

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SNV



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : biologie moléculaire des procaryotes

Thème : Activité anti-phytopathogène de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas spp* fluorescents.

Présenté par :

Maalem Ahlem.

Sansri Dalal.

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mr Mokhtari A.

MAA,

Université de Guelma.

Examineur : Mr Mahdjoubi E.

MAA,

Université de Guelma.

Encadreur : Mlle Khenaka K.

MAB,

Université de Guelma.

Juin 2014

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Dieu qui nous a donné le courage et le savoir afin d'achever ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Guelma.

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Mlle **K. Khenaka** (Maître assistant à l'Université 8 MAI 1945 de Guelma) pour accepter de diriger ce travail, pour son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral.*

*Toute notre gratitude va à Mme **A. Mokhtari** (maitre assistant à l'Université de 8 MAI 1945 de Guelma) et à qui a accepté de présider ce jury.*

*Nous remercions également monsieur **E. Mahdjoubi** (maitre assistant à l'Université de 8 MAI 1945 de Guelma) pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Enfin, nous tenons à remercier tous nos enseignants qui ont assuré notre formation et tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université de 8 MAI 1945 de GUELMA.



Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes parents qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage pour terminer mes études.

*Merci beaucoup **papa** et **maman** je vous aime beaucoup.*

A mes frères Souhil, Salah, surtout mon chère frère Chouaib et mes sœurs Samia, Nadia et surtout ma chère sœur Ola. Qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.

A mes chères cousines :

Hala, Hinda, Amira, Chaima, Sana, Samah et surtout Souad.

et surtout les adorables petites : Sirine, Nour, Maram,

Rayan, Meryem, Khali, Ishak et Ayhem.

A ma grande famille, grande et petite.

À mon très cher fiancé Hicham pour son aide et ses encouragements et ainsi qu'à toute ma belle famille.

A tous mes amis:

Salma, Amina, Sabah, Sara, Ibtissem, Meryem et Meryem h.

DALAL



Dédicaces

Je Dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites

***Mes frères et ma sœur, en reconnaissance de leur affection toujours
constante***

Tous mes proches

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

Mes amis

Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire

AHLEM

Liste des abréviations

PDA: Potato Dextrose Agar.

PGPF: Plant Growth-Promoting Fungi.

PGPY: Plant Growth-Promoting Yeasts.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

YMEA: Yeast Malt Extract Agar.

Liste des figures

Figure 01. Cycle épidémique de la verticilliose.....	07
Figure 02. Association mycorhizienne.....	14
Figure 03. Cycle de vie des <i>Streptomyces</i>	22
Figure 04. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide.....	23
Figure 05. Les étapes d'obtention des extraits des souches d'actinomycètes.....	28
Figure 6. Les étapes de la chromatographie sur couche mince.....	30
Figure 7. Grattage des taches séparées sur la plaque CCM et test contre <i>Verticillium dahliae</i>	31
Figure 8. Les étapes de la Coloration de Gram.....	32
Figure 09. Effet antagoniste d'actinomycète contre <i>Verticillium dahliae</i>	35
Figure10 . Effet antagoniste de quelques souches de <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents contre <i>Verticillium dahliae</i>	36
Figure11. Plaque de chromatographie sur couche mince avec révélation par une Lampe à UV.....	40
Figure 12. Aspect microscopique de la souche T13 après coloration de Gram (x100).....	42



Liste des tableaux

Tableau 1. Classification du champignon <i>Verticillium dahliae</i>	05
Tableau 2. Mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène des souches Rhizosphériques d'actinomycètes.....	33
Tableau 3. Mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène des souches Rhizosphériques de <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents.....	36
Tableau 4. Pourcentages d'inhibition des extraits de la souche MR5 par les deux solvants diclorométhane et chloroforme.....	37
Tableau 5. La chromatographie en couche mince des extraits.....	39
Tableau 6. Les pourcentages d'inhibition de <i>Verticillium dahliae</i> par Bio-autographie	41

Table des matières

Introduction	1
Revue bibliographique	
Chapitre 01 : les champignons phytopathogènes	
1. Définition de la phytopathologie.....	2
2. les grands groupes des champignons phytopathogènes.....	2
2.1. Les champignons à plasmode (<i>Plasmodiophoromycota</i>).....	2
2.2. Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques.....	2
2.2.1. Oomycota.....	2
2.2.2. Chytridiomycota	3
2.2.3. Zygomycota.....	3
2.3. Les Ascomycètes et les Deuteromycètes.....	3
2.3.1. Les Ascomycètes.....	3
2.3.2. Les Deutéromycètes.....	3
2.4. Les Basidiomycètes.....	3
3. Les maladies phytopathogènes	4
3.1. Les maladies non parasitaires.....	4
3.2. Les maladies parasitaires.....	4
4. La verticilliose.....	4
4.1. Généralités.....	4
4.2. Le champignon <i>verticillium dahliae</i>	4
4.3. Hôtes et cycle épidémique de la maladie verticilliose.....	6
Chapitre 02 : la rhizosphère	
1. Généralités.....	8
2. Rôle de rhizosphère.....	8
3. La rhizodéposition.....	9

4. Les exsudats racinaires.....	9
5. Les micro-organismes de la rhizosphère	10
5.1. Les champignons.....	10
5.2. Les rhizobactéries.....	11
6. Les facteurs conditionnant la flore rhizosphérique.	11
7. Les différents types d'interaction dans la rhizosphère	12
7.1. Les interactions entre les micro-organismes de la rhizosphère.....	12
7.1.1. Le commensalisme.....	12
7.1.2. Le mutualisme.....	12
7.1.3. L'antagonisme.....	12
7.1.4. La compétition.....	12
7.1.5. L'hyperparasitisme	13
7.2. Les interaction entre les microorganismes et les plantes.....	13
7.2.1. Interactions non symbiotiques.....	13
7.2.2. Interactions symbiotiques.....	13

Chapitre 03 : Les bactéries promotrices de croissance des plantes et lutte biologique

1. La lutte biologique.....	16
2. Généralités sur les bactéries promotrices de croissance des plantes.....	16
3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance appartenant au groupe <i>Pseudomonas spp</i> Fluorescents.....	16
3.1. Caractéristiques générales du groupe <i>Pseudomonas spp</i> . Fluorescents.....	16
3.2. Interactions de <i>Pseudomonas spp</i> . Fluorescents dans la rhizosphère.....	17
4. Les actinomycètes filamenteuses promotrices de la croissance des plantes.....	18
4.1. Propriétés générales des actinomycètes.....	18
4.1.1. Définition.....	18
4.1.2. Morphologiques des actinomycètes.....	18
4.1.3. Physiologie et écologie.....	19
4.1.4. Génétique et structure de l'ADN.....	20
4.2. Le développement des actinomycètes.....	20
4.2.1. Le cycle de développement des actinomycètes.....	20
4.2.2. Biologie du développement.....	20

4.2.2.1. Formation des spores.....	21
4.2.2.2. La germination des spores.....	22
4.2.2.3. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien.....	22
4.3. Les actinomycètes rhizosphériques.....	24
4.3.1 Activité antimicrobienne des actinomycètes.....	24
4.3.2 Les actinomycètes colonisant la rhizosphère.....	24
4.3.3. Activité des actinomycètes contre les champignons phytopathogènes.....	24

Matériel et méthodes

1. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches rhizosphériques.....	26
1.1 Cas des actinomycètes filamenteux	26
1.2. Cas des <i>Pseudomonas spp</i> fluorescentes.....	26
2. Etude de l'activité antifongique d'extraits de souches rhizosphériques.....	27
2.1 Préparation des extraits.....	27
2.2 Réalisation du test d'inhibition.....	28
3. Etude de l'activité inhibitrice des molécules purifiées par une chromatographie en couche mince.....	29
3.1 Purification des molécules par chromatographie en couche mince.....	29
• Principe	29
• Mode opératoire.....	29
• Révélation et lecture.....	30
3.2. Test d'inhibition pour les taches obtenues par CCM (bio-autographie directe).....	30
4. Etude morphologique des souches d'actinomycètes.....	31
5. Analyses statistiques	32

Résultats et discussion

1. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches rhizosphériques.....	33
1.1 Cas des actinomycètes filamenteux	33
1.2. Cas des <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents	35

2. Activité antifongique des extraits d'actinomycètes.....	37
3. L'activité inhibitrice des molécules purifiées par une chromatographie en couche mince	38
3.1. Molécules séparées par la chromatographie sur couche mince	38
3.2. Activité inhibitrice des taches obtenues (bio-autographie).....	41
4. Etude morphologique des souches d'actinomycètes	41
Conclusion	42
Références bibliographiques	43

Annexes

Résumé

INTRODUCTION

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les microorganismes trouvent en effet dans ce milieu des exsudats libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme, certains de ces microorganismes, principalement les bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influençant de manière bénéfique la croissance des plantes par stimulation de leur croissance par la production des phytohormones et/ou par leur protection contre des agents phytopathogènes. Ces bactéries sont regroupées principalement sous le terme de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) [1].

Depuis plusieurs années des recherches très intenses sont réalisées sur le rôle de ces bactéries à protéger les cultures contre différents agresseurs phytopathogènes, l'intérêt des recherches effectuées dans le domaine de la lutte biologique par l'utilisation des PGPR a comme but principal le remplacement des différentes substances chimiques utilisées dans le domaine de l'agriculture comme les pesticides, en réalité, l'utilisation de ces substances, à côté de leur effet suppresseur du phytopathogène, possèdent des effets néfastes sur les cultures et principalement sur la flore microbienne du sol, de plus, l'utilisation répétée de ces substances a conduit à l'apparition d'une résistance chez les phytopathogènes [2].

Le présent travail est basé sur l'étude de la lutte biologique par des souches de PGPR contre un agresseur très puissant qui attaque principalement les racines de l'olivier, il s'agit de *verticillium dahliae* qui est responsable de la verticilliose. Les bactéries utilisées dans ce travail appartenant à deux groupes très intéressants dans ce domaine, les actinomycètes filamenteux et les *Pseudomonas spp* fluorescents. L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité inhibitrice de ces souches, *in vitro*, ainsi, de réaliser une extraction et une séparation des molécules bioactives contre ce bio-agresseur.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 :

***LES CHAMPIGNONS
PHYTOPATHOGÈNES***

1. Définition de la phytopathologie

La phytopathologie se définit comme étant l'étude des microorganismes et des facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, ainsi que l'étude des mécanismes par lesquels ces différents éléments agissent. Cette science s'intéresse en plus, aux méthodes de prévention et de contrôle des maladies. En général, les maladies causées par les insectes et les animaux supérieurs ne font pas partie de la phytopathologie [3].

2. Les grands groupes des champignons phytopathogènes

2.1. Les champignons à plasmode (*Plasmodiophoromycota*)

Ce sont des organismes dépourvus de paroi dans la majeure partie de leur cycle de développement. Leur thalle est constitué d'un plasmode. Ils sont des parasites d'organes souterrains chez lesquelles, ils provoquent souvent une hypertrophie ou une hyperplasie des tissus infectés. Trois genres présentent des effets pathogènes directs sur la plante : *Plasmodiophora sp*, *Polymyxa sp* et *Spongospora sp*.

2.2. Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques

Ces espèces sont regroupées au sein de 3 phylums :

2.2.1. *Oomycota*

Ce sont caractérisés par un thalle constitué d'une masse de filaments, ramifiés non cloisonnés. Ils produisent des zoospores biflagellées et ce sont responsables de :

- **fontes des semis:** ce sont provoquées par des espèces de *Pythium spp*.
- **pourritures radicales** : par exemple sur la pomme de terre, ces pourritures sont induites par *Phytophthora infestans*.
- **mildious:** les *Peronosporaceae*, parasites obligatoires dont le mycélium se développe entre les cellules des tissus infectées et dans lesquelles il forme des suçoirs, ils sont responsables de divers mildious.
- **rouilles blanches:** ce sont des symptômes induits par les *Albuginaceae*, qui sont des parasites obligatoires.

2.2.2. Chytridiomycota

Il constitue un phylum avec une classe unique, les Chytridiomycètes. Leur thalle est un mycélium ramifié et ils produisent des zoospores uni-flagellées. Deux genres (*Olpidium sp* et *Synchytrium sp*) réunissent des parasites de plantes supérieures qui peuvent également être des vecteurs de maladies virales.

2.2.3. Zygomycota

Ce sont caractérisés par l'absence des zoospores, trois ordres présentent un intérêt agronomique : *Mucorales*, *Entomophthorales* et *Glomales*.

2.3. Les Ascomycètes et les Deutéromycètes

2.3.1. Les Ascomycètes

Ce sont des champignons à mycélium cloisonné dont les spores sexuées se forment sur des asques. Les principaux taxons appartenant à ce phylum sont : Archiascomycètes, Pyrénomycètes, Loculoascomycètes et Discomycètes.

