

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث 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 et cellulaire : biologie moléculaire des procaryotes

---

**Thème : Etude de la capacité de quelques isolats rhizosphériques  
à produire des molécules bioactives contre le phytopathogène**

*Fusarium oxysporum*

---

Présenté par :

- BRAGHTA Hamida

- MERABET Hadjer

Devant le jury composé de :

Président : M<sup>me</sup> GRARA Njoud M. C. A Université de Guelma

Examineur : M<sup>me</sup> AMRI Sandra M. A. A Université de Guelma

Encadreur : M<sup>me</sup> KHENAKA Karima M. A. B Université de Guelma

Juin 2014

# Remerciement

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de  
l'université 08 MAI 1945.*

*Que Madame KHENAKA Karima trouve ici l'expression de notre  
très vive reconnaissance pour avoir accepté la responsabilité de ce  
travail.*

*Nous remercions Madame GRARA Njoud et Madame AMRI  
Sandra de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de  
mémoire.*

*Nous tenons à remercier les techniciennes du laboratoire de  
microbiologie Madame MERABTI Hassiba et Madame KARFAF  
Wafa, pour leurs soutiens et leurs aides pendant la réalisation de ce  
travail.*

*Nos remerciements vont également à Monsieur BENOUARETH  
Djamel Eddine (Professeur à l'université de Guelma), à Madame  
AYAD Ryma et à Madame MERABET Rym ainsi qu'à Madame  
KHALLEF Messaouda et Madame BRAIK Asma, pour leur  
encouragement pendant toute l'année.*

*Nous tenons à remercier nos parents de tous les sacrifices qu'ils ont  
consentis pour nous permettre de suivre nos études dans les  
meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de nous  
encourager tout au long de nos années d'étude.*

*Nous remercions nos collègues et nos ami(e)s de la biologie pour les  
bons moments qu'on a passé ensemble.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants. Pour m'avoir toujours écoutée et leurs soutien moral ainsi que leurs précieux conseils toutes ces longues années d'études.*

*A mes chers frères (Abdessalam Ayoub, Mohamed Seddiq) et (Alla Eddine et sa fiancée).*

*A mes très chères sœurs (Fatima Zahra) et son époux (Nabil SOULLAH). (Sarah) et son époux (Mohamed Adel BENSLIMANE) et à ma petite (Yasmine Belkís)*

*A mes pupilles (Anfel, Israe Taline et Dhoïa). Toujours présentes dans mon cœur malgré la distance qui nous sépare.*

*A mes chères amies (HAMLAOUI Hanane, Manel et Widade, ainsi qu'à TABET Sarah) pour bons les moments passés ensemble.*

*Quoique que je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Si je suis arrivé là, c'est bien grâce à ALLAH et à vous, qui vous bénisses et vous protège pour moi, et vous donne longue vie.*

*A tous ceux et celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du bien de près ou de loin.*

*En témoignage de ma profonde affection*

*Hadjer*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes parents pour leur soutien moral et pour toutes les charges assurées durant toutes ces longues années d'études. Que ce travail soit le symbole de ma reconnaissance de leur amour infini.*

*Je dédie également ce mémoire à mes sœurs et mes frères (Soumia, