



Certifications : Activité Conseil AQ 01 611 - Bonnes Pratiques d'Expérimentation 039
Crédit Impôt Recherche - Organisme de Formation n°72330501433

UFR Sciences
2, Bd Lavoisier
49045 ANGERS Cedex 01

AGRO CAMPUS OUEST
65 rue de St Briec, CS 84 215, BP 35042 -
RENNES Cedex
Université de Rennes I
1, 2 rue du Thabor, CS 46510 - 35065 RENNES
Cedex

GIE FLEURS ET PLANTES DU
SUD-OUEST
71 avenue Edouard Bourleaux
33140 Villenave-d'Ornon

Mémoire de Fin d'Etudes

**Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie et
Technologie du Végétal
Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)**

Parcours I : Productions Végétales Spécialisées / Option : IA-Produits phytosanitaires, réglementations, méthodes alternatives.

Année universitaire 2016-2017

**Evaluation de l'efficacité de produits de biocontrôle
à base de micro-organismes dans la lutte contre *Phytophthora nicotianae*
sur lavande**

Par : Noémie DUBERNARD



Maître de stage : Jean-Marc DEOGRATIAS
Enseignant référent : Thomas GUILLEMETTE
Autres membres du jury :

Soutenu à Angers le : 22 septembre 2017

**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT
M2 PROTEV
2016-2017**

Je soussignée : Noémie DUBERNARD

déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour ce rapport, rédigé au cours de mon master 2 ProTeV. Je m'engage également à respecter les consignes données pour la rédaction de ce rapport.

A : Villenave d'Ornon

Le : 24/08/17



REMERCIEMENTS

En premier lieu, mes remerciements vont à mon maître de stage, Jean-Marc DEOGRATIAS, pour sa confiance tout au long du projet, pour ses encouragements à mes demandes d'emploi et pour le temps passé à la relecture de ce mémoire.

Je souhaiterais également remercier Catherine SAPIN, directrice du GIE, pour m'avoir accueillie en stage dans cette station, et avoir apporté sa bonne humeur et ses conseils avisés.

Un grand merci à toute l'équipe du GIE : à Vincent PROD'HOMME, qui un jour trouvera un titre plus attractif pour un stage thé de compost, Romain JOUANNIC pour sa patience et sa maîtrise des statistiques, Béatrice DARLES pour ses pique-niques parfaits et ses essais laborieux, Michèle PENICHON pour son accent du sud et les séances de rempotage, Emilie MAUGIN pour sa pédagogie et ses idées de sortie, Sylvie LEMMET pour la formation ravageurs très intéressante, Olivier RIAUDEL pour ses conseils techniques et enfin France DAVID pour sa jolie sonnerie de téléphone qui restera gravée et ses sourires à toute épreuve.

Ces six mois de stage auront été aussi l'occasion de collaborer avec différentes personnes issues du laboratoire SAVE de l'INRA. Merci à Jonathan GERBORE pour son fameux *Pythium oligandrum*, pour toute la partie microbiologique et ses conseils sur les résultats de l'essai. Merci à Amira YACOUB et Leslie DARAINES qui ont pris de leur temps pour expliquer chaque détail des étapes de biologie moléculaire. Merci également à la stagiaire Fanny, qui sans elle les longues séances de microscope (sans oospores échinulées) auraient été très fastidieuses.

Je voudrais adresser un remerciement particulier à Thierry RUET, spécialiste du diagnostic des maladies des plantes au LDA33 pour avoir fait partager son expérience et sa passion et avoir aidé avec la souche de *Phytophthora*. Un merci à Patrice REY pour le lancement et suivi du projet de biocontrôle.

J'ajouterais aussi dans la liste des personnes qui ont contribué à ce mémoire mon tuteur référent, Thomas GUILLEMETTE, qui l'a relu avec attention à la virgule près, et à répondu à mes questionnements.

Enfin, je voudrais remercier tous les stagiaires du GIE qui ont été présents tout au long du stage : Sixtine, Ophélie, Eddy (mon 'sous-stagiaire'), Lucie et Thérèse. Cette expérience a été l'occasion de souder de bonnes amitiés et de visiter la région bordelaise.

Un petit mot pour mon binôme qui se reconnaîtra, pour son soutien inconditionnel.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ASTREDHOR : Association nationale de STuctures d'Expérimentation et de Démonstrations en HORTiculture

BPE : Bonnes Pratiques d'Expérimentation

Bt : *Bacillus thuringiensis*

C/N : rapport [Carbone] sur [Azote]

CRIEPPAM : Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales

CWP : Cell Wall Protein (Protéine de la paroi cellulaire)

DAPG : 2,4-diacetylphloroglucinol

EBIC : European Biostimulants Industry Council

FRAC : Fungicide Resistance Action Committee

GIE FPSO : Groupement d'Intérêt Economique Fleurs et Plantes du Sud-Ouest

HR : Réaction d'Hypersensibilité

IBMA : International Biocontrol Manufacturers Association

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

jpb : jour post-biotisation

jpd : jour post-dépôt

MAMP : Mibrobe-Associated Molecular Pattern

MFSC : Matières Fertilisantes et Supports de Cultures

NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthetase

OBS : Organisation Bretonne de Sélection

PDA : Potato Dextrose Agar

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PPP : Produit PhytoPharmaceutique

PVP 40 : Polyvinylpyrrolidone

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RMT : Réseau Mixte Technologique

ROS : Reactive Oxygene Species

SAVE : Santé et Agroécologie du Vignoble

TCAA : Thé de Compost à Aération Active

UFC : Unité Formant Colonie

SAR : Résistance Systémique Acquisée

SDP : Stimulateur de Défense des Plantes

Unités de mesures :

°C : degré Celsius

g : gramme

mL : millilitre

Agroécosystème : écosystème sous gestion agricole. Système dynamique ouvert avec d'autres écosystèmes pour le transfert d'énergie et de matériel.

Chimiotactisme : effet d'attraction ou de répulsion exercé par certaines substances sur une cellule vivante capable de se rapprocher ou de s'éloigner du point d'où diffuse cette substance.

Chlamydospore : spore asexuée de résistance, de forme arrondie ou ovale à paroi épaisse, se formant à partir d'une portion de mycélium.

Diploïde : une paire de chromosome par cellule.

Echinulé : qui est hérissé de protubérances coniques sur sa surface.

Elicitrine : petite protéine sécrétée par les Oomycètes et reconnue comme éliciteur par certaines espèces végétales. Elles déclenchent une HR associée à l'activation locale de réponses de défense, pour assurer le confinement de l'agent pathogène à son site de pénétration.

Floribondité : fait qu'une plante possède de nombreuses fleurs.

Gamétocyste : structure qui produit et contient des gamètes.

Haploïde : un exemplaire de chromosomes par cellule.

Hétérotrophie : nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants.

Inoculum primaire : structure vivante d'un agent pathogène qui permet la contamination de la plante hôte.

Mycélium : ensemble des hyphes ou filaments d'un champignon ou organisme fongiforme.

Oogamie siphonogame : mode de fécondation chez certains oomycètes où les deux gamétocystes s'accolent et émettent des siphons copulateurs perforant la paroi de l'oocyste pour former une oospore.

Oospore : spore sexuelle des Oomycètes aux parois épaisses, résultant de la fécondation d'une oosphère.

Phytoplasme : bactérie sans paroi qui se multiplie exclusivement dans les tubes criblés du phloème.

Sidérophore : métabolite secondaire de faible poids moléculaire synthétisé et sécrété par les micro-organismes pour leur permettre de puiser le fer essentiel à leur développement.

Sporange : organe de fructification en forme de sac arrondi qui contient des spores.

Spore : cellule ou ensemble de cellules formant une unité de reproduction fongique sexuée ou asexuée.

Tellurique : qui se situe naturellement dans le sol.

Zoospore : spore asexuée de champignon, flagellée et mobile dans l'eau.

TABLE DES MATIERES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1

1.	Introduction.....	1
1.1.	Contexte et enjeux de l'étude.....	2
1.1.1.	Présentation de l'établissement d'accueil.....	2
1.1.2.	Problématiques générales et objectifs du stage.....	2
2.	Le pathosystème lavande / <i>Phytophthora nicotianae</i>	3
2.1.	L'hôte : la lavande.....	3
2.1.1.	Culture et utilisation.....	3
2.1.2.	Problèmes sanitaires.....	4
2.2.	L'agent pathogène : <i>Phytophthora nicotianae</i>	4
2.2.1.	Généralités.....	4
2.2.2.	Taxonomie.....	4
2.2.3.	Cycle de reproduction.....	5
	a) Phase asexuée.....	5
	b) Phase sexuée.....	5
2.2.4.	Facteurs abiotiques favorables au développement.....	5
2.2.5.	Symptomatologie.....	6
2.2.6.	Méthodes de lutte.....	6
	a) Prophylaxie.....	6
	b) Lutte chimique conventionnelle.....	6
3.	Le biocontrôle contre les agents phytopathogènes telluriques	7
3.1.	Définition générale et marché du biocontrôle.....	7
3.2.	Mode d'action des micro-organismes de biocontrôle.....	8
3.2.1.	Lutte directe.....	8
	a) Antibiose.....	8
	b) Compétition spatiale et nutritive.....	8
	c) Parasitisme.....	8
3.2.2.	Lutte indirecte.....	9
	a) Biostimulants.....	9
	b) Stimulateurs de Défenses des Plantes (SDP).....	9
3.3.	Exemples d'agents antagonistes des organismes phytopathogènes telluriques.....	10
3.3.1.	<i>Pythium oligandrum</i>	10
3.3.2.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
3.3.3.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> et <i>Bacillus pumilus</i>	12
3.3.4.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	12
3.3.5.	<i>Gliocladium catenulatum</i>	13
3.3.6.	Le thé de compost.....	13

MATERIELS ET METHODES

14

1.	Matériel biologique et chimique.....	14
1.1.	Matériel végétal.....	14
1.2.	Produits phytosanitaires conventionnels.....	14
1.3.	Produits de biocontrôle.....	15
2.	Mise en place générale de l'essai.....	16
3.	Plan d'expérience.....	16
4.	Inoculation du pathogène <i>Phytophthora nicotianae</i>	16
5.	Suivi du taux de colonisation racinaire des micro-organismes de biocontrôle.....	16
5.1.	Prélèvements racinaires.....	16
5.2.	Analyses microbiologiques.....	17
5.2.1.	<i>Pythium oligandrum</i>	17
	a) Dépôts des racines sur boîtes de Pétri.....	17
	b) Lecture des boîtes au microscope.....	17
5.2.2.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	17
5.3.	Analyses moléculaires pour quantifier l'installation de <i>P. oligandrum</i> dans la rhizosphère.....	17
5.3.1.	Extraction ADN.....	17

5.3.2.	Quantification de l'ADN par qPCR.....	18
5.4.	Mise en évidence de l'antagonisme direct par des tests de confrontation <i>in vitro</i>	18
5.5.	Analyse comparée du développement des plants	19
5.5.1.	Etude quantitative de la croissance en hauteur	19
5.5.2.	Etude qualitative du développement racinaire	19
5.5.3.	Etude de la sensibilité des plants à <i>P. nicotianae</i>	19
5.5.4.	Analyses statistiques	19

RESULTATS **20**

1.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet antagoniste des produits de biocontrôle contre <i>P. nicotianae</i>	20
2.	Evaluation <i>in planta</i> de l'efficacité des produits de biocontrôle	20
2.1.	Analyse de la stimulation de croissance aérienne des produits	20
2.2.	Analyse de la stimulation de développement racinaire des produits	21
2.3.	Analyse de la sensibilité des plantes à la pourriture phytophthoréenne	21
3.	Détection des agents de biocontrôle dans la rhizosphère	22
3.1.	Quantification microbiologique de <i>P. oligandrum</i> sur racines.....	22
3.2.	Quantification moléculaire de <i>P. oligandrum</i> sur racines.....	22
3.3.	Détection de l'endomycorhize <i>R. irregularis</i>	22

DISCUSSION **23**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **27**

BIBLIOGRAPHIE **29**

SITOGRAFIE **32**

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Localisation géographique des différentes unités régionales et des stations d'expérimentation de l'institut technique de l'horticulture ASTREDHOR.

Figure 2 : Dépérissements de la lavande causés par le phytoplasme du stolbur.

Figure 3 : Cycle de reproduction probable de *Phytophthora nicotianae* (d'après Bilodeau, 2008).

Figure 4 : Sporangies contenant des zoospores (a) et chlamydospores (b) de *Phytophthora nicotianae* (Blancard, 1998).

Figure 5 : Symptômes racinaires (a) et de flétrissements foliaires (b) sur lavande causés par *Phytophthora nicotianae* (Dubernard, 2017)

Figure 6 : Représentation de la part des agents de biocontrôle dans le marché mondial des produits phytopharmaceutiques (Ongena et Jacques, 2008).

Figure 7 : Mycoparasitisme de *P. oligandrum* contre l'agent pathogène *P. infestans* (Horner, 2008)

Figure 9 : Processus physiologiques et chimiques qui influencent la disponibilité et la transformation du Phosphore (P) présent dans la rhizosphère (Richardson, 2009).

Figure 8 : Induction d'une Réponse Systémique chez une plante suite à la reconnaissance d'éliciteurs (Ongena et Jacques, 2008).

Figure 10 : Oogones échinulés et mycélium de *Pythium oligandrum* (Dubernard, 2017)

Figure 11 : Différentes étapes du mycoparasitisme de *P. oligandrum* (Po) sur son hôte *P. nicotianae* (Ph) (adapté d'après Benhamou et al., 2012 et Picard et al., 2000a).

Figure 12 : (a) Mycélium de *P. nicotianae* (Ph) en culture simple. (b) Phénomène d'épaississement de la paroi cellulaire et condensation du cytoplasme de Ph après trois jours de coculture avec *P. oligandrum* (Picard et al., 2000a).

Figure 13 : (A) Colonisation et inhibition de croissance de *Phytophthora nicotianae* (Ph) par *Pseudomonas fluorescens* (Pf), (B) Ph + Pf (Pyoverdine-), (C) Ph + Pf (Flagelle-), (D) Témoin Ph sans Pf (Yang et al., 1994).

Figure 14 : Mise en évidence de l'antibiose exercée par *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) sur *Phytophthora nicotianae* (Ph). (a) Témoin Ph sans Ba, (b) Ph en présence de Ba (Chen et al., 2009).

Figure 15 : Représentation d'une symbiose endomycorhizienne arbusculaire sur une racine de plante hôte (Chiffлот, 2008)

Figure 16 : Action de parasitisme de *Gliocladium. catenulatum* (c) sur *Pythium aphanidermatum* (p) autour de racines de concombre (r) (Chatterton et Punja, 2009).

Figure 18 : Composition du substrat Faliénor 'Dipladenia'.

Figure 17 : Biotisation du substrat avec *Pythium oligandrum* en solution, à l'aide Varispenser® (Eppendorf) à la surface du substrat, après humectation des pots à l'aide d'une rampe (Dubernard, 2017).

Figure 19 : Disposition des plants de lavandes dans la serre du GIE FPSO (Dubernard, 2017).

Figure 20: Plan d'expérience de l'essai sur la lutte contre la pourriture phytophthoréenne de la lavande.

Figure 21 : Inoculation de l'agent pathogène *P. nicotianae* dans le substrat des lavandes par l'intermédiaire de grains de millet contaminés (Dubernard, 2017).

Figure 22 : Dépôt des fragments racinaires de lavandes sur milieu CMAparp pour la détermination du taux d'installation de *P. oligandrum* dans le substrat (Dubernard, 2017).

Figure 23 : Disposition des agents antagonistes et de *P. nicotianae* dans une boîte de Pétri lors du test de confrontation *in vitro*.

Figure 24 : Classes de développement racinaire des lavandes.

Figure 25 : Classes des symptômes utilisées pour la notation sur la sensibilité des lavandes à *P. nicotianae*.

Figure 26 : Indices d'inhibition de croissance de *P. nicotianae* calculés lors des tests de confrontation *in vitro* des différents produits et agents de biocontrôle.

Figure 27 : Test de confrontation entre les différents agents de biocontrôle (sur les deux pastilles opposées) et *P. nicotianae* (au centre), à 3, 5 et 8 jours post-dépôts (jpd).

Figure 28 : Evaluation de la croissance en hauteur des plants de lavande en fonction des différents agents de biocontrôle, en semaines 23 et 27 (stade pré-inoculation).

Figure 29 : Evaluation du développement racinaire des plants de lavande en fonction des différents agents de biocontrôle, en semaines 16 (a) et 25 (b) (stades pré-inoculation).

Figure 30 : Evaluation des symptômes aériens de *P. nicotianae* sur lavandes en fonction des différents agents de biocontrôle biotisés, en semaines 30 (a) et 31 (b) et 32 (c).

Figure 31 : Quantité d'ADN de *P. oligandrum* retrouvée dans les prélèvements racinaires de lavandes effectués 27 jours post-biotisation (jpb) en S19 (a) et 60 jpb en S24 (b).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Modalités choisies lors de l'essai sur la pourriture phytophthoréenne de la lavande 2017

Tableau II : Composition du milieu CMAparp

Tableau III : Séquence des amorces et de la sonde utilisées en qPCR pour amplifier l'ADN de *P. oligandrum*.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle comprenant des micro-organismes.

Annexe II : Résultats d'analyses du thé de compost Fytaforce®

Annexe III : Températures ambiantes du compartiment C4 de la serre pour la saison de culture des lavandes.

Annexe IV : Protocole d'extraction d'ADN de racines à l'aide du kit Invitex Invisorb Spin Plant Mini (modifié)

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

La protection des plantes contre les ravageurs et les agents phytopathogènes est un enjeu majeur en agriculture. Cette thématique reste essentiellement basée sur l'utilisation de molécules chimiques, formulées dans des produits phytopharmaceutiques. Au cours du siècle dernier, l'utilisation intensive de ces produits efficaces et peu coûteux a conduit à l'augmentation significative des rendements, à la limitation des irrégularités de production liées aux catastrophes parasitaires et à la protection durable des denrées alimentaires (Oerke et Dehne, 2004). Bien que les traitements pesticides apportent des bénéfices non négligeables, ils sont de plus en plus remis en cause pour trois raisons : leur toxicité chimique sur les organismes non cibles (oiseaux, poissons, pollinisateurs, voire Homme), l'apparition de résistances qui leur font perdre en efficacité et enfin la contamination de l'environnement par les résidus.

Face à l'accroissement de ces préoccupations sociétales, et notamment les impacts possibles des pesticides sur la santé des applicateurs et consommateurs, un arsenal législatif et réglementaire a été mis en place à plusieurs niveaux. Il s'agit d'accompagner l'évolution des pratiques agricoles pour assurer une meilleure sécurité et gestion des produits.

Au niveau européen, le règlement CE n°1107/2009 remplace aujourd'hui la directive 91/414/CE pour l'établissement des règles de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques au sein des Etats membres. La mise en application de ce règlement le 14 juin 2011 permet de renforcer le niveau de protection des utilisateurs et de l'environnement, grâce à l'harmonisation et au renforcement des procédures d'évaluation et de décision pour l'Union Européenne. Le programme de réexamen plus strict pour l'homologation des substances actives entraîne une diminution notable du nombre de produits disponibles en protection des cultures. En vingt ans, on assiste au passage d'environ un millier de substances actives autorisées avant 1993 en Europe à 423 au total en 2013 (Alim'agri, 2013). On peut également citer le cas de la Politique Agricole Commune, dont une partie des aides est désormais conditionnée par le respect des règles environnementales (Herth, 2011).

Au niveau national, suite au Grenelle de l'Environnement, le plan Ecophyto est mis en place. Il a comme objectif de limiter l'utilisation des produits phytopharmaceutiques en France, tout en essayant de conserver une agriculture performante. Le regroupement des agriculteurs, des chercheurs et des expérimentateurs donne lieu au lancement de plusieurs programmes d'actions pour favoriser le développement de méthodes alternatives à l'utilisation systématique des produits chimiques de synthèse.

Ce contexte socio-économique d'évolution de la gestion des bioagresseurs en agriculture mène de plus en plus à des impasses phytosanitaires pour des cultures présentant un marché restreint pour les firmes, notamment pour la filière horticole. En effet, le domaine de la production de plantes ornementales est particulièrement touché par les problématiques actuelles de réduction des solutions envisageables en phytoprotection (Hwang *et al.*, 2005).

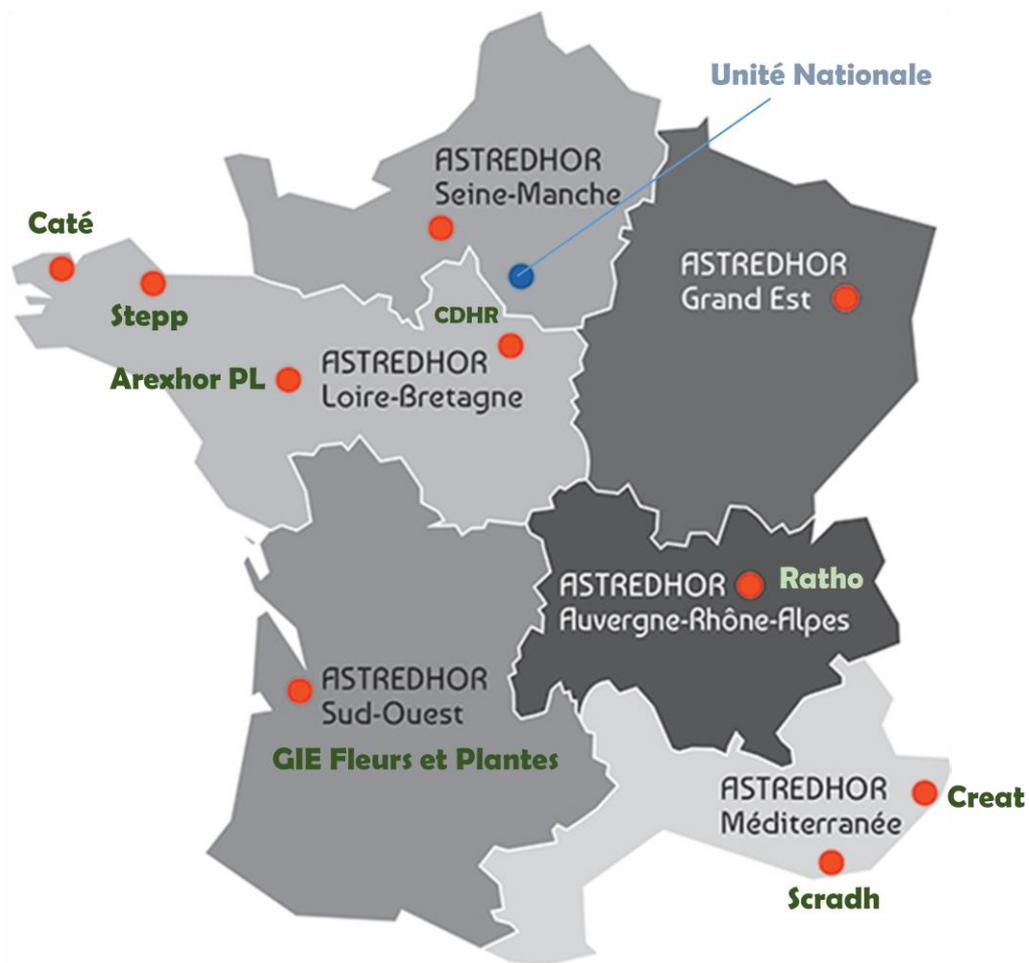


Figure 1 : Localisation géographique des différentes unités régionales et des stations d'expérimentation de l'institut technique de l'horticulture ASTREDHOR.

(<http://www.astredhor.fr/stations-d-experimentation-420.html>)

Ces plantes à forte valeur ajoutée nécessitent une qualité visuelle irréprochable. Le 'zéro défaut' est exigé, et c'est pourquoi de lourdes et rapides pertes sont à prévoir dans le cas du développement d'une maladie. La filière ornementale est également caractérisée par un commerce et des échanges internationaux importants qui favorisent la dissémination longue distance des agents pathogènes, sur une courte période de temps (Herth, 2011). C'est pour toutes ces raisons que les producteurs, par conviction ou par obligation, sont devenus très demandeurs de solutions alternatives ou complémentaires à la lutte chimique.

De ce fait, le biocontrôle est de plus en plus intégré dans les actions d'expérimentation menées au sein des instituts techniques. L'enjeu est de proposer aux producteurs de nouveaux types d'itinéraires techniques appliquant ces méthodes plus respectueuses de l'environnement.

1.1. Contexte et enjeux de l'étude

1.1.1. Présentation de l'établissement d'accueil

L'ASTREDHOR est l'institut technique de la filière horticole, au service des 1 200 adhérents professionnels de l'horticulture, de la fleuristerie et des paysages. Il est également en lien avec l'interprofession VAL'HOR et les pouvoirs publics pour le transfert, la diffusion des résultats et la définition de ses orientations stratégiques. Une centaine de personnes y travaillent, dont 65 ingénieurs expérimentateurs et 25 conseillers techniques.

