiques et macroscopiques en se référant aux clés de détermination cités précédemment. (Fig.23).

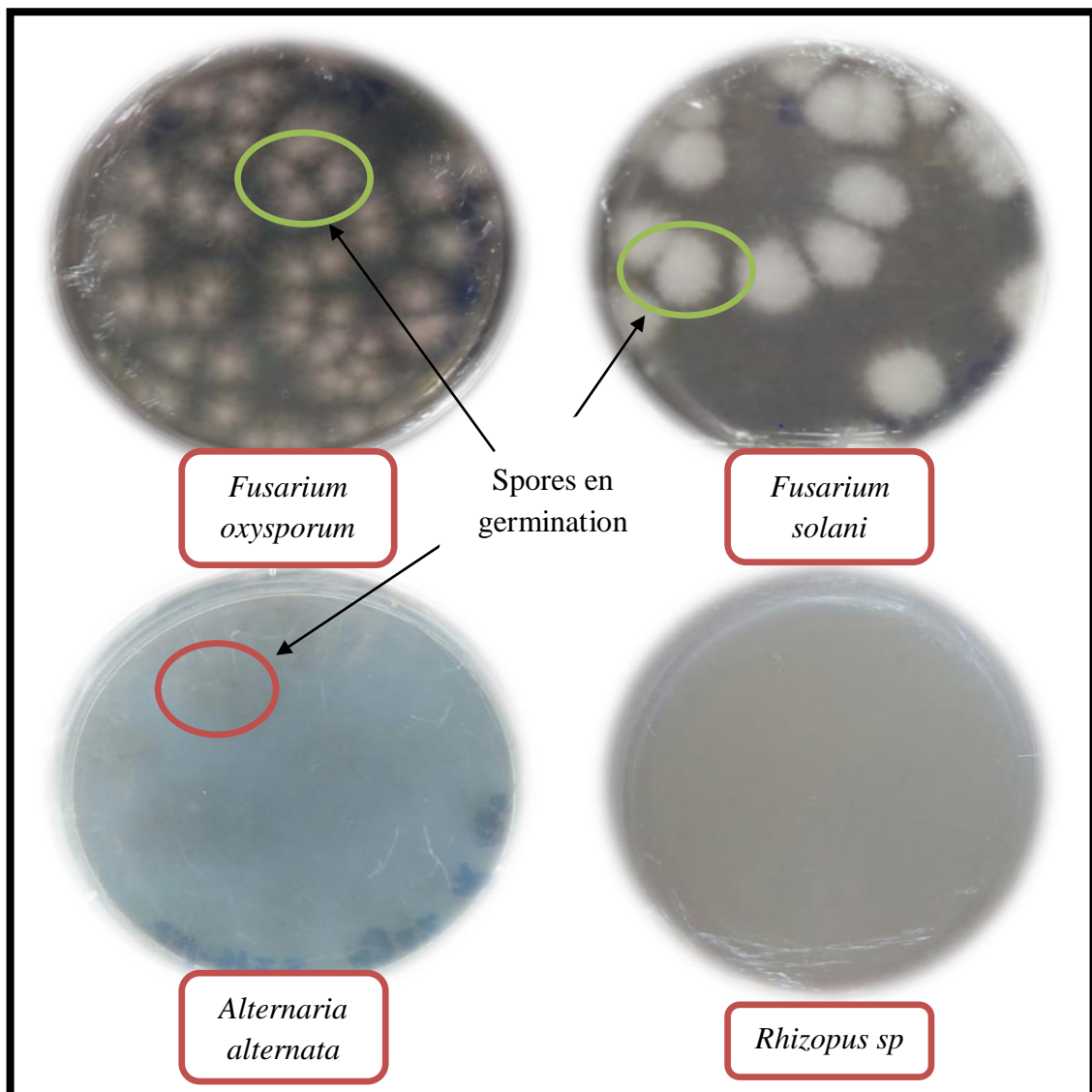


Figure 23 : résultat de la culture monospore.

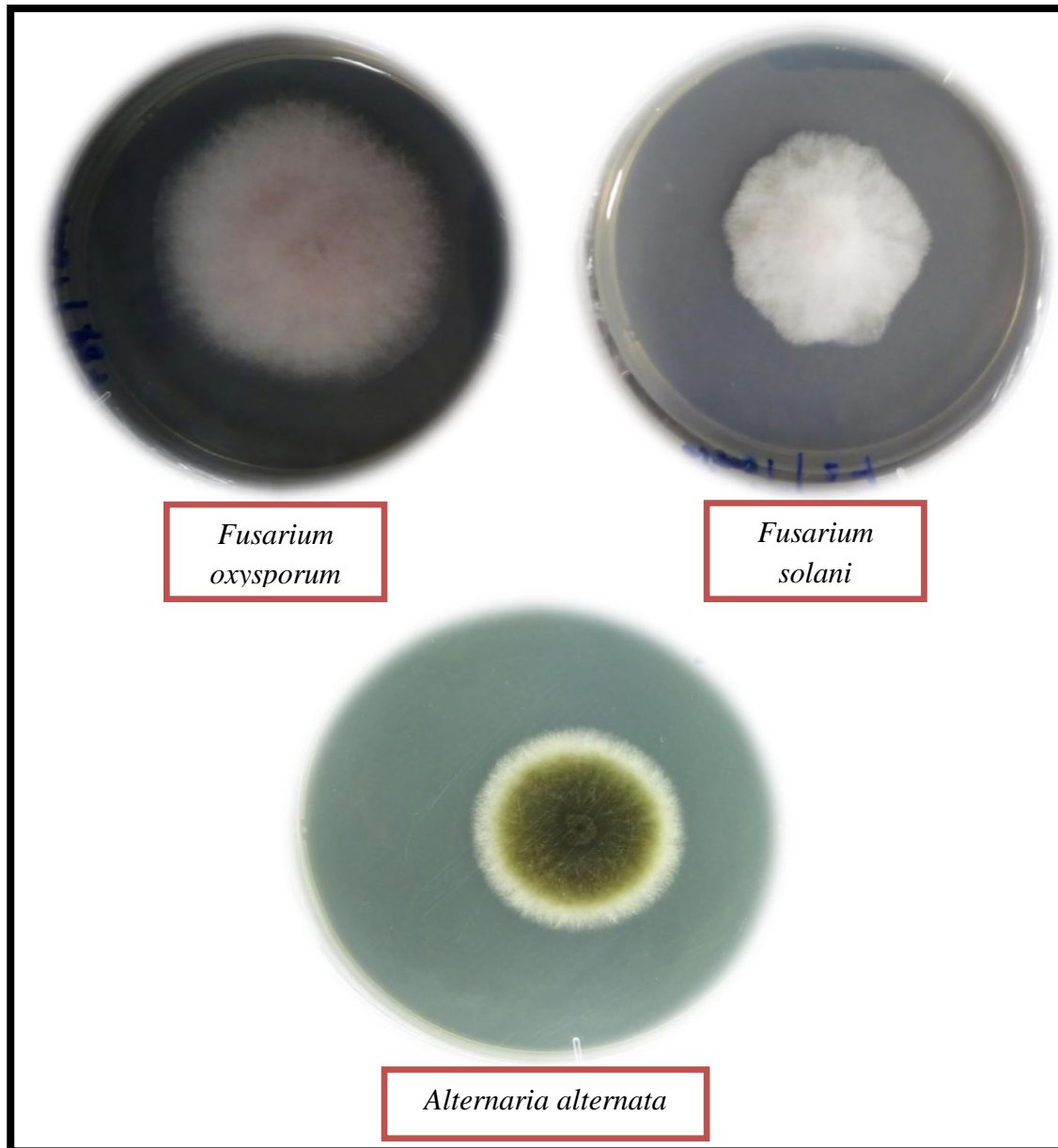

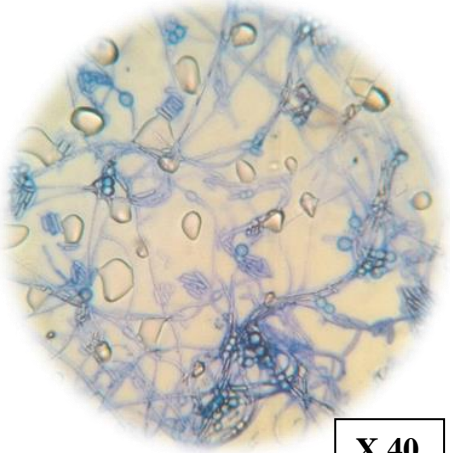
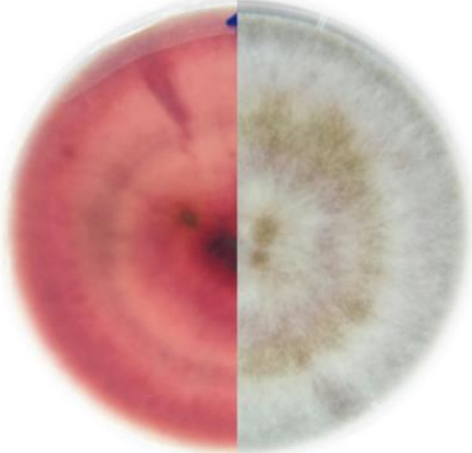

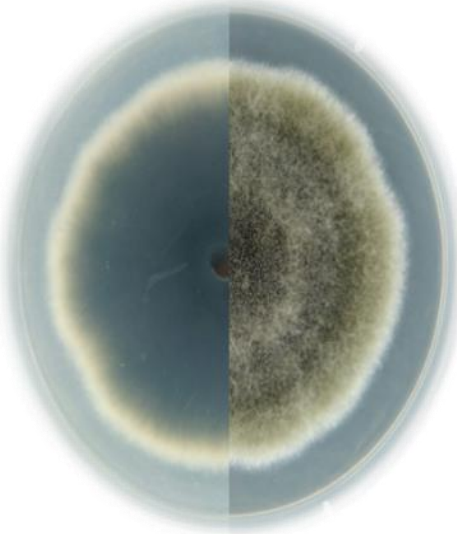
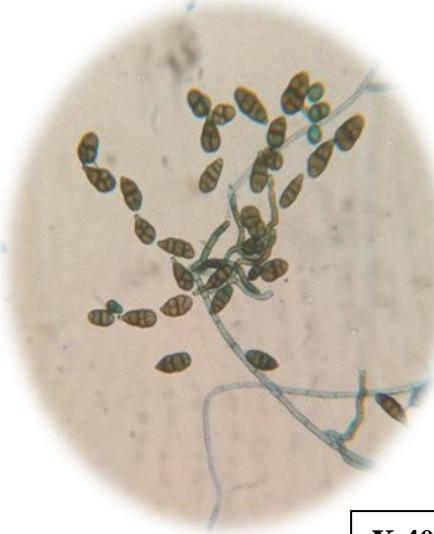
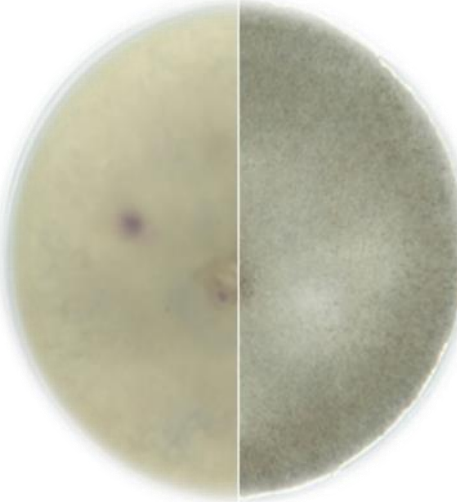
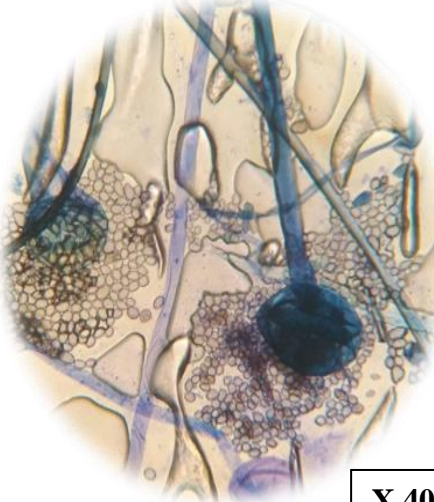


Figure 24 : Culture pure à partir des monospores.

Tableau 6 : Identification macro-microscopique des isolats.

Champignons	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques	Observation microscopique	Caractères microscopiques
<i>Fusarium solani</i>		<ul style="list-style-type: none"> -une colonie unique colonisant la totalité de la boîte. -couleur blanche à crème Le revers est d'un aspect jaune brunâtre. -croissance rapide. 	 X 40	<ul style="list-style-type: none"> -Les microconidies de formes ovoïdes. - les chlamydozoospores sont abondantes, et arrondis en ballonnet. -conidiophores porte des monophialides d'aspect cylindrique.
<i>Fusarium oxysporum</i>		<ul style="list-style-type: none"> -des colonies blanches, pêches, roses saumon à violet. - Le revers est pourpre. - vitesse de croissance modérée 	 X 40	<ul style="list-style-type: none"> -Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou portées par des conidiophores courts et ramifiés. -Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités. -chlamydozoospores, terminales ou intercalaires, formées dans mycélium et dans les conidies.

<p><i>Alternaria alternata</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> -La colonie est plate, duveteuse à laineuse. - La colonie blanc-gris au départ, devient rapidement foncé (vert foncé à noire) au recto comme au verso. vitesse de croissance modérée 	 <p style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">X 40</p>	<ul style="list-style-type: none"> -des conidies ou porospores sont brunes, pluricellulaire d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important.
<p><i>Rhizopus sp</i></p>		<ul style="list-style-type: none"> - Les colonies à croissance très rapide et extensives. - une texture cotonneuse. - Des colonies blanches au départ, deviennent grises et foncées en vieillissant. 	 <p style="text-align: right; border: 1px solid black; padding: 2px;">X 40</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Filament large non ou peu septes. Stolons, rhizoïdes et sporocystophore Ces 3 éléments naissent d'une même origine : le nœud

IV.3. Evaluation de l'activité antifongique :

- ✓ Des trois souches bactériennes de *Bacillus subtilis*.
- ✓ Des deux huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Ammoides verticillata*, *Artemisia judaica*).

IV.3.1. Activité antifongique des souches bactériennes (*Bacillus subtilis*) :

IV.3.1.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste de *Bacillus subtilis* in vitro :

Dans cette étude, on a pu évaluer l'action d'antagonisme des 03 souches de la bactérie *Bacillus subtilis* (B2C, BM14, S2DSP) contre 03 champignons phytopathogène de pomme de terre.

IV.3.1.1.1. Résultats des essais de la confrontation directe :

L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées (Tab 7) par la confrontation directe repose sur le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne. L'analyse de la variance a révélé une interaction significative entre les bactéries testés et les isolats de (*Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*) traités dans cette étude avec un $p < 0,05$ (Tableau 7).

Tableau 7 : L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par confrontation directe.

		ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	P value
<i>Alternaria alternata</i>	Bactéries	11,3856	11	1,03505	5,87E+00	0,0002156
	Temps	26,8956	2	13,4478	76,29	0,000
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bactéries	16,1056	11	1,46414	3,14	0,01076
	Temps	24,6272	2	12,3136	26,4	0,000
<i>Fusarium solani</i>	Bactéries	6,90306	11	0,627551	2,00E+00	0,08081
	Temps	44,5356	2	22,2678	70,82	0,000

D'après les résultats obtenus par la méthode de la confrontation directe entre les champignons et les souches antagonistes de *Bacillus subtilis*, ces derniers présentes des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne qui varient entre 11% et 34% sur les agents pathogènes, Où la plus grande efficacité était présentée par la souche B2C contre *Alternaria alternata* à 33,67%. Alors que la plus faible action antagoniste correspond à celle

enregistrée par l'utilisation de la souche S2DSP contre *Fusarium solani* (11, 63%). La souche BM14 montre une activité inhibitrice sur les trois souches phytopathogènes (*Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*) à des taux d'inhibition de 14,28%, 15,07%, 22,57% respectivement. Les potentialités inhibitrices révélées dans cette partie ne sont pas vraiment intéressantes puisque nous ne pouvons considérer qu'une bactérie antagoniste est vraiment active contre un champignon qu'avec des taux d'inhibition qui dépassent nettement 20 %.