2.3.2. Les Deutéromycètes

Encore appelés champignons imparfaits, sont caractérisés par un mycélium sépté et par l'absence de reproduction sexuée. Les principaux genres phytopathogènes sont : *Moniliales*, *Sphaeropsidales* et *Mélanconiales*.

2.4. Les Basidiomycètes

Ce sont des champignons caractérisés par la production de spores monocaryotiques, haploïdes, appelées basidiospores, à l'extérieur de sporocystes appelés basides. Sur le plan de la systématique, on distingue : les Urédinomycètes, les Ustilaginomycètes, les Hyménomycètes.

- **Les Urédinomycètes** : ce sont des champignons parasites responsables des rouilles. Ces rouilles ont généralement un cycle biologique complexe.

- **Les Ustilaginomycètes** : regroupent un ensemble de champignons provoquant des maladies connues sous le nom de charbons ou caries, avec production de masses caractéristiques de téliosporos noires dans les organes floraux ou sur les feuilles.

- **Les Hyménomycètes** : ce sont les *Basidiomycota* typiques caractérisés par des basides non cloisonnées disposées en hyménium dans un appareil fructifère appelé Basidiocarpe [4].

3. Les maladies phytopathogènes

Les anomalies du phénotype par rapport à la norme attendu portent le nom de symptômes. La pathogénèse représente l'ensemble des processus inducteurs de la maladie qui aboutissent à l'expression des symptômes. Ces derniers comportent essentiellement des changements de couleurs, des altérations d'organes, des modifications anatomiques et des altérations du métabolisme.

En effet, il est possible de distinguer les maladies phytopathogènes en deux grands types: les maladies parasitaires et non parasitaires.

3.1. Les maladies non parasitaires

Elles résultent d'une inadéquation des conditions écologiques. Il peut s'agir de problèmes liés aux conditions climatiques, aux phénomènes de pollution ou à des problèmes nutritifs et la toxicité des pesticides.

3.2. Les maladies parasitaires

Ce sont les maladies causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires, etc.). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et ce sont contagieux [4].

4. La verticilliose

4.1 Généralités

La verticilliose est une maladie causée par des champignons du genre *Verticillium sp* comme *Verticillium dahliae* qui se conserve dans le sol sous forme de microsclérotés. Il infecte aussi bien les arbres fruitiers (abricotier, amandier, etc.) et les plantes maraîchères (Solanacées, Cucurbitacées). Le champignon émet ses filaments qui pénètrent dans le système vasculaire de l'arbre. Il se développe en se ramifiant vers les parties aériennes où il entrave la circulation de la sève, provoquant le dessèchement de la ramification atteinte. Cette maladie est la plus grave pour l'olivier et provoque des pertes très importantes [5].

4.2 Le champignon *Verticillium dahliae*

Le *Verticillium dahliae* est un micro-organisme qui se conserve dans le sol sous forme de microsclérotés, petits amas cellulaires (0,1 à 0,5 mm) à paroi très épaisse. Ces organes peuvent subsister de nombreuses années dans le sol (5 à 10 ans). Ce sont les racines de la plante hôte qui par leurs sécrétions vont stimuler la

germination du champignon. Le filament produit va s'insinuer dans la racine surtout si cette dernière porte des blessures. Puis le champignon phytopathogène atteint le système vasculaire et y progresse rapidement, en partie véhiculé passivement par la sève. Son développement dans les vaisseaux, par les obstructions et les toxines produites, va perturber la physiologie des parties aériennes, feuilles, fleurs, fruits, entraînant un jaunissement et dessèchement plus ou moins graves [6].

Le tableau 1 ci-dessous présente la classification taxonomique de *V. dahliae*.

Tableau 1 : Classification du champignon *Verticillium dahliae* [7].

Règne	Fungi
Embranchement	Ascomycota
Classe	Sordariomycete
Sous-classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Incertae sedis
Famille	Plectosphaerellaceae
Genre	Verticillium
Espèce	Dahliae

Il existe deux phénotypes connus de *V. dahliae* sur milieu de culture tel que le milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Il s'agit de la forme noire et de la forme blanche. La forme noire est constituée de jeune mycélium blanc se transformant avec le temps en mycélium compact et très mélanisé composé de cellules gonflées aux parois épaissies. Le mycélium a un aspect rugueux et vallonné et possède une certaine résistance au froid hivernal. La forme blanche se présente comme un fin mycélium aérien, d'aspect mousseux et complètement blanc. Les deux formes se retrouvent souvent *in vitro* sur le même milieu de culture. La forme blanche présente une pathogénicité atténuée par rapport à la forme noire.

Du point de vue morphologique, le champignon porte des conidiophores disposés en verticilles autour de l'axe principal de l'hyphe. Une phialide se trouve à l'extrémité de

chacune de ces branches et les conidies sont formées une par une à l'extrémité de la phialide. Les conidies peuvent s'agglomérer à l'extrémité des phialides. Par ailleurs, *V. dahliae* produit sous certaines conditions des microsclérotos.

Les microsclérotos sont des structures de survie formées par l'agglomération d'hyphes contigus dont les parois sont épaissies et mélanisées. Les agglomérats formés ont l'aspect de petites boules noires (entre 20 et 200 µm de diamètre) pouvant être séparées des hyphes. Leur germination peut être induite artificiellement sur certains milieux sélectifs. Leur persistance dans le sol varie de 4 à 15 ans [7].

4.3. Hôtes et cycle épidémique de la verticilliose

V. dahliae est l'agent pathogène responsable de la verticilliose (ou flétrissement verticillien) chez plus de 400 hôtes tels que la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), l'artichaut (*Cynara scolymus*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), la laitue (*Lactuca sp.*), le poivron (*Capsicum annum*), l'aubergine (*Solanum melongena*), la fraise, et plusieurs espèces d'arbustes et d'arbres comme l'olivier [7].

L'infection par *V. dahliae* peut avoir lieu même lorsque le pathogène est présent en très faibles quantités dans le sol. Des niveaux aussi bas qu'un microsclérote par gramme de sol suffisent pour causer des symptômes d'infection chez une plante. Les microsclérotos germent dans la rhizosphère (environ 2 mm de la racelle) en réponse à la présence d'exsudats racinaires de la plante hôte. Le tube germinatif peut alors s'infiltrer par une blessure mécanique ou causée par un autre organisme (comme certains nematodes) ou encore profiter de l'élongation cellulaire lors de la rhizogénèse pour s'infiltrer dans la plante (figure 01). En réaction à la formation de conidies et à leur transport dans le système vasculaire, la plante produit certains composés de défense (ex. : callose), bloquant le transport de l'eau dans le xylème. Ce blocage des vaisseaux du xylème par les composés de défense de la plante et le matériel fongique est responsable du flétrissement de la plante [7].

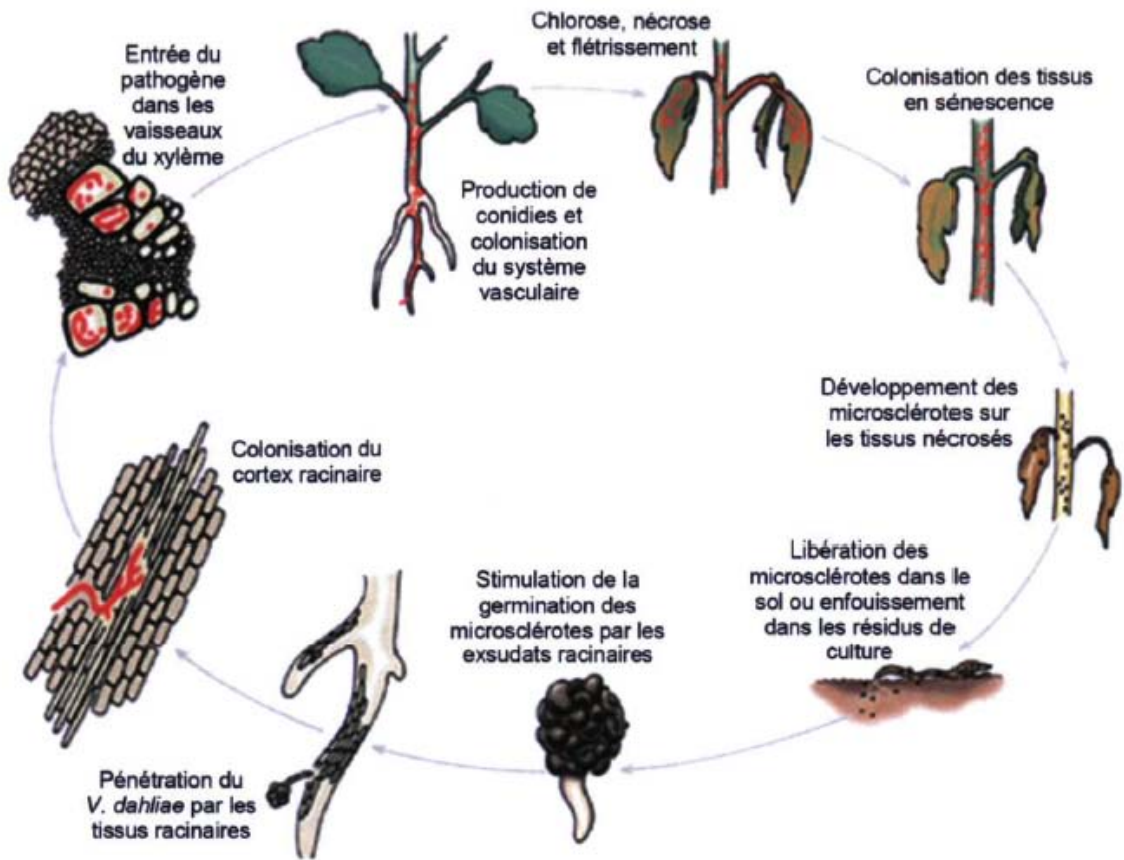


Figure 01. Cycle épidémique de la verticilliose [7].

CHAPITRE 2 :

LA RHIZOSPHERE

1. Généralités

Le terme rhizosphère (du grec rhiza, la racine et de sphère domaine d'influence) a été utilisé pour la première fois par Hiltner (1904) pour définir la zone de sol sous l'influence des racines des légumineuses. La rhizosphère définit aujourd'hui le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes [8].

La rhizosphère est généralement divisée en deux parties:

- La rhizosphère au sens strict correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.
- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines [9].

La géométrie de la rhizosphère dépend donc de la structure du couvert végétal, des espèces considérées, de l'âge des plantes, du cortège microbien associé aux racines, et des actions racinaires considérées. Ses limites sont de ce fait difficiles à préciser. Sa limite externe se confond insensiblement avec l'ensemble du volume de sol colonisé par les racines des plantes.

Les racines des plantes exercent des actions physique (prélèvement de l'eau), chimiques (échanges d'ions minéraux et de molécules gazeuses) et biochimiques (exsudation de substances carbonées), auxquelles le sol réagit dans ses composantes physiques (teneur en eau et potentiel hydrique), chimiques (variations de pH et de potentiel redox, absorption d'anions organiques sur les argiles), et microbiologiques (excrétion d'enzymes par les bactéries et les champignons du sol). Ces modifications de l'environnement sont à l'origine d'une adaptation des racines, qui se traduit en particulier par la formation d'organes symbiotiques rhizobiens (nodosités incluant des bactéries) et mycorhiziens (endo- et ecto- mycorhizes), et des communautés microbiennes du sol [10].

2. Rôle de la rhizosphère

Le rôle de la rhizosphère peut être résumé dans les points suivants:

- la rhizosphère est un passage obligé de tous les éléments minéraux depuis le sol vers les plantes et aussi un lieu d'interactions fortes entre les plantes et les microorganismes du sol [10].

- la rhizosphère rendue compte de la stimulation de la croissance et de l'activité des communautés microbiennes autour des racines [10].
- La rhizosphère est le siège de processus physiques et chimiques spécifiques liés à l'alimentation hydrique et minérale des plantes [10].
- Elle est apparue comme le lieu privilégié des échanges de matières et d'énergie entre les plantes et le sol [10].
- La rhizosphère joue un rôle singulier dans la régulation de la santé et de la nutrition des plantes, en lien avec la nature des exsudats racinaires [10].
- La rhizosphère est un lieu d'intense activité racinaire et microbienne où s'effectuent les échanges entre le sol et la plante (par exemple l'adsorption d'eau et de nutriments minéraux par les racines, ou l'exsudation racinaire des substances organiques) [11].
- Dans la rhizosphère la synthèse de phosphatase mène à une augmentation de la disponibilité du phosphore, et en contre partie son assimilation par les plantes [12].

3. La Rhizodéposition

Le terme "rhizo-déposition" est proposé pour la première fois par Shamoot, (1968) pour décrire la matière organique d'origine racinaire retrouvée dans le sol. La rhizodéposition correspond donc au transfert de carbone des racines vivantes des plantes vers le sol. Ce phénomène recouvre la production de cellules de la coiffe racinaire, la sécrétion de mucilage et la diffusion passive [13].

4. Les exsudats racinaires

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire. Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, encore, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire.

Les exsudats représentent la partie la plus importante des substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale. C'est également celle la plus rapidement métabolisée par les microorganismes. Ils sont généralement composés de sucres,

d'acides aminés, de facteurs de croissance, de vitamines, d'enzymes et d'acides organiques. Ils représentent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique).

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones, des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments [4].

Ces exsudats ont trois rôles majeurs :

- ▶ La protection de la coiffe de la racine, les cellules du méristème apical, à l'origine de l'élongation de la racine [14].
- ▶ L'agrégation physique des particules d'argile (à l'image d'une colle) [14].
- ▶ La ressource énergétique pour de nombreux microorganismes de la rhizosphère [14].

Les exsudats racinaires stimulent ainsi le développement et la prolifération des organismes vivants tout autour de la racine, constituant la fameuse rhizosphère. En effet, à partir des exsudats racinaires, se forment de véritables chaînes alimentaires, comme premiers acteurs, les bactéries (plus rapides à se multiplier) puis les champignons. Viennent ensuite les consommateurs de ce premier niveau alimentaire comme les nématodes, les protozoaires. etc [14].

5. Les micro-organismes de la rhizosphère

5.1. Les champignons bénéfiques ou les PGPF

Des champignons appelés PGPF “ Plant Growth-Promoting Fungi” peuvent stimuler les défenses de la plante et présenter une activité antagoniste envers différents phytopathogènes, tout en stimulant directement la croissance de la plante. Ils peuvent être des champignons filamenteux voire même des levures également appelées PGPY “ Plant Growth-Promoting Yeasts”. Chez diverses plantes, y compris les plantes herbacées, les PGPF peuvent être présents naturellement aussi bien chez des plantes ligneuses, notamment la vigne. Chez ces plantes, les PGPF peuvent être épiphytiques et/ou endophytiques et sont même à l'origine de symbioses comme le cas avec les mycorhizes. Lors d'une association bénéfique entre une plante et les

PGPF, divers mécanismes sont impliqués dans la protection et la stimulation de la croissance de la plante [15]. Ces microorganismes peuvent agir directement sur l'agent pathogène pour protéger la plante, ou indirectement par le biais d'un mycoparasitisme et une sécrétion d'allélochimiques d'inhibiteurs et/ou par un phénomène de compétition pour l'espace et les nutriments, tout en fournissant des composés bénéfiques pour le développement de la plante. Ces microorganismes peuvent également stimuler les défenses des plantes, ce qui Provoque une résistance de la plante contre les agents pathogènes [1].

5.2. Les rhizobactéries

La rhizosphère est la zone de sol qui est sous l'influence des exsudats racinaires. Dans cette zone se trouve un groupe particulier de bactéries, les rhizobactéries. Ces dernières sont capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs. L'association, le rôle et les effets que les rhizobactéries exercent sur la plante sont fonction du succès de leur établissement dans la rhizosphère; elles peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes. Près de 5% des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les agents pathogènes tels les bactéries, les champignons et les nématodes. L'inoculation des semences avec ces rhizobactéries se traduit généralement par des accroissements de rendement d'environ 10 à 30% [16].

6. Les facteurs conditionnant la flore rhizosphérique

D'une façon générale, l'activité microbienne dans la rhizosphère est influencée par des facteurs climatiques de l'environnement (humidité, aération, température, teneur en CO₂, etc) et par des facteurs édaphiques (teneur du sol en eau et oxygène, pH, teneur en éléments assimilable, etc.).

La profondeur des racines jouent aussi un facteur de variation de la flore rhizosphérique où le nombre de microorganismes diminue selon l'augmentation de la distance [17].

7. Les différents types d'interactions entre les micro-organismes

7.1. Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère

Les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et très intenses, ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne [9].

Les principales interactions sont les suivantes :

7.1.1. Le commensalisme

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc.) par un micro-organisme rendant ainsi un climat favorable pour le développement d'un autre.

Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres [18].

7.1.2. Le mutualisme

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse aux microorganismes partenaires, exemple : de *Proteris vulgaris* qui a besoin de biotine, mais qui synthétise l'acide nicotinique requis par *Bacillus polymyxa* qui le transforme en biotine [19].

7.1.3. L'antagonisme

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose [9].

7.1.4. La compétition

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère [18].

7.1.5. Hyperparasitisme

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme [9].

7.2. Interaction entre les microorganismes et les plantes

7.2.1. Interactions non symbiotiques

L'interface entre le sol et les racines est un habitat très dynamique. Dans la masse de sol environnante, la croissance et la prolifération des microorganismes sont limitées par un déficit de carbone et d'énergie. Par contre, la libération continue de nutriments organiques dans la rhizosphère stimule l'activité et la multiplication des microorganismes. Le développement de la communauté rhizosphérique a une variété d'impact direct ou indirect sur la production de biomasse de la plante. Beaucoup de bactéries qui colonisent la rhizosphère produisent des composées organiques qui permettent le développement du système racinaire des plantes. Elles sont responsables du recyclage et de la solubilisation des éléments minéraux (azote, phosphore, calcium); de la synthèse des vitamines, des acides aminés, des auxines lesquels stimulent la croissance des plantes ou bien d'autres substances qui peuvent inhiber les organismes pathogènes des plantes [20].

Les effets indirects résultent de l'effet de la communauté microbienne rhizosphérique sur la structure du sol. En effet, les microorganismes produisent des polysaccharides qui cimentent les particules minérales du sol à l'intérieur des agrégats. L'amélioration de la structure du sol, par l'augmentation de l'agrégation, aboutit à l'amélioration de l'aération du sol, à l'infiltration de l'eau, et à la pénétration des racines [20].

7.2.2. Interactions symbiotiques

En plus des interactions avec les microorganismes dans la rhizosphère, les racines des plantes établissent des relations symbiotiques spécifiques avec certains microorganismes du sol. Les principaux Deux types d'associations peuvent exister sont les associations mycorhiziennes et les symbioses fixatrices d'azote [20].

➤ Les symbioses mycorhiziennes

Les mycorhizes sont des associations bénéfiques entre les racines des végétaux et les filaments mycéliens des champignons supérieurs (Figure 2) [20].

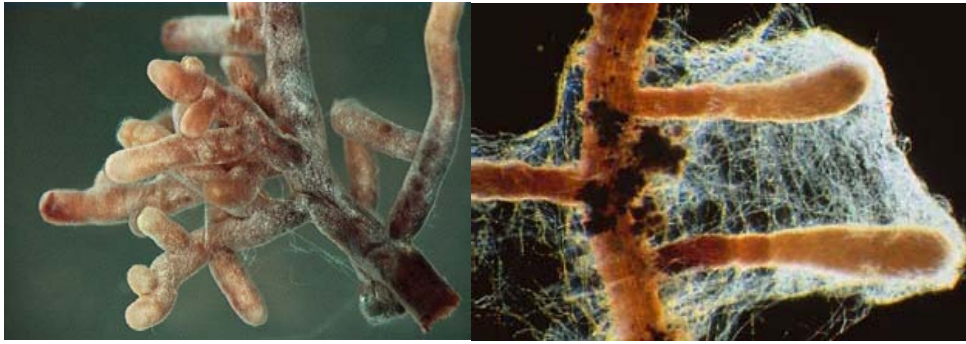


Figure 02. Association mycorhizienne [21].

Cette association améliore la nutrition minérale (principalement du phosphore) de la plante, alors qu'elle fournit au champignon hétérotrophe des assimilats photosynthétiques qu'ils ne peuvent pas les obtenir directement du sol. Il existe trois types de mycorhizes, définies selon des critères morphologiques et cytologiques: les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhizes [21].

Les ectomycorhizes : le champignon (un ascomycète ou basidiomycète) forme une gaine d'hyphe externe dense ou manchon sur les racines fines latérales de leurs plantes hôtes. L'hyphe ne pénètre pas dans les cellules de la plante, mais il se développe vers l'intérieur entre les cellules de l'épiderme et du cortex externe pour former un réseau. La symbiose ectomycorhizienne concerne 5% des plantes vasculaires [21].

Les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules, les hyphes formées se développent à l'intérieur des racines et pénètrent dans les cellules de la paroi pour former des arbuscules microscopiques qui augmentent la surface de contact avec la plante hôte [21].

➤ **Les Symbioses fixatrices d'azote**

Deux groupes de bactéries ont été identifiés comme fixatrices d'azote en association avec les plantes supérieures. Il s'agit de bactéries appartenant au genre *Rhizobium sp* et *Frankia sp* [20].

Ce sont des associations spécifiques, puisqu'elles impliquent un système de reconnaissance mutuelle entre les deux partenaires. La plante exsude dans le milieu des flavonoïdes qui activent les gènes de la nodulation des bactéries, provoquant la synthèse d'une molécule signal, cette dernière déclenche chez la plante des processus qui permettent la pénétration des bactéries dans la racine et la formation de nodules.

Les symbioses fixatrices de l'azote sont extrêmement importantes dans le maintien de la fertilité de sol, elles sont utilisées dans les pratiques agricoles pour augmenter les rendements des cultures [20].

CHAPITRE 3 :

LES BACTÉRIES PROMOTRICES DE CROISSANCE DES PLANTES ET LUTTE BIOLOGIQUE

1. La lutte biologique

La « **lutte biologique** » (« biological control » ou « biocontrol ») est une méthode qui consiste à combattre une maladie, en favorisant ses antagonistes, précisément, la lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme [22]. Ce type de biocontrol est utilisé pour combattre plusieurs maladies de différentes natures telles que les bactéries, les champignons, les insectes, etc. [1].

2. Généralités sur les bactéries promotrices de croissance des plantes

L'expression des rhizobactéries promotrice de la croissance (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) a été d'abord utilisée pour décrire des bactéries du sol colonisant les racines des plantules (après la germination des semences) et favorisant leur croissance.

Plusieurs genre bactériens sont décrits dans la littérature pour leur effet bénéfique sur la croissance des plantes, tels que : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium*. En effet, les rhizobactéries peuvent avoir des effets sur la croissance de plantes avec des mécanismes directes ou indirectes. Les mécanismes directs de la promotion de croissance sont principalement la fixation de l'azote atmosphérique (N₂) qui est transféré aux plantes, la production des sidérophores, la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphore, la synthèse des phytohormones et des vitamines et la diminution de la toxicité de certains polluants de sol tels que les métaux lourds. D'autres rhizobactéries peuvent améliorer la croissance de plantes indirectement par la protection contre les phytopathogènes, par la de synthèse des métabolites antifongiques tels les antibiotiques, les enzymes qui lysent les cellules fongiques, ou bien par compétition envers les nutriments ou la colonisation des racines [23].

3. les rhizobactéries promotrices de la croissance appartenant au groupe *Pseudomonas spp.* Fluorescents

3.1. Caractéristiques générales du groupe *Pseudomonas spp.* Fluorescents

Le genre *Pseudomonas sp* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, famille des *Pseudomonaceae*, ordre des *Pseudomonales*. Les souches appartenant à ce genre possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement

intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable. Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques.

Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1,5 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de longueur, mobiles et asporulées [24].

Ces souches sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores [25].

Les principales espèces appartenant à ce genre sont principalement [26]:

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescentes*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- le groupe des *P. pertucinogena*.

3.2. Les interactions de *Pseudomonas spp.* Fluorescents dans la rhizosphère

Les *Pseudomonas spp.* Fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Les souches influençant avantageusement l'hôte végétal peuvent améliorer la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines. Elles peuvent également augmenter le niveau de la résistance des plantes aux maladies.

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas spp.* Fluorescents. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active dans la rhizosphère. Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les

acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser les racines [24].

4. Les actinomycètes filamenteux promoteurs de la croissance des plantes

4.1. Propriétés générales des actinomycètes

4.1.1. Définition

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination « actinomycètes » du grec *akitino*, mycetes « champignons » ou champignons rayonnant [27].

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des *actinomycetales*, se sont des bactéries à Gram positif dont le coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60% (*Corynebacteria*) et 75% (*Streptomycètes*) [28].

Sous microscope nous observons des formes multiples, depuis la cellule coccoïde ou bacillaire jusqu'à un mycélium complexe générateur des spores enveloppées dans un sporange chez certains genres [29].

Ils ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leur morphologie fongicoïde : filament ramifiés, organes de sporulation, etc. Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de micro-organisme est définitivement classé parmi les bactéries [29].

4.1.2. Morphologie des actinomycètes

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier : se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium). Le second : comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier. Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.

- des colonies pâteuses rugueuses ou lisses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*) hautement résistantes. D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges qui peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* [30].

4.1.3. Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le Genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol. En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air. Dans ce dernier, les spores sont considérées comme des contaminants. Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance. Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts, tel que *Thermoactinomyces*. En général, les actinomycètes sont des chimo-organotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes [31].

Plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. Certains actinomycètes sont capables de se développer à des températures élevées et de produire des enzymes actives dans des conditions acides. Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes, en effet, plusieurs études ont montré la capacité des actinomycètes à coloniser les racines de plantes, en assurant principalement une protection et la production de différents facteurs de croissance au dépend des exsudats racinaires de plantes, ce type de bactéries est

capables de produire des substances antimicrobiennes, des phytohormones tels que les auxines, de plus, certains genres sont capables de fixer l'azote et de solubiliser le phosphate [31].

4.1.4. Génétique et structure de l'ADN

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3,7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E. coli*, la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les actinomycètes possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. À la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir des plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques [32].

4.2. Le développement des actinomycètes

4.2.1. Le cycle de développement des actinomycètes (exemple type : *Streptomyces ssp*) :

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléées, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien [33].

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent, pendant la phase de limitations nutritionnelles, une famille de protéines du type - butyrolactone. Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques [33].

4.2.2. Biologie du développement

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes.

Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains

eucaryotes. Ainsi, les actinomycètes les plus différenciées développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distincts : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche (Figure 3) [34].

4.2.2.1. Formation des spores

Les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistants à la chaleur [27].

- **Les endospores**

Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités [35].

- **Les exospores**

Elles naissent de la formation de parois transversales pour délimiter les spores. Les parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornements externes peuvent se former, le contenu en tréhalose, relativement abondant aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores. Par ailleurs, celles-ci ont fondamentalement la même structure qu'une cellule végétative et ne contient qu'un seul génome haploïde [35].

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et D'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires [28].

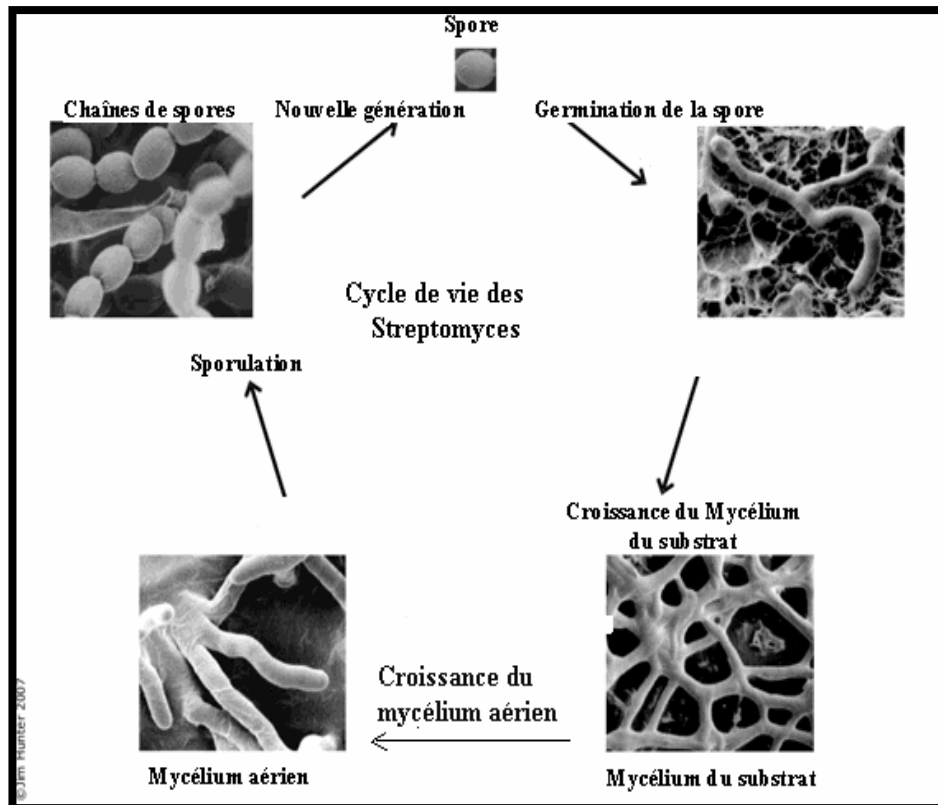


Figure 03. Cycle de vie des *Streptomyces* [28].

4.2.2.2. La germination des spores

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative [34].

Trois événements distincts sont décrits :

- **L'activation** : qui débute par un apport de certains cations divalents. C'est un processus nécessitant de l'énergie. Cette étape est accompagnée par des changements de la rétractibilité des spores, d'une diminution de l'absorbance et de la thermorésistance et d'une augmentation remarquable de l'activité respiratoire.
- **L'initiation** : qui dépend de la présence d'une source de carbone exogène, et elle est marquée par une augmentation de l'activité métabolique et biosynthétique.
- **L'émergence du tube germinal** : qui nécessite une source de carbone et d'azote.

4.2.2.3. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien

Le mycélium de substrat, appelé également mycélium primaire ou végétatif, est un ensemble de filaments multi nucléaires formés à partir de tube germinal, ce dernier s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son

développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des colonies jeunes, formées par des filaments attachés en matrice complexe qui pénètrent dans le milieu et solubilise les molécules organiques par l'action des enzymes extracellulaires. Cette structure leur permet de coloniser les matériaux solides [34].

Sur le mycélium de substrat se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes. Sa formation est influencée par plusieurs facteurs, notamment : la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant sa croissance (figure 4) [34].

Selon **Locci et Sharples (1984)**, la croissance aérienne est inhabituelle chez les procaryotes, elle doit donc présenter une adaptation à l'environnement terrestre. Ainsi, les actinomycètes typiquement aquatiques (par exemple, des espèces de *Micromonospora*, *Actinoplanes*, et Certains autres) sont généralement dépourvus de la croissance du mycélium aérien [34].

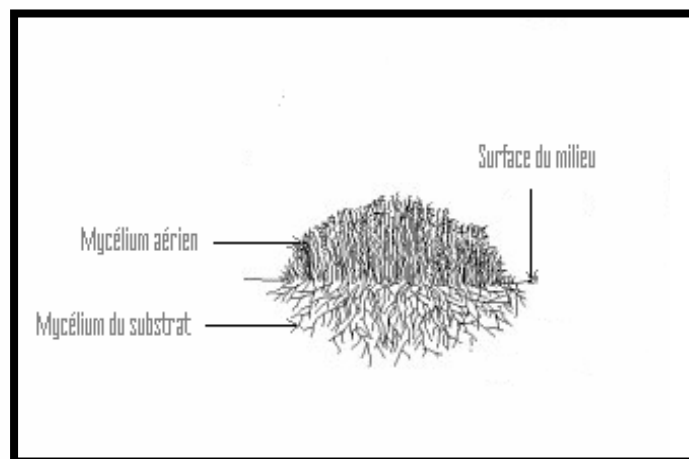


Figure 04. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide [28].

Les différences entre le mycélium aérien et celui de substrat chez le genre *Streptomyces* sont les suivants [35] :

- Le mycélium aérien est légèrement plus épais ;
- Il est habituellement de couleur foncée (à cause des pigments insolubles) ;
- Il est moins ramifié ;
- ne montre presque aucune tendance à pénétrer le milieu ;
- sa couche aérienne est hydrophobe ;
- Il forme des spores par fragmentation.

4.3. Les actinomycètes rhizosphériques

4.3.1 Activité antimicrobienne des actinomycètes

L'usage fréquent et abusif des antibiotiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique ou bactérienne est l'un des facteurs essentiels dans le développement et l'évolution de la résistance microbienne, ce qui accentue l'urgence de découvrir de nouvelles molécules antimicrobiennes d'origines biologiques. Celles-ci sont souvent recherchées à partir des microorganismes isolés d'échantillons prélevés de différents écosystèmes, dans le but de découvrir des taxons originaux et par là de nouvelles molécules biologiquement actives. Vu leur importance dans la production d'antibiotiques et leur omniprésence dans presque tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile, Les actinomycètes sont les acteurs les plus prometteurs pour la production de nouveaux métabolites à activité antimicrobienne [36].

4.3.2 Les actinomycètes colonisant la rhizosphère

Les actinomycètes sont des microorganismes capables de coloniser la rhizosphère grâce à leurs caractères antagonistes et compétitifs vis-à-vis des autres microorganismes du sol. Certains sont connus pour leur production de sidérophores qui permettent de chélater le fer ainsi privant le fer des autres microorganismes. Les actinomycètes peuvent agir également par compétition nutritionnelle et spatiale contre les microorganismes phytopathogènes. Leur faculté d'adaptation à différents milieux rhizosphériques leur permet d'être un bon compétiteur. Certaines espèces sont symbiotiques des plantes supérieures, ces bactéries endophytiques forment des associations appelées actinorhizes permettant la fixation d'azote [1]. Les actinomycètes sont de plus, connues par leur capacité de produire des antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes ont montré une corrélation entre la production d'antibiotiques dans le sol et l'efficacité des actinomycètes dans la lutte contre les agents phytopathogènes [1].

4.3.3. Activité des actinomycètes contre les champignons phytopathogènes

Les actinomycètes présentent un important potentiel d'agents contre des maladies phytopathogènes. En effet, ces dernières décennies, plusieurs études sont intéressées aux rôles que pourrait jouer les actinomycètes dans la suppression des phytopathogènes. Le premier produit de lutte biologique commercialisé à base

d'actinomycètes a été fabriqué à partir de *Streptomyces griseoviridis* pour contrôler les agents phytopathogènes comme le *Verticillium sp* et le *Fusarium sp* [37].

Les microorganismes sont actuellement considérés comme des agents très prometteurs pour assurer une protection phytosanitaire performante. L'usage des antifongiques microbiologiques en font des alternatives viables à la lutte chimique. En effet, plus d'une centaine de bactéries, notamment les actinomycètes, ont été identifiés comme ayant un potentiel d'utilisation dans la lutte biologique [37].

Les antagonistes microbiens sont largement utilisés en lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. L'activité antagoniste de *Streptomyces* vis-à-vis des pathogènes fongiques est généralement liée à la production de composés antifongiques extracellulaires des enzymes hydrolytiques. A titre d'exemple, Les pramicidines, des antifongiques, synthétisés par une souche *d'Actinomadura bibisca*. Elles sont très actives contre des infections systémiques fongiques malgré leur activité modérée *in vitro* [37].

***MATÉRIEL ET
MÉTHODES***

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un test de lutte biologique, il étudie la capacité de certaines souches rhizosphériques à inhiber le phytopathogène *verticillium dahliae*, les souches bactériennes utilisées font partie de deux groupes, des actinomycètes filamenteux et des souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp* fluorescents.

Les souches bactériennes ainsi que le phytopathogène *Verticillium dahliae* sont fournies par le laboratoire de Génie microbiologique et applications. Les souches bactériennes sont isolées des rhizosphères des différentes cultures maraichères et le champignon est responsable de la verticilliose de l'olivier.

1. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches rhizosphériques

1.1 Cas des actinomycètes filamenteux

La technique utilisée pour révéler l'activité antifongique est la technique des cylindres d'agar. A partir d'une culture de 7 jours, un disque de 8 mm de diamètre d'une culture de *Verticillium dahliae* est déposé au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe 1) [38]. Ensuite, deux disques de 8mm de diamètre de culture d'actinomycètes, âgée de 8 jours, sont déposés de part et d'autre de la culture de champignon, de façon à avoir une distance de 3 cm entre le disque du champignon et chaque disque d'actinomycète. Des boites de Pétri qui ne contiennent que le disque de champignon sont utilisés comme contrôle. Toutes les boites sont incubées à 30°C pendant 14 jours [4].

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(C-T)/C]*100$$

C : diamètre de croissance de champignon dans la boite de control.

T : diamètre de croissance de champignon dans la boite test.

1.2. Cas des *Pseudomonas spp* fluorescents

La technique utilisée pour tester l'activité inhibitrice de ces bactéries est la technique des stries [39].

A partir d'une culture de 8 jours de *Verticillium dahliae*, un disque de 8mm est coupé ensuite déposer au centre d'une boite de Pétri contenant le milieu PDA, en parallèle de ce disque, la souche bactérienne est étalée par stries du part et d'autre de la boite, de façon à laisser un espace de 1,5 cm de bord de la boite. Les boites sont incubées à 30°C pendant 72heures [39].

Des boîtes ne contenant que le disque de champignon sont utilisées comme des boîtes contrôles.

La lecture des résultats est réalisée par mesure de diamètre de croissance de champignons, dont les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition = $[(C-T)/C]*100$.

C : diamètre de croissance de champignon dans la boîte de contrôle.

T : diamètre de croissance de champignon dans la boîte test.

2. Etude de l'activité antifongique d'extraits des souches rhizosphériques

2.1 Préparation des extraits

L'extraction est réalisée juste aux souches qui ont les pourcentages d'inhibition les plus élevés. De ce fait, seulement les deux souches d'actinomycètes, la T13 et la MR5, sont utilisées pour faire l'extraction.

L'extraction est réalisée à partir des cultures de 7 jours sur le milieu YMEA+CaCO₃ (Yeast Malt Extract Agar) (annexe1). Par l'utilisation de deux solvants différents, le choix de ces solvants est réalisé selon la littérature et selon leur disponibilité au laboratoire.

Après incubation, le contenu de quatre boîtes est coupé en petits morceaux, ensuite, il est versé dans des flacons en verre et additionné de 20 ml de solvant d'extraction (le dichlorométhane ou le chloroforme). Les flacons sont bien agités et ils sont laissés une nuit pour une bonne diffusion des métabolites (figure 5). Après les mélanges sont filtrés à travers un papier filtre ordinaire pour éliminer la gélose et la culture des actinomycètes. Le séchage complet est réalisé par un évaporateur rotatif à 45° C, ensuite, l'extrait obtenu est récupéré dans 3ml de méthanol. L'extrait est conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation [32].

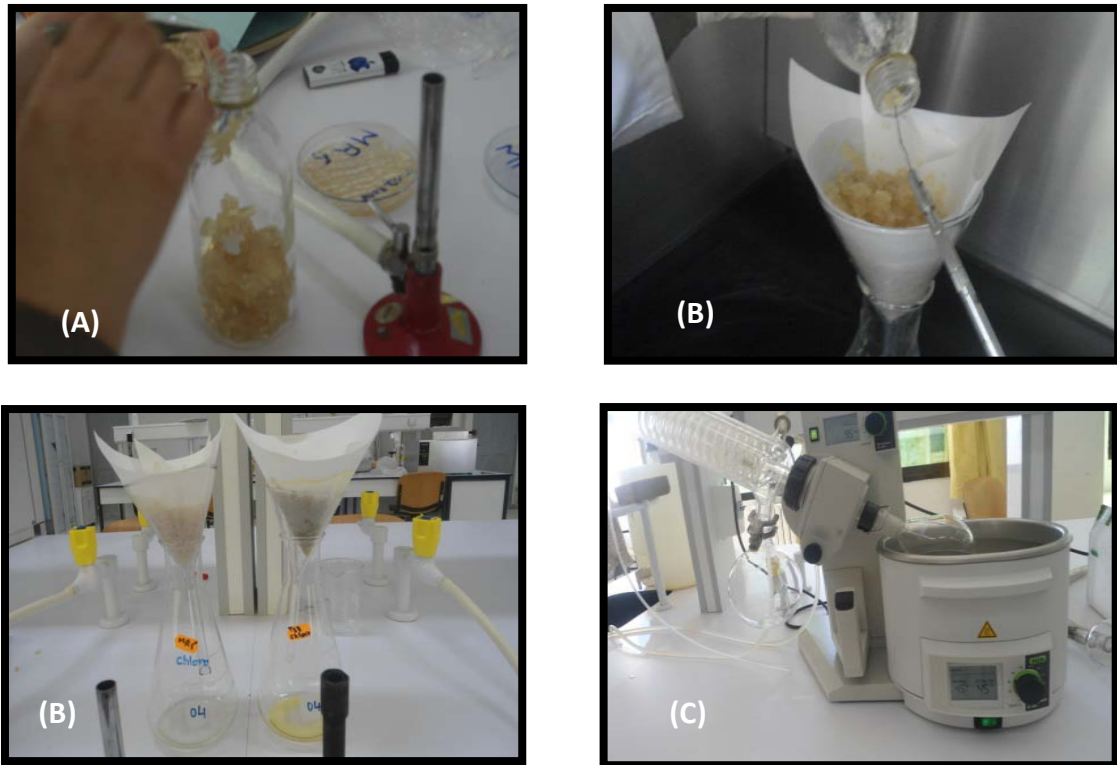


Figure 05. Les étapes d'obtention des extraits des souches d'actinomycètes. (A) : coupure de la culture et addition de solvant, (B) : filtration, (C) : évaporation.

2.2 Réalisation du test d'inhibition

A l'aide des embouts stériles, des puits de 8 mm sont creusés dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA, à une distance de 1,5 cm des bords de la boîte, ensuite, un disque de 8 mm d'une culture de champignon *Verticillium dahliae* est déposé au centre de chaque boîte. Une quantité de 100µl d'extrait d'actinomycète est déposées dans chaque puits [35]. Trois répétitions sont réalisées pour chaque test. Des boîtes ne contenant que le disque de champignon sont utilisées comme control, en plus, des boîtes contenant le méthanol (le dernier solvant d'extraction) sont utilisées pour vérifier l'absence d'activité du solvant d'extraction.

Les boîtes sont laissées à température ambiante à 4°C pendant 5 heures, puis elles sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

La lecture des résultats est réalisée par mesure de diamètre de croissance de champignons, les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(C-T)/C]*100$$

C : diamètre de croissance de champignon dans la boîte de control.

T : diamètre de croissance de champignon dans la boîte test.

3. Etude de l'activité inhibitrice des molécules purifiées par une chromatographie en couche mince

3.1 Purification des molécules par chromatographie en couche mince

- **Principe**

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange.

La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal [5].

- **Mode opératoire**

Pour cette étude, seulement les deux extraits de la souche MR5 sont utilisés, par rapport à leur grande activité comparativement à l'autre souche, la T13.

Le système de migration utilisé est formé d'un mélange de deux solvants, il s'agit du méthanol et du chloroforme, le mélange est utilisé à différents rapports afin d'obtenir une bonne séparation, les rapports utilisés en v/v de chloroforme/méthanol sont : 8/2, 8.25/0.75, 8.5/1.5, 8.75/1.25, 9/1.

Le mélange de solvant est versé dans la cuve de chromatographie avec une hauteur de 0,5 cm,

Sur la plaque de chromatographique, les dépôts des extraits sont marqués à l'aide d'un crayon à 1 cm environ du bord inférieur de la plaque, avec un espace de 4 cm entre deux dépôts, de façon que, la hauteur de solvant dans la cuve soit inférieur au trait de dépôt.

A l'aide d'une micropipette, une quantité de 10 μ l d'extrait est déposée sur chaque dépôt, le solvant d'extraction, le méthanol, est utilisé comme un control négatif. Les plaques sont ensuite déposées dans la cuve et elles sont laissées jusqu'à la migration du solvant vers le front supérieur, dans les cuves bien fermées pour éviter l'évaporation des solvants (figure 6).

A l'aide d'un crayon, le front de migration est tracé, ensuite, les plaques sont séchées [35].

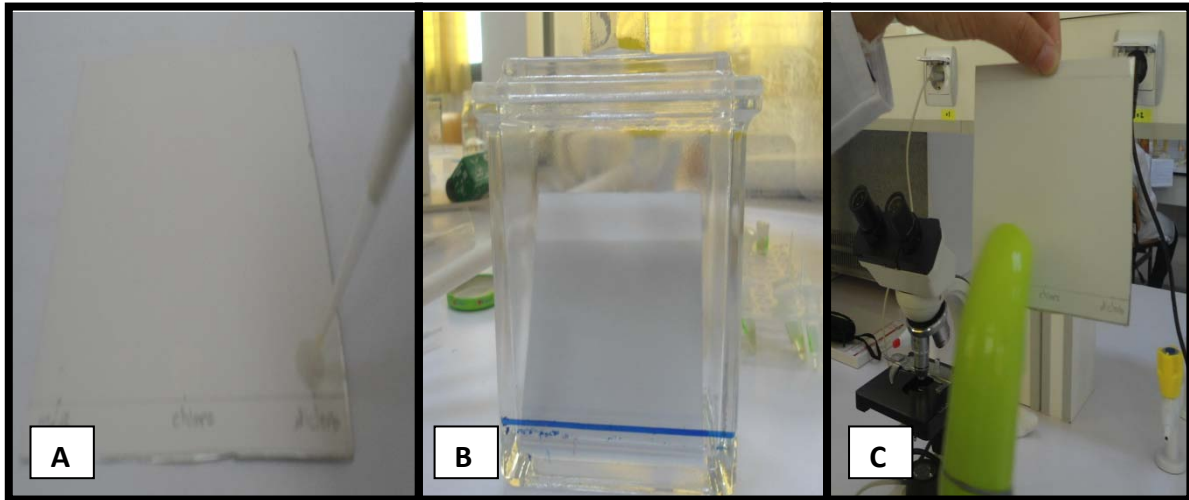


Figure 6. Les étapes de la chromatographie sur souche mince. (A) : dépôt des extraits. (B) : Migration. (C) : Séchage.

- **Révélation et lecture**

La révélation est réalisée soit à l'œil nu et/ou avec des rayons UV à l'aide d'une lampe à deux longueurs d'ondes, 365 nm et 254nm.

Le R_f (rapport frontal ou rétention frontale) est caractéristique pour chaque tache :

$$R_f = \text{Hauteur de migration} / \text{Hauteur du front de solvant} = \text{valeur entre 0 et 1.}$$

Le système de migration où le nombre des taches et le plus élevés ainsi que les taches sont bien séparées est choisi comme le meilleur système de séparation [39].

3.2. Test d'inhibition pour les taches obtenues par CCM (bio-autographie directe)

Des disques de 8 mm de diamètre d'une culture de *Verticillium dahliae* sont déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Sur les plaques CCM les taches bien séparées, révélées à l'œil nu ou avec les rayons UV, sont grattées et déposées à l'un des côtés du disque de champignons avec une distance de 3 cm (figure 7). Trois répétitions sont réalisées pour chaque test. Des boîtes de Pétri qui ne contiennent que le disque de champignon sont utilisées comme contrôle [40].

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72heures. La lecture des résultats est réalisée par mesure de diamètre de croissance de champignons, et calcul du pourcentage d'inhibition :

Pourcentage d'inhibition = $[(C-T)/C]*100$.

C : diamètre de croissance de champignon dans la boîte de control.

T : diamètre de croissance de champignon dans la boîte test.

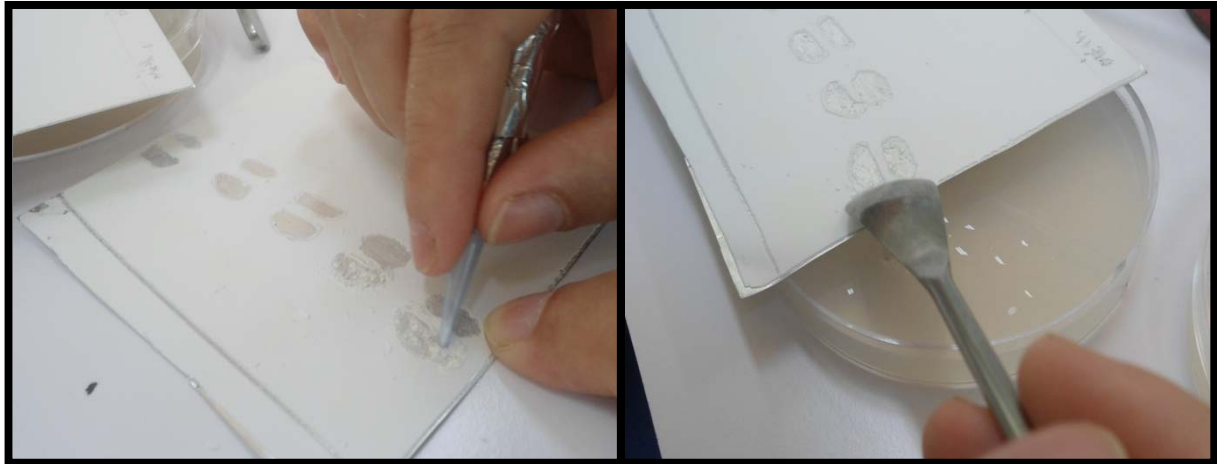


Figure 7. Grattage des taches séparées sur la plaque CCM et test contre *Verticillium dahliae*.

4. Etude morphologique des souches d'actinomycètes

L'étude morphologique des deux souches d'actinomycètes les plus importantes est réalisées par une coloration de Gram.

La première étape consiste à réaliser des frottis de la manière suivante : une partie de la culture des actinomycètes est déposée au centre d'une lame avec une goutte d'eau distillée. Une fixation par dessiccation est réalisée en chauffant fortement deux à trois fois une demie seconde le frottis (Figure 8). La coloration est basée sur l'affinité des souches fixées en colorants (violet de gentiane et fuchsine) selon la nature de leur paroi (figure 8), dont le résultat final c'est un mycélium coloré en violet, car ce type de bactéries sont connus comme des bactéries à Gram positif et la coloration de Gram est utilisée juste pour l'étude de la morphologie [41].