Les programmes de recherche et d'expérimentation sont axés principalement sur l'amélioration des techniques culturales, l'élargissement des gammes variétales, l'étude des marchés et attentes des consommateurs, le développement de l'agriculture urbaine et enfin la protection des plantes. Cet institut est composé d'une unité nationale située à Paris, de six unités régionales, ainsi que de dix stations d'expérimentation (**Figure 1**). Parmi ces dernières, le Groupement d'Intérêt Economique Fleurs et Plantes du Sud-Ouest (GIE FPSO) est situé sur le site de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) à Villenave d'Ornon (33). Cette proximité géographique permet une coopération dans le transfert de connaissances entre les plateformes de recherche fondamentale et les applications de terrain, ainsi que le partage d'infrastructures et matériels. La station GIE FPSO possède un rayon d'action englobant les bassins Poitou-Charentes, Aquitaine, Midi-Pyrénées et Limousin. Elle coordonne de fait ses actions régionales en adéquation avec les attentes et problématiques rencontrées par ses adhérents. Son agrément Bonnes Pratiques d'Expérimentation (BPE) lui permet de garantir des résultats fiables et comparables, notamment lors d'essais réalisés dans le but d'obtenir une autorisation de mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques.

1.1.2. Problématiques générales et objectifs du stage

Tous les essais conduits dans le domaine de la phytoprotection correspondent à l'axe 1 de France Agrimer. Cet axe vise à apprécier la nuisibilité économique des ravageurs et agents pathogènes en horticulture et pépinière. Il a également pour but de mettre à disposition des producteurs des produits phytosanitaires et des méthodes alternatives adaptés aux usages de la filière. A l'intérieur de cet axe, la station GIE FPSO se positionne sur une action de développement du biocontrôle pour réguler les bioagresseurs au sein des agroécosystèmes*. Cette action, initiée en 2005, est déclinée en différents objectifs.

L'un d'eux concerne l'utilisation du biocontrôle dans la lutte contre les champignons et oomycètes telluriques* phytopathogènes à l'aide de micro-organismes. Une gamme de produits de biocontrôle est en cours d'évaluation concernant leur efficacité sur des pathosystèmes tels que *Fusarium oxysporum* sur cyclamen et sur dipladénia et *Phytophthora nicotianae* sur choïsa et sur lavande, avec des résultats variables.

La pourriture phytophthoréenne sur lavande est retenue car c'est un problème fréquemment rencontré chez les producteurs adhérents du GIE FPSO. Depuis 2011, les essais mis en place dans des conditions de production montrent des tendances prometteuses quant aux potentiels effets de certains micro-organismes sur la stimulation de défenses et la promotion de croissance des plantes.

Parmi ces derniers, l'oomycète *Pythium oligandrum* a particulièrement montré son efficacité d'une part en termes de croissance en hauteur des plants, et d'autre part en termes de réduction du nombre d'individus infectés. Il montre aussi une bonne compatibilité pour le substrat utilisé en culture des lavandes, aux vues des forts taux d'installation mesurés (Dubourg, 2014).

Les bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus amyloliquefaciens* se sont enfin révélées potentiellement efficaces dans le cadre d'une lutte curative sur dipladénias (Triolet, 2014).

Ce stage va se focaliser sur l'affinement de la maîtrise de la biotisation du substrat par les micro-organismes antagonistes. Le but est de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus les années précédentes, en restant conscients des variabilités apportées par les facteurs biotiques et abiotiques. Trois missions seront mises en œuvre au cours de l'essai :

- (i) le suivi de l'installation des micro-organismes biotisés dans le substrat (*Pythium oligandrum* et *Rhizophagus irregularis*) au cours du temps, à l'aide de méthodes microbiologiques et moléculaires ;
- (ii) l'appréciation des effets de phytostimulation de croissance par les différents produits de biocontrôle testés *via* des notations phénotypiques de la croissance en hauteur et du développement racinaire ;
- (iii) l'évaluation de l'efficacité de phytoprotection de la part des micro-organismes biotisés *via* des notations de symptômes et des tests de confrontation *in vitro* révélant leur possible action d'antagonisme.

Si ces méthodes alternatives de biocontrôle s'avèrent efficaces, elles permettront ainsi d'aider les producteurs dans leur stratégie de lutte contre l'agent pathogène *Phytophthora nicotianae*.

2. Le pathosystème lavande / *Phytophthora nicotianae*

2.1. L'hôte : la lavande

2.1.1. Culture et utilisation

La lavande est un arbrisseau buissonnant de la famille des Lamiacées, native de la région méditerranéenne. Cette plante pérenne aux petites feuilles linéaires gris-vert peut atteindre une cinquantaine de centimètres de haut en culture de plein champ (Alvarez *et al.*, 2007). Ses fleurs mauves en épis parfumées fleurissent aux mois de juillet-août. La majorité de la production se situe en plein champ, en Provence, pour la confection d'huiles essentielles. Une autre part se situe dans le Sud-Ouest de la France, en tant que plantes ornementales. La culture est conduite en conteneurs (en extérieur ou sous abri) pour la vente aux particuliers (France Agrimer, 2013).



Figure 2 : Dépérissements de la lavande causés par le phytoplasme du stolbur.
Les plants touchés jaunissants sont répartis de manière aléatoire dans le rang (CRIEPPAM, 2015).

Les jeunes plants peuvent provenir de semis (lavande de population), de multiplication *in vitro* ou de bouturage (lavande clonale). La première option apporte de l'hétérogénéité et de l'instabilité génétique, la deuxième est utilisée pour assurer des clones sains pouvant servir de pieds mères et la dernière est donc la plus couramment utilisée par les lavandiculteurs (RATHO, 2008).

L'agriculture biologique est un mode de production en expansion dans le domaine de la culture de lavande. Elle représente environ 52% des surfaces totales des plantes à parfums aromatiques et médicinales bio françaises. Cela peut s'expliquer par une demande croissante des consommateurs concernant les huiles essentielles bio, dans les secteurs de la cosmétique et de l'aromathérapie (CRIEPPAM, 2015).

2.1.2. Problèmes sanitaires

Parmi les maladies rencontrées par les lavandiculteurs, le dépérissement causé par le phytoplasme* du stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) est considéré comme celle entraînant le plus de pertes économiques (Chaisse *et al.*, 2012). La lavande fine y est très sensible (**Figure 2**) et la production d'huile essentielle est passée de 80 tonnes en 2005 à 33 tonnes en 2010. Le vecteur de ce phytoplasme est une cicadelle, *Hyalesthes obsoletus*. Aucune méthode de lutte curative n'est efficace à ce jour.

Au niveau des pathogènes fongiques ou pseudofongiques, *Phoma lavandulae*, agent du dépérissement aérien, *Septoria lavandula*, agent de la septoriose et également *Pythium aphanidermatum* et *Phytophthora nicotianae*, deux agents responsables de la pourriture racinaire et du collet sont fréquemment observés.

Les producteurs sont de plus en plus confrontés à la pourriture phytophthoréenne dans le cas des lavandes ornementales en pots (RATHO, 2008). La qualité sanitaire des pieds mères est très importante car la majorité des dépérissements ont lieu l'année suivant le rempotage des boutures.

2.2. L'agent pathogène : *Phytophthora nicotianae*

2.2.1. Généralités

Le mot *Phytophthora* tire son origine du grec 'phyton', la plante et 'phthora', destructeur. En effet, la totalité du genre *Phytophthora* est phytopathogène. Ce genre a été décrit pour la première fois par Anton de Barry en 1876. Ces organismes sont responsables de nombreuses maladies sur plantes cultivées, dont la plus historiquement connue est le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), qui a conduit à la grande famine irlandaise de 1845. *P. cinnamomi* et *P. nicotianae* (anciennement appelé *P. parasitica*) causent des pourritures racinaires et du collet sur une large gamme d'hôtes, le premier sur les arbres fruitiers ou forestiers et le second sur tabac, lavande ou tomate principalement (Erwin, 1996). Ce genre compte également certains agents pathogènes de quarantaine réglementés tel que *P. ramorum*.

2.2.2. Taxonomie

Phytophthora appartient à la classe des oomycètes et à la famille des pythiacées. Ce type d'organisme n'est donc pas un champignon vrai (Eumycète), mais un organisme fongiforme possédant des hyphes non septés ou coenocytiques (Lacroix, 2001). Les oomycètes ont longtemps été classés parmi les champignons du fait de leur hétérotrophie*, de leur croissance filamenteuse, et de leur absence de chlorophylle. Cependant, le développement de la biologie moléculaire a permis de les rapprocher de la division des Straménopiles, regroupant un certain nombre d'algues brunes et de diatomées.

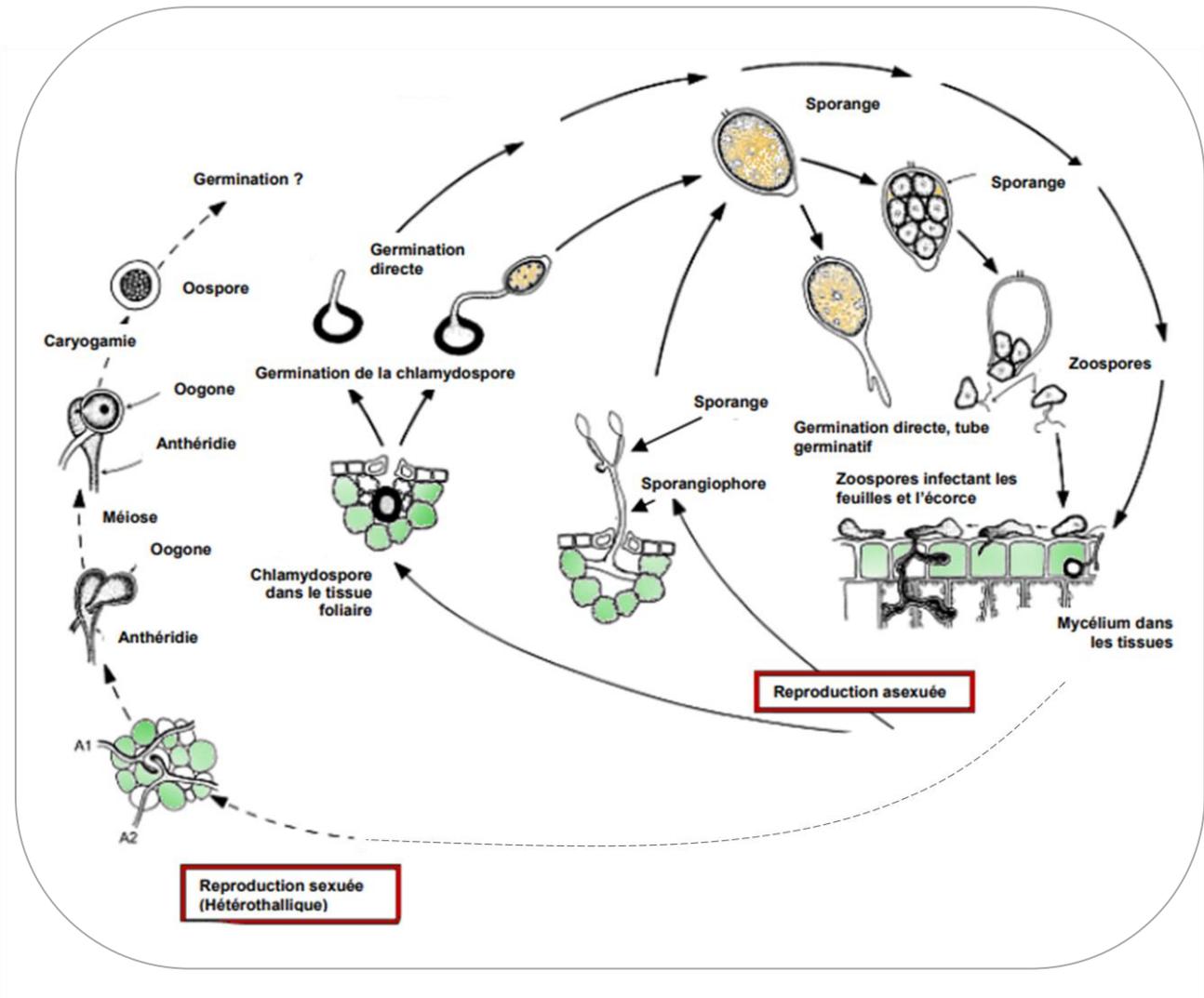


Figure 3 : Cycle de reproduction probable de *Phytophthora nicotianae* (d'après Bilodeau, 2008).

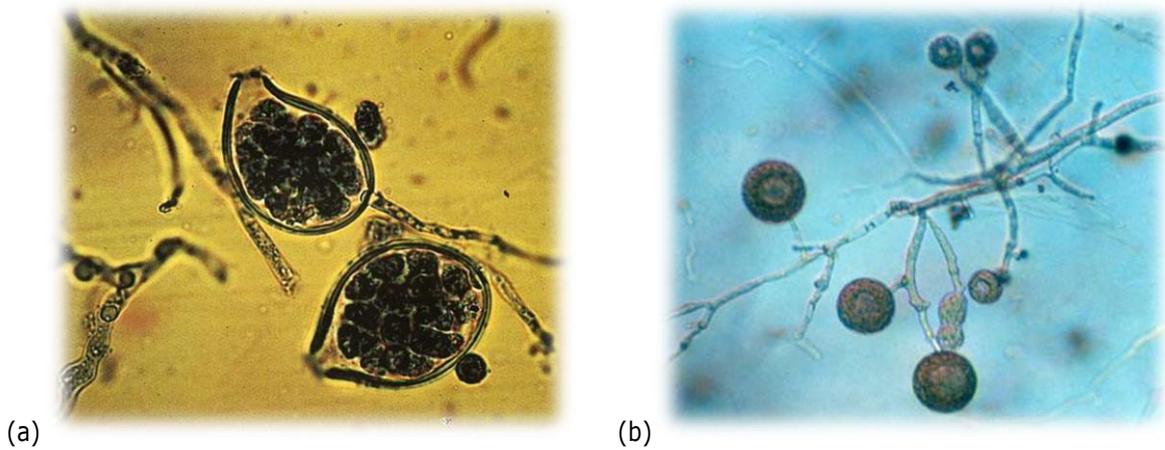


Figure 4 : Sporangies contenant des zoospores (a) et chlamydospores (b) de *Phytophthora nicotianae* (Blancard, 1998).

En effet, la classe des oomycètes présente aussi des similitudes physio-morphologiques avec les Straménopiles : une paroi cellulaire principalement cellulosique au lieu de chitineuse (Ristaino, 2000), des noyaux diploïdes* au lieu d'haploïdes*, une incapacité à synthétiser des stérols. Elle est enfin caractérisée par des spores biflagellées dissemblables (Irwin, 1995).

2.2.3. Cycle de reproduction

a) Phase asexuée

Le mode de reproduction de *Phytophthora nicotianae* le plus couramment observé est le mode végétatif ou asexué, avec des zoospores* biflagellées produites par des sporanges* (**Figure 3**). Chaque sporange est capable de produire une cinquantaine de zoospores, qui vont se déplacer sur de courtes distances dans l'eau du sol. Attirées par chimiotactisme* jusqu'aux racines des plantes à cause des exsudats racinaires sécrétés (Blancard, 1998), elles s'accumulent à l'extrémité des racines, vers la zone d'élongation et s'enkystent. Ces zoospores vont enfin germer avec la production d'un tube germinatif, pénétrer dans les tissus jusqu'au cortex et former du mycélium* qui redonne des sporanges. Ces sporanges peuvent germer directement ou reformer des zoospores. Ceux de *P. nicotianae* sont caractérisés par une forme sphérique, ovoïde à ellipsoïde et papillée, et par une taille moyenne de 43 x 36 µm (**Figure 4a**, Blancard, 2009).

De par leur nombre et leur motilité, les zoospores sont considérées comme la source d'inoculum primaire*, responsable de la dissémination de la maladie (Irwin, 1995). En conditions favorables, plusieurs générations asexuées se succèdent par saison de culture, conférant un caractère épidémique à la maladie. En conditions climatiques défavorables ou en l'absence d'hôte sensible, il peut y avoir production de chlamydospores* (**Figure 4b**). Ces spores* asexuées sont des organes de conservation à parois épaisses, pouvant se maintenir dans le sol jusqu'à six ans (Blancard, 2009). Après germination, soit la spore redonne directement du mycélium, soit elle forme un sporange.

b) Phase sexuée

La phase de fécondation est de type oogame siphonogame*. Elle n'est le plus souvent observée qu'en conditions de laboratoire (Irwin, 1995). *P. nicotianae* est une espèce hétérothallique, ce qui signifie qu'elle a besoin de deux thalles différents, habituellement nommés A1 et A2. L'un porte un gamétocyste* mâle (anthéridie) et l'autre un gamétocyste femelle (oogone). La fusion de ces deux gamétocystes donne naissance à une oospore*, autre forme de conservation dans le sol (**Figure 3**).

2.2.4. Facteurs abiotiques favorables au développement

Comme vu précédemment, l'environnement aquatique est primordial pour la phase de reproduction asexuée. En plus de la présence d'eau, le développement de *P. nicotianae* est favorisé par des conditions chaudes et humides (Minuto *et al.*, 2001), avec des températures optimales comprises entre 24 et 30°C. En dessous de 10°C, le cycle s'arrête. La présence de blessures racinaires favoriserait la pénétration du *Phytophthora*.

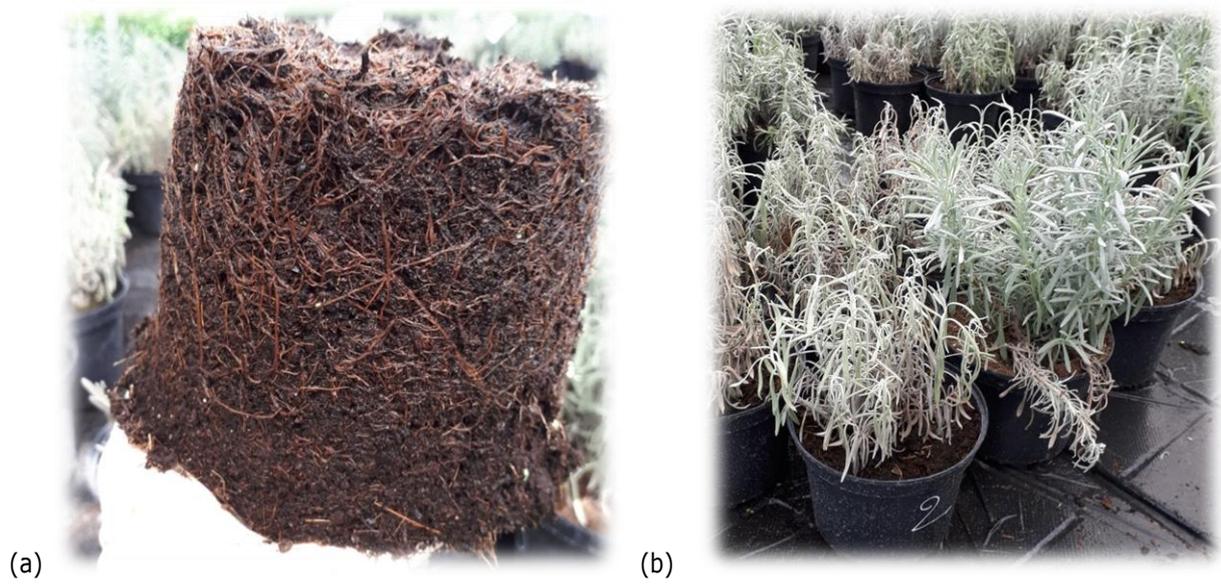


Figure 5 : Symptômes racinaires (a) et de flétrissements foliaires (b) sur lavande causés par *Phytophthora nicotianae* (Dubernard, 2017)

2.2.5. Symptomatologie

Deux types de symptômes se distinguent chez *P. nicotianae* : les primaires et les secondaires. Les symptômes primaires correspondent aux dégâts causés par l'agent et sont souvent non visibles à cause de leur localisation racinaire ou sur le collet des plantes. A ce niveau, les parties souterraines présentent une pourriture sèche et se teintent d'une couleur noir-marron (Putnam, 1991; **Figure 5a**). Ces symptômes proviennent de la colonisation racinaire par le mycélium qui va progressivement obstruer les vaisseaux conducteurs. L'obstruction va finir par bloquer la montée de la sève vers les parties aériennes et provoquer l'apparition plus tardive des symptômes secondaires.

Ces symptômes résultent des effets physiologiques de la maladie et touchent des tissus éloignés de la zone d'infection. Il peut s'agir d'une croissance retardée, d'un manque de vigueur général, pouvant aller jusqu'à une décoloration du feuillage, un flétrissement voire la mort de la plante (Alvarez *et al.*, 2007; **Figure 5b**). Par simple observation visuelle des symptômes aériens, il est possible de confondre la maladie avec un problème d'ordre abiotique tel qu'un stress hydrique. Des fontes de semis sont également observées en cas d'attaque précoce.

2.2.6. Méthodes de lutte

Le contrôle de *P. nicotianae* en serre reste difficile car les conditions climatiques sont favorables à son développement (protection contre les basses températures et irrigation limitant les stress hydriques, Hwang *et al.*, 2005). Sa croissance rapide et ses symptômes primaires non visibles extérieurement sur la plante font qu'il est souvent trop tard pour intervenir une fois que l'agent pathogène a été identifié. De plus, *P. nicotianae* est capable de produire des structures de résistance dans le sol. Même si l'on réussit à le détruire par une lutte curative, la destruction des vaisseaux conducteurs est souvent irréversible et la plante peut continuer à dépérir en absence de l'organisme.

La lutte la plus efficace à ce jour reste donc la lutte préventive, à l'aide de méthodes prophylactiques.

a) Prophylaxie

Avant la mise en place des plantes, le contrôle visuel de la qualité sanitaire des végétaux à leur réception, le choix de cultivars résistants et l'utilisation de pots neufs et d'un substrat désinfecté permet de limiter la source d'inoculum primaire.

Afin de prévenir la dispersion de la maladie au cours de la culture, il est conseillé de retirer les plants présentant des symptômes et de désinfecter le matériel de taille. La gestion de l'irrigation reste la principale recommandation contre *P. nicotianae* (Irwin, 1995), en évitant la présence d'eau stagnante sur les tables de culture et en répondant au plus près aux besoins de la plante sans saturer son substrat.

b) Lutte chimique conventionnelle

Très peu de solutions sont disponibles en lutte conventionnelle pour l'usage «cultures ornementales / traitement de sol / organismes de type pythiacées». Il existe à ce jour trois substances chimiques homologuées en Europe : le Métalaxyl-M (ou Mefenoxam), le Fosétyl-Aluminium et le Dimétorphe, retrouvées dans la formulation de 10 produits commerciaux listés sur la base de données *ephy* de l'ANSES.