Les résultats obtenus ont montré que les 03 souches de *Bacillus subtilis* testées, ont des activités inhibitrices proches les uns des autres sur les 03 souches fongiques isolées (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*), le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est présenté dans le tableau suivant (**Tableau 8**) et (**Fig. 25, 26, 27,28**). :

Tableau 8: Pourcentages d'inhibition (par confrontation direct) de la croissance mycélienne des champignons en présence de trois bactéries de *Bacillus subtilis*.

Confrontation direct		Les bactéries antagonistes						
		B2C		BM14		S2DSP		Témoin
		M	I%	M	I%	M	I%	M
Jour3	<i>Alternaria alternata</i>	2,0333± 0,28868a	42%	2,7333± 0,46188b	22%	2,7333± 0,28868b	22%	3,5000± 0,20000c
	<i>Fusarium oxysporum</i>	5,3000± 0,00000a	0%	4,5000± 0,00000a	6,83%	4,7000± 0,00000a	2,70%	4,8333± 0,41633b
	<i>Fusarium solani</i>	2,8333± 0,05774	24,12%	2,6000± 0,34641	30,29 %	2,9333± 0,55076	21,44%	3,7333± 0,65064
Jour4	<i>Alternaria alternata</i>	3,2333± 0,47258a	26,60%	3,7000± 0,20000a	15,90 %	3,7333± 0,15275a	15,22%	4,4000± 0,20000b
	<i>Fusarium oxysporum</i>	5,4000± 0,26458a	29,22%	4,9000± 0,26458a	35,77 %	5,2333± 0,47258a	31,45%	7,6333± 0,11547b
	<i>Fusarium solani</i>	3,6000± 0,52915	19,28%	3,9000± 0,43589	12,55 %	3,8667± 0,63509	13,45%	4,4667± 0,05774
Jour7	<i>Alternaria alternata</i>	3,9667± 0,25166a	32,42%	5,4333± 0,46188a	7,33%	4,2000± 0,26458b	28,36%	5,8667± 0,15275b
	<i>Fusarium oxysporum</i>	7,4667± 0,55076a	6,28%	5,9667± 0,20817a	25,12 %	6,0333± 0,35119b	24,24%	7,9667± 0,23094b
	<i>Fusarium solani</i>	4,7333± 0,55076	20,63%	5,9667± 0,05774	0%	6,1667± 0,85049	0%	5,9667± 0,72342

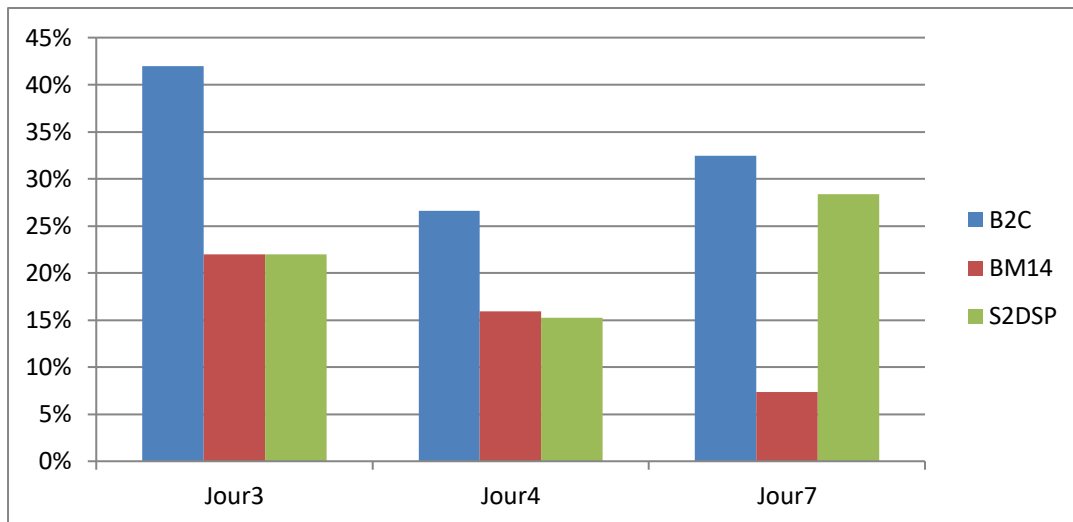


Figure 25 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur *Alternaria alternata*.

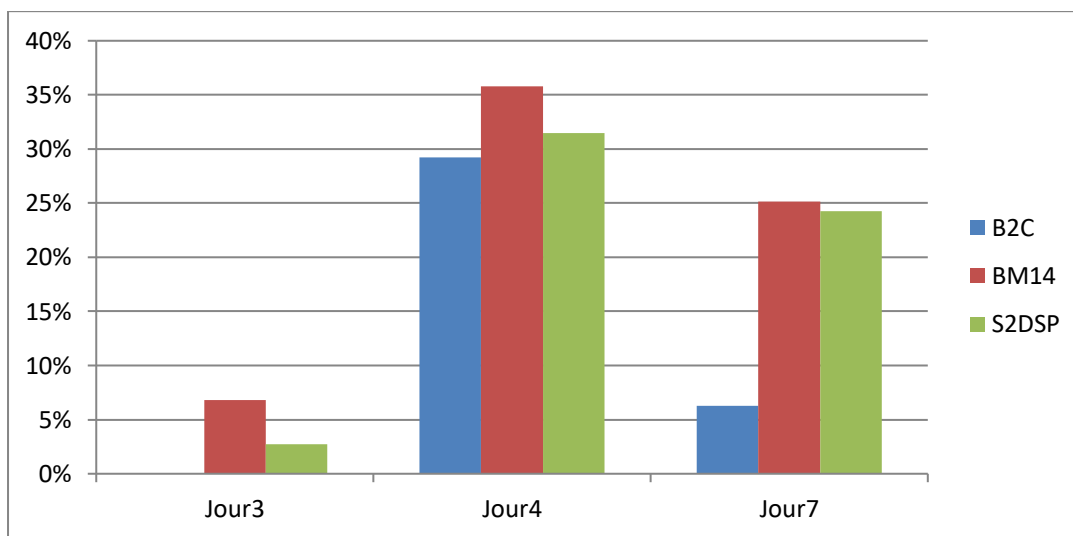


Figure 26 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur *Fusarium oxysporum*.

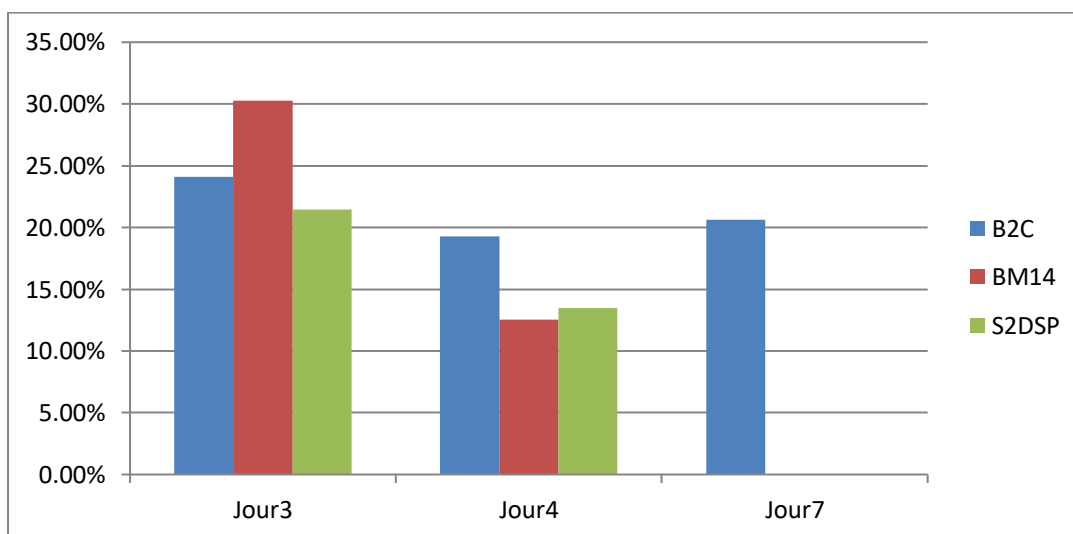


Figure 27 : taux d'inhibition obtenus par confrontation direct sur *Fusarium solani*.

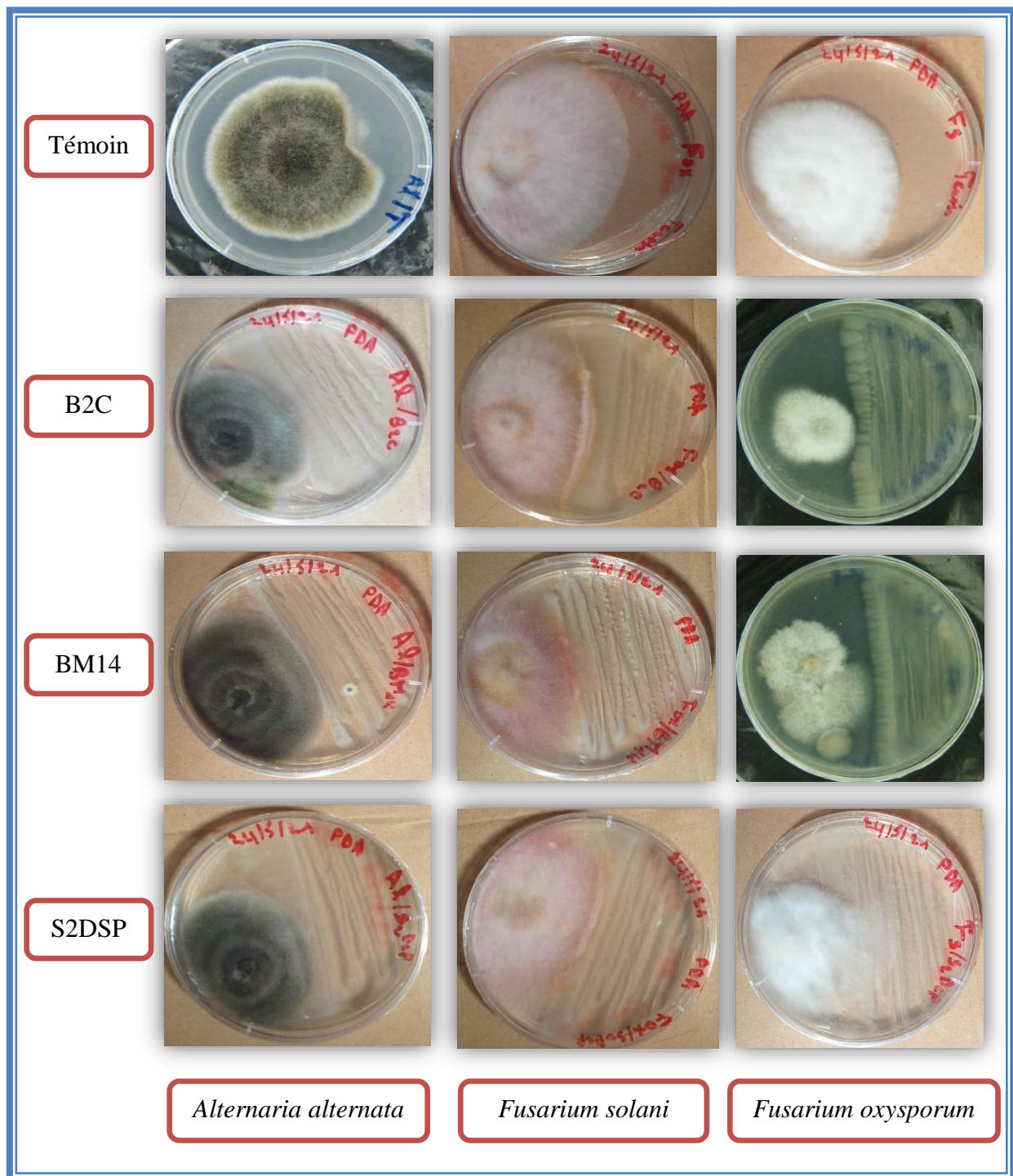


Figure 28 : activité antagoniste du *Bacillus subtilis* contre les champignons phytopathogènes de la pomme de terre par confrontation directe.

IV.3.1.1.2. Résultats des essais de la confrontation indirecte :

L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées (**Tab 9**) par la confrontation indirecte repose sur le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne. L'analyse de la variance a révélé une interaction significative entre les bactéries testés et les isolats de (*Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*) traités dans cette étude avec un ($p < 0,05$ (**Tableau 9**)).

Tableau 9 : L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par confrontation indirecte.

		ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	P value
<i>Alternaria alternata</i>	Bactéries	1,09E+01	11	0,992323	3,827	0,003577
	Temps	25,9756	2,00E+00	12,9878	50,09	0,000
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bactéries	19,0031	11	1,72755	3,021	0,01312
	Temps	72,8672	2	36,4336	63,72	0,000
<i>Fusarium solani</i>	Bactéries	32,0675	1,10E+01	2,91523	4,805	0,0008619
	Temps	77,7917	2	3,89E+01	64,11	0,000

Les différents pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne par l'émission des substances organiques volatils après 03, 04 et 07 jours d'incubation ont été calculés à partir de la formule décrite par (**Albuquerque, 2006**).

Cette technique est utilisée pour la mise en évidence des substances volatiles chez les souches *Bacillus subtilis*, après 7 jours de confrontation, les taux d'inhibition obtenus suite à l'utilisation des différentes bactéries de *Bacillus subtilis* dans ce test étaient tous négligeables voir nulles à l'exception de celui obtenu par l'utilisation de B2C contre *Fusarium solani* qui était de 45,60%.

La souche bactérienne B2C inhibe le développement des champignons dans les proportions variant de 19,26% à 33,39%, aussi les résultats montre que la souche BM14 ne présente aucun effet sur *Fusarium solani* tandis qu'elle présente un effet sur les 2 champignons *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* qui varient entre 17,21% et 21,58%.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 10**) et (**Fig.29, 30, 31,32**).

Tableau 10: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons en présence de trois bactéries de *Bacillus subtilis* par confrontation indirect.

Confrontation indirect		Les bactéries antagonistes						
		B2C		BM14		S2DSP		Témoin
		M	I%	M	I%	M	I%	M
Jour3	<i>Alternaria alternata</i>	2,0667± 0,32146a	31,33%	2,3667± 0,55076a	21,33%	2,5000± 0,36056a	16,66%	3,0000± 0,62450a
	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,2667± 0,40415a	28,03%	3,7333± 0,25166a	17,66%	3,5333± 0,28868a	22,07%	4,5333± 0,15275b
	<i>Fusarium solani</i>	2,9333± 0,23094a	26,75%	4,0000± 0,69282a	0%	2,3667± 0,25166b	41%	4,0000± 0,36056b
Jour4	<i>Alternaria alternata</i>	2,6667± 0,95044a	46,04%	3,8667± 0,35119a	21,70%	3,8000± 0,17321a	22,92%	4,9333± 0,66583b
	<i>Fusarium oxysporum</i>	5,3667± 0,28868a	29,75%	5,3000± 0,55678a	30,53%	4,9333± 0,51316a	35,38%	7,6333± 0,11547b
	<i>Fusarium solani</i>	3,6333± 0,58595a	27,83%	5,4667± 0,70238a	0%	4,0000± 0,43589b	20,47%	5,0333± 0,68069c
Jour7	<i>Alternaria alternata</i>	3,9667± 0,25166a	22,35%	4,6667± 0,40415b	8,62%	4,4000± 0,26458b	13,72%	5,1000± 0,17321c
	<i>Fusarium oxysporum</i>	8,1000± 0,17321a	0%	6,7000± 1,41774a	16,56%	6,1000± 0,36056b	24,03%	8,0333± 0,11547b
	<i>Fusarium solani</i>	4,4667± 0,47258a	45,60%	8,1667± 0,11547b	0,48%	6,6333± 0,15275c	19,14%	8,2000± 0,10000c

Les résultats obtenus dans cette partie rassemblent beaucoup avec ceux obtenus par la méthode directe avec de légères différences pour quelques confrontations avec B2C et S2DSP. D'où découle notre constatation que malgré l'absence d'un contact directe entre les champignons testés et les souches bactériennes B2C et S2DSP, ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des champignons.

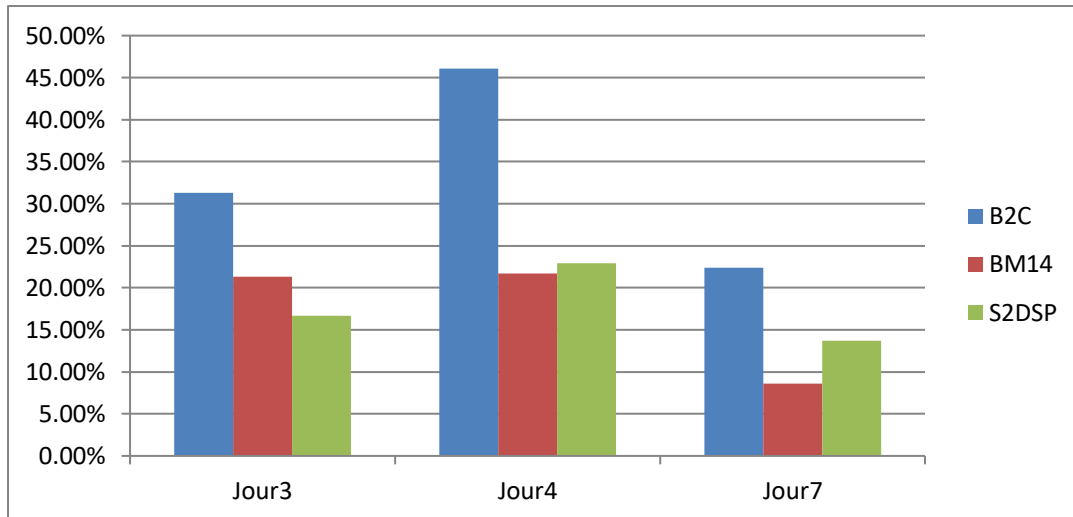


Figure 29 : taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur *Alternaria alternata*.

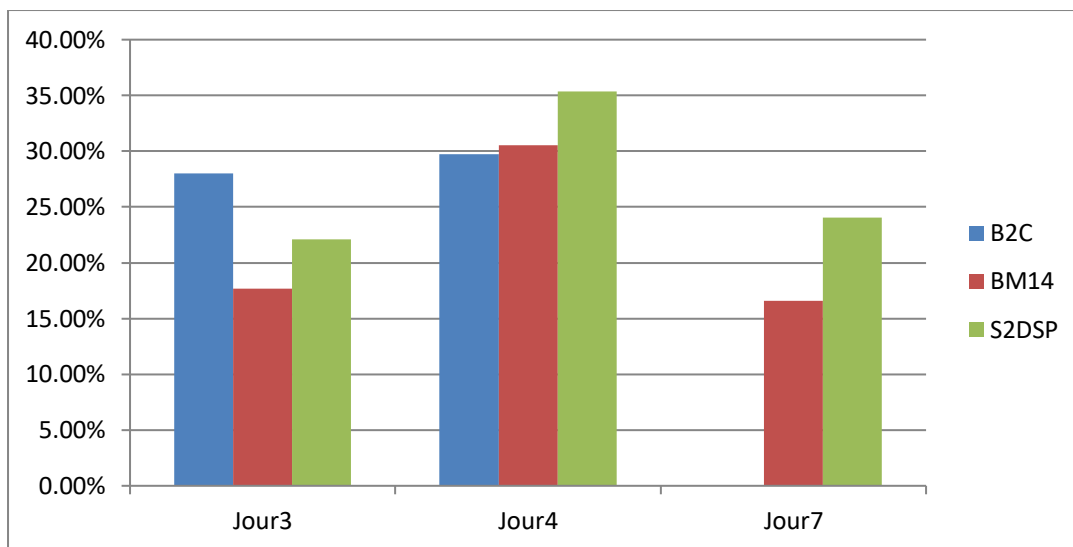


Figure 30 : taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur *Fusarium oxysporum*.

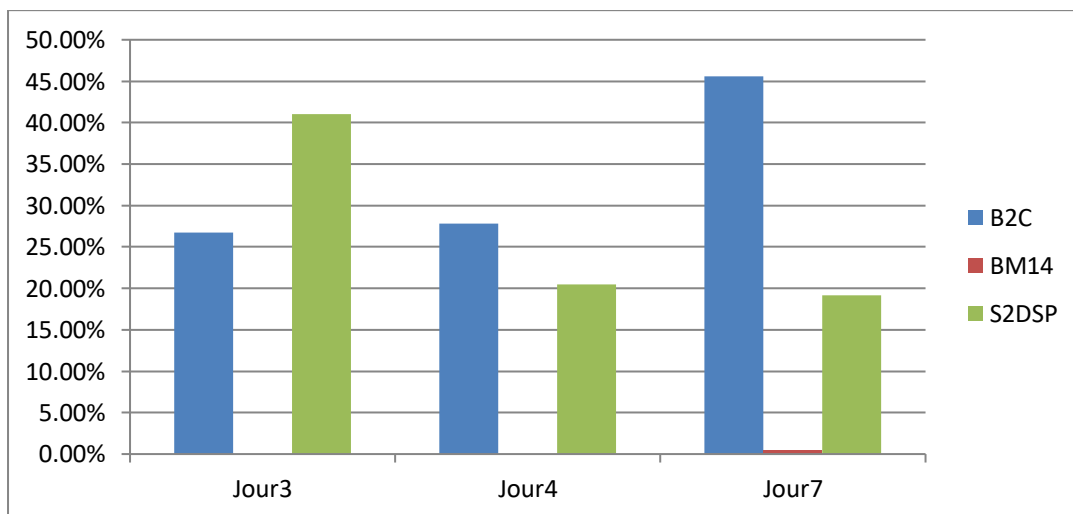


Figure 31 : taux d'inhibition obtenus par confrontation indirect sur *Fusarium solani*.

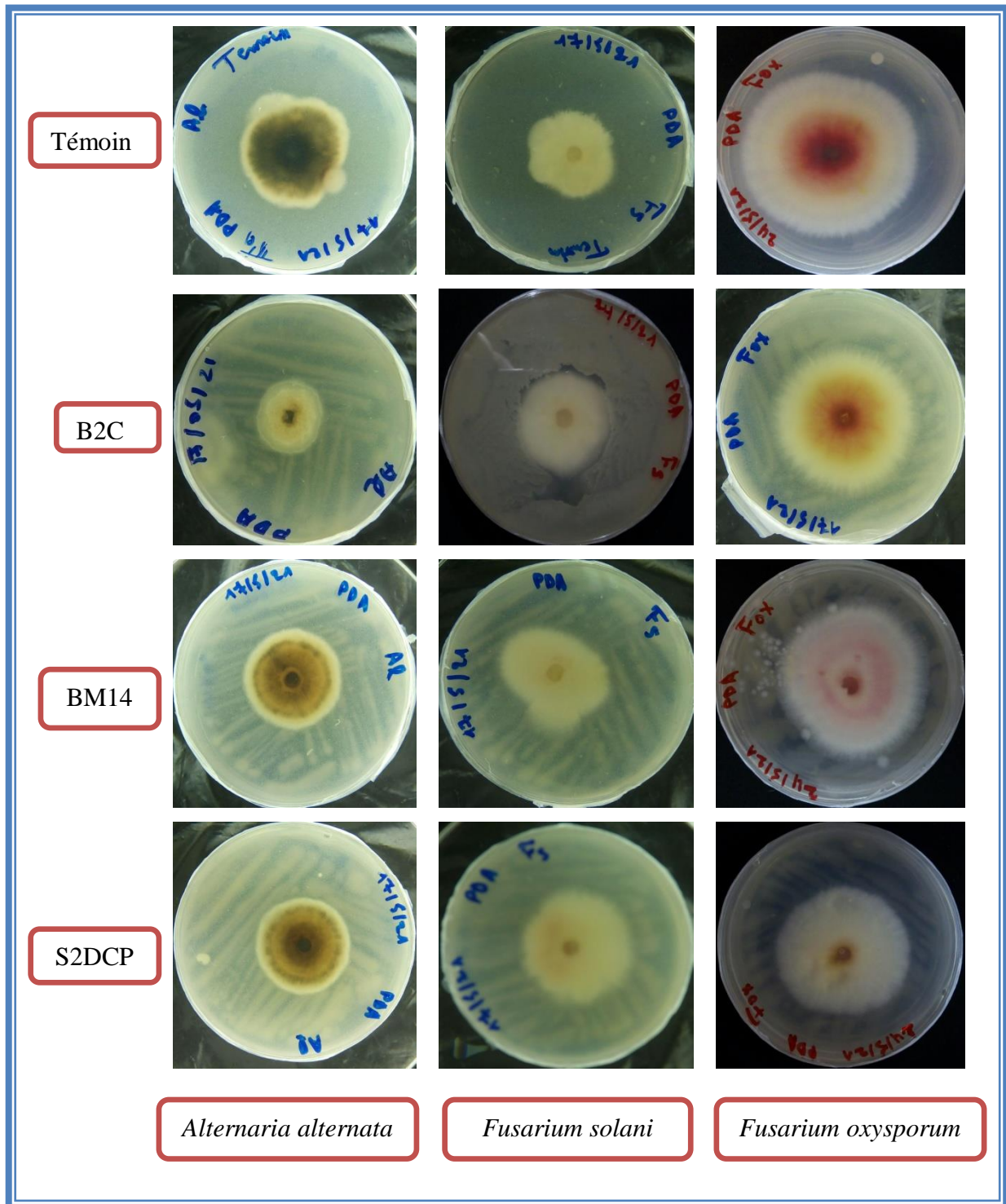


Figure 32 : activité antagoniste de *Bacillus subtilis* contre les champignons phytopathogènes de pomme de terre par confrontation indirect.

IV.3.1.1.3. Résultats des essais de la méthode d'antagonisme par filtrat bactérienne :

L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées (**Tab 11**) par la méthode de filtrat bactérienne repose sur le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne. L'analyse de la variance a révélé une interaction significative entre les bactéries testés et les isolats de (*Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*) traités dans cette étude avec un $p < 0,05$ (**Tableau 11**).

Tableau 11 : L'évaluation de l'efficacité de bactéries testées par filtrat bactérienne.

		ANOVA SS	DDL	Carré moyen	F	P value
<i>Alternaria alternata</i>	Bactéries	61,7542	11	5,61402	31,14	0,000
	Temps	10,0067	2	5,00333	27,75	0,000
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bactéries	109,479	11	9,95263	23,79	0,000
	Temps	27,6422	2	13,8211	33,03	0,000
<i>Fusarium solani</i>	Bactéries	19,8456	11	1,80414	19,43	0,000
	Temps	24,9706	2	12,4853	134,5	0,000

L'incorporation du filtrat des souches antagonistes dans le milieu de culture PDA à beaucoup influencé sur la croissance mycélienne des 03 champignons phytopathogène, dont les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations, Les résultats sont présentés dans le (**Tableau 12**).

Cette technique d'antagonisme nous donne des résultats remarquables en ce qui concerne le taux d'inhibition par rapport aux deux méthodes précédentes.

Au bout de 07 jours Les pourcentages d'inhibition les plus élevés de la croissance mycélienne des différents champignons sont ceux obtenus par l'utilisation de la souche *Bacillus subtilis* (B2C) et qui varient entre (31% - 62%) (**Tab 12**).

Nous avons remarqué aussi que les potentialités inhibitrices des trois souches antagonistes contre les agents phytopathogène *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* sont plus importantes à celles contre *Fusarium solani* notamment en ce qui concerne le taux d'inhibition de la souche S2DSP (**Tab 12**). (**Fig.33, 34, 35,36**).

Tableau 12: Pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon en présence de filtrat bactérienne dans le milieu PDA.

Méthode de filtrat		Les bactéries antagonistes						
		B2C		BM14		S2DSP		Témoin
		M	I%	M	I%	M	I%	M
Jour3	<i>Alternaria alternata</i>	1,36± 0,11a	64,49%	1,73± 0,05 b	54,83%	1,56± 0,15b	59,26%	3,83± 0,05c
	<i>Fusarium oxysporum</i>	2,3000± 0,17321a	56,60%	2,9333± 0,05774b	44,71%	2,6000± 0,10000b	50,94%	5,3000± 0,30000c
	<i>Fusarium solani</i>	1,7000± 0,20000a	52,77%	2,6000± 0,34641b	27,77%	2,9333± 0,55076b	18,61%	3,6000± 0,17321c
Jour4	<i>Alternaria alternata</i>	2,10± 0,70 a	59,30%	2,20± 0,10a	57,36%	2,10± 0,10a	59,30%	5,16± 0,20b
	<i>Fusarium oxysporum</i>	1,7667± 0,15275a	76,93%	3,3667± 0,11547b	55,96%	3,3667± 0,11547b	55,96%	7,6333± 0,11547c
	<i>Fusarium solani</i>	2,9667± 0,05774a	42,30%	3,7000± 0,52915b	27,90%	4,1333± 0,25166b	19,49%	5,1333± 0,30551c
Jour7	<i>Alternaria alternata</i>	2,46± 0,56a	60,32%	2,53± 0,05a	59,19%	2,43± 0,05a	60,80%	6,20± 0,20b
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4,0000± 0,00000a	53,65%	4,1333± 0,20817a	52,14%	4,8333± 0,75719b	43,03%	8,6333± 0,32146c
	<i>Fusarium solani</i>	4,0000± 0,40000a	31,03%	4,3667± 0,32146a	24,82%	4,7333± 0,51316a	18,44%	5,8000± 0,51962b

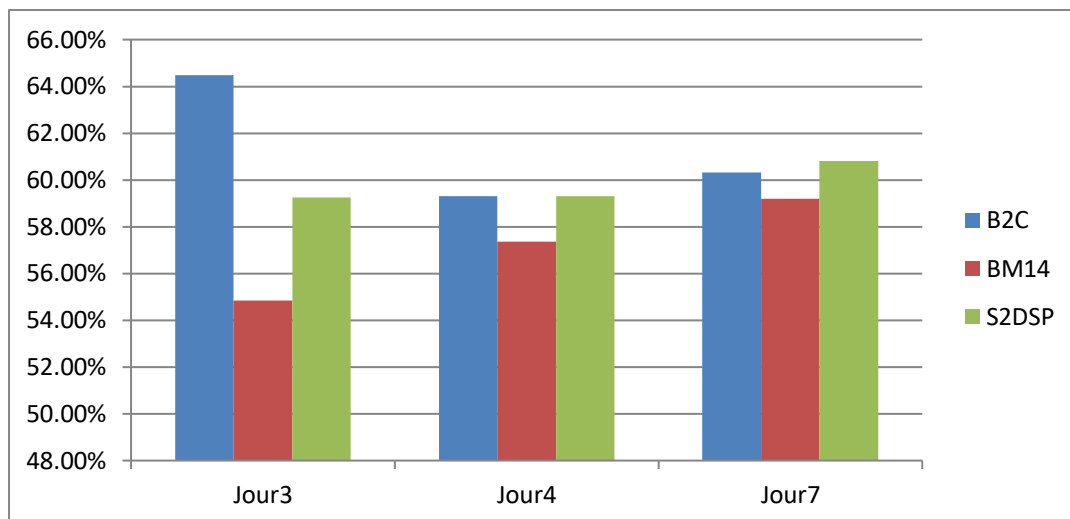


Figure 33 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur *Alternaria alternata*.