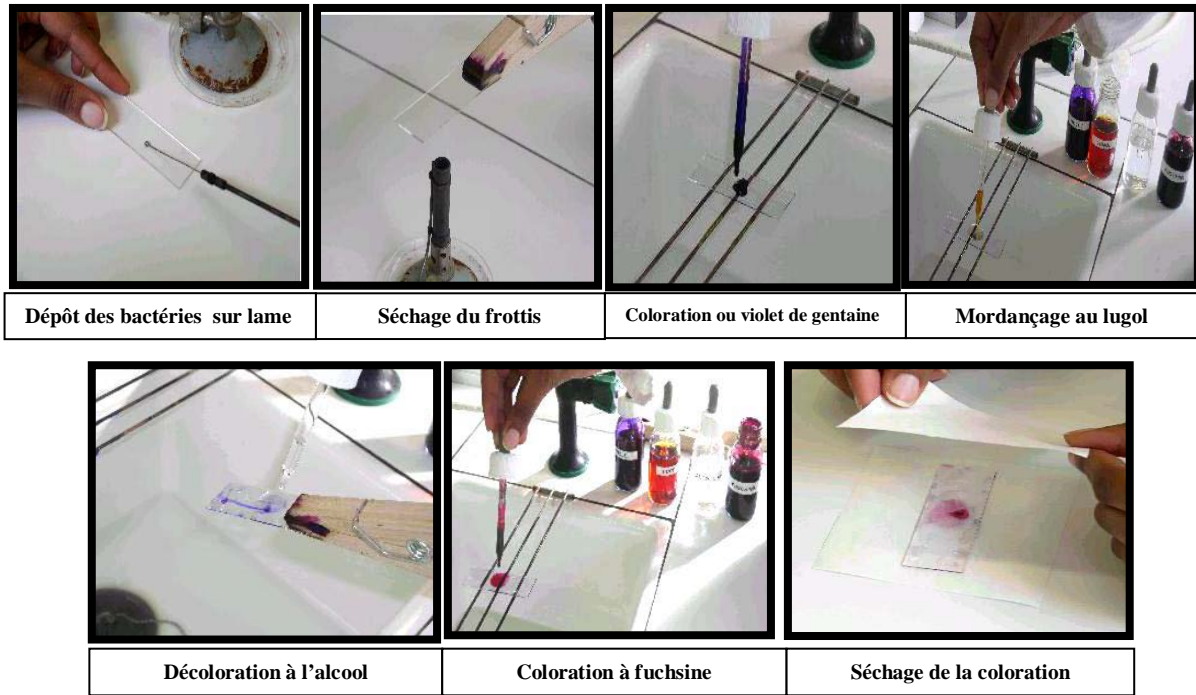


Figure 8. Les étapes de la Coloration de Gram.

5. Analyses statistiques

Le traitement des résultats est réalisé par un logiciel de statistique, Origin version 5, en calculant juste les moyennes et les écart-types.

RÉSULTAT ET DISCUSSION

1. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches rhizosphériques

1.1 Cas des actinomycètes filamenteux

Les résultats du test *in vitro* de l'activité inhibitrice de *Verticillium dahliae* par les actinomycètes rhizosphériques sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène des souches rhizosphériques d'actinomycètes.

Les souches	Diamètre d'inhibition			Pourcentage d'inhibition (moyenne± Ecart type)
	Boîtes contrôles (mm)	Boîtes tests (mm)		
		Boîte 1	Boîte 2	
T13	85	34	28	63,52 ± 4,98
MR5	85	30	45	55,87±12,48
J4	85	51	42	45,29 ± 7,48
MNR16	85	43	38	52,61 ± 3,78
T1	85	37	44	52,35 ± 5,82
F7	85	40	44	50,58 ± 3,33
T6	85	45	40	49,99 ± 4,16
T5	85	45	41	49,40 ± 3,33
MR1	85	43	43	49,41 ± 0
F6	85	45	42	48,81 ± 2,49
SRB2	85	44	44	48,23 ± 0
C.NOIR	85	46	43	47,64 ± 2,49
T15	85	44	47	46,46 ± 2,49
F3	85	46	45	46,46 ± 0,82
MR10	85	45	46	46,46 ± 0,82
MNR7	85	40	52	45,88 ± 9,98
J9	85	49	47	43,52 ± 1,66
T4	85	46	52	42,35 ± 4,99
T8	85	54	46	41,17 ± 6,65
C15	85	50	50	41,17 ± 0
MR6	85	47	53	41,17 ± 4,99
F2	85	48	54	39,99 ± 4,98
T12	85	53	50	39,40 ± 2,49
T7	85	52	55	37,05 ± 2,49
SRO1	85	85	85	00
T9	85	85	85	00
F7 CRIS	85	85	85	00

Tableau 2. Mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène des souches rhizosphériques d'actinomycètes (suite).

Les souches	Diamètre d'inhibition			Pourcentage d'inhibition (moyenne± Ecart type)
	Boîtes contrôles (mm)	Boîtes tests (mm)		
		Boîte 1	Boîte 2	
SRB1	85	85	85	00
T11	85	85	85	00
C17	85	85	85	00
F5	85	85	85	00
J5	85	85	85	00
J3	85	85	85	00
J1	85	85	85	00
F1	85	85	85	00
C18	85	85	85	00
T14	85	85	85	00
F8	85	85	85	00
F4	85	85	85	00
SRO3	85	85	85	00
MR7	85	85	85	00
C19	85	85	85	00
T2	85	85	85	00
J2	85	85	85	00
T18	85	85	85	00
T10	85	85	85	00

Selon ce tableau, plus de 50% des souches étudiées possèdent une activité contre *Verticillium dahliae*, alors que 21 souches n'ont aucune activité contre ce champignon. D'après ces résultats, 5 souches ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, dont l'inhibition la plus importante est enregistrée pour les souches T13 et MR5 avec des pourcentages de 63 et 55% respectivement. Les autres souches ont des pourcentages d'inhibition situés entre 37 et 50%, alors que le reste des souches n'ont aucune activité vis-à-vis *Verticillium dahliae*.

L'effet de compétition et d'antagonisme *in vitro* représenté par la figure 9 confirme que la structure du champignon est désorganisée et altérée suite à la sécrétion des composants antifongiques extracellulaires par les souches d'actinomycètes.

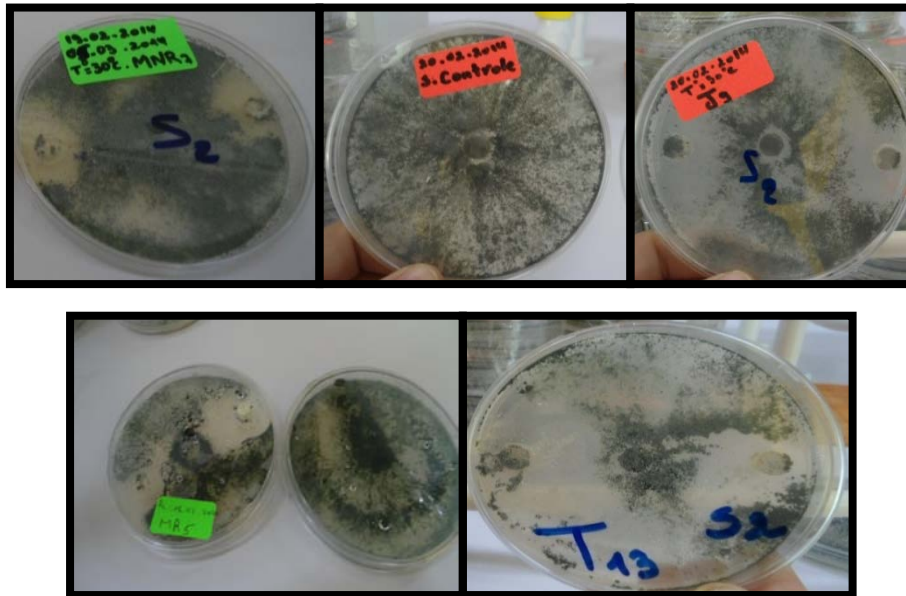


Figure 09. Effet antagoniste d'actinomycète contre *Verticillium dahliae*.

Les actinomycètes présentent un important potentiel d'agents contre des maladies Phytopathogènes et promoteurs de croissance des plantes. En effet, ces dernières décennies, plusieurs études sont intéressées aux rôles des actinomycètes dans la suppression des phytopathogènes. Le premier produit de lutte biologique commercialisé à base d'actinomycètes a été fabriqué à partir de *Streptomyces griseoviridis* pour contrôler plusieurs agents phytopathogènes comme *Botrytis sp*, *usarium sp* et *verticillium sp* [4].

Plusieurs études en parallèle ont mis en évidence la capacité des actinomycètes filamenteuses à inhiber plusieurs phytopathogènes tels que *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *M. nivale*, *D. teres*, *B. sorokiniana*, *B. fabae* et *V. dahliae* [4].

1.2. Cas des *Pseudomonas spp* fluorescents

Les résultats du test d'antagonisme de ces bactéries contre le champignon *Verticillium dahliae* sont enregistrés dans le tableau 3. Selon ces résultats toutes ces souches bactériennes n'ont aucune activité contre le champignon étudié, malgré que dans certaines boîtes une diminution de la croissance mycélienne est enregistrée (figure 10).

Tableau 3. Mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène des souches rhizosphériques de *Pseudomonas spp* fluorescents.

Les souches	Diamètre de croissance			(% d'inhibition
	Boite control (mm)	Les boîtes tests (mm)		
		Boite 01	Boite 02	
T4	85	85	85	00,00
T2	85	85	85	00,00
J8	85	85	85	00,00
FC2	85	85	85	00,00
FC1	85	85	85	00,00
F1	85	85	85	00,00
J7	85	85	85	00,00
J4	85	85	85	00,00
J6	85	85	85	00,00
J5	85	85	85	00,00
T5	85	85	85	00,00
FA	85	85	85	00,00
F3	85	85	85	00,00
FD1	85	85	85	00,00
T1	85	85	85	00,00
FB	85	85	85	00,00
T3	85	85	85	00,00

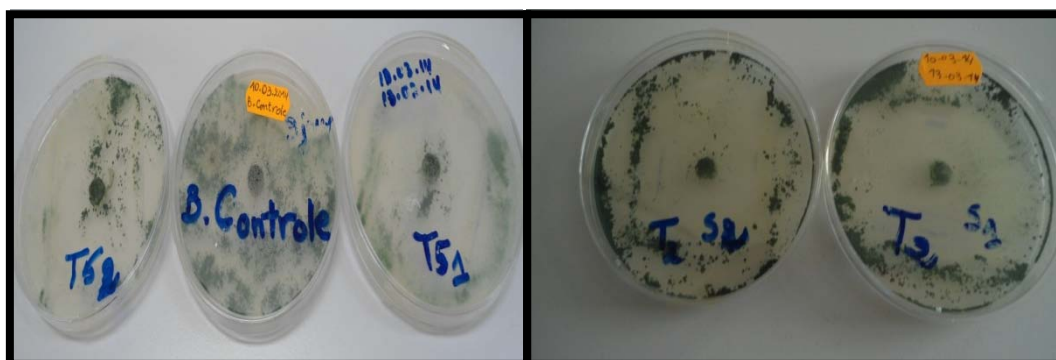


Figure10. Effet antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas spp* fluorescents contre *Verticillium dahliae*.

Les souches appartenant au groupe de *Pseudomonas spp* fluorescents sont connues pour leur aptitude à coloniser les racines des plantes et de réduire l'incidence des maladies racinaires, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes comme, cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores [25]. Cependant, dans notre étude juste une faible diminution de la croissance est enregistrée avec quelques souches ce qui signifie que les métabolites produits par ces souches n'ont pas d'activité inhibitrice contre *Verticillium dahliae*. L'efficacité des bactéries appartenant au groupe de *Pseudomonas spp* fluorescents est observée avec d'autres genre bactériens tels que *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *penicillium sp*,...dans une étude réalisée précédemment, une souche de *Pseudomonas* fluorescentes a montré une activité contre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* et *Aspergillus nidulas*, cependant une absence d'activité est remarquée contre *Verticillium dahliae* [42].

2. Activité antifongique des extraits d'actinomycètes

Les résultats du test d'inhibition de *Verticillium dahliae* par les extraits des souches MR5 et T13 sont résumés dans le tableau 5.

Pour la souche MR5, l'extrait dichlorométhanique possède une activité inhibitrice de champignon comparativement à l'extrait chloroformique qui n'a aucune activité, ce qui signifie que le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction des molécules bioactives contre *Verticillium dahliae* comparativement au chloroforme.

Tableau 4. Pourcentages d'inhibition des extraits de la souche MR5 par les deux solvants diclorométhane et chloroforme.

Extrait	Diamètre de croissance				pourcentage d'inhibition
	Boîtes contrôles (mm)	Boîtes tests (mm)			
		Boîtes 1	Boîtes 2	Boîtes 3	moyenne± écart-type
Extrait dichlorométhanique de MR5	85	45	40	54	45,48 ± 8,34
Extrait chloroformique de MR5	85	85	85	85	00

Les deux extraits de la souche T13 n'ont aucune activité inhibitrice sur la croissance de *Verticillium dahliae*. Ce qui signifie que ces deux solvants sont inefficaces pour l'extraction des molécules bioactives contre *Verticillium dahliae*.

Par définition, un solvant est une substance, liquide à sa température d'utilisation, qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans lui-même se modifier. En réalité, l'affinité des composants bioactifs, tels que les antibiotiques, vis-à-vis les solvants est principalement liés à la nature des solvants eux même, principalement la polarité et la charge ionique [43].

3. L'activité inhibitrice des molécules purifiées par une chromatographie sur couche mince

3.1. Molécules séparées par la chromatographie sur couche mince

L'application de différents systèmes solvant à permet la séparation de différentes molécules en observant les plaques à l'œil nu ou avec une lampe à UV λ ($\lambda = 254$ ou 365 nm) (figure 11). En comparant les résultats des deux longueurs d'ondes, on peut déduire que la longueur d'onde 365 nm permet la meilleur révélation.