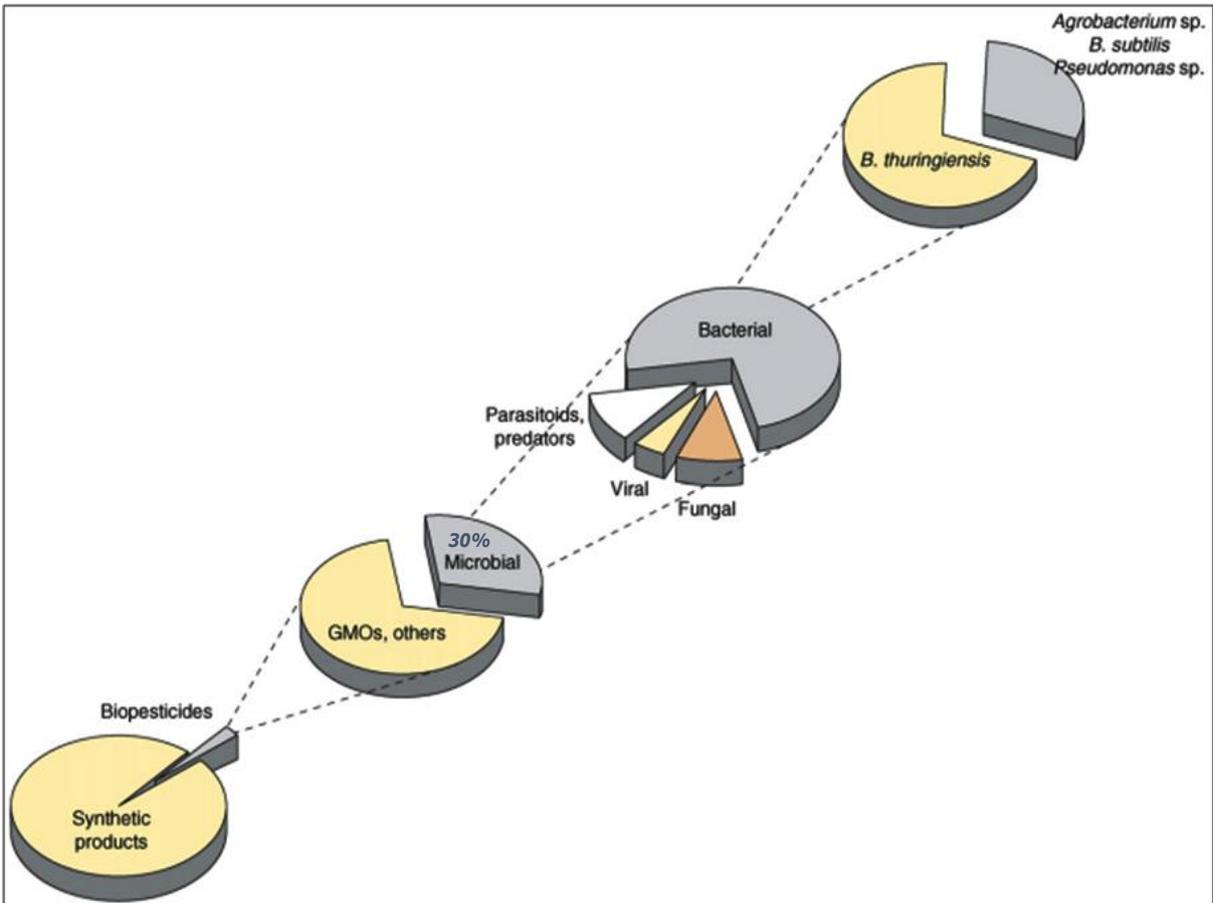


Figure 6 : Représentation de la part des agents de biocontrôle dans le marché mondial des produits phytopharmaceutiques (Ongena et Jacques, 2008).

La mention 'others' comprend les nématodes et insectes.

Les Phénylamides (dont le Métalaxyl) sont utilisés en tant que fongicides sélectifs systémiques des oomycètes, qui ne se déplacent dans la plante que par des mouvements ascendants. Ils agissent sur la formation des sporanges, la croissance mycélienne et l'établissement de nouvelles infections en inhibant notamment la synthèse d'ARN ribosomique (Gisi et Ziegler, 2002). Un seul produit commercial contient cette substance active : Subdue® Gold (Santhal®) de Syngenta, en lutte préventive et curative.

La stratégie la plus efficace reste l'application du Métalaxyl et Fosétyl-Al (Droui, 2017; Hwang et Benson, 2005). Cette efficacité est pourtant remise en cause par l'observation de résistance au Métalaxyl chez *P. nicotianae* en horticulture ornementale (Saville *et al.*, 2015).

Dans le contexte de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques dits 'conventionnels', les produits issus du biocontrôle pourraient être une voie prometteuse pour réussir à atteindre les objectifs du plan Ecophyto, et surtout pour aboutir à une lutte plus efficace contre la pourriture phytophthoréenne.

3. Le biocontrôle contre les agents phytopathogènes telluriques

3.1. Définition générale et marché du biocontrôle

Le biocontrôle peut être défini de manière très générale comme "*toute méthode, produit ou organisme fondé sur la gestion des équilibres des populations de bioagresseurs et limitant leur éradication systémique*" (IBMA, 2014). Il sert donc à contrôler les populations de nuisibles (ravageurs et agents pathogènes), afin de maintenir les dégâts causés sur une espèce végétale cultivée en dessous du seuil de nuisibilité économique supportable par le producteur.

Cette définition comprend quatre catégories d'approche :

- des macro-organismes (insectes, nématodes, acariens)
- des micro-organismes (champignons, bactéries, virus)
- des médiateurs chimiques (phéromones sexuelles, kairomones)
- des substances naturelles d'origine végétale, minérale ou animale.

Seuls les macro-organismes et les barrières physiques ne sont pas considérés comme des produits phytopharmaceutiques (PPP). Les autres sont par conséquent soumis à une évaluation pour obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché.

Actuellement, 70 produits phytopharmaceutiques de biocontrôle à base de micro-organismes possèdent cette autorisation en France (**Annexe I**), dont 80% concernent la lutte contre des maladies telluriques. Les genres utilisés sont peu nombreux et appartiennent surtout aux genres *Trichoderma* pour les champignons et *Bacillus* pour les bactéries. Les produits à base de spores et protéines de *Bacillus thuringiensis* (Bt, **Figure 6**) sont les plus vendus dans le monde et sont distribués depuis les années 70 en France.

La part des produits de biocontrôle représente 5% du marché mondial des produits phytopharmaceutiques. Ce marché a pourtant tendance à croître chaque année (de 15% en moyenne). Il représente environ 100 millions d'euros en France en 2013 (IBMA, 2014). Un quart de cette somme concerne la vente de produits à base de micro-organismes.

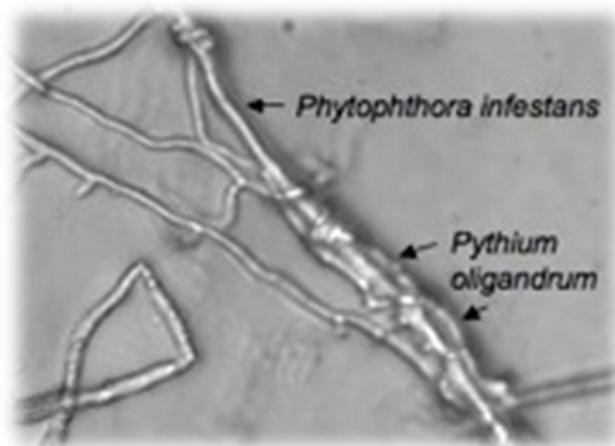


Figure 7 : Mycoparasitisme de *P. oligandrum* contre l'agent pathogène *P. infestans* (Horner, 2008)

3.2. Mode d'action des micro-organismes de biocontrôle

Les populations microbiennes de la rhizosphère constituent la première barrière contre les maladies telluriques (Barea *et al.*, 2005). Il est primordial de bien connaître les mécanismes d'action de la protection biologique pour sélectionner des agents de lutte plus performants.

Les actions des traitements contenant des micro-organismes sont multiples : lutte directe ou indirecte contre les agents pathogènes, ou enfin un mélange des deux actions. Chaque produit commercial peut posséder une combinaison de plusieurs micro-organismes pour chercher à obtenir une synergie d'actions.

3.2.1. Lutte directe

a) Antibiose

Ce mécanisme d'action antagoniste est le plus utilisé dans le cadre du biocontrôle. Il consiste en l'inhibition du développement du pathogène (effet biostatique) ou en la destruction de l'inoculum (effet biocide), grâce à la synthèse de composés antimicrobiens.

Les métabolites secondaires sécrétés sont de nature spécifique ou non, tels que des enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des agents pathogènes (chitinases, cellulases, β -1,3-glucanases,...), des antibiotiques, des phénols, des alcaloïdes, des composés volatils et autres métabolites toxiques (Haggag et Mohamed, 2007). L'antibiose est aisément mise en évidence en laboratoire sur boîte de Pétri, avec l'observation de zones d'inhibition, mais elle reste fonction de l'environnement (Bardin, 2015). De plus, les potentiels effets sur les micro-organismes non cibles et les possibles apparitions de résistance ne sont pas encore parfaitement connus.

b) Compétition spatiale et nutritive

La compétition entre les micro-organismes est considérée comme un phénomène naturel qui régit la dynamique des populations des individus partageant une même niche écologique en conditions de ressources limitantes (Davet, 1996). L'utilisation d'agents antagonistes capables de coloniser rapidement les sites potentiels d'infection (ou ceux riches en eau et nutriments) permettrait d'empêcher leur accès pour les agents pathogènes. Les sites d'intérêt se retrouvent autour des racines secondaires, des cellules épidermiques endommagées, des stomates ou des nectaires.

Raaijmakers *et al.* (1995) montrent que la production de sidérophores* par les micro-organismes permet d'améliorer l'efficacité d'interception du fer présent dans la rhizosphère. De fait, le sidérophore est un facteur contribuant à la compétitivité des antagonistes du sol. En effet, le fer ferrique Fe^{3+} , cofacteur de nombreuses enzymes, est un des éléments souvent présent en quantité insuffisante dans les substrats. Les résultats attendus avec ce mode d'action sont toutefois très dépendants de l'effet dose et ne sont concluants qu'en traitements préventifs (Pal et McSpadden Gardener, 2006).

c) Parasitisme

Le mycoparasitisme est un mode d'action qui requiert une grande rapidité d'action, une forte spécificité et un contact direct entre l'agent antagoniste et le champignon phytopathogène (**Figure 7**).

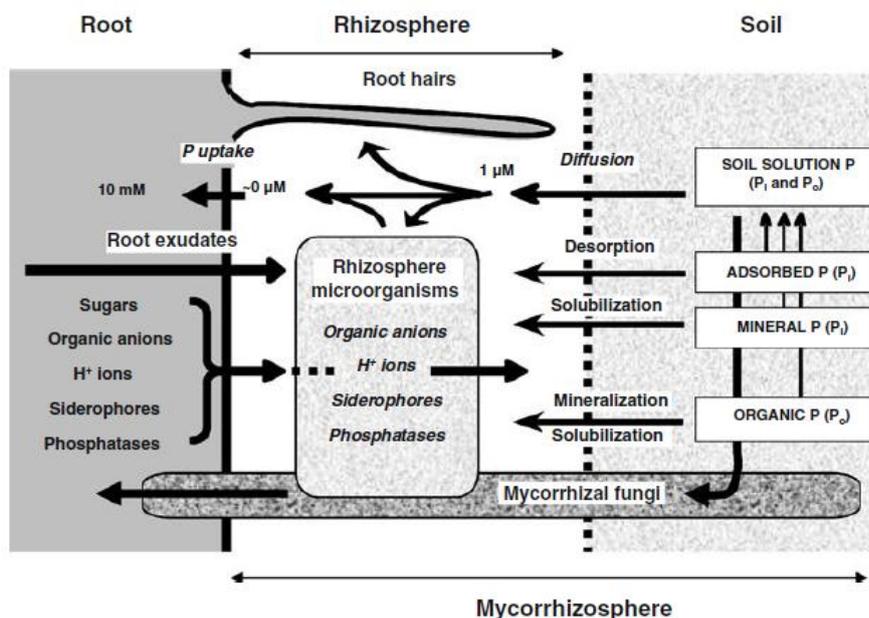


Figure 9 : Processus physiologiques et chimiques qui influencent la disponibilité et la transformation du Phosphore (P) présent dans la rhizosphère (Richardson, 2009).

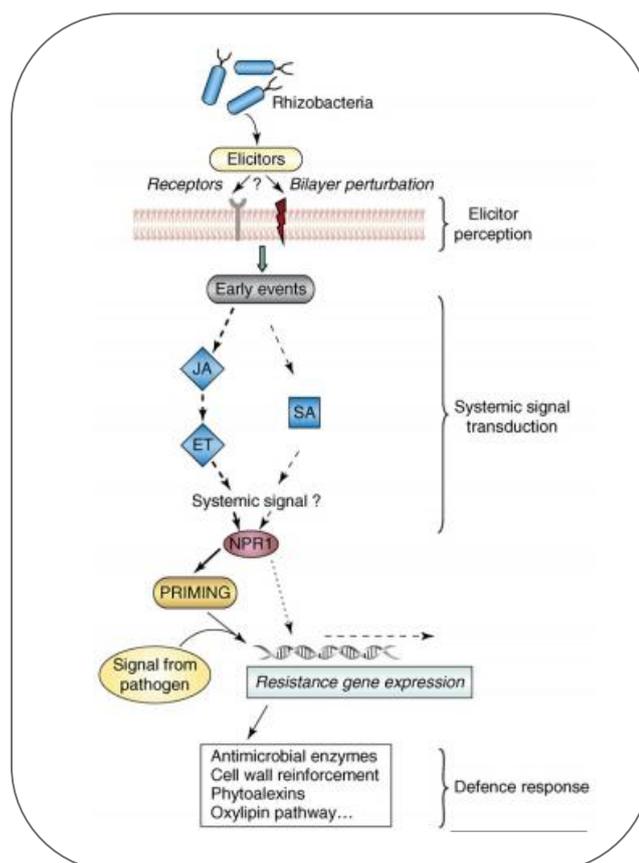


Figure 8 : Induction d'une Réponse Systémique chez une plante suite à la reconnaissance d'éliciteurs (Ongena et Jacques, 2008).

JA: Acide Jasmonique, **SA** : Acide Salicylique, **ET** : Ethylène et **NPR1** : Natriuretic Peptide Receptor 1.

Il suppose le développement de l'agent aux dépens de son hôte, qu'il utilise comme une ressource nutritive (Pal et McSpadden Gardener, 2006). Différentes enzymes sont généralement impliquées dans l'interaction pour lyser la paroi fongique (chitinase, β -1,3 glucanase), selon que l'agent soit biotrophe ou nécrotrophe.

3.2.2. Lutte indirecte

a) Biostimulants

D'après la définition de l'EBIC en 2014, un biostimulant est « *un matériel qui contient une ou des substance(s) et/ou micro-organisme(s) dont la fonction [...] est de stimuler les processus naturels pour améliorer l'absorption et l'efficacité des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques, et la qualité des cultures, indépendamment du contenu en nutriments du biostimulant* » (Hérault, 2015). Les bactéries contenues dans ces produits sont appelées PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

La croissance de la plante peut notamment être améliorée directement grâce à la synthèse de phytohormones par les micro-organismes, telles que l'auxine (Faessel et al., 2014). Ces phytohormones stimulent la rhizogénèse, ce qui conduit à un volume de sol exploré plus important et donc à une meilleure absorption des nutriments du sol.

La nutrition est aussi rendue plus efficace par la présence de bactéries et champignons agissant de manière indirecte, en rendant disponibles les nutriments essentiels à la plante autour de la rhizosphère. Peuvent coexister : les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique N₂ (comme les *Rhizobium*), les bactéries et champignons qui solubilisent le Phosphore ou le Potassium (**Figure 8**), ou encore les mycorhizes qui établissent une symbiose avec la plante en prolongeant son système racinaire (Richardson et al., 2009).

b) Stimulateurs de Défenses des Plantes (SDP)

Les SDP concernent « *toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée, face à des stress biotiques* » (RMT Elicitra, 2017).

Ils permettent la reconnaissance du bioagresseur par des éliciteurs généraux exogènes : les MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Ces éliciteurs déclenchent une réponse de défense de la plante qui est non spécifique vis-à-vis de l'espèce pathogène (Garcia-Brugger et al., 2006). Ils induisent soit une réaction directe de résistance chez la plante, soit un effet potentialisateur (l'induction peut déclencher une activation ultérieure plus rapide et plus intense des mécanismes de défense) (Faessel et al., 2014). Suite à l'interaction entre l'éliciteur et le récepteur, une cascade d'évènements de signalisation va se déclencher, entraînant la synthèse de molécules de défense (phytoalexines, protéines PR...) et de formes actives de l'oxygène (ROS, **Figure 9**). Ces molécules sont souvent à l'origine d'une Réaction d'Hypersensibilité (HR), qui consiste en l'autodestruction de la cellule attaquée et/ou d'un renforcement de la paroi afin de faire une barrière physique à l'entrée du pathogène.

La transmission du signal au sein de la plante peut se terminer par la mise en place d'une résistance systémique acquise (SAR).

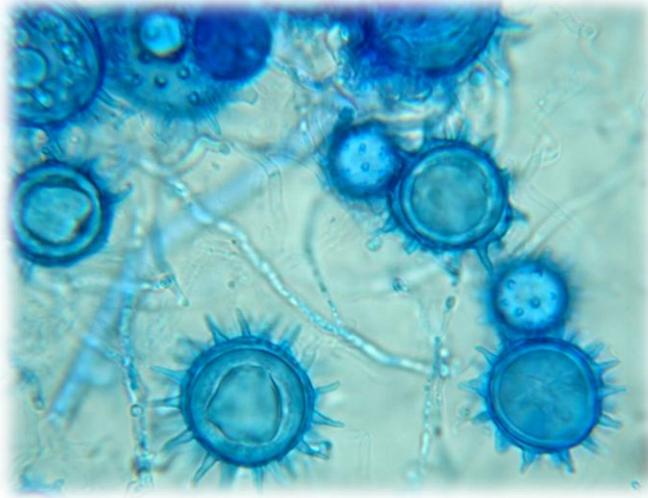


Figure 10 : Oogones échinulées et mycélium de *Pythium oligandrum* (Dubernard, 2017)

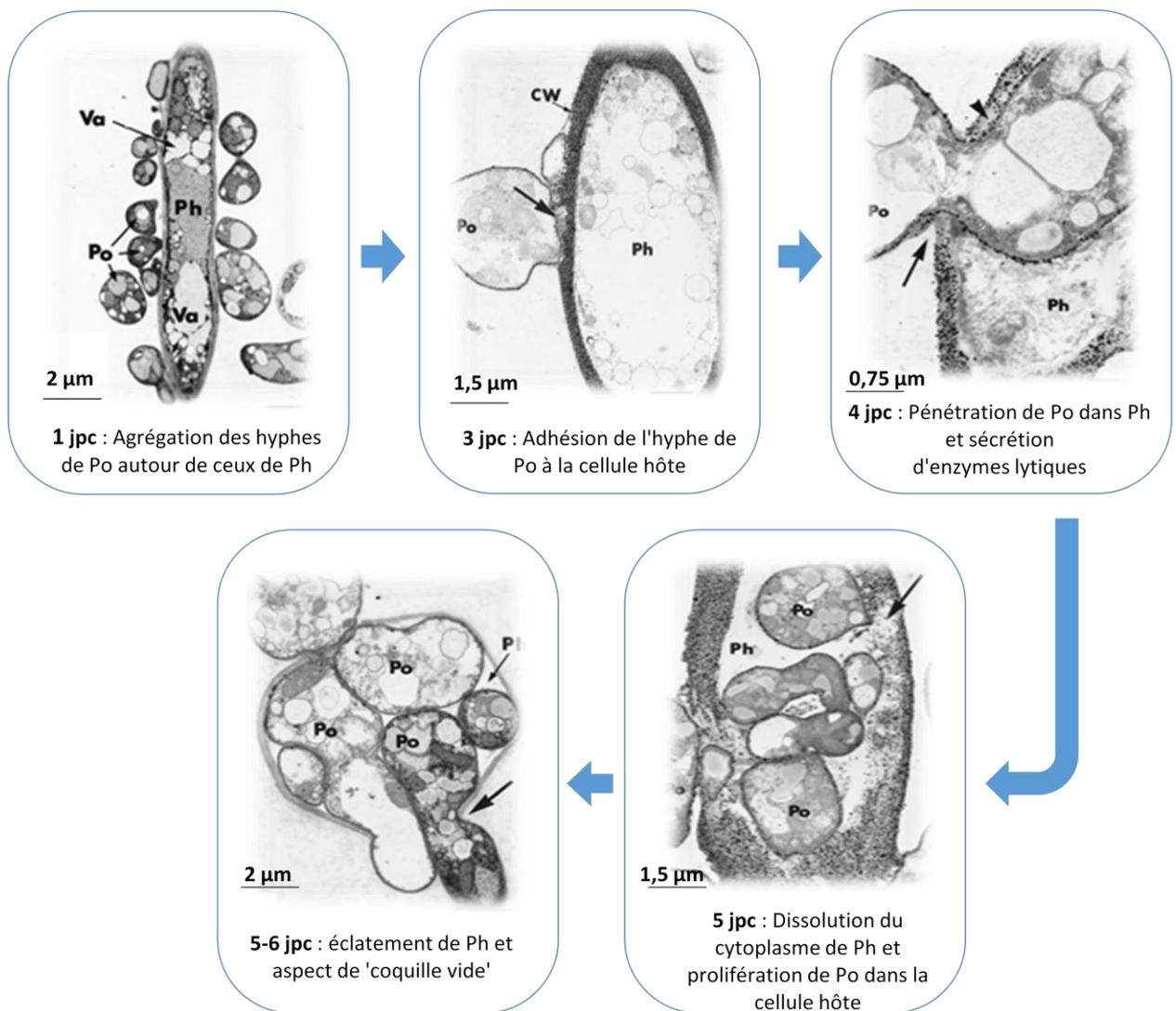


Figure 11 : Différentes étapes du mycoparasitisme de *P. oligandrum* (Po) sur son hôte *P. nicotianae* (Ph)

(adapté d'après Benhamou et al., 2012 et Picard et al., 2000a).

jpc : jour post-coculture de Po et Ph. *CW* : paroi cellulaire. *Va* : vacuole

3.3. Exemples d'agents antagonistes des organismes phytopathogènes telluriques

3.3.1. *Pythium oligandrum*

Oomycète appartenant à la même famille que *P. nicotianae*, *P. oligandrum* est une espèce tellurique considérée comme non phytopathogène. La grande majorité du genre *Pythium* est pourtant connue pour être responsable de graves dégâts, notamment de la fonte de semis. L'espèce est aisément reconnaissable par ses oogones échinulées* (ornementées de protubérances coniques, **Figure 10**).

P. oligandrum est étudié depuis une dizaine d'années pour ses potentielles qualités d'agent de biocontrôle sur différentes cultures telles que la vigne (Yacoub *et al.*, 2015), la tomate (Picard *et al.*, 2000b), le blé et la betterave (Takenaka *et al.*, 2003). Ce *Pythium* aurait un effet bénéfique dans la lutte contre un grand nombre de micro-organismes pathogènes : Ascomycètes, Basidiomycètes, Oomycètes et même contre des structures de résistances comme les sclérotés. Une étude de Picard *et al.* (2000) a démontré la grande vulnérabilité de *P. nicotianae* à l'attaque de cet agent de biocontrôle.

En 2015, le premier produit à base de la souche M1 de *P. oligandrum* a été homologué sous l'appellation 'Polyversum®' de De Sangosse, dans le but de lutter contre les sclérotinioses et les fusarioses sur crucifères oléagineuses, blé et orge (Brozova, 2002).

Cet Oomycète est capable d'adapter sa stratégie d'attaque selon le micro-organisme avec lequel il entre en interaction (Gerbore *et al.*, 2014). Parmi les stratégies utilisées, les plus fréquemment observées et exploitables en biocontrôle sont le mycoparasitisme et l'induction de résistance chez la plante hôte.

(i) Le mycoparasitisme représente la principale action de biocontrôle sur *P. nicotianae*. La première étape post-inoculation consiste en l'agrégation de l'antagoniste autour de sa proie par chémo-attraction (**Figure 11, 1 jpc**). Cette agrégation est suivie d'une adhésion et d'une pénétration de *Pythium* dans l'hyphe de l'agent pathogène, qui est permise par la sécrétion d'enzymes lytiques dégradant la paroi cellulaire de l'hyphe (Benhamou *et al.*, 2012, **3 et 4 jpc**). La localisation de l'agent à l'intérieur de l'hyphe de l'hôte va entraîner une altération cellulaire avec une complète dissolution du cytoplasme. En cinq à six jours, l'hyphe a l'apparence d'une 'coquille vide' avec simplement la paroi restante (Picard *et al.*, 2000a ; **5-6 jpc**).

Notons qu'une mise en place de réactions de défenses a pu être observée de la part de *P. nicotianae* en amont du contact avec l'antagoniste (Benhamou *et al.*, 1999; Picard *et al.*, 2000a). En effet, il est possible de distinguer un épaissement anormal de la paroi de l'hyphe (**Figure 12**). Ces modifications cytologiques ne sont toutefois pas suffisantes pour contrer la pénétration de *P. oligandrum*.

(ii) L'induction d'un état de résistance de la plante à *P. nicotianae* (Picard *et al.*, 2000b) par *P. oligandrum* se différencie fortement des autres agents de biocontrôle utilisés. En effet, *P. oligandrum* est capable de coloniser l'intérieur des tissus corticaux des racines sans causer de dommages, tandis que les autres agents restent à la périphérie des racines. La plante colonisée va alors être en mesure de reconnaître deux types de MAMPs spécifiques à cet oomycète : l'oligandrine (une glycoprotéine) et des fragments de protéines de sa paroi cellulaire (CWP), nommés POD-1 et POD-2 (Takenaka *et al.*, 2003).