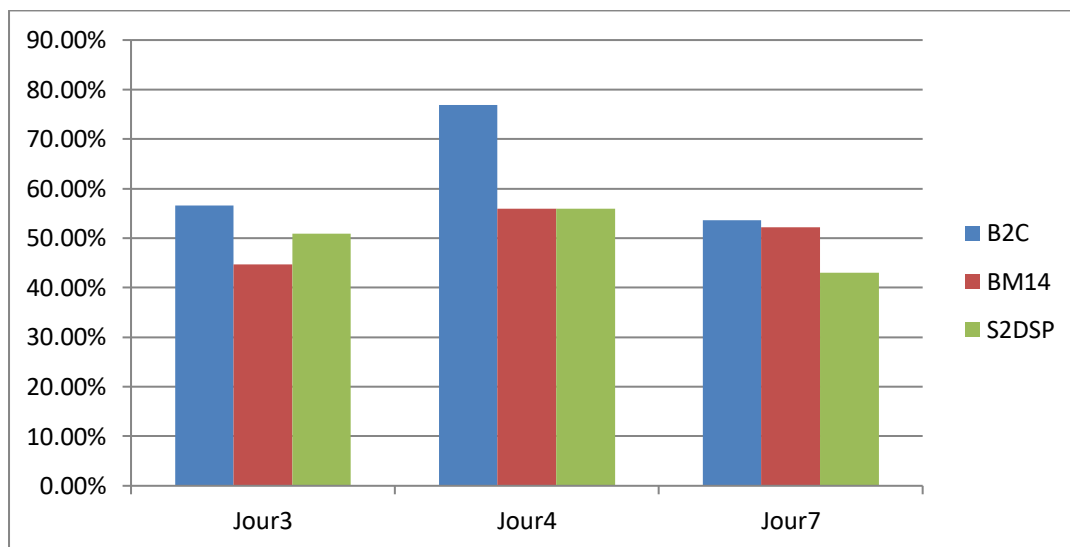


Figure 34 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur *Fusarium oxysporum*.

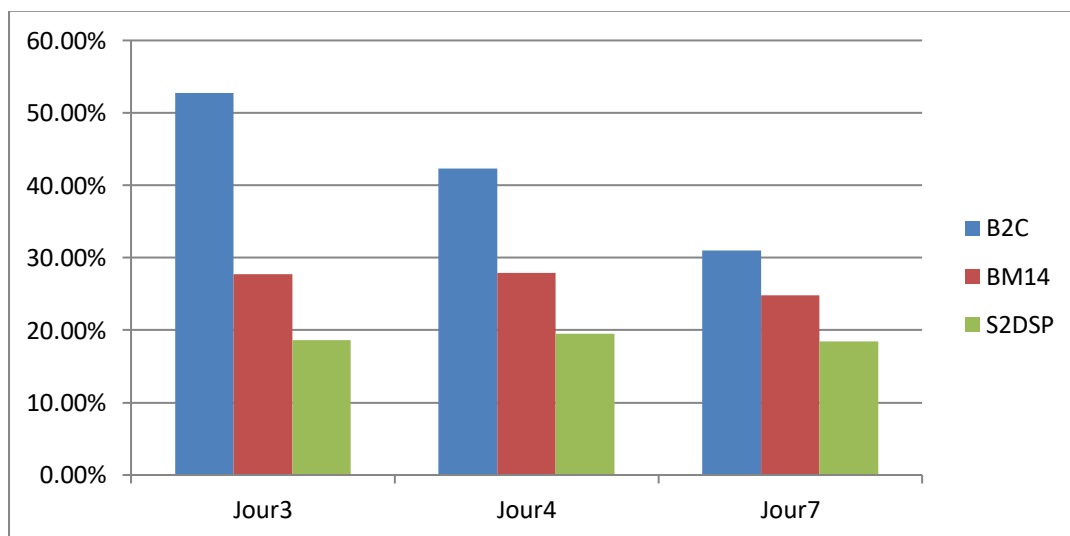


Figure 35 : taux d'inhibition obtenus par méthode de filtrat sur *Fusarium solani*.

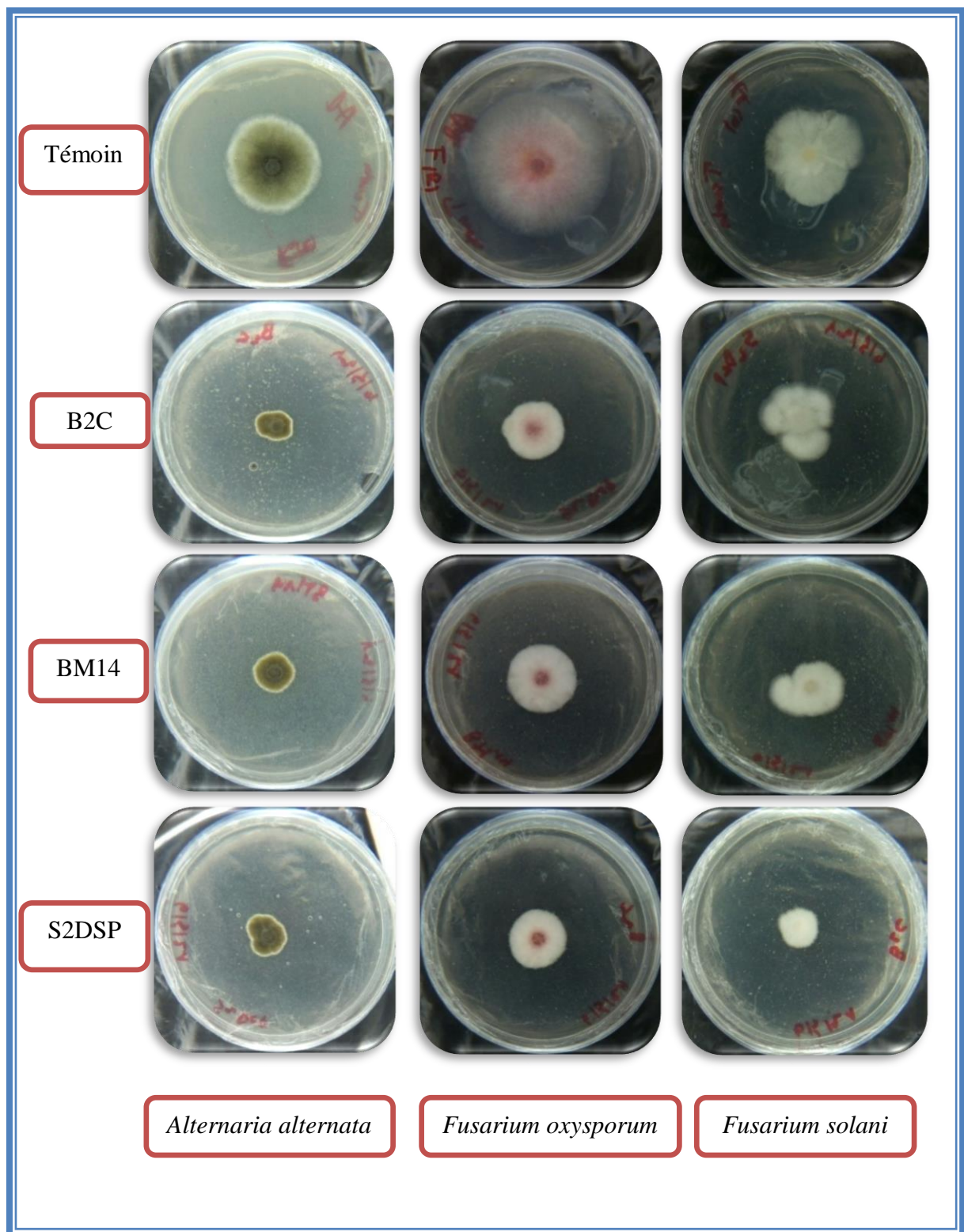


Figure 36 : Activité antagoniste de *Bacillus subtilis* contre les champignons phytopathogènes de pomme de terre par méthode de filtrat bactérienne.

IV.4. Evaluation de l'activité antifongique des deux huiles essentielles d'*Artemisia judaica* et *Ammoïdes verticillata*:

IV.4.1. Extraction des huiles essentielle :

Les deux huiles essentielles des deux plantes obtenues par Hydrodistillation sont des liquides visqueux, limpides, de couleurs différents et odeurs fortes. Le rendement en huile essentielle des deux espèces est exprimé en pourcentage massique par rapport à la matière végétal sèche.

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 13: Rendement des deux plantes aromatiques.

Extrait	Quantité de matière sèche	Rendement
<i>Ammoïdes verticillata</i>	555g	0.90%
<i>Artemisia judaica</i>	1070g	0.60%

Les résultats obtenus montrent que il y a des différentes de rendements entre les deux plantes : l'extrait de plante d'*Ammoïdes verticillata* représente le rendement le plus élevé (0.9%), par rapport l'extrait de plante *Artemisia judaica* qui possède un rendement de (0.60%). Divers facteurs peuvent influencer le rendement en HE tels que, la période de récolte de la plante, l'âge, la partie soumise à la distillation, conditions de stockage de la plante et la méthode d'extraction utilisée.

IV.4.2. Caractéristique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles des espèces étudiées obtenues après une Hydrodistillation, présentent des caractéristiques regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Caractéristiques des huiles essentielles.

Espèce	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Ammoïdes verticillata</i>	Jaune clair	Forte odeur	Liquide
<i>Artemisia judaica</i>	Vert foncé	Forte odeur	Liquide

Ces caractéristiques différent d'une plante à une autre comme elles peuvent aussi être différentes en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction (**Ghrib, 2014**).



Figure 37: Huile essentielle d'*A. Verticillata*.

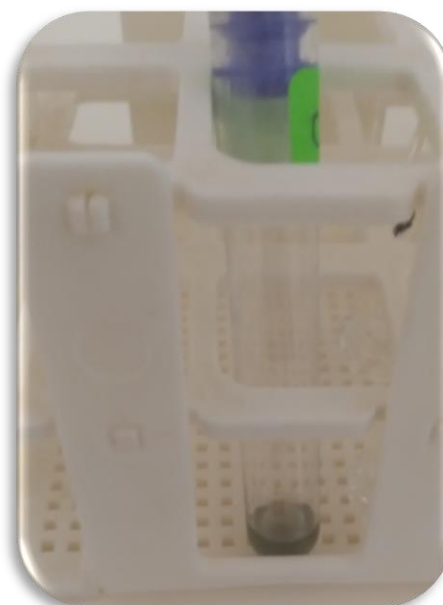


Figure 38: Huile essentielle d'*A. judaica*.

IV.4.3. Activité antifongique des deux huiles essentielles :

IV.4.3.1. Cas d'HE d'*Ammoides Verticillata* :

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a été évaluée contre quatre champignons phytopathogène de la pomme de terre (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp*) par la méthode de diffusion, qui sert à tester l'efficacité d'inhibition de cette HE contre ces champignons phytopathogènes.

Les disques en papier utilisés dans cette partie (imbibés par 15µl de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*) ont présentés une très forte activité antifongique dans la totalité des tests réalisés, avec un taux d'inhibition de croissance mycélienne qui arrive jusqu'à 100%.

Les résultats montrent que les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des témoins sont nuls.

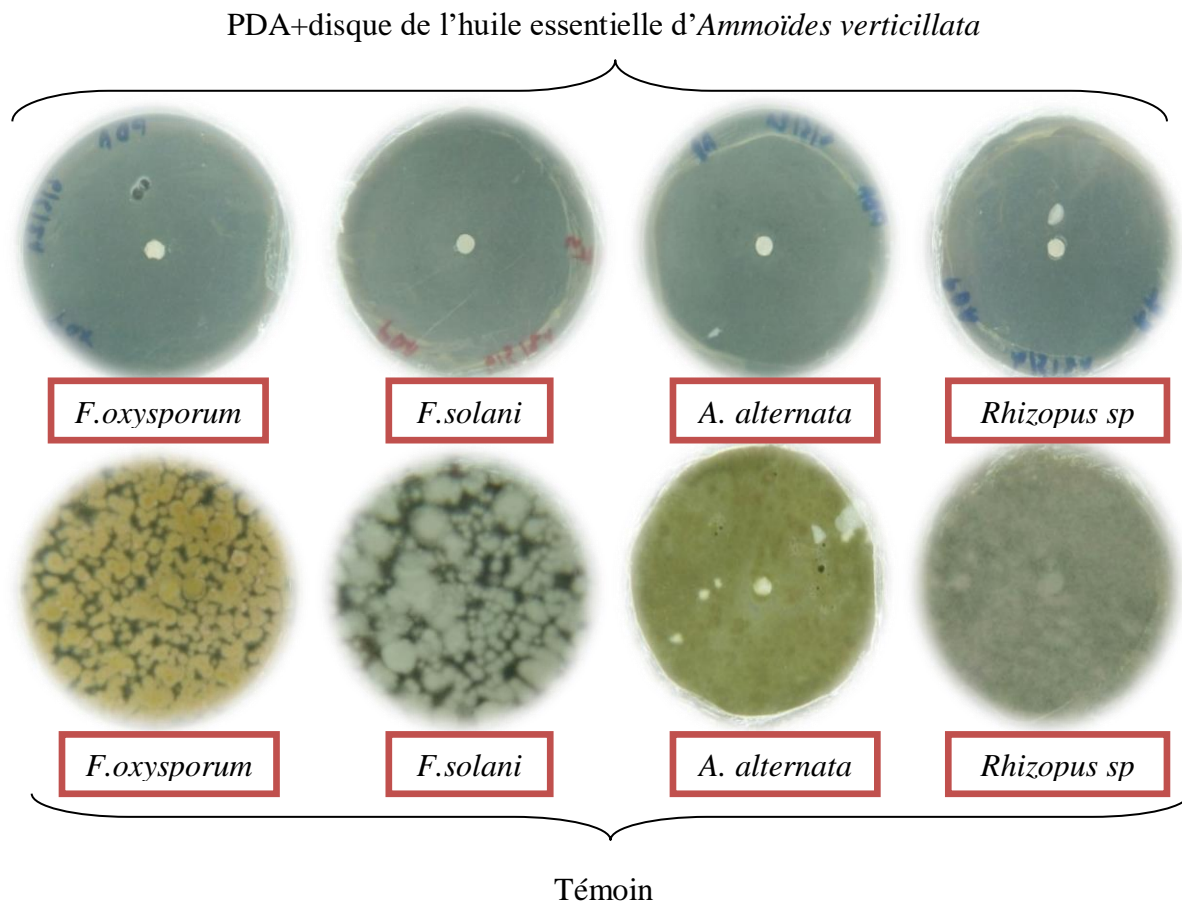


Figure 39 : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

Remarque : d'après les résultats obtenus après incubation nous constatons que les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA + Tween20 ne montrent aucune zone d'inhibition de la croissance microbienne, ce qui indique donc l'absence totale de l'effet inhibiteur du Tween 20 interférant dans l'action des différents agents antimicrobiens. Ainsi, l'effet antimicrobien additionnel éventuel du Tween 20 se trouvant dans les échantillons serait nul.

IV.4.3.2. Cas d'HE d'*Artemisia judaica* :

Pour l'huile essentielle d'*Artemisia judaica* la méthode de diffusion par disque, à montré que cette huile possède un effet inhibiteur remarquable sur les 4 champignons traités (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* ; *Rhizopus sp*), notamment contre les deux espèces de *Fusarium*.

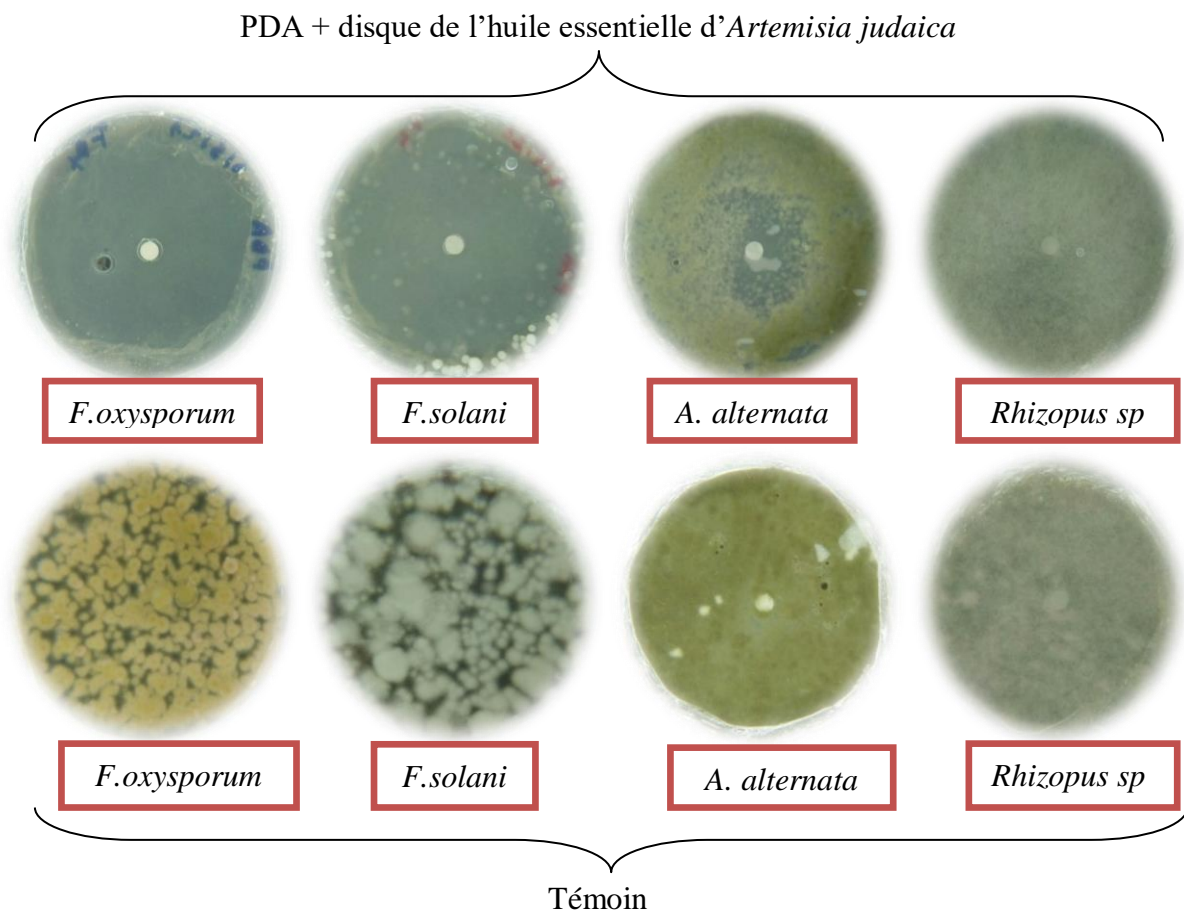


Figure 40 : Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*.

IV.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

CMI (concentration minimale inhibitrice) : c'est la plus petite concentration d'extrait pour laquelle il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu.

La croissance mycélienne des champignons (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus sp*) a été évaluée en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle dans le milieu de culture PDA et en son absence (utilisation de différentes concentrations de tween seulement) pour le témoin.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* possède une puissante activité antifongique contre les quatre souches fongiques (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* ; *Rhizopus sp*), avec des concentrations qui sont relativement faibles (1 µl/ml, 0.5 µl/ml, 0.25 µl/ml), cette activité diffère significativement d'une concentration à l'autre car le *P* value obtenu était inférieur à 0.05 pour la totalité des tests effectués.

La concentration minimale inhibitrice correspond à 0.25 µl/ml pour l'ensemble des champignons traités.

A partir des résultats obtenus le logiciel utilisé lors des analyses statistique, nous a permis d'avoir une simulation de concentrations ayant les capacités d'inhiber la croissance mycélienne à différents pourcentage avec des intervalle de confiance **tab 15,16,17, 18 ;(Fig.41,42,43,44).**

Tableau 15 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Rhizopus sp* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

	Taux d'inhibition%	Concentration	Borne inférieure - Borne supérieure
<i>Rhizopus sp</i>	10	0,147	0,066 - 0,180
	20	0,162	0,090 - 0,197
	30	0,173	0,111 - 0,214
	40	0,184	0,130 - 0,235
	50	0,194	0,148 - 0,262
	60	0,205	0,163 - 0,300
	70	0,218	0,178 - 0,354
	99	0,322	0,247 - 0,355

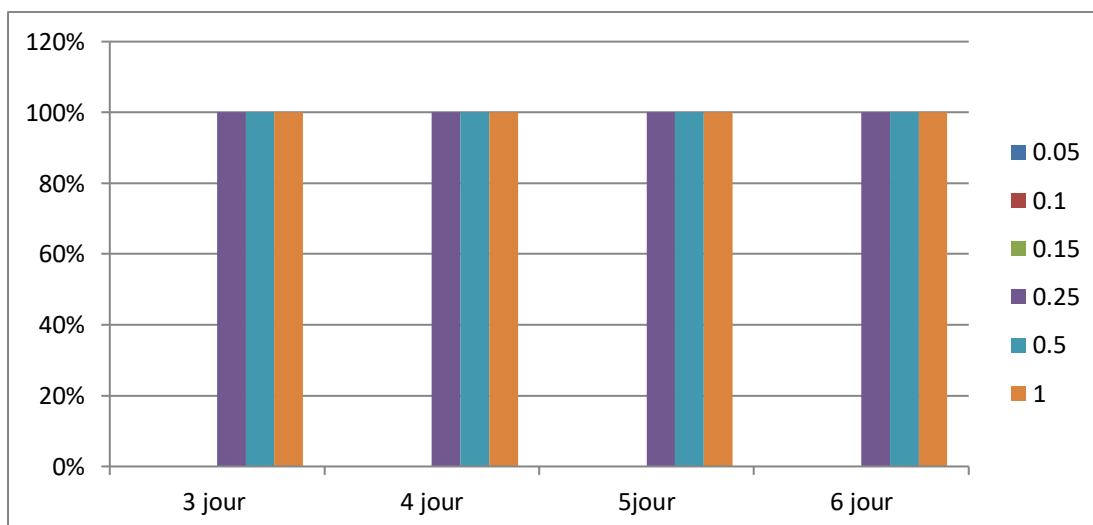


Figure 41 : Pourcentage d'inhibition de *Rhizopus sp* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

Tableau 16 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

<i>Alternaria alternata</i>	Taux d'inhibition%	Concentration	Borne inférieure - Borne supérieure
	10	0,135	0,108 - 0,153
	20	0,149	0,125 - 0,167
	30	0,160	0,138 - 0,179
	40	0,170	0,150 - 0,191
	50	0,180	0,160 - 0,205
	60	0,190	0,170 - 0,221
	70	0,201	0,180 - 0,242
99	0,299	0,248 - 0,463	

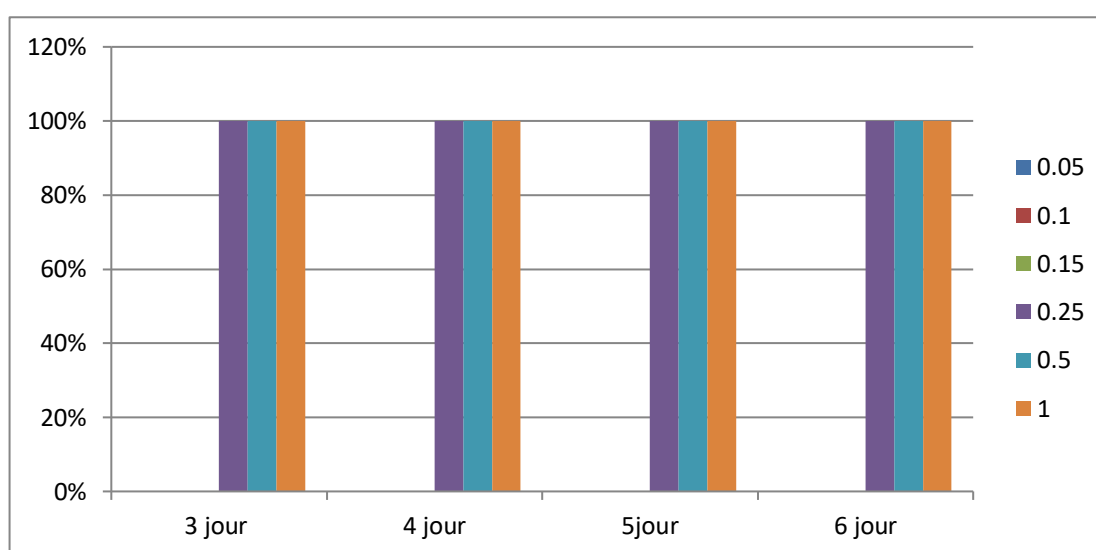


Figure 42 : Pourcentage d'inhibition d'*Alternaria alternata* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

Tableau 17 : les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

<i>Fusarium solani</i>	Taux d'inhibition%	Concentration	Borne inférieure - Borne supérieure
	10	0,086	0,009 - 0,119
	20	0,102	0,022 - 0,137
	30	0,116	0,040 - 0,159
	40	0,129	0,064 - 0,191
	50	0,142	0,089 - 0,251
	60	0,157	0,111 - 0,369
	70	0,175	0,129 - 0,605
99	0,355	0,220 - 0,440	

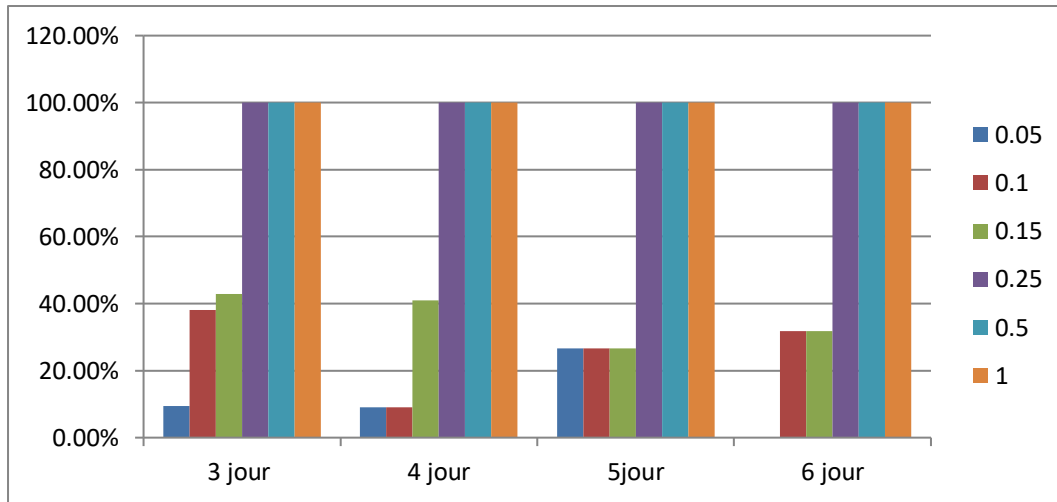


Figure 43 : Pourcentage d’inhibition de *Fusarium solani* induits par différentes concentrations de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata*.

Tableau 18 : les taux d’inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* induits par différentes concentrations de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata*.

<i>Fusarium oxysporum</i>	Taux d’inhibition%	Concentration	Borne inférieure - Borne supérieure
	10	0,032	0,000 - 0,063
	20	0,046	0,002 - 0 ,080
	30	0,060	0,006 - 0 ,098
	40	0,074	0,013 - 0 ,120
	50	0,091	0,028 - 0 ,154
	60	0,111	0,050 - 0 ,224
	70	0,138	0,079 - 0 ,403
	99	0,587	0,264 - 0 ,473

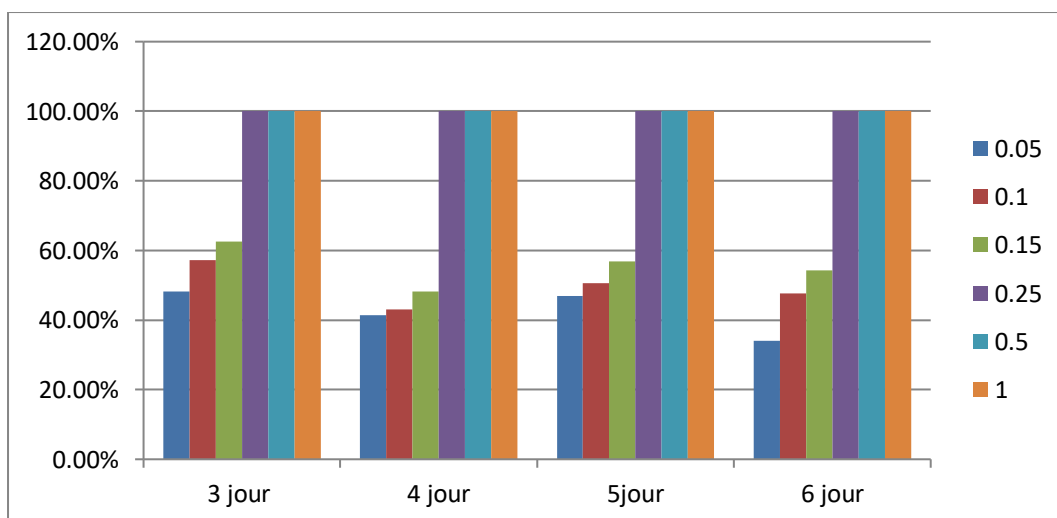


Figure 44 : Pourcentage d’inhibition de *Fusarium oxysporum* induits par différentes concentrations de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata*.

L'huile essentielle d'*Artemisia judaica* possède aussi une activité antifongique considérable contre les quatre souches fongiques, cette activité diffère significativement d'une concentration à l'autre car le *P* value obtenu était inférieur à 0.05 pour la totalité des tests effectués.

Nous signalons que les valeurs des concentrations minimales inhibitrices d'*Artemisia judaica* de la croissance des quatre champignons traités sont nettement supérieures à celles d'*Ammoïdes verticillata*. Dont elles correspondent à 4 µl/ml pour *Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* et à 3 µl/ml pour *Rhizopus sp.* (Fig.45, 46, 47,48).

Par conséquent nous constatons que l'ensemble des champignons traités présentent différents degrés de résistance vis-à-vis les deux huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* et d'*Artemisia judaica* qui varient selon les différentes concentrations utilisées.

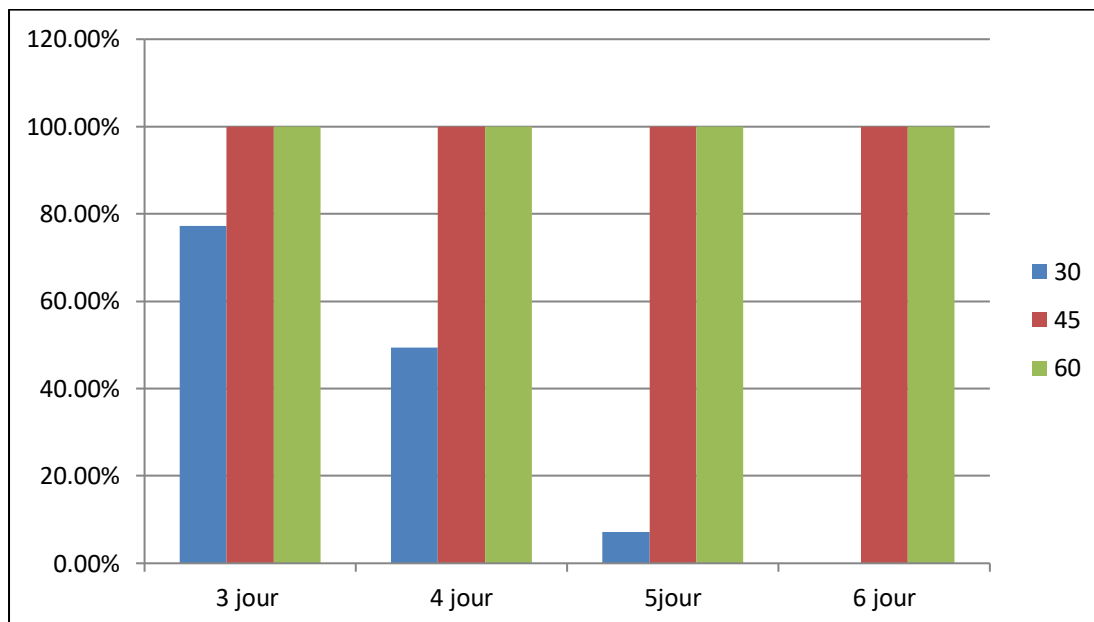


Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de *Rhizopus sp* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*.

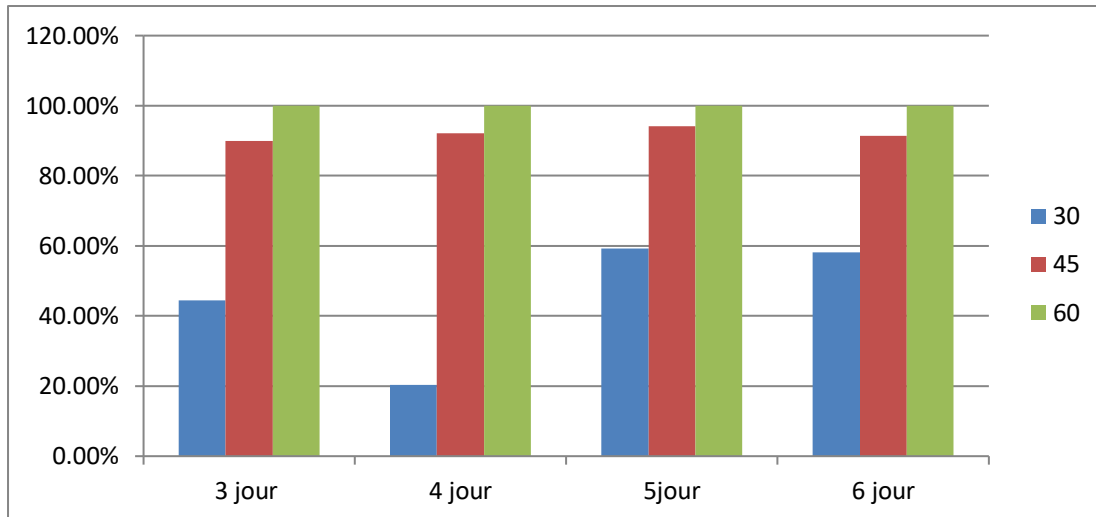


Figure 46 : Pourcentage d'inhibition de *Fusarium oxysporum* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*.

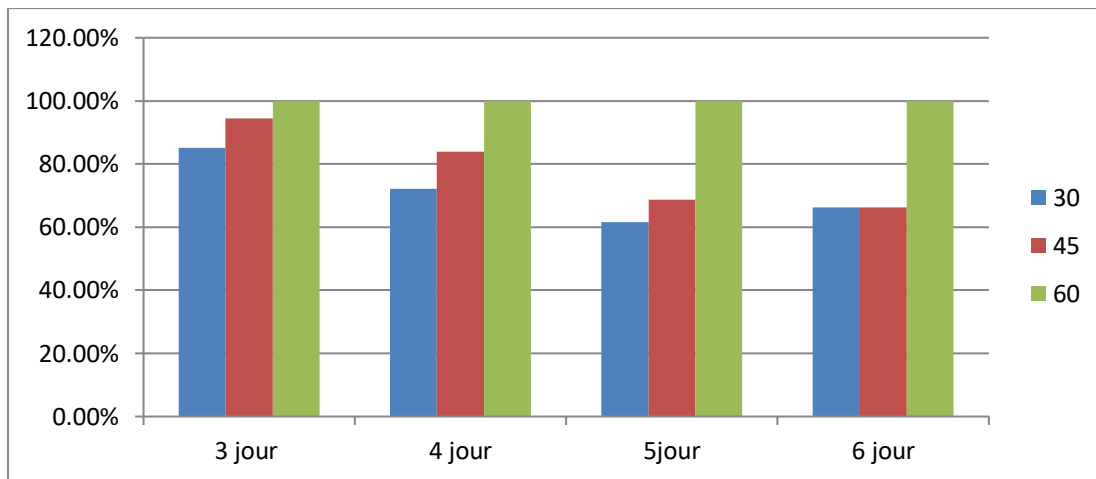


Figure 47 : Pourcentage d'inhibition d'*Alternaria alternata* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*.

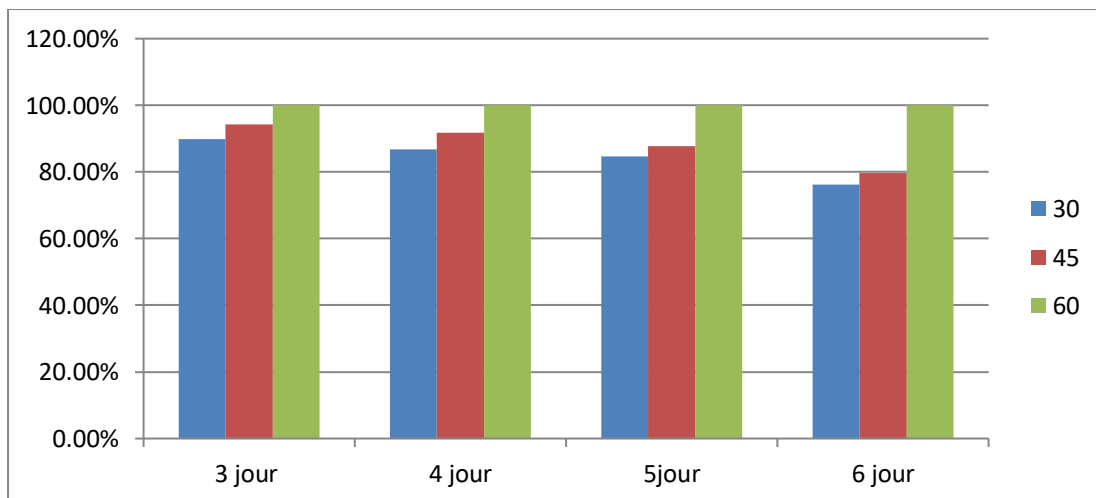


Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de *Fusarium solani* induits par différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*.

Discussion générale:

Dans Cette étude, 4 espèces fongiques ont été identifiées à partir de différents organes de la plante de pomme de terre, dont les feuilles présentent des petites taches brunes aux bords nécrosés et des blessures sur les tiges. Ces symptômes causés par des facteurs biotiques ou abiotiques qui favorisent la pénétration des espèces fongiques responsables de diverses maladies fongiques. (**Lazzizera et al. (2008)**).

L'étude mycologique de nos pomme de terre montre une diversité des genres de champignon pathogènes présents, qui sont *Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* ; *Rhizopus sp.*

A partir de la méthode de dilution, l'espèce la plus dominante c'est *Alternaria alternata*.

Nous avons constaté qu'*Alternaria alternata* était la moisissure la plus dominante. **Woudenberg et al. (2013)** a également signalé qu'*Alternaria sp* est l'un des champignons communs sur plusieurs matrices et largement connu comme pathogène facultatif responsable de maladies sur d'autre fruits et légumes tel que d'olivier.

Pour la méthode direct les espèces *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* étaient largement représentés dans cette étude .D'ailleurs, selon **Ikhoul (2011)**, *Fusarium sp* est l'un des principaux agents responsables de la détérioration des fruits commercialisés en Algérie.

En ce qui concerne le genre *Rhizopus sp*, il est présent avec une faible incidence dans les échantillonnages traités.

Selon (**Trachuk et al., 2008**), les souches de *Bacillus* mésophile peuvent parasiter les microorganismes phytopathogènes en dégradant leurs parois. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont efficaces dans le biocontrôle des divers champignons phytopathogènes (**Williams et Asher, 1996**) et la plupart ont été capables d'inhiber la croissance de *Fusarium*, *Aspergillus*, et *Penicillium* (**Landa et al., 1997**).

Bacillus subtilis a été largement utilisé comme agent de lutte biologique. Cette bactérie appartient au groupe de bactéries ayant le pouvoir de synthétiser des molécules et des substances antibactériennes et antifongiques, telles que les surfactine, les iturine et les fengycines (**Nagorska et al.2007**).

Le but de cette étude était l'évaluation de l'efficacité des souches bactériennes comme moyens de contrôler ou au moins réduction des effets toxiques des agents pathogènes qui causent des maladies fongiques sur les plantes de la pomme de terre.

Dans le présent travail, les trois souches de *Bacillus subtilis* isolées du sol de la rhizosphère de l'oranger (*Citrus sinensis*) sont testées in vitro sur des trois champignons

phytopathogène de pomme de terre (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata*).

Après les tests d'antagonisme antifongique effectués, nous avons eu des résultats encourageants concernant l'activité antagoniste vis-à-vis les trois champignons phytopathogènes traités dont nous avons trouvé que la souche *B2C* présente une activité antifongique la plus importante vis-à-vis *Alternaria alternata* dans la confrontation directe. Les résultats obtenus concernant l'évaluation de l'activité antifongique des substances inhibitrices volatiles de la même souche étaient un peu plus satisfaisants en les comparant aux résultats obtenus dans le test précédent, dont on a remarqué que la souche *B2C* inhibe la croissance des deux souches fongiques avec un pourcentage différent (*Alternaria alternata* 33,24%, et *Fusarium solani* 33,39%).

D'après ces résultats, on constate que les trois souches antagonistes (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) présentent des substances volatiles inhibitrices des champignons phytopathogènes. Par ailleurs, il a été démontré dans d'autres travaux de recherche que les espèces appartenant aux genres *Bacillus* présentent des activités antibactériennes et/ou antifongiques par l'émission de composés organiques volatils (COV) (**Berrada et al, 2012; Cernava, 2012; Rybakova et al, 2015**).

Concernant la méthode d'antagonisme par l'utilisation du filtrat bactérien on note que les trois souches de *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) possèdent une efficacité très importante vis-à-vis les souches fongiques (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata*) avec des pourcentages d'inhibition considérables. Cela, peut signifier que nos souches de *Bacillus subtilis* disposent d'un ou plusieurs types de molécules lipopeptidiques ayant des capacités remarquables d'inhibition des moisissures phytopathogènes ciblées.

Aussi, d'après (**A. M. Mardanov et al. 2017**) des recherches ont mis en évidence des activités antagonistes de *Bacillus subtilis* contre (*Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*) par la sécrétion des molécules lipopeptidiques antifongiques dans les régions productrices de melons (**Beatty & Jensen 2002**) et confirmé par (**Zhao Q., Mei X., Xu Y. 2016**).

Les résultats *in vitro* ont illustré que toutes les souches de *B. subtilis* utilisées, produisent des métabolites extracellulaires et inhibent la croissance des pathogènes, ces résultats sont en

accord avec les recherches précédemment effectuées par (**Romanenko et al., 2000 et Kamal et al., 2009**)

Le pouvoir antifongique de *Bacillus subtilis* ne se limite pas au genre *Fusarium*, mais cette dernière espèce est capable d'inhiber la croissance de divers champignons phytopathogènes tel que *A. alternata*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* et *Cladosporium herbarum* (**Abou-zeid, et al., 2009**).

Selon (**Abdelmoteleb et al. 2017**) La souche « ALICA » de *B. subtilis* isolé du sol de la rhizosphère de *P. juliflora* avait une forte activité antagoniste contre *Alternaria alternata*.

D'après les études de (**Zhang et al.2020**) La pénétration des hyphes, la germination des conidies et la virulence d'*Alternaria solani* étaient significativement réduits lorsqu'ils étaient traités avec des composés organiques volatiles produits par la souche ZD01.

Tous les molécules volatiles actifs produites par les bactéries jusqu'à présent peuvent être regroupés en alcools, cétones, aldéhydes, alcènes, alcynes, benzènes, esters, terpénoïdes, hétérocycles et contenant du soufre composés (**Fernando et al., 2005; Corcuff et al., 2011; Lemfack et al., 2014**).

Notre travail a également basé sur l'utilisation des huiles essentielles dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes isolés de pomme de terre.

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**).

Ammoïdes verticillata (Nokha) a un rôle important dans la lutte biologique comme un biopesticide avec un bon rendement, il requiert une faible dose pour provoquer une mortalité ou inhibition importante chez tous les champignons phytopathogène (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* ; *Rhizopus sp*).

L'extraction de notre échantillon effectué par Hydrodistillation a fourni un rendement moyen de 0,90%.

D'après les travaux de **Bekhechi et al., (2010)** sur la même plante récoltée dans les régions de Tlemcen et d'Ain-Temouchent rapportent des rendements d'extraction en HE qui varient de 2.1 à 5.4%.

D'autres rendements ont été rapportés par autres études pour la même plante : 2.51% par **Bnouham et al, (2012)**, dans la région d'Oujda (Maroc), 2.8% par **Khajeh et al, (2004)**, 2.7 par **Bendahou, (2007)** (Tlemcen), 2.1% par **Hashemi et al, (2014)** (Iran) et 2.5% par **Nickavar et al, (2014)** (Iran).

Les résultats obtenus lors des essais de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* vis-à-vis les 4 champignons traités ont montrés des activités très intéressantes puisqu'elles ont été très efficaces même avec de très faibles concentrations (0,25 µl/ml), d'autre part et selon des travaux réalisées par (**Senouci, H. 2020**) utilisant l'huile essentielle de la même plante contre *F. solani*, *R. stolonifer* et *A. alternata* isolés à partir des plantes d'olive, des activités inhibitrices à partir d'une concentration de 0,4µL/ml ont été prouvées. Dans le même contexte une autre recherche a été réalisée par (**Amara, A. 2016**) sur l'effet des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* contre des champignons pathogènes de l'olivier (*Olea europaea*) montre que pour la dose 0,5 µL/ ml l'activité antifongique vis –à – vis *Alternaria sp* et *Fusarium solani* est la plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de 89%, alors que en diminuant les doses de huiles essentielles utilisées (0,125 µL/ ml ; 0,06 µL/ ml ; 0,03µL/ ml) l'auteur a observé une augmentation de la résistance des deux champignons cités envers l'huile essentielles d'*Ammoïdes verticillata*, ce qui a été le cas pour les tests que nous vont effectué par notre huile essentielles d'*Ammoïdes verticillata*.

Artemisia judaica est aussi un bon biopesticide mais avec des doses plus élevées, il peut être recommandé aux agriculteurs en leur indiquant les concentrations efficaces.

L'extraction du plante d'*Artemisia judaica* nous à donné un rendement moyen de 0,60%. Une étude comparative entre les huiles essentielles d'*Artemisia judaica* et *Artemisia herba alba* à Saudia Arabie (**Lamya H. Naser Al-Wahaibi et al.2008**) Le rendement sur la base du poids frais des huiles volatiles dérivées d'A. judaica et A.herba-alba après une Hydrodistillation était de 0,18 g (0,18 % (v/p) et (0,045 g, 0,051% (v/p) respectivement).

Concernant le résultat obtenu suite à l'utilisation d'HE d'*Artemisia judaica*, nous avons trouvé des activités antifongiques considérables contre les champignons phytopathogène (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*) à une concentration 4µL/ ml et à une concentration 3µL/ml contre (*Rhizopus sp*), mais elles restent moins importantes par rapport à celles qui correspondent à HE d'*Ammoïdes verticillata*. En parallèle selon la recherche de (**Mr. Ghrib, 2009**) l'huile essentielle d'*Artemisia judaica*

présente une activité antifongique moins considérable contre (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*) à des concentrations de 5 µL/ml, 10µL/ml.

Cette plante possède d'autres activités, antifongique, insecticide, molluscicide (**Abdelgaliel et al., 2008, Bratt et al., 2001 ; Abdel-Elhady, 2012 ; Bakry et al., 2011**)

Toutefois, les différences enregistrées entre les résultats peuvent être expliquées par la différence entre les compositions biochimiques des huiles essentielles des deux plantes.

La composition chimique en huile essentielle est fortement influencée par des facteurs biotiques et abiotiques. Elle dépend des conditions climatiques, saisonnières et géographiques ainsi que de la période de récolte de la plante voire de la technique d'extraction (**Kapoor et al., 2002 ; Baydar et al., 2004 ; Colombo et al., 2013**). En outre, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est en relation directe avec la composition et la concentration en composés volatils, le type des microorganismes cible, les conditions et les méthodes de traitement (**Baydar et al., 2004**). Cela a été confirmé par les résultats obtenus grâce aux différences et aux disparités en termes d'efficacité dans l'activité inhibitrice de la croissance mycélienne des différents champignons phytopathogènes traités.