La révélation à permet l'observation de différentes taches de couleurs différentes, le nombre de taches ainsi que les rapports frontaux obtenus sont résumés dans le tableau 5.

Par l'utilisation des systèmes 1, 2 et 3 a donnée une mauvaise séparation, où toutes les molécules ont données des taches très proches ou carrément non séparé. Cependant, les systèmes 4 et 5 ont donné des taches bien séparées, en comparant les rapports frontaux des deux systèmes, on peut constatant que le meilleur système de séparation est le système 4.

Tableau 5. La chromatographie en couche mince des extraits

Le système de solvants	L'observation des nombre des taches.		Rapport frontal
	Par la lampe UV	à l'œil nu	
Système1 : 24 ml de chloroforme+ 06ml de méthanol (8/2)	3 taches fluorescentes non séparées	une seule grande tache au sommet de la plaque de couleur jaune.	$*R_f = \frac{8,4}{9} = 0,93$
Système 2 : 27 ml de chloroforme+ 03ml de méthanol (9/1)	une grande tache fluorescente au sommet de la plaque	une grande tache de couleur jaune.	$*R_f = \frac{7,8}{8,5} = 0,91$
Système3 : 18 ml de chloroforme +12ml de méthanol (6/4)	une seule tache fluorescente	une seule tache de couleur jaune.	$*R_f = \frac{7,3}{8,3} = 0,87$
Système 4 : 28,5 ml de chloroforme + 1,5 ml de méthanol (9.5/0.5)	quatre taches fluorescentes	quatre taches bien séparer et à distance différentes, de couleur jaune à orange.	$*R_f :$ $T_1 = \frac{5,5}{8} = 0,68$ $T_2 = \frac{5,7}{8} = 0,71$ $T_3 = \frac{7,2}{8} = 0,9$ $T_4 = \frac{7,7}{8} = 0,96$
Système 5 : 29,25 ml de chloroforme + 0,75 ml de méthanol (9.75/0.25)	Quatre taches bien séparées de couleur jaune.	quatre taches, dont deux taches bien séparer et deux taches très rapprochées de couleur jaune.	$*R_f :$ $T_1 = \frac{4,1}{8} = 0,51$ $T_2 = \frac{4,4}{8} = 0,55$ $T_3 = \frac{4,9}{8} = 0,61$ $T_4 = \frac{5,5}{8} = 0,68$

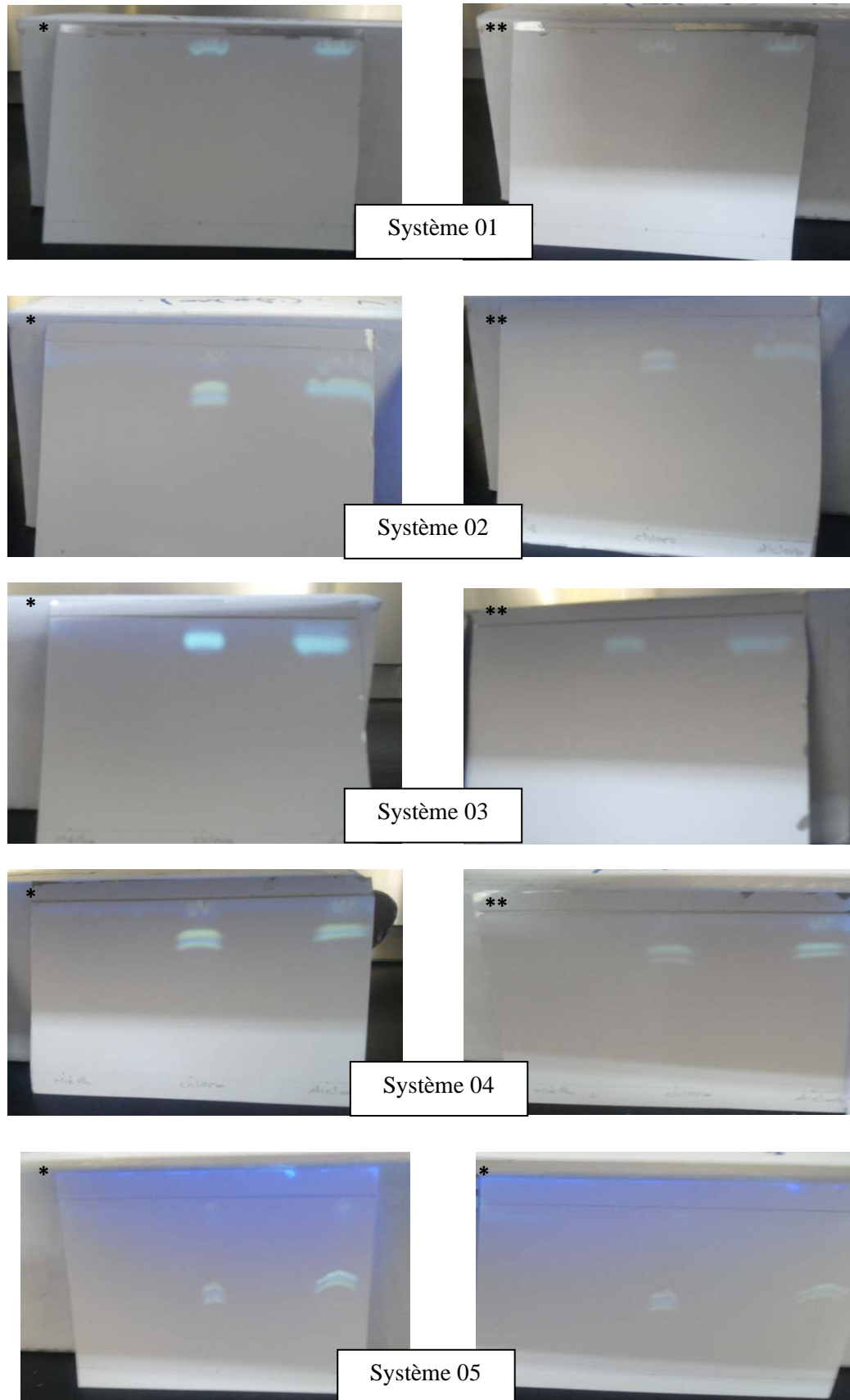


Figure 11. Plaque de chromatographie sur couche mince avec révélation par une lampe à UV. (* $\lambda = 365$ nm. ** $\lambda = 254$ nm).

3.2. Activité inhibitrice des spots obtenus (bio-autographie)

Le système choisi pour réaliser ce test est le système 04. Les spots qui apparaissent sur la plaque CCM sont grattés et déposés à la surface du milieu PDA contenant déjà un cylindre du champignon *Verticillium dahliae* [40]. Après incubation à 37°C pendant 7 jours, l'effet d'antagonisme des spots récupérés contre *Verticillium dahliae* sont résumés dans le tableau 6. D'après ces résultats, aucune activité inhibitrice est enregistrée, cela peut être lié principalement à plusieurs facteurs, tel que, l'inefficacité du système de migration utilisé, la concentration de la molécule active est faible dans les spots récupérés, ou par rapport aux techniques de révélation utilisées, qui peuvent être non efficaces pour la révélation des spots d'intérêt.

Tableau 6. Les pourcentages d'inhibition de *Verticillium dahliae* par bio-autographie.

Diamètre de croissance	Boite contrôle (mm)	Boites tests (mm)			
		Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4
	85	85	85	85	85
pourcentage d'inhibition	00%	00%	00%	00%	00%

4. Etude morphologique des souches d'actinomycètes

D'après l'observation des colonies sous microscope, il apparaît que les deux souches (MR5 et T13) possèdent un mycélium de substrat, et un mycélium aérien ramifié et sporulé.

Les résultats des colorations reflètent la composition chimique de la paroi des bactéries d'une manière générale. Après observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à immersion ($G \times 100$). Il s'est confirmé que les deux souches d'actinomycètes isolées sont des bactéries à Gram positif.

Les caractéristiques morphologiques microscopiques sont largement utilisées pour caractériser les genres d'actinomycètes, l'identification des actinomycètes repose

aussi sur les caractéristiques morphologiques par rapport à la spécificité morphologique observée des différentes souches sur différents milieux de culture [31].

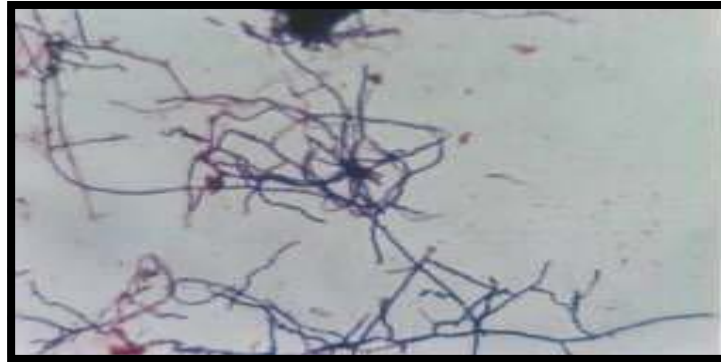


Figure 12. Aspect microscopique de la souche T13 après coloration de Gram (x100).

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Cette étude s'inscrit dans le cadre de test de lutte biologique en étudiant l'inhibition du phytopathogène *Verticillium dahliae* par l'utilisation des souches rhizosphériques, appartenant à deux groupes différents, les actinomycètes filamenteux et les *Pseudomonas spp* fluorescents.

Pour les actinomycètes filamenteux, plus de 50% des souches étudiées possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis *Verticillium dahliae*, dont 5 souches ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, avec un maximum de 63 et 55% pour les souches T13 et MR5 respectivement. L'extraction du principe actif des souches MR5 et T13 par le dichlorométhane et le chloroforme a révélée une activité inhibitrice du champignon juste avec l'extrait dichlorométhanique de la souche MR5, cependant, aucune activité inhibitrice est enregistrée pour les spots séparés par chromatographie en couche mince en utilisant le chloroforme /méthanol comme système de migration. Pour les souches appartenant au groupe de *Pseudomonas spp* fluorescents aucune activité contre *Verticillium dahliae* est observée par la technique des stries sur le milieu PDA, malgré que dans certaines boites une diminution de la croissance mycélienne est observée.

La réalisation de cette étude a permis d'enrichir nos connaissances dans le domaine de la lutte biologique et principalement sur la grande capacité des souches appartenant au groupe des actinomycètes filamenteux dans ce domaine.

Dans le but de progresser dans ce travail il est nécessaire d'élargir le domaine d'étude, en étudiant la capacité des souches isolées à inhiber d'autres microorganismes phytopathogènes, comme il est nécessaire de réaliser d'autres extractions en utilisant d'autres solvants, et de même, il est indispensable d'utiliser d'autres systèmes de migration pour la séparation des molécules bioactives de l'extrait dichlorométhanique de la souche MR5.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **S. Loqman.** 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: isolement, caractérisation de souches de bactéries actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine, L'université de Reims Champagne-Ardenne ,26-96p.
- [2] **A. Yekkour, N. Sabaou, A. Zitouni, R. Errakhi, F. Mathieu, A. Lebrihi.** 2012. Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. Journal Letters in Applied Microbiology, 55 (427), 427p.
- [3] **G. R. Knudsen, L. Dandurand.** 2013. Phytopathologie: l'étude de la Santé des Plantes. Université d'Idaho, 4-5p.
- [4] **L. Aouar.** 2012. Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Université Mentouri-Constantine, 5-25p.
- [5] **S. Smaoui .**2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Université de Toulouse, 18-19p.
- [6] **C. Gratraud, C. pinatel.** 2011. Verticilliose : toujours d'actualité. Journal le nouvel olivier, (79), 19p.
- [7] **A. Martin-Lapierre.** 2011. Application de composts et de fumigants pour lutter contre la verticilliose (*verticillium dahliae*) du fraisier. Université Laval, 5-8p.
- [8] **M. Norini.** 2007. Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP-métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization. Université Henri Poincaré, 32p.
- [9] **B. Soufiane.** 1998. isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Université Laval ,1p.
- [10] **M. C. Girad, C. Water.** 2005. Sol et environnements. Dunod, Paris, 306-317 p.
- [11] **S. Meyer, C. Reeb, R. Bosdeveix.** 2008. Botanique: biologie et physiologie végétales. 2^{em} Edition Maloine, Paris, 328-334 p.
- [12] **J. M. Gobat, M. Aragno, W. Matthez.** 2003. Le sol vivant : Bases de pédologie biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires, Lausan, 568 p.