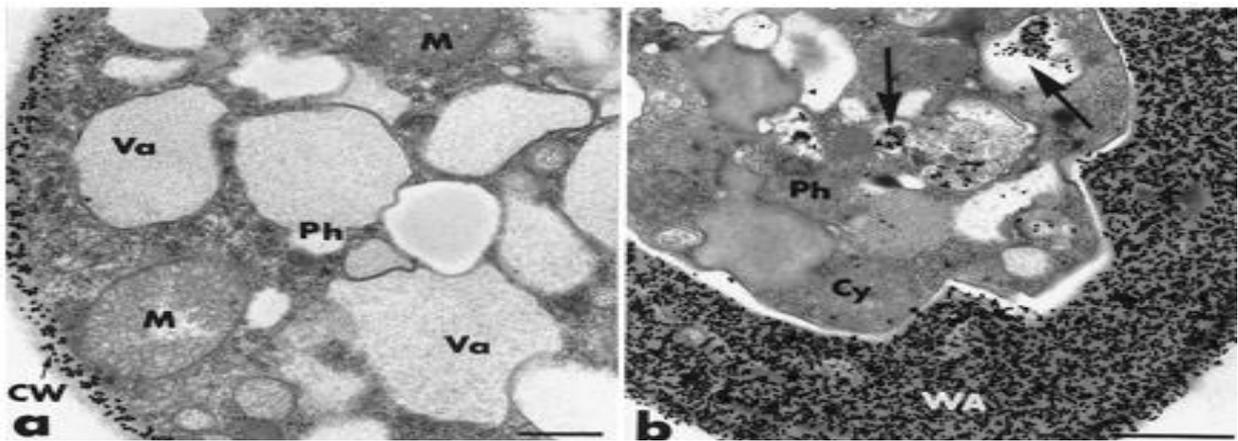


Figure 12 : (a) Mycélium de *P. nicotianae* (Ph) en culture simple. (b) Phénomène d'épaississement de la paroi cellulaire et condensation du cytoplasme de Ph après trois jours de coculture avec *P. oligandrum* (Picard et al., 2000a).

Va : vacuole. M : Mitochondrie. Cy : cytoplasme. WA : appositions de la paroi

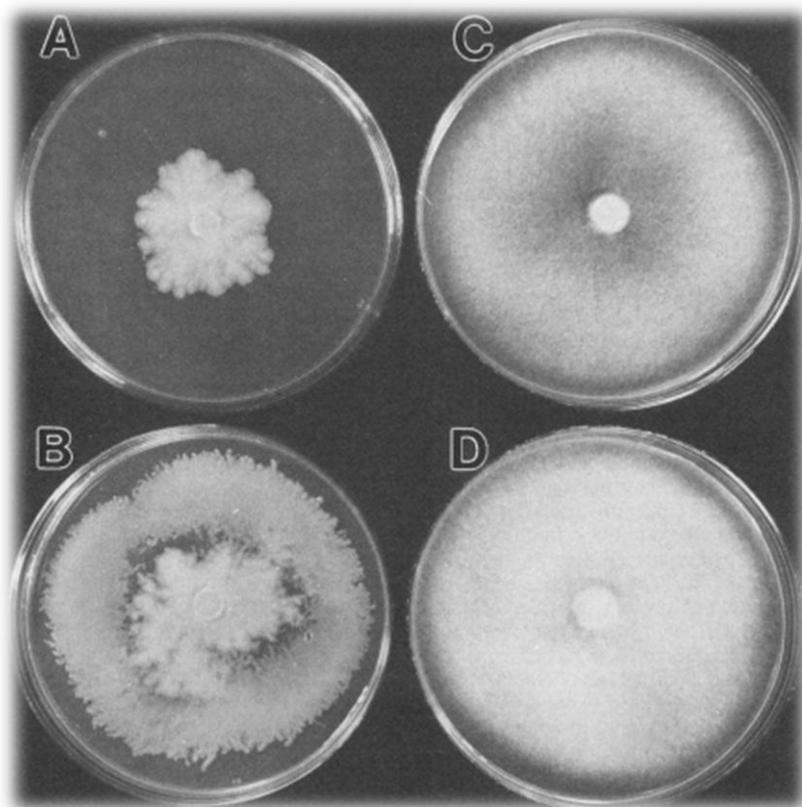


Figure 13 : (A) Colonisation et inhibition de croissance de *Phytophthora nicotianae* (Ph) par *Pseudomonas fluorescens* (Pf), (B) Ph + Pf (Pyoverdine-), (C) Ph + Pf (Flagelle-), (D) Témoin Ph sans Pf (Yang et al., 1994).

(iii) Enfin, *P. oligandrum* est capable de stimuler la croissance végétale grâce à la production de tryptamine (TNH₂) (Le Floch *et al.* 2003). Ce composé sera absorbé par le système racinaire de la plante qui va l'utiliser pour synthétiser de l'auxine.

De par ses modes d'action multiples contre les agents phytopathogènes du sol, sa capacité de colonisation rapide et le fait qu'il n'interfère que très peu avec la microflore indigène de la rhizosphère, *P. oligandrum* peut être classé parmi les agents de biocontrôle prometteurs, dont l'étude des interactions avec les autres micro-organismes et avec les plantes est à approfondir (Gerbore *et al.*, 2014).

3.3.2. *Pseudomonas fluorescens*

Bactérie Gram négative saprophyte, *P. fluorescens* est communément rencontré dans les sols, les eaux et à la surface des plantes. L'utilisation de bactéries de ce genre taxonomique est la plus documentée dans le cadre du biocontrôle car ce sont de très bonnes colonisatrices racinaires (Barea *et al.*, 2005). Cette colonisation de la rhizosphère est d'autant plus efficace si la densité du sol est faible (environ 0.82g/cm³) et la température est forte (en moyenne 22°C, Yang *et al.*, 1994).

Ces bactéries appartiennent au groupe des PGPR et sont connues pour leurs modes d'actions mêlant deux mécanismes : la diminution de la sévérité de la maladie par antagonisme direct avec les agents pathogènes du sol et la promotion de la croissance de la plante. C'est le cas du produit Cérès® de Biovitis, homologué comme MFSC sur grandes cultures.

(i) En ce qui concerne la protection directe des plantes contre les bioagresseurs du sol, cette rhizobactérie est capable de produire une grande variété de métabolites secondaires avec des actions à large spectre (antivirales, antifongiques et antibactériennes). De nombreux composés antibiotiques ont été identifiés chez *P. fluorescens*, tels que le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG, Schouten *et al.*, 2004) contre *F. oxysporum*, les phénazines (comme la pyocyanine) contre le piétin échaudage du blé (Mazzola *et al.*, 1995), ou encore le cyanure d'hydrogène HCN, composé volatil hautement toxique (Haas et Keel, 2003).

(ii) En termes de nutrition des plantes et de rhizostimulation, *P. fluorescens* solubiliserait le Phosphore inorganique et chélaterait le Fer à l'aide de sidérophores pour rendre ces éléments plus disponibles pour les racines (Faessel *et al.*, 2014). La synthèse de ces sidérophores, lui permettrait également d'être plus compétitive dans la recherche de nutriments dans le substrat (Barea *et al.*, 2005). L'espèce est capable de produire deux types de sidérophores : la pyoverdine et la pyochéline, efficaces dans le contrôle de *Fusarium* et de *Pythium* (Raaijmakers *et al.*, 1995). Yang *et al.*, (1994) ont formulé l'hypothèse que la production de pyoverdine, pigment donnant sa fluorescence sous UV à la rhizobactérie, et la présence de flagelles seraient à l'origine de la suppression des populations de *P. nicotianae* dans la rhizosphère d'un verger d'agrumes (**Figure 13**).

Cependant, l'utilisation de *P. fluorescens* dans le cadre du biocontrôle reste assez limitée du point de vue commercial, malgré la compréhension de plus en plus poussée des mécanismes moléculaires régissant les interactions entre la bactérie et les agents pathogènes.



Figure 14 : Mise en évidence de l'antibiose exercée par *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) sur *Phytophthora nicotianae* (Ph). (a) Témoin Ph sans Ba, (b) Ph en présence de Ba (Chen et al., 2009).

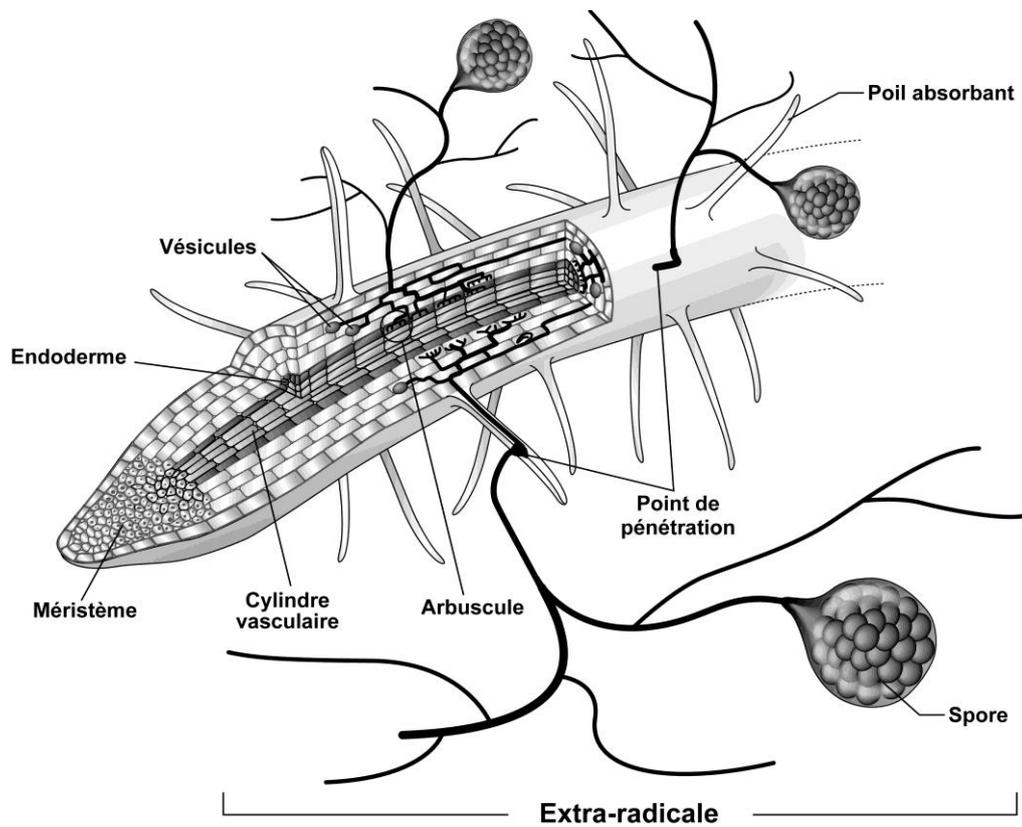


Figure 15 : Représentation d'une symbiose endomycorhizienne arbusculaire sur une racine de plante hôte (Chiffлот, 2008)

3.3.3. *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus pumilus*

Ces bactéries PGPR et Gram positives sont reconnues pour leurs multiples actions protectrices contre les agents phytopathogènes du sol, qui va de l'antagonisme direct à la stimulation des défenses de la plante et à la promotion de sa croissance.

(i) Leur capacité à fabriquer des endospores ayant un fort niveau de résistance à la dessiccation et aux autres stress physiques favorise une conservation durable dans la formulation de produits commerciaux (Ongena et Jacques, 2008). Les *Bacillus sp.* sont aussi naturellement présents de manière abondante dans les sols et se reproduisent rapidement, ce qui est intéressant pour atteindre un niveau de colonisation racinaire élevé, quelques jours après la biotisation (Nielsen et Sørensen, 1997).

(ii) Ces bactéries sont surtout très efficaces en antagonisme direct grâce à la synthèse d'une large gamme de métabolites secondaires, parmi lesquels se trouvent des antibiotiques et des enzymes hydrolytiques (**Figure 14**). En effet, la production de cellulases et hémicellulases leur permet de dégrader les parois des Oomycètes. Ongena et Jacques ont répertorié en 2008 la liste des composés antibiotiques connus à ce jour qui sont sécrétés par *B. amyloliquefaciens*. Ces composés sont des lipopeptides cycliques, dont la biosynthèse est réalisée par des 'non ribosomal peptide synthetases' (NRPSs).

(iii) *B. pumilus* serait capable d'induire un état de résistance chez des plants de tomate contre le mildiou causé par *Phytophthora infestans* (Yan *et al.*, 2002). Dans l'essai en serre, la germination des sporanges et zoospores du pathogène a été significativement impactée suite à la biotisation du substrat avec la rhizobactérie. L'activité antagoniste et de promotion de la croissance de la plante de *B. pumilus* contre *P. nicotianae* a également été démontrée sur poivrons (Mei *et al.*, 2010), avec entre autres une réduction de la croissance mycélienne de 72%. Wang *et al.* (2012) ont tenté de sélectionner des bactéries potentiellement antagonistes pour le contrôle du pied noir du tabac, causé par *P. nicotianae*, en vérifiant leur efficacité *in vitro* et *in planta*. *B. amyloliquefaciens* et *B. pumilus* ont été classés parmi les quinze bactéries présentant une efficacité de protection de 100%.

3.3.4. *Rhizophagus irregularis*

R. irregularis, (anciennement *Glomus intraradices*), est un champignon mycorhizien arbusculaire. Il entretient une association symbiotique avec les racines de la plupart des espèces cultivées en agriculture, horticulture et sylviculture. La symbiose consiste en une extension du système racinaire de la plante grâce au mycélium du champignon, en contrepartie de l'apport de composés carbonés (sucres provenant de la photosynthèse) par la plante (**Figure 15**). Le mycélium est également capable de produire des enzymes lytiques qui dégradent les macromolécules pour favoriser leur assimilation par la plante (Chiffot, 2008).

R. irregularis est de plus en plus exploité dans le cadre du biocontrôle contre les agents pathogènes telluriques (Pozo *et al.*, 2002). Il semblerait que l'induction des défenses de la plante soit le facteur clé pour la limitation de la prolifération de ces agents pathogènes. La mise en place d'une résistance systémique acquise chez la plante (Zheng *et al.*, 2005) a été observée notamment pour les couples Poivron/*Phytophthora capsici* et Tomate/*Phytophthora nicotianae* (Pozo *et al.*, 2002; Lioussane *et al.*, 2009), suite à une pré-inoculation de *R. irregularis*.

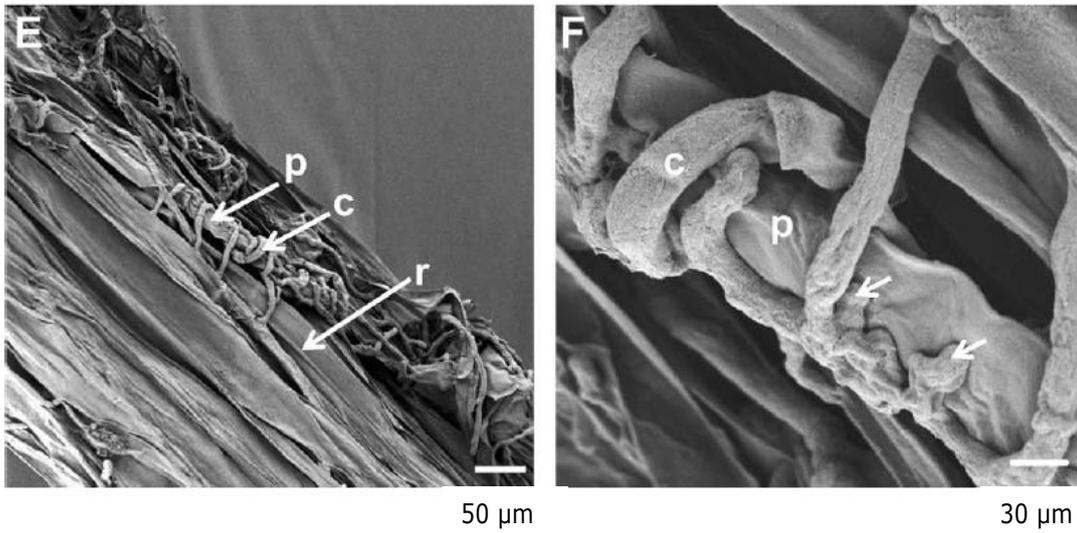


Figure 16 : Action de parasitisme de *Gliocladium. catenulatum* (c) sur *Pythium aphanidermatum* (p) autour de racines de concombre (r) (Chatterton et Punja, 2009).
Les flèches montrent les pseudo-appressoria de *Gliocladium* attachés à un hyphe de *Pythium*.

Dans ces exemples, *Phytophthora* réussissait à infecter les racines des plantes non mycorhizées et échouait à infecter celles pré-inoculées avec les mycorhizes à arbuscules.

3.3.5. *Gliocladium catenulatum*

G. catenulatum (aussi retrouvé sous le nom de *Clonostachys rosea f. catenulata*) est un champignon Ascomycète saprophyte. Il possède la capacité de coloniser à la fois le système aérien et racinaire des plantes, ce qui en fait un bon agent de biocontrôle contre une large variété de champignons pathogènes (Chatterton et Punja, 2009). Il a été montré à ce jour une efficacité antagoniste contre des maladies telluriques causées par *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* et *Alternaria*, ainsi que des maladies foliaires causées par *Botrytis* ou encore des maladies de conservation telles que l'hémithosporiose.

Ces modes d'action sont doubles : le mycoparasitisme et la compétition spatiale et nutritive.

(i) La compétition se met en place grâce à une colonisation extensive des racines par un dense réseau d'hyphes de *G. catenulatum*. Il prive ainsi les autres micro-organismes de leur niche écologique avec un accès réduit à l'espace et aux nutriments.

(ii) Son action de mycoparasitisme se fait par contact direct avec les hyphes des agents pathogènes (**Figure 16**). La détection de la présence de ces agents induit la formation d'un pseudo-appressorium qui va s'enrouler autour de l'hyphes à parasiter. *Gliocladium* sécrète alors des enzymes hydrolytiques comme des chitinases et b-1,3-glucanases, permettant la pénétration et la dissolution des parois cellulaires de l'hôte. Chatterton et Punja (2009) ont montré que les enzymes sont produites et agissent de manière optimale à un pH compris entre 6 et 7.

La souche J1446 de *G. catenulatum* est commercialisée depuis 2015 dans le produit Prestop[®], de Lallemand Plant Care pour des traitements généraux du sol contre les champignons pythiacées, ainsi que pour des traitements des parties aériennes contre les pourritures grises et sclérotinioses. L'action est toujours préventive car l'antagoniste est capable de créer un environnement défavorable à la croissance des agents pathogènes, par la synthèse de métabolites secondaires antifongiques (Decoin, 2013).

3.3.6. Le thé de compost

Le thé de compost est un produit commercialisé en tant que matière fertilisante, mais qui pourrait aussi être un outil de biocontrôle grâce à ses propriétés suppressives (Pane et al., 2014). Il consiste en une infusion à froid de compost dans de l'eau, qui permet de recueillir un liquide concentré en micro-organismes et en éléments nutritifs.

Le thé de compost à aération active (TCAA), est issu d'une infusion avec l'ajout d'un bulleur dans la cuve. Ce système permet d'extraire les micro-organismes bénéfiques et de stimuler leur multiplication rapide. Il est possible de choisir entre des thés à dominance fongique, bactérienne ou de composition équilibrée en jouant sur le rapport C/N du compost d'origine. En effet, un compost plus riche en carbone (issu de la dégradation de matériel végétal) va favoriser le développement de champignons tandis qu'un compost plus riche en azote (d'origine animale, comme les purins et les fumiers) va favoriser le développement des bactéries. Les essais réalisés mettent en évidence une action biostimulante en se basant sur la production d'hormones par les bactéries PGPR et sur l'amélioration de la nutrition de la plante qui pourraient permettre une meilleure résistance aux stress abiotiques et un meilleur rendement.

Une potentielle action phytoprotectrice du produit est aussi envisagée, avec des micro-organismes agissant de manière directe contre l'agent pathogène par antagonisme ou indirecte par stimulation des défenses de la plante. Par exemple, une réduction significative de l'incidence et de la sévérité de la maladie causée par *Phytophthora capsici* a été observée chez des plants de poivrons traités avec du thé de compost par rapport au témoin (Sang *et al.*, 2010). *In vitro*, la germination des zoospores du pathogène a été impactée, ainsi que l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne. Ces effets bénéfiques ne sont pas retrouvés avec le même thé filtré ou autoclavé, ce qui montre l'importance de la présence des micro-organismes dans l'action phytoprotectrice.

Mais les résultats restent encore très variables et des recherches approfondies sont nécessaires avant la commercialisation du thé de compost en tant que produit phytosanitaire.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique et chimique

1.1. Matériel végétal

630 plants de *Lavandula x intermedia* 'Grosso' sont utilisés pour cet essai. Les boutures reçues sur plaques de micro-mottes proviennent de la pépinière La Forêt Jeunes Plants (44) qui s'est fournie chez le multiplicateur Decock. Elles ont été bouturées à partir de pieds mères en automne 2016. L'homogénéité de la hauteur des plants est confirmée statistiquement par une notation initiale en semaine 15.

1.2. Produits phytosanitaires conventionnels

Subdue Gold[®] : substance appartenant à la famille chimique des acylalanines avec pour mode d'action l'inhibition de la synthèse des ARN ribosomiques, en ciblant l'ARN polymérase I (classé A1 par la FRAC). Lors de l'essai, 113 mL/pot sont appliqués à l'aide d'un pulvérisateur à dos, avec une bouillie préparée à une concentration de 0,4 mL/L d'eau.

Aliette[®] EV : fongicide essentiellement préventif, commercialisé par Bayer. Il est à base de Fosétyl d'aluminium, substance active appartenant à la famille chimique des éthyl-phosphonates dont le mode d'action reste encore inconnu. La substance perturberait la germination des spores et la croissance du mycélium. Aliette[®] possède une double systémie : ascendante et descendante (Matheron et Porchas, 2000). 113 mL/pot sont appliqués à l'aide d'un pulvérisateur à dos, avec une bouillie préparée à une concentration de 2 g/L d'eau.

Ces deux produits phytosanitaires servent de référence efficacité pour l'essai et sont appliqués en alternance une fois par mois.



Figure 17 : Biotisation du substrat avec *Pythium oligandrum* en solution, à l'aide Varispenser® (Eppendorf) à la surface du substrat, après humectation des pots à l'aide d'une rampe (Dubernard, 2017).

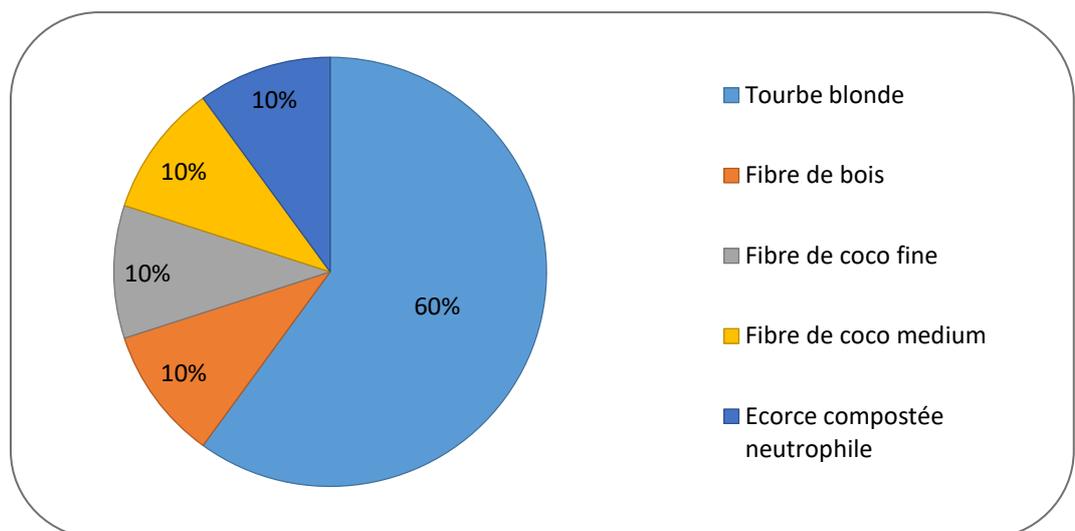


Figure 18 : Composition du substrat Faliénor 'Dipladenia'.

1.3. Produits de biocontrôle

Prestop[®] : produit en poudre mouillable à base de *Gliocladium catenulatum* (souche J1446).

50 mL de bouillie, soit 0,2 g/pot de lavande ($2 \cdot 10^8$ UFC/g) sont apportés toutes les six semaines selon les recommandations du fournisseur.

GHA180[®] et Mike[®] Pro PS3 : de Premier Tech Faliénor est autorisé en tant que matière fertilisante en maraichage et plantes ornementales, avec comme revendication une augmentation de la masse végétale.

La solution est à base de *Bacillus pumilus* (souche GHA180), à une concentration de $1 \cdot 10^9$ spores/mL.

Le produit a été fourni au GIE FPSO pour des premiers essais dans le cadre de la protection des plantes pour une possible demande d'homologation du produit en tant que produit phytosanitaire.