Les capacités inhibitrices des différentes bactéries utilisées et malgré qu'elles étaient dans la majorité des cas pour les deux confrontations directes et indirectes, négligeables, elles peuvent être exploitées dans des stratégies de défense contre ces agents phytopathogènes ciblés en combinaison avec d'autres moyens de lutte biologique ou chimique.

Conclusion générale

Conclusion

Ce travail a été essentiellement consacré à l'étude des activités antifongiques des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales : *Ammoides verticillata* et *Artemisia judaica* et des trois souches de la bactérie *Bacillus subtilis* contre quelques moisissures phytopathogènes responsables des maladies cryptogamiques (fongiques) de la pomme de terre qui sont : (*Fusarium solani* ; *Fusarium oxysporum* ; *Alternaria alternata* ; *Rhizopus sp*).

L'étude *in vitro* du pouvoir antagoniste des souches bactériennes de *Bacillus subtilis* vis-à-vis les trois champignons phytopathogènes a révélé que toutes les bactéries testées possèdent une activité antifongique au moins sur un seul champignon.

Dans le cas de confrontation indirecte réalisé *in vitro*, malgré l'absence d'un contact direct entre les pathogènes et les souches antagonistes, une réduction remarquable des diamètres des colonies des mycètes est observée par rapport aux témoins négatifs. Cela prouve que les souches bactériennes utilisées sécrètent des substances volatiles qui sont capables de limiter à distance le développement des souches fongiques.

D'autre part, le test de l'activité antifongique a été réalisé *in vitro* dans le cadre de lutte biologique des trois souches de *Bacillus subtilis* (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) par confrontation directe vis-à-vis des champignons isolés. D'après nos résultats, la meilleure efficacité de l'activité antifongique a été obtenue par la souche *Bacillus subtilis* (*B2C*) avec un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne qui arrive jusqu'à 33.67% sur *Alternaria alternata*.

En général, les résultats de confrontation direct et indirect n'étaient pas tellement intéressants contrairement par rapport à ceux obtenus par l'utilisation des filtrats bactériennes des trois souches (*B2C*, *BM14*, *S2DSP*) où les pourcentages d'inhibition obtenues étaient relativement importants et qui varient généralement entre 18,84% et 62%.

D'autre part, l'étude des activités antifongiques des deux huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et d'*Artemisia judaica* contre les champignons phytopathogènes de la pomme de terre cités précédemment, a montré de bonnes efficacités qui peuvent leur qualifier en tant que des excellents moyens de luttés dans le cadre d'un éventuelle programme de lutte biologique, ou même de proposer leur combinaison avec d'autres moyens de lutte dans le cadre d'un programme de lutte intégrée. Les différentes CMI enregistrées suite à l'utilisation de ces deux huiles essentielles dans le présent travail confirment leurs potentialités antifongiques importantes contre les champignons traités car elles étaient toutes inférieures à 4 µl/ml.

Conclusion

Sur la base des résultats obtenus, l'huile essentielle *d'Ammoides verticillata* a montré une efficacité plus importante par rapport à celle d'*Artemisia judaica*.

Dans un contexte global d'une forte demande sociale pour la mise en place des moyennes de lutte plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine, il est primordial de trouver des solutions menant à une baisse de l'usage global des pesticides chimiques jusque la utilisés.

Les résultats obtenus montrent que lors de la mise en place d'un programme de lutte éventuel nous aurions la possibilité d'utiliser ces souches et ces huiles essentielles comme des bio-fongicides contre les champignons phytopathogènes de la pomme de terre.

*Référence
bibliographique*

1. **Abd El Monaim Hassen A, 1999.** Production de pomme de terre. Maison arabe de L'édition et la distribution. 446p.
2. **Abdalla, S.S., Abu-Zagra., M.H., 1987.** Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica*, on isolate guinea-pigileum. *Planta Med.* 53, 322-324.
3. **Abdelgaleil S. A., Abbassy M. A., Belal A. S. H., & Rasoul M. A. A. (2008).** Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresource technology* 99(13): 5947-5950.
4. **Abd-Elhady H. K. (2012).**Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Protection Research* 52(3): 347-352.
5. **Abdelmoteleb A, Troncoso-Rojas R, Tzintzum-Camacho O, González-Mendoza D, Ceceña Duran C, Grimaldo-Juárez O, Aviles-Marin M, Duran-Hernández D.** Biocontrol of *Fusarium* spp., causal agents of damping-off in cotton plants by native *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora*. *Int J Agric Biol* 2017; 19:713 8.
6. **Abdelouahid, D.E., Bekhchi, C. (2004):** Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha). *Rev, Biologie et santé* 4(2):1-10.
7. **Abou-Zeid, A. M, Altalhi. A.D and Abd El-Fattah. R.E, 2009.** Bacterial control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif Governorate, Saudi Arabia, Taif University, Saudi Arabia., 7(1): 11-20.
8. **Adesemoye, A.O., Torbert H.A., & Kloepper J.W. (2008).** Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 876–886.
9. **Afrikjan, E. G., V. A. Tchilingirln et L. A. Tchil-Akopln. 1969.** Bakterialnii incekticidnii preparat BIP-805. *Biol. j. Armenii*, t. 22, 3-7.
10. **Agrios G.N. (2005).** *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press. USA, UK.
11. **Agrios, G. N. 1997.** *Plant Pathology* (4th ed. p. 635). San Diego: Academic Press, USA.

12. **Ahmed, S. I. et S. R. Leather. 1994.** Suitability and potential of entomopathogenic Microorganisms for forest pest management - some points for consideration. Intern. J. Pest Management 40: 287-292.
13. **Aired S., 2007 :** La culture de la pomme de terre in Agriculture et développement. Rev. Vulg. Communication., Inst. Nati. Vul. Agri., n° 05 : 49-54.
14. **Albuquerque C.C., Camara T.R., Marian R.D., Willadino L., Marcellino C., Ulisses C. (2006).** Antimicrobial action of the essential oil of *Lippiagracilis*Schauer. Brazilian Archives of Biologie Archives of Biologie and Technology. 49: 527-535.
15. **Albuquerque U.; Monteiro J.; Ramos M.; Amorim E., 2006.** Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. J. Ethnopharmacol. Doi: 10.1016/j.jep.2006.09.010.
16. **Al-Gaby A., Allam R. (2000).** Analyse chimique, activité antimicrobienne, et les huiles essentielles de certaines herbes sauvages en Egypte Journal d'herbes, d'épices et les plantes médicinales vol. 7, n°1, pp. 15-23.
17. **Amara, A. 2016.** Activités antiparasitaires et antifongiques des huiles essentielles et hydrolats de *Ammoides verticillata* et *Echinops spinosus* sur les pathogènes de l'olivier *Olea europea*, Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Master en science biologiques, Université Aboubakr Belk Aïd – Tlemcen, 104p.
18. **Arroyave-Toro J. J., Mosquera S., Villegas-Escobar V. (2017).** Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biol. Control* 114 195–200.
19. **Aryal S.** Biochemical tests and identification of *Bacillus subtilis* **2016** [25/12/16]. Available from: <http://www.microbiologyinfo.com/biochemical-test-andidentification-ofbacillus-subtilis/>
20. **Bakry F. A, Ragaa T. M, El-Hommosany K. (2011).** Biological and biochemical responses of to some extracts of *Biomphalaria alexandrina* of the plants *Solanum sinicum* and *Artemisia judaica* L. Pesticide Biochemistry and Physiology, 174-180.

21. **Bamouh h. 1999.** Technique de production la culture de pomme de terre, bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA, N° 58, PP1-15.
22. **Bardeau F., 1976.** La médecine par les fleurs. Ed. Robert Laffont.
23. **Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T., 2004.** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control. 15, 169–172.
24. **Baytop T. et Sütlüpınar N., 1986.** - Characteristics of « Nanahan» cultivated in Anatolia and its volatile oil. J. Fac. Pharm. Istanbul, 22: 73 - 76.
25. **Beatty P.H., Jensen S.E. (2002):** *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Canadian Journal of Microbiology, 48: 159–169.
26. **Beatty, P.H. and Jensen, S.E. (2002)** *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Canadian Journal of Microbiology, 48, 159-169. doi:10.1139/w02-002.
27. **Bekhechi C., Abdelouhid D. (2010).** Les huiles essentielles. Office des publications Universitaires. Place centrale- Ben-Aknoun-ALGER.55p.
28. **Belaiche P. (1979).** Aromatogramme. In Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Edition Maloine-S-S, tome I. p. 9-20.
29. **Bellakhdar J, 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle, Edition Ibis Press p: 759.
30. **Benaissa M., El Haitoum A., Hadjadj K. 2018** - Floristic and medical diversity interest of Djebel Aissa national park (Ksour Montains, Algeria), Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences 14(2): 303-306.
31. **Benbrook, C. M., Groth, E., Hansen, M. K, Halloran, J. M., and Marquardt, S., 1996,** Pest Management at the Crossroads (Yonkers: Consumers Union of United States).

32. **Bendahou M., Benyoucef M., Benkada D., Soussa Elisa M. B. D., Galvao E. L., Marques M. M. O., Muselli A., Desjobert J. M., Bernardini A. F., Costa J., 2007.** Influence of the processes extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. Ed. J. of Applied Sciences, 8, pp: 1152-1157.
33. **Benniou R., 1988 :** Etude de l'influence de quelques caractéristiques physiques du sol sur la production chez quatre variétés de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) cultivés en région sétifeinne. Thèse Mag. INA., El harrach. Alger., 81 p.
34. **Bernhards U. (1998).** La pomme de terre *Solanum Tuberosum*.L. Monographie. institue National Agronomique. Paris.grignon. 219-230P.
35. **Berrada I., A. Willems, P. De Vos, M. El Fahim, N. Bendaou, M. Melloul, J. Swings and M. Amar, 2012.** Diversity of cultur-able halophilic bacteria in a salt marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). African Journal of Microbiology Research 6(10), 2419–2434.
36. **Bhargava, HaKsar (1961) in Mehta R. L., Zayas J. F. (1995).** Antioxidative effect of Ajowan in a model system. JAOCS, 72:1215 - 1218.
37. **Bnouham M., Benalla W., Asehraou A. & Berrabah M. (2012).** Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. Spatula, 2(1): 69-73.
38. **Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
39. **Boufares K, 2012.** Comportement de trois variétés de pommes de terre (Spunta, Désirée et Chubaek) entre deux milieux de culture substrat et hydroponique. Thèse de magister. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. 108p.
40. **Bouguefda M. 2013 -** Modélisation de la nappe du créacé inferieur de la gouttière synclinale d'El Maader (Monts des ksours, Atlas saharien occidental). Thèse de magister, Département des sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen, 100 p.

41. **Bouquet, A., Pauquet, J., Adam-Blondon, A. F., Torregrosa, L., Merdinoglu, D., & Wiedemann-Merdinoglu, S. (2000).** Vers l'obtention de variétés de vigne résistantes à l'oïdium et au mildiou par les méthodes conventionnelles et biotechnologiques. *Bulletin de l'OIV*, 73(833-34), 445-452.
42. **Bowles EJ, (2004)** *The Chemistry of Aromatherapeutic oils* (Third Ed.). Crows Nest, NSW, Allen & Unwin Academic, New South Wales, Australia.
43. **Bratt K., Sunnerheim K., Nordenhem H., Nordlander G., & Långström B. (2001).** Pine weevil (*Hylobius abietis*) antifeedants from lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Journal of chemical ecology* 27(11): 2253-2262.
44. **Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., and Briandet, R. (2010).** The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J. Microbiol. Methods* 82, 64–70. Doi: 10.1016/j.mimet.2010.04.006.
45. **Bruneton J., (1999).** *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
46. **Bruneton J., 1999.-** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
47. **Bruneton J., 1999.** *Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales*. 3ème Ed. Tec et Doc., p. 484 – 540.
48. **Bruneton, J (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie; plantes médicinales*. 3ème édition. Paris: Editions médicales, Tri. Édition Ter- et Doc Lavoisier, 1120 p.
49. ***Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 85, 2016, p. 276 – 290.***
50. **Burt, S.A. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
51. **Cahagnier B., Richard-Molard D., (1998),** *Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, p 140-158.

52. **Cernava T (2012)** Identification of volatile organic compounds from plant-associated bacteria. Master's thesis, Graz University of Technology.
53. **Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., et Penn P. 2002.** Cahier de formation Biologie médicale, Les moisissures d'intérêt médical, France: Bioforma. 160p.
54. **Cheffi Azabou M., Gharbi Y., Medhioub I., Ennouri K., Barham H., Tounsi S., Ali Triki M. 2020.** The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium Wilt* of Olive and a potential plant growth promoting bacteria. *Biological Control* 142.
55. **Cherfi M., 1989:** Comparaison de différentes variétés de pomme de terre pour la détermination des meilleurs. Mém. Ing. Agro., Inst. Nati. Ens. Sup. Scie. Biol., Sétif., 38 p.
56. **Chibane A, 1999.** Techniques de production de la pomme de terre au Maroc. Bull. Mens. De liaison et d'information du PNTTA ; MADRPM/DERD n°52. Janvier 1999. Inst Agro. Hassan II ; Rabat-Maroc. 8p.
57. **Chibane A. (1999).** Technique de production de la pomme de terre au Maroc. Bulletin de liaison et d'information du PNTTA. Transfert de technologie en agriculture N°52. P04.
58. **Clevenger J.F., 1928.** Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **17**, 341-346.
59. **CNCCSP (2010).** Bulletin de variétés de pomme de terre, centre national de contrôle et certification des semences et plants.
60. **Cohn, F. (1872)** "Untersuchungen über Bakterien". Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1. pp. 127–224. As cited in: Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (editors). *Approved Lists of Bacterial Names (Amended)*. Washington (DC): ASM Press; 1989. [Http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK819/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK819/).
61. **Colombo RP., Martíneza AE., di Pardo AF., Bidondo LF., Van Baren C., Di Leo Lira P., Godeas AM., 2013.** Differential effects of two strains of *Rhizophagus*

- intraradices on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta*. *Rev. Argent. Microbiol.* 45: 114-118.
62. **Comporta P., 1985.** Antagonisme in vitro de *Trichoderma* sp. Vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie*, 1985, 5 (7), 613-620.
63. **Cook R.J. (1993).** Making greater use of introduced Microorganisms for biological contrôle of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, p. 53-80.
64. **Corbaz R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes. D'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Canada, pp56.
65. **Corbaz, R. (1990).** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires ramandes. Première édition, 205p.
66. **Corcuff, R., Mercier, J., Tweddell, R., and Arul, J. (2011).** Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. *Fungal Biol.* 115, 220–227.
67. **Cronquist, A. (1981).** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, 248-250.
68. **Daira et al, 2016:** Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Ammoïdes verticillata* (Desf.) Briq. De l'Est Algérien», *Bulletin De La Société Royale Des Sciences De Liège* [En ligne], Volume 85 - **Année 2016**, Articles, 276 -290.
69. **Danielle Huard., 1999.** Les huiles essentielles, l'aromathérapie. Canada: Quebec: 195p.
70. **Degryse, A.C., Delpla, I., et Voinier M.A. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
71. **Dennis, C.; Webster, J. (1980).** Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. I. Production of Non-Volatile Antibiotics. *Trans. Br.Mycol. Soc.*, 84:25-39.