- [13] **N. Christophe.** 2007. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour les plantes. Ecole Doctorale Ressources, Produits, Procédés, Environnement, 46p.
- [14] **C. Waligora, F. Thomas.** 2010. relations racines et sol. Great Plains France. 21p.
- [15] **J. G. Fuchs, S. A. Biophyt.** 1999. Les produits biologiques: bien les connaître pour mieux les utiliser, 6-7p.
- [16] **C.J. Beauchamp.** 1993. « Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique ». *Phytoprotection*, 1 (74) ,19-27p.
- [17] **R. P. Freitas.** 2012. Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogène. Université Paris Est-Créteil Val De Marne, 19-22 p.
- [18] **N. Nehem.** 2008. Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 43-44 p.
- [19] **M. Barroca.** 2005. Hétérogénéité des relations parasites-oiseaux : importance écologique et rôle évolutif. Université de Bourgogne, 3-4 p.
- [20] **D. Djigal.** 2003. Interactions entre la communauté microbienne du sol (Bactéries et champignons mycorhizes) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Université cheikh antadiop de Dakar ,19-22p.
- [21] **D. G. Strullu, R. Pikrin, C. Planchette, J. Carbaye.** 1989. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Université Lavoisier, 26-27 p.
- [22] **B. Schiffers.** 2001. La lutte biologique et protection intégrée. Université de Gembloux, 20p.
- [23] **A. Adam.** 2008. Elicitation de la résistance systématique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non pathogène. Université de Liège, 7-10 p.
- [24] **N. H. Rabhi.** 2011. Isolement de *Pseudomonas* spp. Fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Université Ferhat Abbas Sétif, 35-46p.

- [25] **M. Allaire.** 2005. diversités fonctionnelles des *pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Université Laval, 6p.
- [26] **S. Mezaache.** 2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas Sétif, 10p.
- [27] **A. Saci.** 2011. Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Université Mentouri, Constantine, 3p.
- [28] **F. Zermane.** 2007. étude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliqués dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composées organiques de synthèse. Université Mentouri Constantine, 28p.
- [29] **J. Pelmont.** 1996. Bactérie et environnement. Printed in France, 96p.
- [30] **L. Aouar.** 2006. Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Université Mentouri Constantine, 6p.
- [31] **R. Kebabi, F. Merouane.** 2010. Identification d'isolats cliniques d'actinomycètes et mise en évidence de leur activité antimicrobienne. Université Mentouri – Constantine, 3-19p.
- [32] **A. Boudemagh.** 2007. Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Université mentouri Constantine ,29p.
- [33] **K. Loucif.** 2010. Recherche de substances antibactériennes à partir d'une Collection des souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Université Mentouri-Constantine ,10p.
- [34] **C. Djaballah.** 2010. Biodiversité des actinomycètes halophiles et haltolerants isole de la sebkha de Ain M'Lila, Université Mentouri – Constantine, 5-48p.
- [35] **M. Kitouni.** 2007. isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrêmes, identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Université Mentouri – Constantine, 15-16p.

- [36] **R. Chelli.** 2010. Etude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes autres que streptomycètes. Université Mentouri Constantine, 33p.
- [37] **E. Boussaber, I. Meftah Kadmiri, L. Hilali, A. Hilali.** 2012. Isolement des Souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques Isolation of actinomycètes strains producing antifungal substances. Science Lib Editions Mersenne. (4), 3p.
- [38] **H. Antoun, L. M. Bordeleau, C. Gagnon, R. A. Lachance.** 1978. Actinomycètes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiologie, (24), 558-562 p.
- [39] **M. S. S. Noori, H. M. Saud.** 2012. Potential plant growth promoting activity of *pseudomonas sp* isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. Journal plant pathologie & microbiologie, 3 (120), 2-3 p.
- [40] **F. Boughachiche.** 2012. Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkha. Université Mentouri-Constantine ,79-92p.
- [41] **S. Guenoune.** 2009. Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch. Université Mentouri Constantine ,28p.
- [42] **A. Bojanowski.** 2011. Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de pseudomonas envers helminthosporium solani, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre. Université Laval ,27-34p.
- [43] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Solvant>.

ANNEXE

Annexe 01. La composition des milieux utilisés**Potato Dextrose Agar (PDA) [39]**

L'extrait de pomme de terre (200g de pomme de terre +1000ml d'eau distillée)
.....200 ml

Glucose.....20g

Agar.....20g

PH = 5,8 à 25°C.

Yeast Malt Extract Agar (YMEA+ CaCO₃) [33]

Extrait de Malt20 g

Glucose..... 5 g

Extrait de levure10 g

CaCO₃.....1g

Agar..... 15 g

Eau distillée..... 1000 ml

PH = 7,3.

RÉSUMÉ

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un test de lutte biologique, il étudie la capacité de certaines souches rhizosphériques à inhiber le phytopathogène *verticillium dahliae*, les souches bactériennes utilisées font partie de deux groupes, 46 souches des actinomycètes filamenteux et 17 souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp* fluorescents.

Les techniques utilisées pour révéler l'activité antifongique, *in vitro*, est la technique des cylindres d'agar sur milieu PDA pour les actinomycètes filamenteux et la technique des stries sur milieu PDA pour les *Pseudomonas spp* fluorescents.

L'extraction par rota-évaporation du principe actif des souches les plus prometteuses (MR5 et T13) est réalisée par le dichlorométhane ou le chloroforme. La révélation de l'activité est réalisée sur milieu PDA. Une séparation des molécules actives est réalisée par une chromatographie en couche mince par le chloroforme/méthanol à différents rapports (8/2, 8.25/0.75, 8.5/1.5, 8.75/1.25, 9/1). La révélation est réalisée à l'œil nu et avec des rayons UV, les spots sont séparés et testés par une bio-autographie directe.

Pour le test d'inhibition, *in vitro*, plus de 50% des souches actinomycètes filamenteux possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis *Verticillium dahliae*, dont 5 souches ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, avec un maximum de 63 et 55% pour les souches T13 et MR5 respectivement. Cependant, aucune activité n'est enregistrée pour les souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp* fluorescents. Juste l'extrait dichlorométhanique est apparu actif contre le phytopathogène, cependant, aucune activité inhibitrice n'est enregistrée pour les spots séparés par chromatographie en couche mince. Ce travail a mis en évidence l'activité inhibitrice des souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux vis-à-vis leurs inhibitions du phytopathogène *Verticillium dahliae*, cependant, il est indispensable de réaliser des extractions avec d'autres solvants et d'utiliser d'autres systèmes de migration pour bien séparer les molécules bioactives, de même, il est nécessaire d'élargir l'étude par des tests contre d'autres phytopathogènes.

Mots clés : Rhizosphère, actinomycètes filamenteux, *Pseudomonas spp* fluorescents, phytopathogène, *Verticillium dahliae*, lutte biologique.

Abstract

The objectives of this study were to evaluate and characterize 17 fluorescent *Pseudomonas* strains and 46 filamentous actinobacteria with antagonistic *in vitro* activities against phytopathogenic fungi *Verticillium dahliae*, and to evaluate the effect of separated molecules with chromatographic bioassay.

The *in vitro* evaluations of the antifungal activity of the rhizospheric strains were studied in the PDA medium with the agar cylinders technique for filamentous actinobacteria and streaks technique for fluorescent *Pseudomonas* strains. The extraction of active molecules of the most promising actinobacteria strains (MR5 et T13) was performed by rota-evaporation by the use of two solvents, dichloromethane and chloroform, the evaluation of the activity of these extracts was performed on PDA medium. The separation of bioactive molecules was performed by a thin layer chromatography with chloroform / methanol as migration system at different ratios (8/2, 8.25/0.75, 8.5/1.5, 8.75/1.25, 9/1). Evaluation of spots obtained was studied by direct bio-autography on PDA medium.

For the *in vitro* inhibition assay, over 50% of filamentous actinobacteria strains possess inhibitory activity against *Verticillium dahliae*, where 5 strains have a percent inhibition greater than 50%, with a maximum of 63 and 55% for strains T13 and MR5 respectively. However, no activity is recorded for fluorescent *Pseudomonas* strains. Just dichloromethane extract appeared active against the phytopathogenic fungi , however, no inhibitory activity is recorded for separated spots by thin layer chromatography. This work demonstrated the inhibitory activity of rhizospheric strains belonging to the groups of filamentous actinobacteria against the phytopathogenic fungi, *Verticillium dahlia* , however, it is essential to perform extractions with other solvents and use of other migration systems for well separated bioactive molecules, so it is necessary to extend the study by testing against other plant pathogens.

Keywords: Rhizosphere, *filamentous actinobacteria*, fluorescent *Pseudomonas*, plant pathogen, *Verticillium dahliae*, biological control.

ملخص

هذا العمل هو جزء من اختبار المكافحة البيولوجية ، يدرس قدرة بعض السلالات الريزوسفيرية على منع مرض النبات *verticilium dahliae*، السلالات البكتيرية المستعملة تنتمي إلى مجموعتين ، 46 سلالة من نوع *actinomycète* و 17 سلالة من *Pseudomonas spp fluorescents* .

التقنيات المستخدمة للكشف عن النشاط المضاد للفطريات في المختبر هي طريقة اسطوانات أقار على وسط PDA من أجل سلالة *Pseudomonas spp fluorescents*. بواسطة جهاز التبخر الدوراني، نزرع العنصر النشط للسلالات الواعدة MR5 و T13 يتم بواسطة ثنائي كلور الميثان أو الكلوروفورم ؛ كشف النشاط يتم بواسطة وسط PDA . يتم الفصل بين الجزيئات النشطة من قبل طبقة رقيقة كروماتوغرافي من طرف الكلوروفورم/ميثانول في مختلف النسب (8/2, 8.25/0.75, 8.5/1.5, 8.75/1.25, 9/1). يتم الكشف بالعين المجردة أو الأشعة فوق البنفسجية، فصل البقع واختبارها بواسطة Bio autographie مباشرة.

من أجل اختبار التثبيط في المختبر، أكثر من 50 % من سلالة *actinomycètes filamenteux* تملك نشاط تثبيطي لـ *verticilium dahliae*، 5 سلالات لديها أكبر من 50% من نسبة التثبيط. بحد أقصى 63 و 55% لسلالات T13 و MR5 على التوالي. في حين لم يتم تسجيل أي نشاط لمجموعة *Pseudomonas spp fluorescents*. فقط خلاصة ثنائي كلور الميثان ظهرت نشيطة ضد مرض النبات ، في حين لم يسجل أي نشاط تثبيطي للبقع المفصولة بالكروماتوغرافي.

أظهر هذا العمل النشاط التثبيطي لسلالات الريزوسفيرية المنتمية إلى مجموعة *actinomycètes filamenteux* ضد مرض النبات *verticilium dahliae*. في حين من الضروري تحقيق النزر باستعمال محاليل أخرى و استخدام أنظمة أخرى للهجرة من أجل فصل جيد للجزيئات الحيوية النشطة، ولذلك فمن الضروري تمديد الدراسة عن طريق اختبار ضد مثبطات الأمراض النباتية الأخرى.

الكلمات المفتاحية: ريزوسفير، *actinomycète filamenteux*، *Pseudomonas spp fluorescents*، ممرض النبات، *verticilium dahliae*، المكافحة البيولوجية.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un test de lutte biologique, il étudie la capacité de certaines souches rhizosphériques à inhiber le phytopathogène *verticillium dahliae*, les souches bactériennes utilisées font partie de deux groupes, 46 souches des actinomycètes filamenteux et 17 souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp* fluorescents.

Les techniques utilisées pour révéler l'activité antifongique, *in vitro*, est la technique des cylindres d'agar sur milieu PDA pour les actinomycètes filamenteux et la technique des stries sur milieu PDA pour les *Pseudomonas spp* fluorescents.

L'extraction par rota-évaporation du principe actif des souches les plus prometteuses (MR5 et T13) est réalisée par le dichlorométhane ou le chloroforme. La révélation de l'activité est réalisée sur milieu PDA. Une séparation des molécules actives est réalisée par une chromatographie en couche mince par le chloroforme/méthanol à différents rapports (8/2, 8.25/0.75, 8.5/1.5, 8.75/1.25, 9/1). La révélation est réalisée à l'œil nu et avec des rayons UV, les spots sont séparés et testés par une bio-autographie directe.

Pour le test d'inhibition, *in vitro*, plus de 50% des souches actinomycètes filamenteux possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis *Verticillium dahliae*, dont 5 souches ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, avec un maximum de 63 et 55% pour les souches T13 et MR5 respectivement. Cependant, aucune activité n'est enregistrée pour les souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp* fluorescents. Juste l'extrait dichlorométhanique est apparu actif contre le phytopathogène, cependant, aucune activité inhibitrice n'est enregistrée pour les spots séparés par chromatographie en couche mince. Ce travail a mis en évidence l'activité inhibitrice des souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux vis-à-vis leurs inhibitions du phytopathogène *Verticillium dahliae*, cependant, il est indispensable de réaliser des extractions avec d'autres solvants et d'utiliser d'autres systèmes de migration pour bien séparer les molécules bioactives, de même, il est nécessaire d'élargir l'étude par des tests contre d'autres phytopathogènes.

Mots clés : Rhizosphère, actinomycètes filamenteux, *Pseudomonas spp* fluorescents, phytopathogène, *Verticillium dahliae*, lutte biologique.