Dans certaines modalités des essais menés pour l'évaluation du produit (ANSES, 2015), le substrat de culture était également biotisé avec le champignon endomycorhizien *Rhizophagus irregularis*. Mike[®] Pro PS3, l'inoculat mycorhizien à base de *R. irregularis* sous forme de poudre et contenant 3200 spores viables/g est donc ajouté au rempotage. Au total, 50 g sont mélangés dans les 100 L de substrat utilisé, soit une concentration de 500 g/m^3 . GHA180[®] est apporté deux semaines après le rempotage en un unique apport de 25 mL/pot, avec une dilution de 8,8 mL de produit dans 1 L d'eau.

Pythium oligandrum souche P37 : souche fournie sous forme de poudre hydrosoluble par l'entreprise BIOVITIS qui étudie actuellement ses effets positifs sur la croissance et la protection contre les maladies du bois de la vigne (Gerbore *et al.*, 2014).

Afin d'affiner les modalités de biotisation de la souche de *P. oligandrum*, différentes concentrations (10^4 , 10^5 et 10^6 oospores/mL) et différentes fréquences d'application (un apport en début de culture ou apports mensuels) sont testées. 50 mL de la solution sont apportés par pot. Par exemple pour la concentration 10^6 oospores/mL, 40g sont dilués dans 2L d'eau (**Figure 17**).

Bacillus amyloliquefaciens et Pseudomonas fluorescens : la combinaison des deux agents de biocontrôle est testée pour la deuxième année, après des tendances positives sur la croissance en hauteur des plants de lavande et une floraison deux fois plus importante pour le cyclamen (Deogratias, 2016). Les micro-organismes sont fournis également par l'entreprise BIOVITIS, sous forme de poudre hydrosoluble. 50 mL par pot sont appliqués avec une solution de concentration 10^6 UFC/mL (soit $5,0 \cdot 10^7$ UFC/plant).

Thé de compost : le produit Fytaforce[®] est commercialisé par l'entreprise Soiltech. C'est un thé de compost oxygéné prêt à l'emploi. Le thé est issu d'un compost à base d'extraits végétaux et la composition en micro-organismes et éléments nutritifs est connue. Une analyse réalisée en 2016 par le laboratoire MycAgro dans le cadre de l'essai "Thé de compost" sur la station (**Annexe II**) confirme les teneurs et propriétés physico-chimiques du produit. Les taux de Phosphate et d'Azote analysés sont inférieurs à ceux de l'étiquette du produit et la quantité de micro-organismes reste assez similaire. On retrouve les bactéries PGPR de type *Bacillus sp.* et *P. fluorescens*, déjà testées dans une autre modalité avec des concentrations comparables (10^7 UFC/mL). Fytaforce[®] est appliqué toutes les deux semaines, à raison de 80 mL/pot, en solution diluée à 1%.



Figure 19 : Disposition des plants de lavandes dans la serre du GIE FPSO (Dubernard, 2017).

Paroi de la serre

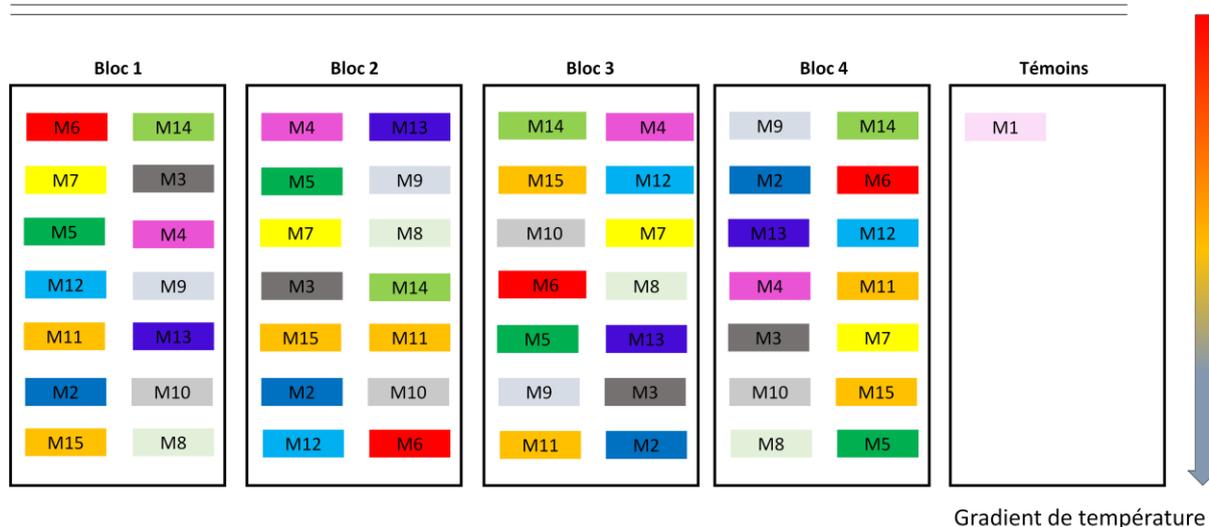


Figure 20: Plan d'expérience de l'essai sur la lutte contre la pourriture phytophthoréenne de la lavande.



Figure 21 : Inoculation de l'agent pathogène *P. nicotianae* dans le substrat des lavandes par l'intermédiaire de grains de millet contaminés (Dubernard, 2017).

2. Mise en place générale de l'essai

Le rempotage des plants de lavande est effectué en semaine 13, dans des pots de 2L. Le substrat utilisé est Faliénor 'Dipladenia' de l'entreprise Premier Tech Faliénor (**Figure 18**).

La fertilisation est réalisée dès le rempotage par l'apport de 3 g d'engrais retard à diffusion lente (Basacote native 6 mois (16.3.19)) par litre de substrat.

Les pots sont ensuite placés dans la serre verre de la station, sur des tablettes (**Figure 19**). L'irrigation se fait manuellement à l'aide d'une canne d'arrosage. Les biotisations du substrat débutent toutes en semaine 15 et se poursuivent au cours de la saison selon les modalités. Les conditions climatiques du compartiment de la serre sont mesurées chaque heure à l'aide d'un capteur MT/MTV d'Hortimax (**Annexe III**).

3. Plan d'expérience

L'essai concerne l'étude d'un facteur contrôlé qualitatif : la biotisation du substrat, qui se décline en 15 modalités à tester, nommées M1 à M15 (4 témoins, 5 biotisées avec des micro-organismes seuls, 5 biotisées avec des micro-organismes en combinaison et 1 avec un apport de thé de compost) (**Tableau I**). Le dispositif retenu est aléatoire en blocs complets, comportant 4 blocs afin d'avoir 4 répétitions biologiques, selon un dispositif de Fisher. Chaque modalité comprend 40 plants, ce qui fait 10 plants par modalité et par bloc (**Figure 20**).

Les modalités M2 à M15 subissent une inoculation artificielle de *P. nicotianae*, ce qui implique que le témoin M1 non inoculé soit exclu des blocs pour éviter toute contamination indésirable. L'étude va se porter sur deux variables quantitatives (la croissance en hauteur et la sensibilité à *P. nicotianae*) et une variable qualitative (le développement racinaire).

4. Inoculation du pathogène *Phytophthora nicotianae*

Deux souches de *P. nicotianae*, l'une isolée de choisya et l'autre de lavande par le laboratoire de l'OBS en Bretagne, ont été utilisées pour l'inoculation. Les souches sont apportées au substrat *via* 10L de grains de millet contaminés, à raison de 5L de chaque souche mélangées dans un seau au préalable.

20 mL de grains de millet sont déposés par plante, dans un trou de 3 cm de profondeur de chaque côté du collet de la plante (**Figure 21**), afin d'atteindre un taux de contamination de 1% du volume du pot. Seules les 40 plantes témoins de la modalité 1 ne sont pas inoculées.

5. Suivi du taux de colonisation racinaire des micro-organismes de biocontrôle

5.1. Prélèvements racinaires

Les racines de lavandes situées au centre de la motte sont prélevées à l'aide d'un scalpel désinfecté entre chaque plante. Afin de vérifier si le prélèvement n'aura pas d'impact futur sur le développement de la plante, une étiquette est placée dans le pot des lavandes qui ont été sélectionnées. Les racines sont ensuite nettoyées en les frottant sans eau pour retirer grossièrement le substrat collé.

Tableau I : Modalités choisies lors de l'essai sur la pourriture phytophthoréenne de la lavande 2017

MODALITE		TRAITEMENT / BIOTISATION	APPORT	INOCULATION <i>P. nicotianae</i>
M1	Témoins	Non traité		Non inoculé
M2		Non traité		Inoculé
M3		Référence fongicide (alternance Aliette® et Subdue Gold®)	Mensuel	Inoculé
M4		Référence micro-organismes (Prestop®)	Mensuel	Inoculé
M5	Micro- organismes seuls	<i>P. oligandrum</i> P37	[10 ⁴] 1 apport	Inoculé
M6		<i>P. oligandrum</i> P37	[10 ⁵] 1 apport	Inoculé
M7		<i>P. oligandrum</i> P37	[10 ⁶] 1 apport	Inoculé
M8		<i>P. oligandrum</i> P37	[10 ⁴] Apports mensuels	Inoculé
M9		<i>P. oligandrum</i> P37	[10 ⁶] Apports mensuels	Inoculé
M10	Micro- organismes en combinaison	GHA 180® : <i>Bacillus pumilus</i> + <i>R. intraradices</i> (Premier-Tech)	1 apport	Inoculé
M11		<i>P. fluorescens</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i>	1 apport	Inoculé
M12		<i>P. fluorescens</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>P. oligandrum</i>	[10 ⁶] 1 apport	Inoculé
M13		<i>P. fluorescens</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> puis <i>P. oligandrum</i>	[10 ⁶] 1 apport	Inoculé
M14		<i>P. fluorescens</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i> puis <i>P. oligandrum</i>	[10 ⁶] Apports mensuels de <i>P. oligandrum</i>	Inoculé
M15	Thé de compost Fytaforce®	Soiltech	Bimensuel	Inoculé

5.2. Analyses microbiologiques

5.2.1. *Pythium oligandrum*

a) Dépôts des racines sur boîtes de Pétri

Au total, 3 plantes des modalités M1 (témoin), M5, M6, M7, M8, M9, M12, M13 et M14 sont prélevées aléatoirement. Les racines sont découpées en fragments de 1 cm environ et sont déposées sous hotte stérile dans des boîtes de Pétri contenant du milieu CMAparp (Corn Meal Agar Pimaricine, Ampicilline, Rifampicine, Pentachloronitrobenzène, **Tableau II**). Ce milieu est censé favoriser entre autres la croissance de *P. oligandrum* car il sélectif des Oomycètes. Au total, deux boîtes par plante, soit deux répétitions sont utilisées, avec 10 fragments racinaires par boîte (**Figure 22**).

b) Lecture des boîtes au microscope

Après 10 jours en chambre de croissance à 23°C, un mycélium rasant et translucide caractéristique de *P. oligandrum* est censé se former. Les observations sous microscope permettent d'établir une fréquence d'installation de ce micro-organisme dans le substrat, en estimant le pourcentage d'explants racinaires colonisés. Une racine est considérée comme positive si autour d'elle au moins une oospore de *P. oligandrum* est présente. Ces oospores sont caractérisées par une forme échinulée, faisant penser à un oursin.

5.2.2. *Rhizophagus irregularis*

Après avoir prélevé des racines sur des plantes de la modalité M10, les racines sont traitées en quatre étapes afin de pouvoir visualiser la présence de structures fongiques à l'intérieur des racines : éclaircissement, blanchiment, coloration et décoloration. Le protocole est adapté d'une méthodologie proposée par Plante & Cité pour l'étude du statut mycorhizien des arbres en ville (Coïc et Garbaye, 2009).

Tout d'abord, l'éclaircissement consiste en un traitement avec une solution potassique (KOH à 10%). Pour cela les racines préalablement nettoyées à l'eau sont placées au bain marie à 90°C pendant 15 minutes. Cette étape provoque l'hydrolyse basique des cellules végétales et fongiques. Elle est suivie d'un rinçage de 10 minutes dans un bain d'eau claire. Le blanchiment permet de faciliter la coloration à venir. Les racines sont mises à tremper dans un bain de 10 volumes d'eau oxygénée pendant 5 minutes. Elles sont ensuite immergées dans un mélange d'encre bleue à 5% et de vinaigre blanc. L'encre en cartouches va se fixer uniquement sur les parois végétales et non sur les parois fongiques. L'acide acétique du vinaigre a la capacité de fixer la coloration sur les parois. Enfin les racines sont alors placées dans un bain d'eau contenant quelques gouttes de vinaigre blanc. Elles peuvent être placées par la suite au réfrigérateur pour une observation dans la journée, le temps de décoloration n'étant pas fixe. Afin de vérifier l'installation de *Rhizophagus* dans les tissus racinaires, les racines sont observées au microscope optique.

5.3. Analyses moléculaires pour quantifier l'installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère

5.3.1. Extraction ADN

Les racines de lavandes sont d'abord broyées finement à l'aide d'un broyeur mécanique (TissueLyser II, Qiagen) sous azote liquide. 120 mg de poudre sont pesés pour réaliser l'extraction.

Tableau II : Composition du milieu CMAparp

Mélange Corn Meal Agar prêt à l'emploi (Difco)	17 g
Pimaricine (2.5%) - Ampicilline (99%) (Aldrich)	250 mg dissous dans de l'eau distillée
Rifampicine (97%) (Sigma)	100 mg dissous dans du DMSO
Pentachloronitrobenzene (97%) (Aldrich)	200 mg dissous dans du DMSO



Figure 22 : Dépôt des fragments racinaires de lavandes sur milieu CMAparp pour la détermination du taux d'installation de *P. oligandrum* dans le substrat (Dubernard, 2017).

Tableau III : Séquence des amorces et de la sonde utilisées en qPCR pour amplifier l'ADN de *P. oligandrum*.

Nom	Cible	Séquence	Taille de l'amplicon	Référence
Amorce UpF1	<i>P. oligandrum</i> ITS	5'-TGCTTCGTCGCAAGACT-3'	124 pb	Godfrey <i>et al.</i> , 2003
Amorce Lo146		5'-CGTATTCGGAGTATAGTTTCAGT-3'		Le Floch <i>et al.</i> , 2007
Sonde Taqman 142 LNA		5'-FAM-AGTCT GCGTCTATTT GGA-BHQ1-3'		Tambong <i>et al.</i> , 2006

Le protocole utilisé est celui du kit commercial Invisorb Spin Plant Mini Kit® d'Invitex (**Annexe IV**). Seule la première étape de lyse cellulaire a été modifiée avec l'ajout de β -mercaptoéthanol et de polyvinylpyrrolidone (PVP 40) au tampon de lyse afin d'éviter la présence de contaminants. Ces produits facilitent la dénaturation des protéines en réduisant leurs liaisons disulfures et permettent l'absorption des polyphénols.

Suite à l'extraction, une vérification de la pureté et de la concentration en ADN est effectuée à l'aide du spectrophotomètre DeNovix DS-11. Un échantillon est considéré comme pur lorsque le rapport 260/230 et 260/280 (pour doser les contaminations en matières organiques et en protéines respectivement) est compris entre 1,8 et 2,2. La hauteur du pic d'absorbance à 260 nm représente la teneur en ADN dans l'échantillon. Chaque échantillon est enfin dilué afin d'obtenir une concentration finale de 20 ng/ μ L.

5.3.2. Quantification de l'ADN par qPCR

Le thermocycleur Mx3005P d'Agilent Technologies est utilisé afin d'amplifier spécifiquement la séquence de *P. oligandrum* parmi l'ADN total extrait. Le mélange réactionnel préparé contient 7,5 μ L de Quantitex Mix, 0,3 μ L des amorces UpF1 et Lo146, 0,3 μ L de la sonde Taqman FAM 142 LNA (**Tableau III**) et 1,6 μ L d'eau sans RNase. Les amorces sélectionnées sont spécifiques de l'espèce *P. oligandrum*. Chaque puits de la plaque reçoit 10 μ L du mélange réactionnel et 5 μ L d'ADN.

Une gamme étalon de 7 échantillons est réalisée par une dilution de 10 en 10, avec une concentration en ADN de *P. oligandrum* de 20 ng/ μ L à $2 \cdot 10^{-4}$ ng/ μ L. A cette gamme s'ajoute un témoin négatif contenant de l'eau. Deux réplicats de chaque échantillon testé sont effectués par plaque qPCR. Le programme d'amplification comprend une première dénaturation initiale de l'ADN à 95°C durant 15 minutes, puis 40 cycles décomposés en 3 phases : dénaturation (30 secondes, 95°C), appariement avec les amorces (30 secondes, 60°C) et élongation (30 secondes, 72°C).

A la fin du programme, le logiciel MixPro analyse les résultats. La courbe étalon est établie pour permettre le calcul de la concentration ADN de *P. oligandrum* dans les échantillons et vérifie l'efficacité de la réaction (R^2).

5.4. Mise en évidence de l'antagonisme direct par des tests de confrontation *in vitro*

Les produits de biocontrôle Prestop®, GHA 180®, Fytaforce®, *B. amyloliquefaciens*, *P. fluorescens* et *P. oligandrum* sont testés sur boîtes de Pétri avec trois répétitions chacun. Tout d'abord, un explant de culture de *P. nicotianae* est déposé au centre des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar). L'agent pathogène est laissé 24 heures à 22°C afin qu'il commence à se développer. Le lendemain, 10 μ L de solution du même produit, dilué à la même concentration que pour l'apport dans le substrat des lavandes, sont déposés sur des pastilles diamétralement opposées, situées à 2,2 cm de l'explant de *P. nicotianae*. 10 μ L d'eau stérile sont utilisés comme témoins négatifs sur les deux pastilles restantes (**Figure 23**). Trois mesures totales de la croissance de l'agent pathogène sont effectuées tous les 2 à 3 jours.

Un indice d'inhibition de croissance (I_c) est alors calculé pour chaque produit à l'aide des formules :

$$I_{c1} = \frac{TR1}{T1} - \frac{SR1}{A1} \quad \text{et} \quad I_{c2} = \frac{TR2}{T2} - \frac{SR2}{A2}, \quad \text{soit un } I_c \text{ final} = \frac{I_{c1} + I_{c2}}{2} \quad (\text{protocole interne de l'INRA de Bordeaux-}$$

Aquitaine).

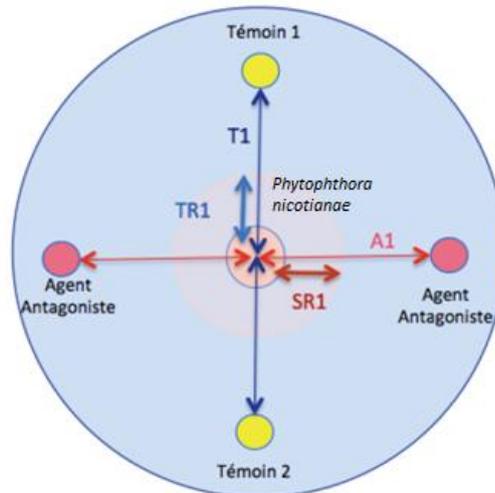


Figure 23 : Disposition des agents antagonistes et de *P. nicotianae* dans une boîte de Pétri lors du test de confrontation *in vitro*.

SR1 : Rayon de croissance de *P. nicotianae* dans l'axe de l'agent antagoniste. **TR1** : Rayon de croissance de *P. nicotianae* dans l'axe du témoin. **A1** : Distance entre l'explant de *P. nicotianae* et la pastille de l'agent antagoniste. **T1** : Distance entre l'explant de *P. nicotianae* et la pastille du témoin.

			
Classe 1 0-15% de racines visibles	Classe 2 Début de croissance le long du pot. 15-50% de racines visibles	Classe 3 Croissance le long du pot et début de ramification. 50-70% de racines visibles.	Classe 4 Forte ramification avec une colonisation plus dense du pot et début de saturation. 70-100% de racines visibles.

Figure 24 : Classes de développement racinaire des lavandes.

5.5. Analyse comparée du développement des plants

Des notations régulières sont effectuées afin d'évaluer les effets des agents de biocontrôle en termes de stimulation de croissance et de protection contre l'agent pathogène *P. nicotianae*.

5.5.1. Etude quantitative de la croissance en hauteur

La croissance des parties aériennes des lavandes est mesurée à l'aide d'une règle en partant du collet jusqu'à l'apex, sur les 40 plantes de chaque modalité. Une première mesure est effectuée au temps T_0 (semaine 16) afin de valider l'homogénéité de départ des plants, puis deux autres vont suivre en semaines 23 et 27 (pré-inoculation de *Phytophthora*). Pour prendre en compte la variabilité biologique, une moyenne des tailles par modalité est calculée.

5.5.2. Etude qualitative du développement racinaire

Le développement racinaire des plants est évalué par des notations basées sur des observations visuelles, déclinées en quatre classes. Ces classes sont déterminées selon le taux de recouvrement racinaire du substrat à la périphérie des pots (**Figure 24**). Les observations sont effectuées en semaines 16 et 25 (pré-inoculation de *Phytophthora*), sur l'intégralité des plants des 15 modalités.

5.5.3. Etude de la sensibilité des plants à *P. nicotianae*

Afin de déterminer l'incidence de la maladie, le nombre de plants infectés par rapport au nombre total de plants dans chaque modalité est calculé. Les résultats sont donnés sous la forme d'un pourcentage de plants présentant des symptômes. Les notations sont hebdomadaires et commencent en semaine 30, soit 3 semaines après l'inoculation de *P. nicotianae* dans le substrat.

5.5.4. Analyses statistiques

Les logiciels R Studio et Statbox sont utilisés pour réaliser les tests statistiques de l'essai. Un test d'analyse de variance (ANOVA), suivi d'un test de Tukey, sont choisis pour la comparaison de la croissance en hauteur selon les différentes modalités. Un test du χ^2 pour la comparaison des distributions des classes racinaires entre les modalités ainsi qu'un test de Kruskal-Wallis pour la comparaison de l'incidence de la maladie entre les modalités ont été effectués. Les données sont considérées comme statistiquement significatives avec un risque $\alpha=5\%$.

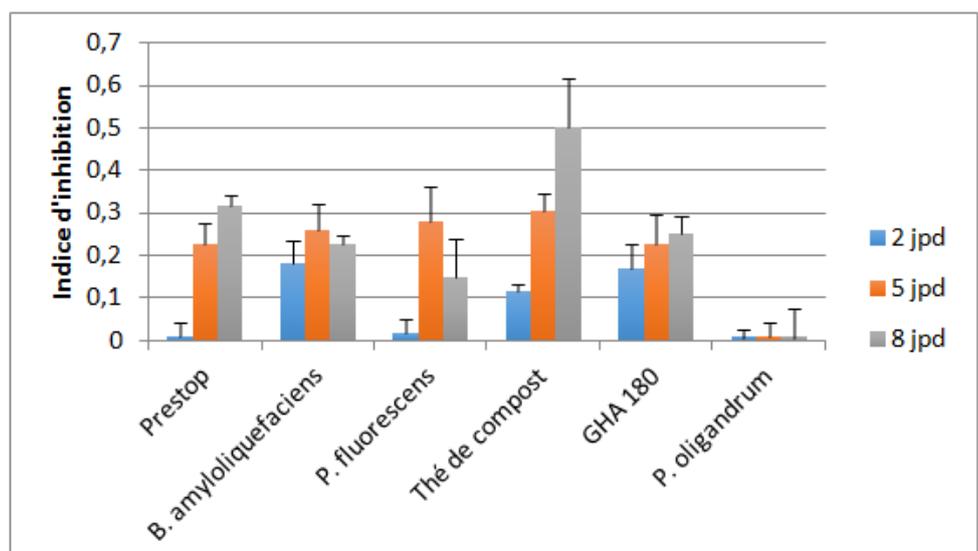


Figure 25 : Indices d'inhibition de croissance de *P. nicotianae* calculés lors des tests de confrontation *in vitro* des différents produits et agents de biocontrôle. **jpd** : jours post-dépôt des produits sur boîtes

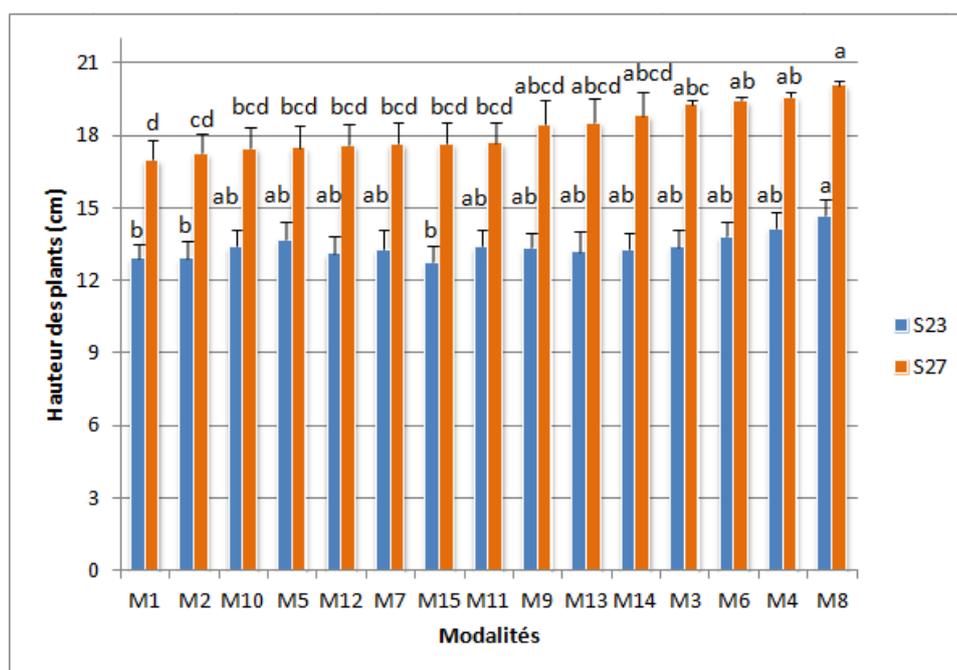


Figure 26 : Evaluation de la croissance en hauteur des plants de lavande en fonction des différents agents de biocontrôle, en semaines 23 et 27 (stade pré-inoculation). Le repotage est réalisé en semaine 13.