72. **Dob T., Che1ghoume C. (2006)** Chemical. Composition of the essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria. Flavour and fragrance journal, vol. 21, n °2, pp. 343-347. Dob T.
73. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.09.004.
74. **Dunlap C. A., Schisler D. A., Price N. P., Vaughn S. F. (2011).** Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of fusarium head blight. *J. Microbiol.* 49 603–609.
75. **Dupont F, 2004.** Botanique - Systématique Moléculaire. Ed Masson. 110-125.
76. **Duvauchelle, S. et Andrivon, D. 1996.** Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In Rousselle, P.; Robert, Y. Et Croisnier, J.C. Ed. INRA et ITCF. France: 607.
77. **E. Macé, 1897.** Traité Pratique De Bactériologie, Troisième édition, PARIS LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS, 1185 p.
78. **Easton, G. D., and Nagle, M. E. 1990.** Aircraft-applied sulfur for control of powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*) on potato in Washington State. *Amer. Potato J.* 67:385-392.
79. **Ehrenberg, C. G. (1835)** 'Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus den Jahren 1833–1835. pp. 145–336. As cited in: Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (editors). *Approved Lists of Bacterial Names (Amended)*. Washington (DC): ASM Press; 1989.
80. **Elqaj.M, A. Ahami, D. Belghyti, 2007:** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires, Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
81. **Emmert EA and Handelsman J. 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* 171: 1-9.
82. **FAOSTAT 2013.** Available online : <http://faostat.fao.org>

83. **Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. and Guo, Z. (1986).** Places des plantes medicinales dans la therapeutiques.bulltin de l'organisation mondiale de la santé. 64(2): 159-164.
84. **Felidj M., Bouazza M., Ferouani T., 2010.** - Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoïdes pussila (verticillata)* dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale).Rev, Geo-Eco-Trop., **2010**, 34: 147 - 154.
85. **Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., and Savchuk, S.C. (2005).** Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol. Biochem. 37, 955–964. Doi: 10.1016/j.soilbio.2004.10.021.
86. Fickers, P. 2012. Antibiotic compounds from Bacillus: Why are they so amazing. Am. J. Biochem. Biotechnol. 8: 40-46.
87. **Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007).** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chemistry, 102(3), 898-904.
88. **Gaucher, D., Duvauchelle, S. and Andrivon, D. 1998.** Mildiou de la pomme de terre – le champignon évolue, la lutte aussi! Perspectives agricoles. 236:1-20.
89. **Gherib, 2014.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielle *et des flavonoides d'Artemisia herba alba* Asso; *Artemisia judaica* .L. ssp. *sahariensis*; *Artemisia campestris* L; *Herniaria mauritanica* Murb et *Warionia saharae* Benth. Et Coll. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid —Tlemcen, 133 p.
90. **Guinochet M et Vilmorin R. (1975):** Flore de France fascicules. Ed. Centre national de la recherche scientifique France.
91. **Hashemi M.B., Niakousari M., Saharkhiz M.J., Eskandari M.H. (2014).** Stabilization of sunflower oil with Carum copticum Benth & Hook essential oil. J.Food Sci. Technol., 51(1): 142.

92. **Hmamouchi M (1999)** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie, lexique. Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), 389 p.
93. **Holt et al., 1994 J.G. Holt, N.R. Kring, P.H. Sneath, J.T. Standley, S.T. Williams** Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed), Williams and Wilkins, Baltimore, USA (1994).
94. [Http: //www.viamichelin.fr/](http://www.viamichelin.fr/) Situation géographique la commune de Terni Béni Hdiel.
95. **Ignoffo, C. M. 1970.** Proceedings of the Tall Timbers Conference on Ecology of Animal Contributions by Habitat Management, Tallahassee, Florida. Tall Timbers Research Station: 47-57.
96. **Ignoffo, C. M., 1973.** Vertebrates and entomopathogènes, Ann. N.Y. Acad. Sci., 217, 165.
97. **Ikhoul J., (2011).** Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant disease, 67(5), 499-503.
98. **Janiciewickz, W.J., Leverentz, B., Conway, W.S., Saftner, R.A., Reed, A.N., and Camp, M.J. 2003.** Control of bitter rot and blue mold of apples integrating heat and antagonistic treatments on 1-MCP treated fruits stored under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biology and Technology 29: 129-143.
99. **Joshi B. S., Ramanujam S., Sahena M. B. L. (1963).** Improvement of some essential oil bearing spice plants. Bull. Regional Res. Lab. Ja., 1:94— 100.
100. **Kamal AM Abo-Elyousr, Hashem M Mohamed (2009)** Biological control of Fusarium wilt in tomato by plant growth-promoting yeasts and rhizobacteria. Plant pathol. J 25(2): 199-204.
101. **Kapoor R., Giri B., Mukerji KG., 2002.** *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum [*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague]. World. J. Microbiol. Biotechnol .18:459-63.

102. **Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ileim A (2001).** Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. of Ethno*, 47: 997-1001.
103. **Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., et al., 2004.** Comparison of essential oil of Carom coticum obtained by supercritical carbondioxide extraction and Hydrodistillation methods. *Food Chem.*, **86**(4):587–591. [doi:[10.1016/j.foodchem.2003.09.041](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.041)]
104. **Khaled F. El-Massry Ahmed, El-Ghorab H, Farouk Amr. 2002.** Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chemistry*, volume79, 331–336.
105. **Kim P. I., Ryu J., Kim Y. H., Chi Y. T. (2010).** Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 138–145.
106. **Knobloch K., Pauli A., Iberi B., Weigand H., Weis N. (1989).** Antimicrobial and antifungal properties of essential oils components. *J of essential oil Research*, 4: 189-190.
107. **Kolev N., 1979 :** Les cultures maraichères en Algérie. T (3). C.N.P.A : 95-120.
108. **Korsten, L., & DE Jager, E.S. 1995.** Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado post-harvest pathogens. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18:124-130.
109. **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS.
110. **Kumar K.V.K., Yellareddygar S.K., Reddy M., Kloepper J., Lawrence K., Zhou X., Sudini H., Groth D.E., Raju S.K., Miller M.E.** Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice. *Rice Sci.* **2012**; 19(1):55–63.

111. **Kunst et al. 1997.** The complete genome of sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, Nature.
112. **Lahlou M, (2004)** Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour & Fragrance J.* 19, 159-165.
113. **Lahlou M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *Phytotherapy research*, 18(6), 435-448.
114. **Lahmissi A., 2004 :** Assainissement de deux variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) (Diamant et désirée) par culture de méristème et thérapie. Thèse. Mag. INA., El Harrach. Alger., 122 p.
115. **Lamya H. Naser Al-Wahaibiadeem Mahmood merajuddin Khanhamad Z. Alkhatlan, 2008,** Comparative study on the essential oils of *Artemisia judaica* and *A. herba-alba* from Saudi Arabia, 13, 2053-2056.
116. **Landa, B.B., Hervas, A., Bethiol, W., Jimenez-Diaz, R.M. (1997).** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *Ciceris*. *Phytoparasitica*, N°25, pp305-318.
117. **Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., Lopes, J., Phillips, A.J.L. (2008)** Fungal Diversity. N°31, pp 63–71.
118. **Leclère V., Bechet M., Adam A., Guez J.-S., Wathelet B., Ongena M., et al. (2005).** Mycosubtilin over production by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microb.* 71 4577–4584. 10.1128/aem.71.8.4577-4584.2005.
119. **Legrand G. 1978.** Manuel préparatoire en pharmacie. 8^{ème} Ed. Masson.
120. **Lemberg S. 1982.** Armoise *Artemisia herba Alba*. *Parfumer flavorist*, 7, p 58 – 63.
121. **Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., and Piechulla, B. (2014).** MVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D744–D748.
122. **Lepoivre, P. (2003).** *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte.* De Boeck. Ed. Première édition. 125-291-292.

123. **Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006).** The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Hoboken, 1-2.
124. **Lis-balchin, M. (2002).** Lavender, the genus *Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis, p.268.
125. **Liu J., Hagberg I., Novitsky L., Hadj-Moussa H., Avis T. J. (2014).** Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biol.* 118 855–861. 10.1016/j.funbio.2014.07.004.
126. **Lugtenberg B, Kamilova F (2009).** Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556.
127. **Lundberg, A.; Unestan, T. (1971).** Antagonism against *Fomes annosus*. Comparison between different test methods “in vitro” and “in vivo”. *Mycopathologia*, **70**:107-115.
128. **M M Nakano, Y P Dailly, P Zuber, and D P Clark. 1997.** Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Nov. 1997, p. 6749–6755.
129. **Mansouri R., 2003 :** Influence de la vitesse et de la profondeur de travail sur les pertes et la qualité des tubercules de la pomme de terre l’hors d’une récolte mécanisée. *Mém. Ing. INA., El harrach. Alger., 76 p.*
130. **Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M. and Sharipova, M.R. (2017)** *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 8, 1-20. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2017.81001>
131. **Mejri S., Siah A., Coutte F., Magnin-Robert M., Randoux B., Tisserant B., et al. (2017).** Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 29822–29833. 10.1007/s11356-017-9241-9

132. **Mihalache G., Balaes T., Gostin I., Stefan M., Coutte F., Krier F. (2017).** Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 29784–29793. 10.1007/s11356-017-9162-7
133. **Moule C., 1972 :** Les plantes sarclées. Ed. Maison rustique. Paris. 246 p.
134. **Nagorska K, Bikowski M, Obuchowski M (2007).** Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances supports usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim Pol* 54:495-508.
135. **Nasraoui B., (2006).** Les Champignons Parasites Des Plantes Cultivées, Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Chapitre 1. P: 141-151. Chapitre 3 et 4. P: 320-447.
136. **Nelson, S. C. 2008.** Late blight of Tomato (*Phytophthora infestans*). College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa Cooperative Extension Service PD-45. 10p.
137. **Nickavar B., Adeli A. & Nickavar A. (2014).** TLC-Bioautography and GC-MS Analyses for Detection and Identification of Antioxidant Constituents of *Trachyspermum copticum* Essential Oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1): 127-133.
138. **Ongena M. ET Jacques P. (2008).** *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16:115-125.
139. **Pal, K. K., and B. M. Gardener. 2006.** Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. Biological control. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
140. **Paterson, R., & Lima, N. (2011).** Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International*, 44, 2555–2566.
141. **Pitt & Hocking. (1997).** *Fungi and food spoilage*, 2nd Edition, Gaithersburg M. D: Aspen Publishers.
142. **Pitt J.I et Hocking A.D. (1997).** *Fungi and food spoilage*. 2ème Edition. London: Blackie Academic and Professional.

143. **Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S. (2008).** Antifungal potential of extracellular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 330-337.
144. **Quezel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome. II Ed. CNRS. Paris.
145. **Quezel P. et Santa S., 1963.** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris, 671p.
146. **Rajnachapal M. J., 1987.** la pomme de terre fait peau neuve. *Biofutur*, Pp. 25-33.
147. **RAPILLY F. (1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Épiphyties* 19 (n° hors série), 102 p.
148. **Rapilly F. (2001).** Champignons des plantes: les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *Science de la vie*, 324, 893-898.
149. **RAYNAUD, J.,** Prescription et conseil en aromathérapie Editions Lavoisier.
16. **PAOLA, S (2006)**
150. **Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q., and Shen, Q. (2015).** Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol. Control* 80, 89–95.
151. **Romanenko VM, Alimov M (2000)** Ability of representatives of *Pantoea* agglomerans as well as *Bacillus subtilis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytopathogenic bacteria and micromycetes and regulate the plant growth. *Microbiology Journal* 62: 29-37.
152. **Romero D., De Vicente A., Rakotoaly R. H., Dufour S. E., Veening J.-W., Arrebola E., et al. (2007b).** The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20 430–440. 10.1094/mpmi-20-4-0430.

153. **Rousselle. P, Robert. Y, Crosnier J.C, 1996.** La pomme de terre: production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. Paris: INRA Editions.
154. **Rybakova D, Cernava T, Köberl M, Liebminger S, Etemadi M, Berg G (2016)** Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. Plant Soil 405:125–140
155. **Saidi, N., Kouki, S., M’Hiri, F., Hajlaoui, M. R., Mahrouk, M., Ouzari, H., & Hassen, A. (2009).** Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Annals of microbiology*, 59(2), 191-198.
156. **Sedra, My.H., 1995.** Problèmes phytosanitaires du palmier dattier en Mauritanie et propositions de moyens de lutte. Rapport de mission d'expertise effectuée en Mauritanie du 8 au 16 juin 1995. Réseau de recherche & développement du palmier dattier (BI, FIAD, FADES, ACSAD /Syrie. Cité par Sedra.
157. **Senouci, H. 2020.** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de *Ammoïdes verticillata*, en combinaison avec les huiles essentielles de *Curcuma longa* et *Allium sativum* et Micro- encapsulation de l’HE de *Ammoïdes verticillata* en vue d’une lutte biologique, Thèse de Doctorat en Ecologie animale, Université Aboubakr Belk Aïd – Tlemcen, 140p.
158. **Soltner D. (2005).** Les grandes productions végétales. Collection scientifiques de technologies agricoles. 20^{ème} édition. 472P.
159. **Soltner D., 1979.** Les grandes productions végétales. Collection Scientifique des Technologies Agricoles. 16ème édition, 494p.
160. **Sonenshein, A. L. (2000a).** Bacterial sporulation: a response to environmental signals. In *Bacterial stress responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Washington, D.C., ASM Press: 199-215.

161. **Srivastava M., Saxena A., Baby P. (1999).** GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copticum* Benth & look. *Acta Alimentaria*, 28: 291-295.
162. **Starnes, R. L, Liu, C. L. and Marrone, P. G. 1993.** History and Future of Microbial Insecticides. *American Entomologist*, vol.38 – 40, p. 83 – 91.
163. **Starnes, R. L., C. L. Liu et P. G. Marone. 1993.** History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39: 83-91.
164. **Tao Y., Bie X. M., Lv F. X., Zhao H. Z., Lu Z. X. (2011).** Antifungal activity and mechanism of fenuglycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *J.*
165. **Touré Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A., Thonart P. (2004).** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96 1151–1160. 10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x.
166. **Toussaint V. (2007).** caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *Rubicausa* le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maîtrise des sciences. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
167. **Tschen, J. S. M., & Kuo, W. L. (1985).** Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Chih wu pao hu hseh hui hui kan*= Plant protection bulletin.
168. **Van Loon L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 243-254.
169. **Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. & Perez-Alvarez J.A., 2008.** Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**, 526-531.
170. **Wang s. y., Chen P. F., Chang, S. T. (2005).** Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*innamomiim o.çmtjnholoelum*) leave againsts wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96: 813-818.

171. **Williams, G.E., Asher, M.J.C. (1996).** Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. Crop prot. N°15, pp479-486.
172. **Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. (2013).** *Alternaria* redefined Studies in Mycology. N°75, pp. 171-212.
173. **Zhang D, Yu S, Yang Y, Zhang J, Zhao D, Pan Y, Fan S, Yang Z and Zhu J (2020).** Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. Front. Microbiol. 11:1196. doi: [10.3389/fmicb.2020.01196](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196).
174. **Zhao Q., Mei X., Xu Y. (2016):** Isolation and identification of antifungal compounds produced by *Bacillus* Y-IVI for suppressing *Fusarium* wilt of muskmelon. Plant Protect. Sci., 52: 167-175. <https://doi.org/10.17221/70/2015-PPS>

Annexe 01

➤ Composition des solutions et des milieux de culture utilisés.

PDA : Potatos Dextrose Agar

Pomme de terre 200 g.
Sucrose 20..... g.
Agar 20g.
Eau distillée 1000ml.

Gélose nutritive (composition en g/l)

Extrait de viande.....1g.
Extrait de levure.....2g.
Peptone.....5g.
Chlorure de sodium.....5g.
Agar.....15g.
Eau distillé.....1000ml.
pH= 7,4.

Bouillon nutritif :

Peptone5 g.
Extrait de viande 1 g.
Extrait de levure2 g.
Chlorure d sodium 5 g.
Eau distillée1000 ml.

Eau physiologique stérile (composition g/l)

Chlorure de sodium (NaCl)..... .9g.
Eau distillé.....1000ml.

pH=7.

Stérilisation à 120C° pendant 15min.

➤ **Les réactifs :**

Bleu de méthylène

Huile d'immersion

Annexe 02

➤ **Matériels utilisés**

1. Autoclave.
2. Etuve.
3. Microscope Optique.
4. Balance De Précision.
5. Four pasteur.
6. Les instruments de laboratoire microbiologique.
7. Hydrodistillateur.
8. Colorimètre.
9. Vortex
10. Centrifugeuse