1 : Témoin non biotisé non inoculé avec *P. nicotianae*. **2** : Témoin non biotisé inoculé. **3** : Référence fongicide. **4** : Référence biofongicide (Prestop®). **5** : *P. oligandrum* au repotage 10^4 oospores/mL. **6** : *P. oligandrum* au repotage 10^5 . **7** : *P. oligandrum* au repotage 10^6 . **8** : *P. oligandrum* mensuel 10^4 . **9** : *P. oligandrum* mensuel 10^6 . **10** : GHA 180® + Myc500® au repotage. **11** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* 10^6 UFC/mL au repotage. **12** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* + *P. oligandrum* 10^6 . **13** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 1 mois après. **14** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 mensuel. **15** : Fytaforce®

Les données avec des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ (Anova).

RESULTATS

Dans le but de sélectionner les agents de biocontrôle capables de présenter une action antagoniste sur *P. nicotianae*, des tests préliminaires de confrontation en boîtes de Pétri sont réalisés dans un premier temps. Dans un deuxième temps, les produits sont testés directement en conditions semi-contrôlées sur la culture. Enfin, différentes analyses de laboratoire sont menées en vue de vérifier et de quantifier la présence des agents de biocontrôle sur le système racinaire.

1. Evaluation *in vitro* de l'effet antagoniste des produits de biocontrôle contre *P. nicotianae*

Les produits de biocontrôle de l'essai sont d'abord évalués lors de tests de confrontation directe avec *P. nicotianae*. Le calcul d'un indice d'inhibition de croissance permet de mettre en évidence une potentielle cinétique d'efficacité des micro-organismes auxiliaires sur l'agent pathogène.

Les résultats du test ne révèlent pas d'action antagoniste de la part de l'oomycète *P. oligandrum* (**Figures 25 et 26**). Le thé de compost donne l'indice d'inhibition le plus élevé par rapport aux autres produits. Ce dernier augmente au cours du temps pour atteindre 0,5 après 8 jours de contact avec *P. nicotianae*. Les deux bactéries du genre *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens* et *B. pumilus* de GHA 180[®]) induisent des indices comparables, qui restent stables dans le temps ($I_c=0,22$ en moyenne). Enfin, l'indice d'inhibition de croissance lié à la présence de *P. fluorescens* atteint son maximum pour 5 jours post-dépôt ($I_c=0,28$) puis diminue progressivement. A la fin du test, l'agent pathogène recouvre entièrement cette bactérie.

Sur la **Figure 27**, on distingue que les micro-organismes de biocontrôle n'entrent pas en contact direct avec *P. nicotianae* et inhibent sa croissance à distance, à l'exception de *G. catenulatum* de Prestop[®]. Ce dernier se développe jusqu'à rencontrer le mycélium de l'agent pathogène. Une observation microscopique permet de vérifier que ce mycélium est découpé en de multiples fragments, même si aucune interaction entre les mycéliums des deux organismes n'est détectée.

2. Evaluation *in planta* de l'efficacité des produits de biocontrôle

2.1. Analyse de la stimulation de croissance aérienne des produits

Deux notations de la hauteur des plantes sont réalisées : l'une deux mois et demi après le rempotage des mottes (semaine 23) et l'autre trois mois et demi après (semaine 27).

Pour les deux dates, les témoins 1 et 2 sont significativement égaux, avec les tailles en hauteur les plus basses comparées au reste des modalités (**Figure 27**).

En semaine 23, seule la modalité 8 (biotisée mensuellement avec *P. oligandrum* à 10^4 oospores/mL) est significativement différente des deux modalités témoins 1 et 2, avec un gain de 1,8 cm de hauteur.

En semaine 27, on retrouve cette même tendance pour les plantes de la modalité 8 qui possèdent la meilleure croissance des parties aériennes comparée aux témoins 1 et 2, avec 3,1 cm de plus.

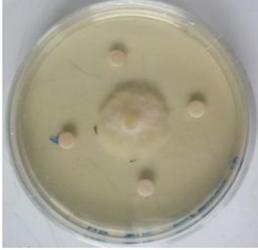
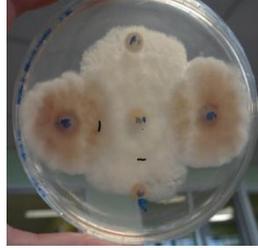
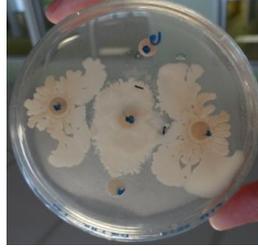
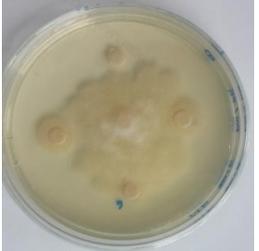
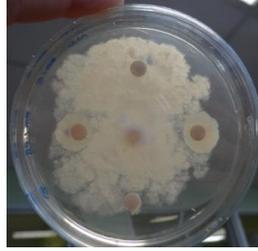
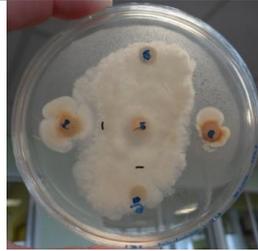
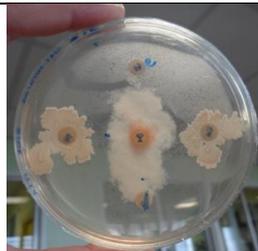
	3 jpd	5 jpd	8 jpd
Prestop			
<i>B. amyloliquefaciens</i>			
<i>P. fluorescens</i>			
Thé de compost			
GHA 180			
<i>P. oligandrum</i>			

Figure 27 : Test de confrontation entre les différents agents de biocontrôle (sur les deux pastilles opposées) et *P. nicotianae* (au centre), à 3, 5 et 8 jours post-dépôts (jpd).

Les deux pastilles opposées restantes sont les témoins avec de l'eau stérile. Le milieu PDA est utilisé.

Suivent ensuite les modalités 4 (*P. oligandrum* au repotage à 10^4 oospores/mL, +2,6 cm), 6 (*P. oligandrum* au repotage à 10^5 oospores/mL, +2,4 cm) et 3 (référence fongicide, +2,3 cm).

2.2. Analyse de la stimulation de développement racinaire des produits

Deux notations concernant le développement racinaire des lavandes sont effectuées : l'une 3 semaines après le repotage des mottes (en semaine 16) et l'autre 3 mois après (en semaine 25).

Les résultats sont présentés sous la forme de fréquences d'observation de chaque classe racinaire par modalité (**Figure 28**).

En semaine 16, les plantes de la modalité 12 (*P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* + *P. oligandrum* 10^6) possèdent significativement moins de système racinaire de classe 1 que les autres modalités (2,5% contre 16,8% en moyenne).

Seule la fréquence d'observation de la classe racinaire 1 de la modalité 15 (traitée avec Fytaforce®) est significativement plus élevée (deux fois plus de plants en classe 1 que la modalité 1 témoin). Le retard de développement de cette modalité 15 pourrait provenir d'une attaque des racines par des larves de mouches des terreaux. Ces larves causent des dégâts sur jeunes plants dans des terreaux riches en tourbe et humides. Elles ont été traitées par le produit phytosanitaire Trigard® 75 WP qui a été efficace. La fréquence d'observation des classes racinaires pour les modalités restantes ne sont pas significativement différentes entre elles.

En semaine 25, la fréquence d'observation de la classe racinaire 3 est significativement plus élevée pour la modalité 14 (*B. amyloliquefaciens* + *P. fluorescens* puis *P. oligandrum* mensuel) que pour les autres modalités, soit 55,5% contre 38% en moyenne. Une tendance se dessine concernant la modalité 1 témoin qui possède 16% de plus de classe 2 que la moyenne, ce qui la place en dernière position.

2.3. Analyse de la sensibilité des plantes à la pourriture phytophthoréenne

Les notations de l'incidence de la pourriture phytophthoréenne débutent 3 semaines après l'inoculation de l'agent pathogène (semaine 30) et se font de manière hebdomadaire. Les résultats sont présentés sous la forme d'un pourcentage de plants infectés par modalité (**Figure 29**).

Les modalités 1 (témoin négatif non inoculé) et 3 (référence fongicide) ont significativement moins de plantes malades que les autres modalités, avec 0% et 8,6% respectivement pour les semaines 30 et 31, puis 7,5% et 17,5% en semaine 32.

En semaine 30, exceptées les modalités 1 et 3, celles possédant significativement le moins de plantes infectées sont les modalités 5 (*P. oligandrum* à 10^4 en 1 apport ; 41%), 14 (*B. amyloliquefaciens* + *P. fluorescens* puis *P. oligandrum* 10^6 mensuel ; 46%) et 4 (Pretsop® ; 47%) comparées à la modalité témoin positif 2 (65%).

En semaines 31 et 32, il n'y a plus de différence significative entre les modalités où sont testées des micro-organismes de biocontrôle.

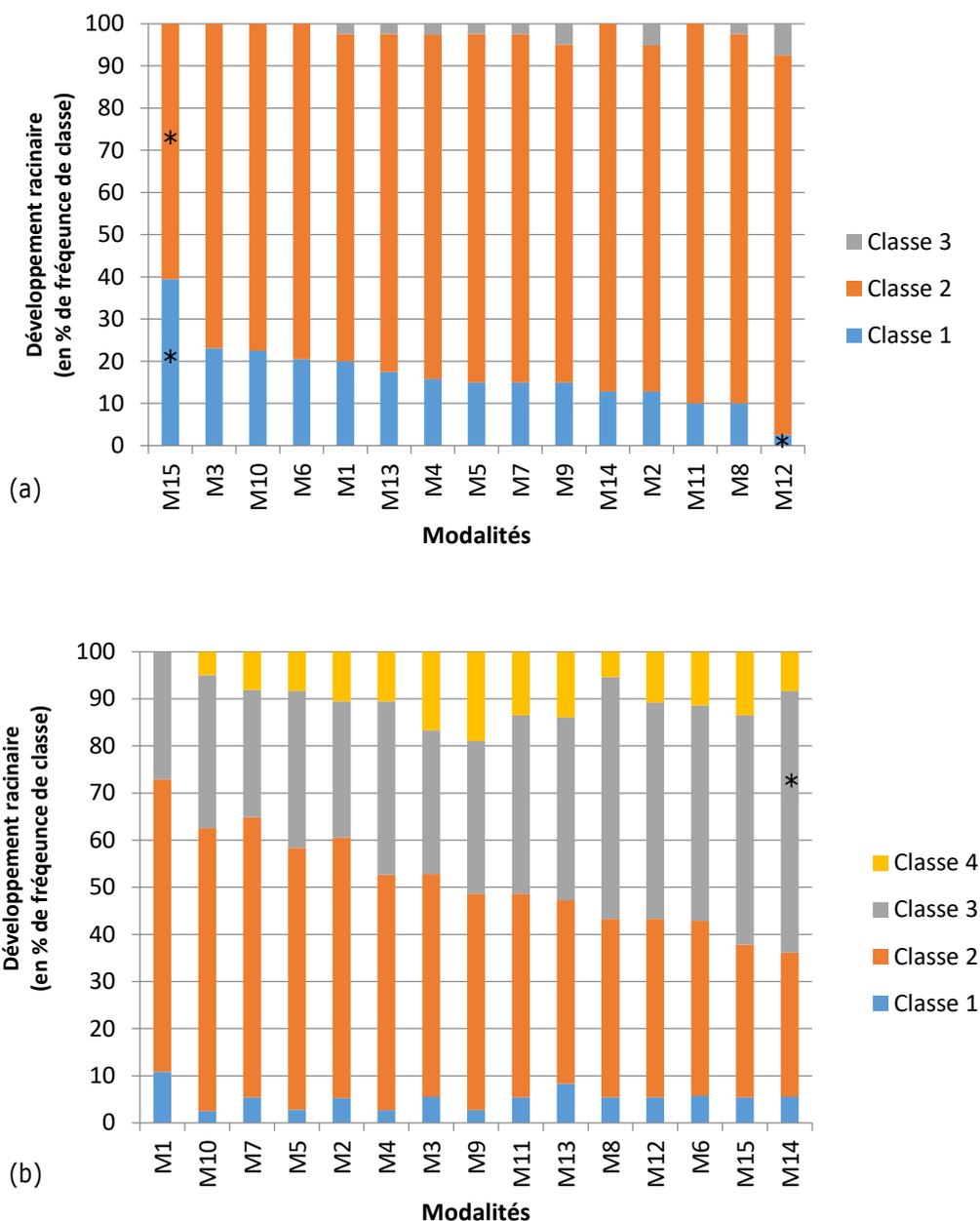


Figure 28 : Evaluation du développement racinaire des plants de lavande en fonction des différents agents de biocontrôle, en semaines 16 (a) et 25 (b) (stades pré-inoculation). Rempotage réalisé en semaine 13.

Les résultats sont triés selon la classe 1 (a) et selon la classe 2 (b) de manière décroissante.

Classe 1 : 0-15% de racines visibles. **Classe 2** : 15-50%. **Classe 3** : 50-70%. **Classe 4** : 70-100%.

1 : Témoin non biotisé non inoculé avec *P. nicotianae*. **2** : Témoin non biotisé inoculé. **3** : Référence fongicide. **4** : Référence biofongicide (Prestop®). **5** : *P. oligandrum* au repotage 10^4 oospores/mL. **6** : *P. oligandrum* au repotage 10^5 . **7** : *P. oligandrum* au repotage 10^6 . **8** : *P. oligandrum* mensuel 10^4 . **9** : *P. oligandrum* mensuel 10^6 . **10** : GHA 180® + Myc500® au repotage. **11** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* 10^6 UFC/mL au repotage. **12** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* + *P. oligandrum* 10^6 . **13** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 1 mois après. **14** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 mensuel. **15** : Fytaforce®

* : test de χ^2 significatif au seuil $\alpha=5\%$.

3. Détection des agents de biocontrôle dans la rhizosphère

3.1. Quantification microbiologique de *P. oligandrum* sur racines

Trois prélèvements racinaires sont effectués : 27, 60 et 104 jours post-biotisation de *P. oligandrum* dans le substrat. Les racines sont déposées sur un milieu spécifique et sont observées au microscope pour détecter les oospores de *P. oligandrum*. Aucune oospore échinulée n'est visualisée pour les deux premiers prélèvements. Lors du troisième prélèvement, les boîtes contenant les racines des modalités 8 Bloc 2 et 13 Bloc 4 sont positives à 50% et 40% respectivement.

3.2. Quantification moléculaire de *P. oligandrum* sur racines

Deux des trois prélèvements racinaires (27 et 60 jpb) sont analysés par PCR quantitative afin de doser la quantité d'ADN de *P. oligandrum* présent au niveau des racines des lavandes biotisées. La mesure des concentrations en ADN totaux obtenues grâce au Denovix montre des taux élevés, compris entre 42 et 285 ng/μL. Les rapports 260/230 et 260/280 sont compris entre 1,66 et 2,12.

Un R^2 de 0.99 est obtenu pour les deux courbes de gammes étalon effectuées suite aux résultats de la qPCR, ce qui reflète une bonne qualité de l'analyse avec une forte corrélation entre les cycles seuils et la concentration en ADN de *P. oligandrum*. Les résultats présentant une forte hétérogénéité entre les blocs testés au sein des modalités, le choix a donc été fait de ne pas les moyenniser entre eux. L'échelle des deux histogrammes est différente afin de pouvoir visualiser au mieux les valeurs des prélèvements (**Figure 30**).

Pour le premier prélèvement racinaire à **24 jpb**, l'ADN de *P. oligandrum* n'est pas détecté pour les modalités qui n'ont pas été biotisées (témoin M1 et M13, M14), ainsi que pour les deux modalités biotisées à 10^4 oospores/mL (M5 et M8). Les modalités 7, 9 et 12 (toutes biotisées à 10^6 oospores/mL une seule fois) sont à peu près comparables avec un ordre de grandeur de 10^{-4} ng/μL d'ADN.

Pour le deuxième prélèvement à **60 jpb**, les modalités 5 et 6 qui n'ont pas subi de nouvelle biotisation voient leur concentration en ADN de *P. oligandrum* inchangée par rapport au premier prélèvement, exceptée pour le bloc 4 qui présente une faible présence du micro-organisme (mais ce bloc n'a pas été testé auparavant). Les modalités 8 et 9, ayant été biotisées deux fois depuis la première analyse, passent d'une concentration en ADN de 0 à 10^{-3} ng/μL et de 10^{-4} à 10^{-2} ng/μL (multipliée par 100) respectivement. La concentration ADN de la modalité 12 a été également multipliée par 100 pour le bloc 2 (de $1,4 \cdot 10^{-3}$ à $9,6 \cdot 10^{-2}$ ng/μL), alors qu'aucun nouvel apport de *P. oligandrum* n'a été effectué.

3.3. Détection de l'endomycorhize *R. irregularis*

Trois colorations racinaires sont réalisées à 49, 85 et 125 jours post-biotisation (soit semaines 20, 25 et 31). L'observation microscopique n'a pas révélé la présence d'endomycorhizes dans les racines prélevées de la modalité 10, ni dans celle du témoin 1.

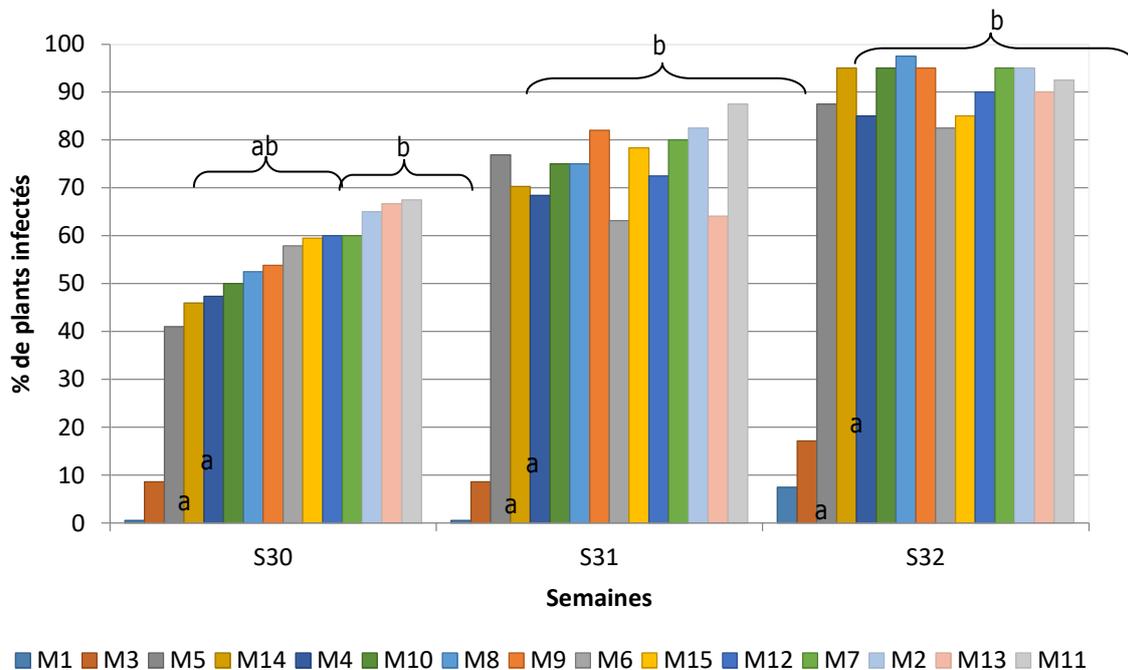


Figure 29 : Evaluation des symptômes aériens de *P. nicotianae* sur lavandes en fonction des différents agents de biocontrôle biotisés, en semaines 30, 31 et 32. Le repotage est réalisé en semaine 13 et l'inoculation en semaine 27. Les modalités sont triées dans l'ordre croissant des résultats de la semaine 30.

1 : Témoin non biotisé non inoculé avec *P. nicotianae*. **2** : Témoin non biotisé inoculé. **3** : Référence fongicide. **4** : Référence biofongicide (Prestop®). **5** : *P. oligandrum* au repotage 10^4 oospores/mL. **6** : *P. oligandrum* au repotage 10^5 . **7** : *P. oligandrum* au repotage 10^6 . **8** : *P. oligandrum* mensuel 10^4 . **9** : *P. oligandrum* mensuel 10^6 . **10** : GHA 180® + Myc500® au repotage. **11** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* 10^6 UFC/mL au repotage. **12** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* + *P. oligandrum* 10^6 . **13** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 1 mois après. **14** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au repotage puis *P. oligandrum* 10^6 mensuel. **15** : Fytaforce®

Les données avec des lettres différentes dans la même semaine sont significativement différentes à $p < 0,05$ (Test de Kruskal-Wallis).

DISCUSSION

- **Suivi de la présence des agents de biocontrôle dans le substrat**

L'échec de la mise en place de la mycorhization des racines de lavande par *Rhizophagus irregularis* est difficile à expliquer compte tenu des précédentes tentatives sur lavandes avec le même protocole où 100% des plants observés contenaient des vésicules (Challet, 2011). Deux hypothèses peuvent être émises: soit la souche utilisée a connu une perte de viabilité avant même la biotisation à cause d'une "shelf life" dépassée, soit cette perte s'est réalisée pendant le déroulement de l'essai à cause de températures ambiantes excessives dans la serre (**Annexe III**), allant jusqu'à 40°C.

Concernant l'installation de *P. oligandrum* au cours du temps, en 2015 (seule année où le suivi de *P. oligandrum* a été réalisé sur lavandes), cet agent a été retrouvé avec un taux de colonisation racinaire de 80% en moyenne en microbiologie et à une concentration de 2 à 20 ng/μL d'ADN à 76 jpb (Deogratias, 2016). Lors de cet essai, l'absence de détection d'oospores échinulées en analyse microbiologique, alors que de l'ADN de ce micro-organisme est retrouvé en analyse moléculaire, pourrait provenir de plusieurs hypothèses.

Tout d'abord, il est envisageable que les autres oomycètes prélevés en même temps que *P. oligandrum* soient entrés en compétition sur le milieu de culture et se soient développés plus rapidement pour ne pas laisser la possibilité à l'agent de biocontrôle de fructifier. De plus, la qPCR est une méthode d'analyse mesurant la quantité d'ADN total présent au niveau des racines, y compris dans les cellules mortes. Dans ce cas, on peut conclure que *P. oligandrum* est soit réellement absent de la surface racinaire (aucune cellule viable), soit présent mais en dessous du seuil de détection de la qPCR, ou la méthode de prélèvement est à affiner. Le fait qu'il soit absent ou en très faible quantité est possible car *P. oligandrum* a aussi subi des températures de substrat qui avoisinent ses températures sublétales, commençant à partir de 35-40°C (**Annexe III**; Gerbore *et al.*, 2014). Des tests de plasmolyse réalisés par l'entreprise Biovitis et un test de dépôt de la poudre diluée sur milieu gélosé ont démontré la viabilité des cellules de ce micro-organisme contenues dans le produit avant la biotisation.

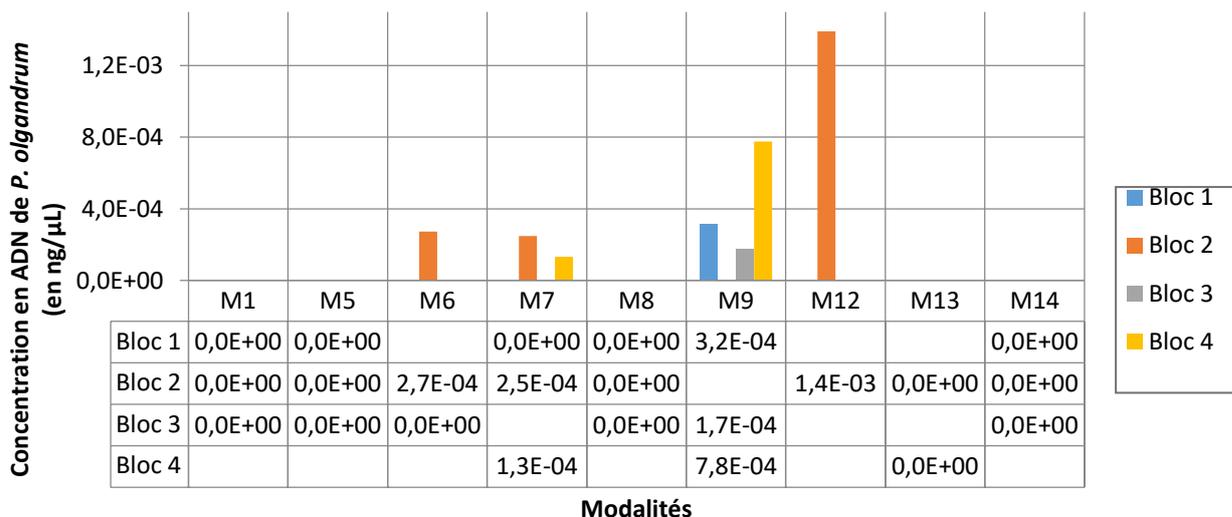
Au vu de l'hétérogénéité des résultats de qPCR selon les blocs d'une même modalité, la dernière hypothèse concernant la méthode de prélèvement est également probable. En effet, les fragments racinaires ont été prélevés sans distinction de leur position sur la racine, de la taille de la racine, ou encore de sa lignification. Ces paramètres pourraient être à l'origine d'une colonisation différentielle de *P. oligandrum* le long de la racine. Il serait donc intéressant de tester différents types de prélèvements racinaires lors de futurs essais de biotisation de micro-organismes dans le substrat.

Il est tout de même encourageant de voir que le troisième prélèvement a révélé la présence de quelques oospores sur des racines provenant de modalités avec un apport mensuel de *P. oligandrum*.

- **Effet biostimulateur des produits de biocontrôle**

Les précédents résultats obtenus en 2015 sur cyclamens ont montré que *P. oligandrum* pourrait avoir un effet intéressant en terme de protection des plantes mais interférerait avec la qualité des plantes.

(a)



(b)

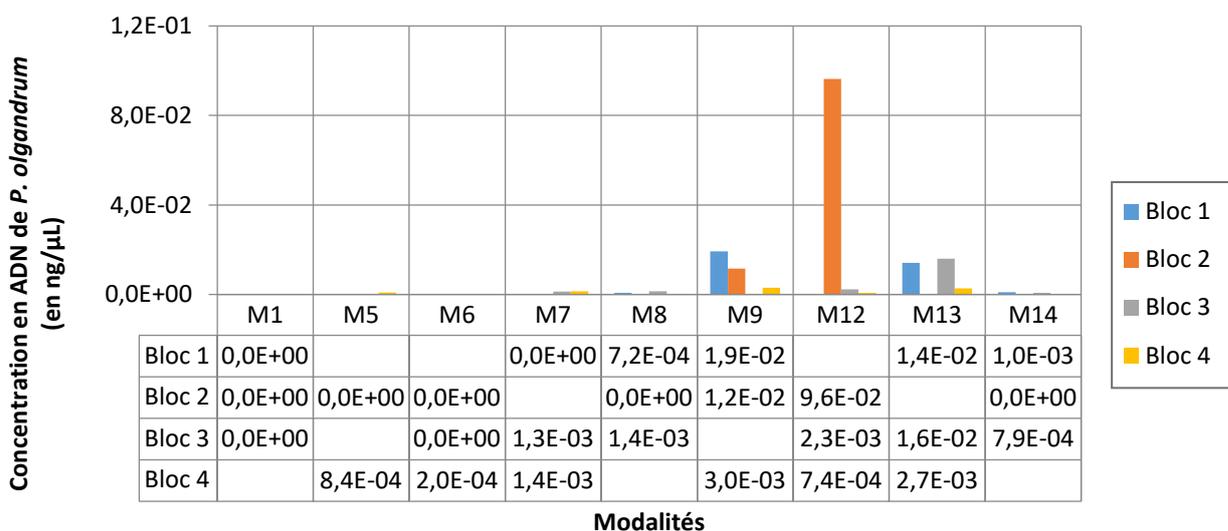


Figure 30 : Quantité d'ADN de *P. oligandrum* retrouvée dans les prélèvements racinaires de lavande effectués 27 jours post-biotisation (jpb), en S19 (a) et 60 jpb en S24 (b).

Les biotisations de *P. oligandrum* avaient été réalisées en semaine 15 puis en semaines 19 (post-prélèvement) et 23 pour les modalités d'apport mensuels.

1 : Témoin non biotisé non inoculé avec *P. nicotianae*. **2** : Témoin non biotisé inoculé. **3** : Référence fongicide. **4** : Référence biofongicide (Prestop®). **5** : *P. oligandrum* au rempotage 10^4 oospores/mL. **6** : *P. oligandrum* au rempotage 10^5 . **7** : *P. oligandrum* au rempotage 10^6 . **8** : *P. oligandrum* mensuel 10^4 . **9** : *P. oligandrum* mensuel 10^6 . **10** : GHA 180® + Myc500® au rempotage. **11** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* 10^6 UFC/mL au rempotage. **12** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* + *P. oligandrum* 10^6 . **13** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au rempotage puis *P. oligandrum* 10^6 1 mois après. **14** : *P. fluorescens* + *B. amyloliquefaciens* au rempotage puis *P. oligandrum* 10^6 mensuel. **15** : Fytaforce®

Il a en effet été observé une baisse de la floribondité* par rapport au témoin non biotisé (Deogratias, 2016). Le système de stimulation des défenses peut représenter un coût physiologique pour la plante en absence de micro-organismes pathogènes. L'hypothèse est que le végétal va allouer préférentiellement ses réserves au renforcement de ses différents mécanismes de résistance plutôt qu'à sa croissance (Herth, 2011). C'est pourquoi une stratégie a été élaborée et mise en place afin de tester des modalités avec d'abord, une biotisation avec *B. amyloliquefaciens* et *P. fluorescens*, reconnus pour leurs actions de stimulation de croissance des plantes (PGPR), puis un apport plus tardif de *P. oligandrum*. Le but est de laisser le temps aux deux bactéries de s'installer et d'agir.

En ce qui concerne le **développement racinaire**, les résultats sont assez cohérents avec ceux attendus. La modalité 14 qui suit la logique précédente a le meilleur taux d'enracinement. Le thé de compost a également eu un bon effet sur la rhizogénèse des lavandes. Cet effet est probablement dû à l'apport de nutriments azotés et phosphorés et/ou à une synergie des bactéries et champignons contenus dans le produit tels que les *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* et *Rhizobium*. La revendication du fabricant concernant l'obtention d'un meilleur chevelu racinaire serait donc mise en évidence dans cet essai.

Pour mémoire, un essai mené par Arexhor Pays de la Loire en 2014 sur le pathosystème choisya/*Phytophthora* conforte ces résultats, avec un gain en hauteur des plants et un meilleur enracinement grâce à l'apport de thé de compost.

Pour ce qui est de la **croissance des parties aériennes**, les résultats sont contraires à ceux attendus. En effet, ce sont deux modalités avec *P. oligandrum* et celle avec Prestop® qui ont le meilleur gain de croissance comparé aux témoins, et les bactéries PGPR ne produisent aucun effet significatif. La biostimulation de *P. oligandrum* pourrait provenir de sa production de tryptamine, un précurseur de l'auxine qui joue un rôle dans le développement de la plante (Le Floch *et al.*, 2003). De façon générale, toutes les tailles des lavandes ayant été biotisées par des agents de biocontrôle sont supérieures à celles des témoins. Si les lavandes n'étaient pas mortes avant l'apparition des premières fleurs, il aurait été intéressant d'ajouter une notation sur la floribondité.

On peut tout de même noter que les facteurs abiotiques peuvent aussi avoir eu un rôle dans le développement des plants. La présence d'un gradient de température et de luminosité lié aux parois de la serre (**Figure 20**) a influencé le taux d'humectation des pots, qui séchaient plus rapidement en bordure de table. Le fait d'avoir quatre répétitions de chaque modalité permet de limiter ce biais. Deux sondes mesurant la température pourraient être placées à chaque extrémité de la parcelle d'essai, afin de vérifier si cet écart de chaleur est réellement significatif. De plus, le plan d'expérience pourrait prendre en compte ce gradient en plaçant les blocs de manière perpendiculaire à celui-ci. Un dernier point concerne l'arrosage à la canne, qui n'est pas le mode d'irrigation le plus homogène, mais qui a été retenu pour limiter la percolation des pots et donc la perte des micro-organismes.

De manière générale, le but visé par l'expérience est d'améliorer la vigueur globale de la plante et d'obtenir un système racinaire mieux développé, pour aboutir à des plantes plus résistantes contre les attaques des agents pathogènes.

- **Efficacité de protection des plantes :**

Les tests de confrontation *in vitro* de *P. nicotianae* avec les agents de biocontrôle ont montré des résultats intéressants et ont permis de voir la spécificité d'action antagoniste contre l'agent pathogène en question.

L'antibiose, qui avait déjà été observée chez *P. fluorescens* (Yang *et al.*, 1994) et sur *B. amyloliquefaciens* (Chen *et al.* 2009), a de nouveau été mise en évidence.

Par contre, *P. fluorescens* aurait plutôt un effet fongistatique, c'est à dire qu'il freine la progression du *Phytophthora* pendant environ 5 jours puis la croissance de ce dernier reprend. *B. amyloliquefaciens* et *B. pumilus* (GHA 180®) possèderaient un effet fongicide car la croissance n'a jamais reprise. Le thé de compost Fytaforce® est là encore un produit efficace avec une action d'antibiose forte exercée par les différents types de bactéries ayant poussé dans le milieu. Ce produit n'est pourtant homologué qu'en tant que matière fertilisante, une homologation future en tant que produit phytosanitaire pourrait être envisagée. Comme prévu, la souche de *Gliocladium catenulatum* du produit Prestop® a eu une action directe sur *P. nicotianae* par mycoparasitisme (Chatterton et Punja, 2009).

A l'avenir, les résultats du test de confrontation pourraient être affinés en prenant également en compte la mesure de la croissance globale de l'agent pathogène. En effet, l'indice d'inhibition a été calculé en comparant la croissance de *P. nicotianae* en direction de l'agent de biocontrôle à celle en direction de l'eau stérile. Pourtant si l'on compare les **Figures 25 et 26**, on s'aperçoit que les indices d'inhibition de croissance calculés ne sont pas forcément corrélés aux observations visuelles d'inhibition de croissance. Les résultats donnent en effet un indice d'inhibition plus élevé pour le thé de compost que pour *Bacillus*, alors que *P. nicotianae* a d'avantage poussé sur le milieu contenant le thé de compost. Cela peut s'expliquer par le fait que l'efficacité antagoniste prononcée des *Bacillus* sur *P. nicotianae* se fait par l'intermédiaire de métabolites sécrétés qui diffusent le long de la gélose, y compris du côté du témoin. La croissance de l'agent pathogène est donc stoppée de manière circulaire autour du point de repiquage pour les *Bacillus*, tandis que cette croissance n'est pas restreinte en direction des témoins pour le thé de compost.

Si l'on analyse maintenant les résultats obtenus dans le cadre des tests des agents de biocontrôle sous serre, les efficacités des antagonistes en termes de protection des plantes sont nettement inférieures. Les modalités avec des micro-organismes de biocontrôle se retrouvent quand même avec un nombre de plants infectés toujours plus bas que celui de la modalité 2 (témoin positif) lors de la première notation, excepté pour l'association de *B. amyloliquefaciens* avec *P. fluorescens*. Seule la référence fongicide classique a révélé sa très bonne efficacité de protection appliquée en lutte préventive, avec un nombre de plantes saines, comparable à celui du témoin non inoculé.

Ce manque de succès peut s'expliquer par une performance nettement diminuée des micro-organismes de biocontrôle quand les essais passent du laboratoire *in vitro* aux tests *in planta*. Les conditions environnementales jouent un rôle très important dans l'installation et l'action antagoniste des micro-organismes (Sahayaraj, 2014), c'est pourquoi même s'ils réussissent à survivre dans le milieu, ils ne seront pas forcément capables de lutter contre le *Phytophthora*.

De plus, l'efficacité de ces nouveaux produits est fortement liée au niveau de pression des bioagresseurs (Herth, 2011). Dans le cas de cet essai, les plantes étaient encore très jeunes au moment de l'inoculation de *P. nicotianae* et le taux de contamination à 1% du volume du pot a été sûrement surévalué. En effet, le suivi de la cinétique de l'apparition des symptômes de la maladie n'a pas pu réellement s'effectuer, compte tenu de la rapidité à laquelle les plants sont morts (un mois). La souche était peut-être plus virulente que les années précédentes. La maîtrise de la biotisation reste un facteur difficile et pourtant déterminant dans l'évaluation des nouveaux produits de biocontrôle. Si la pression de l'agent pathogène avait été moindre, comme en conditions naturelles de production, il aurait été possible de suivre avec plus de précision et sur du plus long terme l'évolution de la maladie et l'action antagoniste des agents de biocontrôle. Cette situation de contamination naturelle des plants a pu être observée en semaine 35 sur les témoins non inoculés qui ont subi un taux de mortalité de 77,5%.

- **Mise en relation du suivi de l'installation des micro-organismes avec les résultats des notations**

En résumé, la concentration de biotisation de *P. oligandrum* à 10^4 oospores/mL en un apport serait trop faible pour permettre une colonisation racinaire efficace et ainsi agir sur la biostimulation des plantes. Par contre un apport mensuel à 10^4 oospores/mL (M8) permettrait une bonne installation stable de l'agent antagoniste dans la rhizosphère et donc de favoriser la croissance en hauteur des lavandes et leur développement racinaire. En effet, il a déjà été montré que le fait d'augmenter la dose de produit contenant des micro-organismes pouvait avoir un effet inverse à celui escompté pour la croissance des plantes. Les agents modifieraient l'abondance relative des populations microbiennes de la rhizosphère, perturberaient les équilibres établis avant l'addition du produit et entraîneraient une faible diminution du développement de la plante (Qiao *et al.*, 2017). Ce phénomène est peut-être observé pour la modalité avec un apport mensuel de *P. oligandrum* à 10^6 oospores/mL, dont la quantité d'ADN retrouvée au niveau des racines est la plus élevée, mais qui n'a pas de différence significative de taille, de développement racinaire ou de protection contre *P. nicotianae* comparée au témoin. Le fait d'obtenir des résultats de phytostimulation alors que *P. oligandrum* n'est pas retrouvé en qPCR pourrait provenir d'un seuil d'activité biologique de l'organisme inférieur au seuil de détection du thermocycleur.

- **Vers une utilisation des produits chez les producteurs ?**

La finalité de toute expérimentation menée au sein de la station d'expérimentation est l'application des méthodes jugées les plus prometteuses directement chez leurs producteurs adhérents. Pour cela, un sondage a été réalisé durant les journées portes ouvertes de la station auprès de dix "lavandiculteurs". Les points qui en sont ressortis concernaient le mode d'irrigation, l'itinéraire cultural ainsi que le type de substrat utilisé.

Huit producteurs sur dix se sont tournés vers une irrigation par aspersion, à cause des nombreux problèmes de pourriture racinaires rencontrés qui se dispersent par les eaux de ruissellement. Ces pourritures constituent le principal problème sanitaire rencontré sur lavandes, d'où la confirmation de l'importance économique du sujet de l'essai.

L'apport des agents de biocontrôle pourrait s'envisager par fertirrigation, car le risque d'obstruer les tuyaux avec les produits est plus faible qu'avec une irrigation par goutte à goutte, qui impliquent des tuyaux plus fins. Par contre, la perte d'éléments fertilisants et de micro-organismes est supérieure en aspersion par rapport au goutte à goutte, qui se fait au plus près des racines et limite la percolation des pots. L'apport à l'aide d'un pulvérisateur devrait se faire de manière répétée dans la saison et serait donc plus contraignante car plus coûteuse en temps et en main d'œuvre.

La totalité des producteurs cultivent les lavandes avec une partie au moins du cycle en extérieur, où les conditions climatiques sont alors non maîtrisées. Les températures et hygrométries variables et la pluie faisant percoler sont autant de facteurs abiotiques pouvant contribuer au mauvais développement des micro-organismes biotisés et donc à leur manque d'efficacité.

Enfin, le substrat favorable à l'installation des micro-organismes utilisé lors de l'essai pourrait être adapté aux exigences culturales des différents producteurs.

Actuellement, les dix producteurs ont recours uniquement à des produits phytosanitaires conventionnels dans la lutte contre la pourriture racinaire, ainsi qu'à des méthodes prophylactiques. La conversion en biocontrôle requiert non seulement des produits plus stables dans leur efficacité, mais aussi de revoir de manière générale leur système de culture.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche de nouvelles méthodes de lutte innovantes et respectueuses de l'environnement dans la lutte contre la pourriture phytophthoréenne sur lavandes est un sujet encore assez récent. Il reste de l'approfondissement et des répétitions de l'essai afin de trouver une solution efficace, économiquement acceptable et adaptable chez les producteurs. Pour la quatrième année d'expérimentation sur lavandes, des micro-organismes de biocontrôle ont été testés à différentes concentrations et associations afin de vérifier leur potentielle efficacité sur la qualité commerciale des plants (croissance en hauteur et enracinement) et sur la protection contre *P. nicotianae*.

Pour cet essai, une tendance a pu être mise en évidence concernant la stimulation du système racinaire par le thé de compost Fytaforce® et l'association des bactéries PGPR *B. amyloliquefaciens* et *P. fluorescens* avec l'oomycète *P. oligandrum*. L'apport de *P. oligandrum* mensuellement à une concentration de 10^4 oospores/mL s'avèrerait le plus bénéfique pour la croissance des parties aériennes des lavandes. Aucun produit de biocontrôle n'a prouvé sa réelle efficacité dans la protection des plantes contre *P. nicotianae*, bien que ces résultats soient aussi liés aussi à un inoculum de départ sûrement trop agressif. De nos jours, les produits de biocontrôle à base d'organismes vivants sont utilisés majoritairement en préventif et en complément d'autres méthodes de lutte. A l'avenir, il serait intéressant de tester des agents antagonistes compatibles avec des fongicides chimiques conventionnels et/ou des produits de synthèse de type SDP ou biostimulants, afin de conserver le choix du produit par les producteurs selon la pression du bioagresseur.

Il existe encore certains inconvénients qui freinent les investissements de la part des producteurs et restreignent le marché des produits de biocontrôle à un marché de niche. La rémanence du produit est souvent faible (problèmes de lessivage, de résistance aux stress), ce qui oblige à répéter plusieurs fois les applications pendant la saison de culture. Les coûts restent plus élevés que pour la lutte chimique conventionnelle et enfin l'installation de l'agent antagoniste est dépendante des conditions climatiques et les résultats sont susceptibles de varier selon les années, les régions et les cultures. C'est ce que l'on a observé sur la station pour les trois années d'essais sur lavandes, où les taux d'installation de *P. oligandrum* calculés par des méthodes microbiologiques étaient élevés en 2014 et 2015, puis limitée en 2017. C'est pour cette raison que la lutte biologique est utilisée à 82% en horticulture, du fait de sa meilleure efficacité sous abri, où le producteur a un contrôle partiel de l'environnement physique.

De plus, les homologations sont encore récentes, ce qui limite le recul d'expérience sur ces produits. En effet, même la référence biofongicide Prestop® n'a pas l'effet de protection escompté alors qu'il est homologué contre *Phytophthora*. Les perspectives à court terme du marché du biocontrôle concernent donc le développement de nouveaux produits ou alors l'extension des zones géographiques d'homologation et des spectres d'action des produits déjà existants. L'objectif de l'essai d'affinement des biotisations de *P. oligandrum* serait ici d'envisager une future homologation de *P. oligandrum* en tant que produit phytosanitaire par l'entreprise Biovitis, notamment en horticulture ornementale. Actuellement, les entreprises fournissant des produits à base de micro-organismes considèrent que la réglementation des MFSC est moins contraignante. C'est pourquoi la grande majorité des substances à caractère mixte (biostimulants et SDP) sont mises sur le marché en tant que MFSC et revendiquent uniquement des effets de stimulation de croissance ou de résistance aux stress abiotiques.

Afin d'augmenter la reproductibilité et l'efficacité des résultats et par conséquent la confiance des agriculteurs, des recherches sont en cours et particulièrement au GIE FPSO pour affiner l'application des micro-organismes sur les organismes cibles et favoriser leur colonisation dans les tissus de la plante ou le substrat. Des recherches portent aussi sur la protection des micro-organismes contre les stress environnementaux, à travers la formulation du produit ou le substrat de culture. Néanmoins, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension de l'installation des micro-organismes dans le substrat pour s'assurer de leur présence. Une première communication des résultats de l'essai et une présentation du biocontrôle en général a déjà été réalisée auprès des producteurs et des différents acteurs de la filière lors des journées portes ouvertes de la station, le 28 juin 2017. Cette fonction d'interface entre le monde de la recherche et celui de la production ornementale de la station permet de valoriser et de transférer les connaissances pour appliquer concrètement un projet de lutte alternative aux méthodes de lutte chimique conventionnelle.

Bibliographie

- Álvarez L.A., Pérez-Sierra A., Armengol J., García-Jiménez J. (2007). Characterization of *Phytophthora nicotianae* isolates causing collar and root rot of lavender and rosemary in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 89 (2):261-264.
- ANSES. (2015). Conclusions de l'évaluation relatives à la demande d'autorisation de mise sur le marché de la matière fertilisante PREMIER TECH-GHA180 de la société PREMIER TECH BIOTECHNOLOGIES. Maisons-Alfort (FR). 13p. Dossier n° 2013-1752.
- Bardin M. (2015). Facteurs d'efficacité de la protection biologique contre les maladies des plantes. In : 11e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 7-9 décembre 2015.
- Barea J. M., Pozo M. J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56:1761-1778.
- Benhamou N., Rey P., Picard K., Tirilly Y. (1999). Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, 89(6):506-517.
- Benhamou N., le Floch G., Vallance J., Gerbore J., Grizard D., Rey P. (2012). *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology*, 158:2679-2694.
- Blancard D. (1998). Maladies du tabac : Observer, Identifier, Lutter. ed. Quae. Versailles, 376p.
- Blancard D. (2009). Les maladies de la tomate : Identifier, connaître, maîtriser. ed. Quae. Versailles, 680 p.
- Brozova J. (2002). Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, 38(1):29-35.
- Challet E. (2011). Evaluation de micro-organismes pour lutter contre les champignons pathogènes telluriques en pépinière hors-sol. Mémoire pour l'obtention du titre d'Ingénieur de l'ENITA de Bordeaux. 64p.
- Chaisse E., Foissac X., Verdin E., Nicolè F., Bouverat-Bernier J.P., Jagoueix-Eveillard S., Semetey O., Gaudin J., Fontaine M., Danet J.L., Moja S., Conord C., Jullien F., Legendre L., Gallois P. (2012). Amélioration des stratégies de lutte contre le dépérissement de la lavande et du lavandin. *Innovations Agronomiques*, 25:179-192.
- Chatterton S. et Punja Z.K. (2009). Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. catenulate against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 356-367.
- Chiffot V. (2008). Étude moléculaire des champignons mycorhiziens arbusculaires dans un système agrisylvicole. Maîtrise en agroforesterie, Université de Laval, 101p.
- Coïc M. et Garbaye J. (2009). Evaluer le statut mycorhizien des arbres en ville : méthodes pour évaluer le statut mycorhizien. Fiche de Plante & Cité.
- Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. *Quae*, 384p.
- Decoin M (2013) Produits phytos, c'est les bios les nouveaux. *Phytoma-La santé des végétaux* 661:28-32.
- Deogratias J.M. (2016). Evaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle à base de micro-organismes pour lutter contre la fusariose du Cyclamen et du Phytophthora de la Lavande Approches biologiques et moléculaires. Compte rendu : FP-16-MF-02-02. 29 p.
- Droui A., Astredhor Sud-Ouest. Fiche Technique Maladies : Le *Phytophthora* en pépinière, Janvier 2017, 6p.

Dubourg C. (2014). Développement de méthodes de protection de la lavande contre *Phytophthora* par l'utilisation de micro-organismes. Rapport de stage pour la Licence à l'Université d'Angers. 36p.

Faessel L., Gomy C., Tostivint C., Dechanteloup A., Nassr N., Hipper C. Etude réalisée par BIO by Deloitte et RITMO Agroenvironnement et commanditée par le Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF). (2014) Rapport final : Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes –Étude des connaissances disponibles et recommandations stratégiques. 155p.

France Agrimer. (2013) Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales. Production et marchés des huiles essentielles de lavandes et lavandins. *Les synthèses de France Agrimer*, n°1, 13pp.

Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7):711-24.

Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C., Rey P. (2014). Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:4847-4860.

Godfrey S.A.C., Monds R.D., Lash D.T., Marshall J.W. (2003). Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycology Research*, 107:790-796.

Haas D. and Kee C. (2003). Regulation Of Antibiotic Production In Root-Colonizing *Pseudomonas Spp.* And Relevance For Biological Control Of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41:117-53

Haggag W. M. et Mohamed H. A. (2007). Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 1(1):7-12

Héroult, B (2015). Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes : état des lieux et perspectives. In : Centre d'études et de prospective, Analyse N° 79, Avril 2015.

Herth A. (2011) Le bio-contrôle pour la protection des cultures : 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes. Rapport au Premier ministre François Fillon Mission parlementaire auprès de Bruno Le Maire, ministre de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire, confiée à Antoine Herth, député du Bas-Rhin. 156p.

Hwang J. et Benson D. M. (2005). Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease*, 89:185-190.

Irwin J.A., Cahill D. et Drenth A. (1995). *Phytophthora* in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 36:1311-1337.

Lacroix M. (2001). Les *Peronospora*, *Pythium* et *Phytophthora* sont-ils des champignons ? *Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec*. 6p.

Le Floch G., Rey P., Déniel F., Benhamou N., Picard K., Tirilly Y. (2003). Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agronomie* 23(5- 6):455-460.

Lioussanne L., Jolicoeur M., St-Arnaud M. (2009). Role of the modification in root exudation induced by arbuscular mycorrhizal colonization on the intraradical growth of *Phytophthora nicotianae* in tomato. *Mycorrhiza*, 19:443-448.

Matheron M. E. et Porchas M. (2000). Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 84:454-458.

- Mazzola M., Fujimoto D.K, Thomashow L. S., Cook R.J. (1995). Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas spp.* and Effect on Biological Control of Take-All of Wheat. *Applied And Environmental Microbiology*, 61(7):2554–2559.
- Mehta C.M., Palni U., Franke-Whittle I.H., Sharma A.K. (2014). Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*, 34:607–622.
- Mei X.L., Zhao Q.Y., Tan S.Y., Xu Y.C., Shen B., Shen Q.R. (2010). Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 21(10):2652-2658.
- Müller U. et Gisi U. (2007). Newest aspects of nucleic acid synthesis inhibitors – metalaxyl-M. In: Modern Crop Protection Compounds. Krämer W., Schirmer U., ed. Weinheim (Allemagne). pp.739-746.
- Nielsen P. et Sorensen J. (1997). Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *Microbiology Ecology*, 22(3):183–192.
- Oerke E.C. et Dehne H.W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23:275–285.
- Ongena M. et Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16:115-125.
- Pal K. et McSpadden Gardener B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Pane C., Celano G. et Zaccardelli M. (2014). Metabolic patterns of bacterial communities in aerobic compost teas associated with potential biocontrol of soilborne plant diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2):277–286.
- Picard K., Tirilly Y., Benhamou N. (2000a). Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied Environment Microbiology*, 66(10):4305–4314.
- Picard K., Ponchet M., Blein J.-P., Rey P., Tirilly Y., Benhamou N. (2000b). Oligandrin. A Proteinaceous Molecule Produced by the Mycoparasite *Pythium oligandrum* Induces Resistance to *Phytophthora parasitica* Infection in Tomato Plants. *Plant Physiology*, 124(1):379-395.
- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M., Azcón-Aguilar C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(368):525-534.
- Putnam M. (1991). Root rot of lavender caused by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Pathology*, 40:480-482.
- Qiao J., Yu X., Liang X., Liu Y., Borriss R. et Liu Y. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology*, 17:131.
- Raaijmakers J.M., Van Der Sluis I., Koster M., Bakker P.A.H.M., Weisbeek P.J., Schippers B. (1995). Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas spp.* *Canadian Journal of Microbiology*, 41:126-135.
- Richardson A.E, Barea J.M., McNeill A.M. et Prigent-Combaret C. (2009). Acquisition of Phosphorus and Nitrogen in the rhizosphere and plant. *Plant and Soil*, 321:305–339.
- Sang M.K., Kim J.G. et Kim K.D. (2010). Biocontrol activity and induction of systemic resistance in pepper by compost water extracts against *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 100:774–783.
- Sahayaraj K. eds. (2014). Basic and Applied Aspects of Biopesticides. Springer, Inde, 401p.

Saville A., Graham K., Grünwald N. J., Myers K., Fry W. E., Ristaino J. B. (2015). Fungicide sensitivity of U.S. genotypes of *Phytophthora infestans* to six Oomycetes-targeted compounds. *Plant Disease*, 99:659-666.

Schouten A., van den Berg G., Edel-Hermann V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., de Vos C.H., Lemanceau P., Raaijmakers J.M. (2004). Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 17(11):1201-1211.

Station d'expérimentation horticole RATHO. Fiche de Culture : Lavande. Octobre 2008, 6p.

Takenaka S, Nishio Z, Nakamura Y. (2003). Induction of Defense Reactions in Sugar Beet and Wheat by Treatment with Cell Wall Protein Fractions from the Mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 93(10):1228-1232.

Tian X. et Zheng Y. (2013). Compost teas and reused nutrients solution suppress plant pathogens in vitro. *HortScience*, 48(4):510-512.

Tambong J.T., De Cock A., Tinker N.A., Lévesque C.A. (2006) An oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2691-2706.

Triolet M. (2014). Evaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle à base de micro-organismes pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*. Approches biologiques et moléculaires. Mémoire pour le Master 2 de l'Université d'Angers. 31 p.

Wang H.C., Li W.H., Chen Q.Y., Huang Y.F., Li K., Xia H.Q., Wang M.S., Cai L.T., Shang S.H., Shi J.X. (2012). A rapid microbioassay for discovery of antagonistic bacteria for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 102:267-271.

Yacoub A., Gerbore J., Magnin N., Dufour M.-C., Corio-Costet M.-F., Guyoneaud R., Rey P. (2015). *Pythium oligandrum* testé contre l'esca de la vigne. *Phytoma*, 682:32-35.

Yan Z., Reddy M.S., Ryu C.-M., McInroy J.A., Wilson M., et Kloepper J.W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 92:1329-1333.

Yang C.-H., Menge J.A., Cooksey D.A. (1994). Mutations Affecting Hyphal Colonization and Pyoverdine Production in Pseudomonads Antagonistic toward *Phytophthora parasitica*. *Applied And Environmental Microbiology*, 60(2):473-481.

Zheng H-Z., Cui C-L., Zhang Y-T., Wang D., Jing Y., Kim K.Y. (2005). Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University*, 6B(8):778-786.

Sitographie

Alim'agri. (2013). Protection des cultures et maîtrise des produits phytosanitaires. <http://agriculture.gouv.fr/protection-des-cultures-et-maitrise-des-produits-phytosanitaires> (consulté le 23 avril 2017).

Astredhor (2017). Stations d'expérimentations. <http://www.astredhor.fr/stations-d-experimentation-420.html> (consulté le 15 avril 2017)

CRIEPPAM. (2015). Itinéraire technique. <http://www.crieppam.fr/publications/item/41-lavande-itineraire-technique>. (consulté le 20 avril 2017).

IBMA (2014). Vaury C. Perspectives du Biocontrôle en France. http://www.ibmafrance.com/uploads/1/9/8/2/19823647/panorama_acteurs_biocontrole_france.pdf (consulté le 15 avril 2017).

RMT Elicitra (2017). http://elicitra.org/index.php?rub=definition_des_sdp (consulté le 23 avril).

ANNEXES

Annexe I : Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle comprenant des micro-organismes.

(En rouge, les produits utilisant les même micro-organismes que ceux testés dans l'essai)

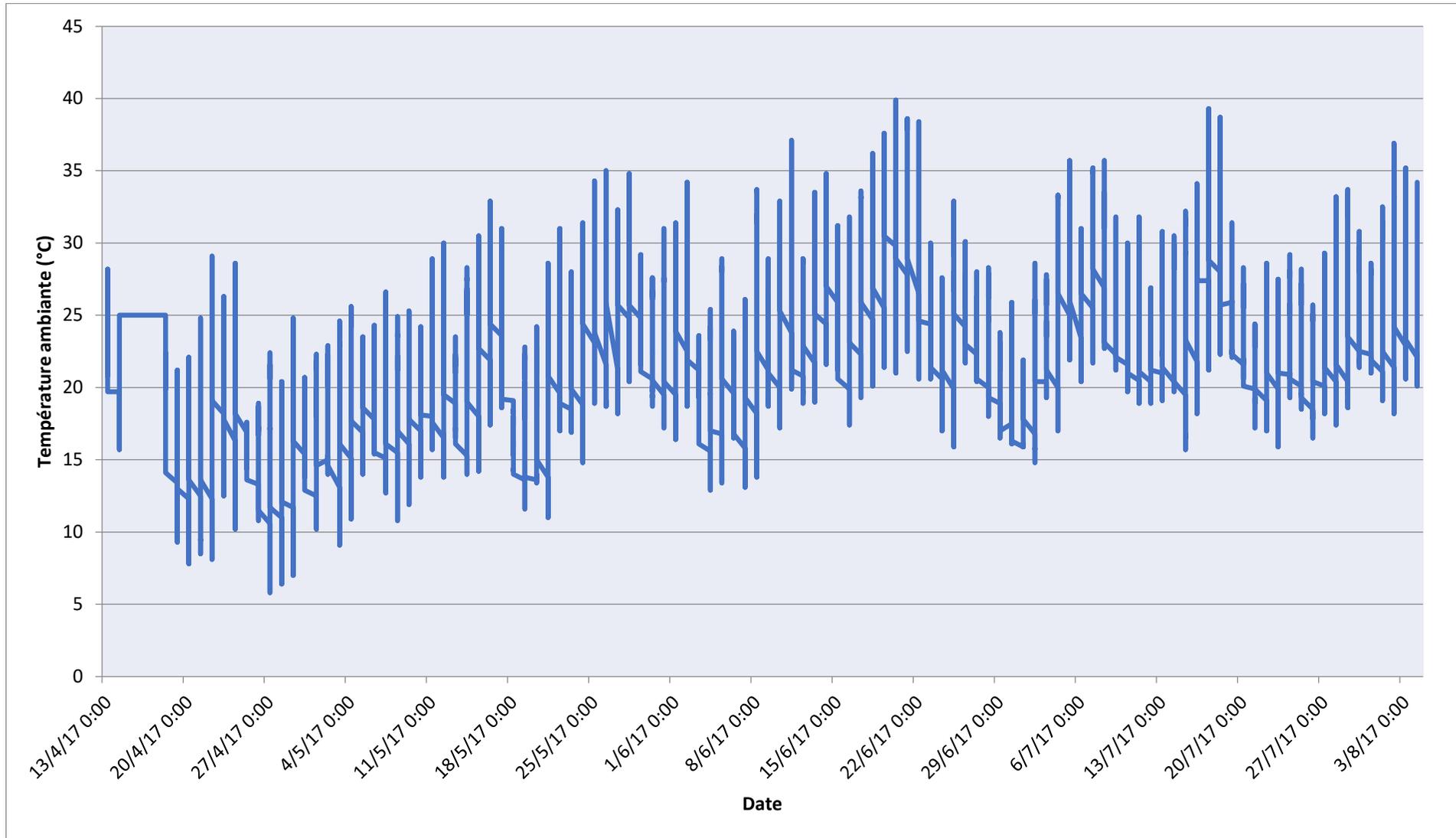
Substance active	Nom commercial	N°AMM
<i>Adoxophyes orana</i> GV strain BV-0001	CAPEX	2140187
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	AQ 10	2100207
<i>Aureobasidium pullulans</i> (strains DSM 14940 and DSM 14941)	BLOSSOM PROTECT	2110079
<i>Aureobasidium pullulans</i> (strains DSM 14940 and DSM 14941)	BOTECTOR	2120082
<i>Aureobasidium pullulans</i> (strains DSM 14940 and DSM 14941)	CINERKIL	2140036
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>Plantarum</i> strain D747	AMYLO-X WG	2160841
<i>BACILLUS FIRMUS</i> I-1582	FLOCTER	2120069
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	BALLAD	2140160
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	SERENADE JARDINS	2110040
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	SERENADE MAX	2100162
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	SERENADE BIOFUNGICIDE	2050001
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	XENTARI	2020241
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	AGREE 50 WG	2170436
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i>	DELFIN	9200482
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i>	DELBACILETI	2160943
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	WASCO WG	9200482
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	DELFIN JARDIN	2030175
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	WASCO JARDIN	2030175
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	DIPEL DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACIVERS DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACTOSPEINE DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACTURA DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	SCUTELLO DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BIOBIT DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	INSECTOBIOL DF	2010513
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	DIPEL DF JARDIN	2150417
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACIVERS DF JARDIN	2150417
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACTOSPEINE DF JARDIN	2150417
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BACTURA DF JARDIN	2150417
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	SCUTELLO DF JARDIN	2150417
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	FORAY 48 B	8900137
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	LEPINOX PLUS	2160494
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i>	NOVODOR FC	9800280
<i>Beauveria bassiana</i> strain 147	OSTRINIL	9300093
<i>Candida oleophila</i> souche O	NEXY	2080108
<i>Coniothyrium minitans</i>	CONTANS WG	9900189
<i>Coniothyrium minitans</i>	FELIZ	2140217
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	CARPOVIRUSINE 2000	9800076
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	CARPOVIRUSINE 2000 J	2160620
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	CARPOVIRUSINE EVO 2	2120081
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	CARPOVIRUSINE GARDEN	2150851
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	MADEX PRO	2130175
<i>Cydia pomonella granulosis virus</i>	MADEX TWIN	2140238
<i>Gliocladium catenulatum</i> souche J1446	PRESTOP	2120177
<i>Gliocladium catenulatum</i> souche J1446	PRESTOP 4B	2150847
<i>Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus</i>	HELICOVEX	2140094
<i>Isaria fumosorosea</i> Apopka strain 97	PREFERAL	2010206
<i>Lecanicillium muscarium</i> strain Ve6	MYCOTAL	2040354
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BIPESCO 5/F52	MET52 GRANULÉ	2110055
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> BIPESCO 5/F52	MITAXION G	2110055
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	TRITSTOP	2120176
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	CERALL	2080056
<i>Pythium oligandrum</i>	POLYVERSUM	2150328
<i>Streptomyces</i> K61 (formerly <i>S. griseoviridis</i>)	MYCOSTOP	2140208
<i>Trichoderma asperellum</i> strains ICC012 T25 and TV1	XEDAVIR	2130089
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	T34 Biocontrol	2160492
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	ASPERELLO T34 Biocontrol	2160492
<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	ESQUIVE WP	2080004

<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	TRI-SOIL	2160686
<i>Trichoderma atroviride</i> SC1	VINTEC	2169998
<i>Trichoderma atroviride</i> T11 et <i>Trichoderma asperellum</i> T25	TUSAL	2150839
<i>Trichoderma gamsii</i> ICC080	TELLUS	2150155
<i>Trichoderma gamsii</i> ICC081	CASSAT WP	2150155
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai strains T-22 and ITEM-908	TRIANUM-G	2090168
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai strains T-22 and ITEM-908	TRIAGRO GR	2090168
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai strains T-22 and ITEM-908	TRIANUM-P	2090169
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai strains T-22 and ITEM-908	TRIAGRO WG	2090169
Virus de la mosaïque du pépino, souche CH2, isolat 1906	PMV-01	2159995
Virus de la mosaïque jaune de la courgette souche bénigne	AGROGUARD-Z	2060125
Virus de la polyhedrose nucléaire	LITTOVIR	2160706

Annexe II : Résultats d'analyses du thé de compost Fytaforce®

	Revendication de Soiltech (étiquette du produit)	Analyse indépendante (laboratoire MycAgro 2016)
EC	2,5 - 5,0 mS/cm	2,96
pH	5,5 - 7,5	6,05
Phosphate (P ₂ O ₅)	1400 mg/L	450 mg/L
Azote (N)	300 mg/L	240 mg/L (dont NH ₄ : 33 mg/L)
Micro-organismes totaux	7,5x10⁸ CFU/mL	
Bactéries totales	6,8x10⁸ CFU/mL	6,3x10⁷ CFU/mL
dont : <i>Bacillus spp,</i>	1,3x10 ⁶ CFU/mL	3,7x10 ⁵ CFU/mL
<i>Pseudomonas fluorescents</i>	2,0x10 ⁷ CFU/mL	1,2x10 ⁷ CFU/mL
<i>Fixatrices d'azote(Rhizobium...)</i>	1,4x10 ⁸ CFU/mL	
<i>Bactéries acides lactiques</i>	8,3x10 ⁵ CFU/mL	
Champignons totaux	6,6x10⁷ CFU/mL	1,2x10⁷ CFU/mL
dont : <i>Trichoderma spp,</i>	4,3x10 ⁷ CFU/mL	1,6x10 ⁵ CFU/mL
Solubilisateurs de phosphate	1,0x10 ⁵ CFU/mL	
Protozoaires	2,6x10 ⁶ CFU/mL	

Annexe III : Températures ambiantes du compartiment C4 de la serre pour la saison de culture des lavandes.



Annexe IV : Protocole d'extraction d'ADN de racines à l'aide du kit Invitex Invisorb® Spin Plant Mini (modifié)

	Mode opératoire	Réf : MO-BMO-MET-06 Version 02 date : 24 avril 2017 page 1/3 ..
	<u>Protocole Extraction ADN Kit INVITEK Invisorb Spin Plant Mini Kit (racines)</u>	

Echantillon de 100 mg environ à peser dans Eppendorf 2mL. (max 120 à 180 mg si matière fraîche).

Ajouter 404 µl de tampon de lyse (*cf annexe*).

Vortexer 5 sec.

Ajouter 20 µL de protéinase S (Protéinase S).

Vortexer 2 fois 5 sec.

Transférer sur un préfiltre (Prefilter Vert) avec tube 2 mL.

Centrifuger 1 min à 12000 rpm à 4°C.

Éliminer le préfiltre.

Ajouter 4 µL de RNase A (100mg/mL).

Vortexer brièvement et incubé 5 min à T° ambiante.

Ajouter 200 µL de tampon de fixation A (Binding Buffer A).

Vortexer 10 sec.

Transférer la solution sur un filtre (Spin filter blanc) et un tube 2 mL.

Centrifuger 2 min à 12000 rpm à 4°C.

Éliminer le filtrat et remplacer le filtre sur le tube 2 mL.

Ajouter 550 µL de tampon lavage I (Wash Buffer I).

Centrifuger 2 min à 12000 rpm à 4°C.

Éliminer le filtrat et placer le Spin filter sur le tube de 2 mL.

Ajouter 550 µL de tampon lavage II (Wash Buffer II).

Centrifuger 1 min à 12 000 rpm à 4°C.

Éliminer le filtrat et placer le Spin filter sur le tube de 2 mL.

Ajouter 550 µL de tampon lavage II (Wash Buffer II).

Centrifuger 1 min à 12 000 rpm à 4°C.

Éliminer le filtrat et centrifuger 4 min à 12000 rpm à 4°C pour éliminer l'éthanol résiduel.

Placer le Spin filter dans un tube de 1,5 mL (Receiver tubes Blanc : indiquer date et vrai code échantillon), laisser les tubes ouverts sous la sorbonne pendant 1h environ.

Ajouter 50 µL d'eau stérile RNase free conservée au réfrigérateur (flacon marron ou vert).

Incuber pendant 5 min à température ambiante.

Centrifuger 1 min à 10 000 rpm à 4°C.

Éliminer le filtre. Conserver les tubes dans la glace pour dosage ADN.

5 – ANNEXE

Préparation du tampon de lyse pour 20 échantillons dans un tube Falcon 15 mL :

- PVP 40 = 0,29 mg

- Tampon de lyse P (Lysis Buffer P) = 9,6 mL
- β -mercaptoéthanol (sous la sorbonne) = 96 μ l.

Changer de gants.

Ou préparation du tampon de lyse / échantillon:

12 μ g (3% (p/v)) de PVP 40

400 μ L Tampon de Lyse P (Lysis Buffer P)

4 μ l (1%) de β -mercaptoéthanol sous la sorbonne.

  	<u>Diplôme / Mention</u> : Biologie et Technologie du végétal (BTV) <u>Spécialité</u> : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) <u>Parcours</u> : Productions Végétales Spécialisées (PVS) <u>Option</u> : IA-Produits phytosanitaires, réglementation, méthodes alternatives
<u>Auteur</u> : Noémie DUBERNARD <u>Date de naissance</u> : 06/09/1994	<u>Organisme d'accueil</u> : GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest
<u>Nb pages</u> : 32 <u>Annexes</u> : 4	<u>Adresse</u> : 71 avenue Edouard Bourleaux 33140 Villenave d'Ornon
<u>Année de soutenance</u> : 2017	<u>Maître de stage</u> : M. Jean-Marc Deogratias
<u>Titre français</u> : Evaluation de l'efficacité de produits de biocontrôle à base de micro-organismes dans la lutte contre <i>Phytophthora nicotianae</i> <u>Titre anglais</u> : Effectiveness assessment of the micro-organism-based biocontrol products to fight against <i>Phytophthora nicotianae</i> .	
<u>Résumé</u> : En horticulture ornementale, le biocontrôle apparaît comme une solution alternative aux produits phytosanitaires conventionnels. L'utilisation de micro-organismes antagonistes pour lutter contre les agents phytopathogènes telluriques est actuellement à l'étude. C'est dans ce contexte qu'un essai a été mis en place sur la pourriture phytophthoréenne de la lavande, maladie tellurique touchant une grande majorité des producteurs du bassin du Sud-Ouest de la France. L'objectif de l'essai est de tester l'efficacité de différents produits en termes d'amélioration de la vigueur des plantes et de protection contre cette maladie. Le suivi de l'installation de <i>P. oligandrum</i> dans le substrat par des approches microbiologiques et moléculaires (qPCR) a permis de mettre en évidence une variabilité de colonisation racinaire selon le nombre de biotisations et la concentration en oospores apportées. Le thé de compost Fytaforce®, la biotisation de <i>P. oligandrum</i> mensuellement à 10 ⁴ oospores/mL, ainsi que la combinaison de <i>P. oligandrum</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> et <i>P. fluorescens</i> ont montré les meilleurs résultats pour la stimulation de croissance de la plante. Aucun produit n'a réellement eu d'effet de protection des plantes, comparé à la référence fongicide classique. Les tests de confrontation réalisés <i>in vitro</i> ont pourtant prouvé des efficacités antagonistes de la plupart des micro-organismes contre <i>P. nicotianae</i> . Le passage du laboratoire au champ reste encore une étape cruciale dans le développement des futurs produits de biocontrôle.	
<u>Abstract</u> : In the field of ornamental horticulture, biocontrol products appeared to be a promising alternative solution to conventional pesticides. Using antagonistic micro-organisms to fight against soil phytopathogenes is currently studied. A trial was carried on about the lavender root rot caused by <i>Phytophthora nicotianae</i> , one of the most commonly found telluric disease in the south-west of France. The goal of the experiment was to assess the effectiveness of different products concerning a potential plant vigour improvement and plant protection against this disease. The monitoring of the <i>P. oligandrum</i> settlement in the substrate was initiated by microbiologic and molecular approaches (qPCR). It showed that this oomycete has a strongly-variable root colonization according to the input numbers along the cropping season and the oospore concentration. The best results for plant growth stimulation was obtained with the compost tea, <i>P. oligandrum</i> with 10 ⁴ oospores per mL monthly provided to the substrate and the combination of <i>P. oligandrum</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> et <i>P. fluorescens</i> . Compared to the conventional fungicide control, no product had an significant protection effect against <i>P. nicotianae in planta</i> , even though <i>in vitro</i> tests highlighted a real antagonistic action. These data proved that it still remains a step between interesting results from the laboratory and fluctuating ones from the field.	
<u>Mots clés</u> : Lavande, <i>Phytophthora nicotianae</i> , Biocontrôle, <i>Pythium oligandrum</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , thé de compost, qPCR, agents pathogènes telluriques <u>Key words</u> : Lavender, <i>Phytophthora nicotianae</i> , Biocontrol, <i>Pythium oligandrum</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , compost tea, qPCR, soil pathogenic agents.	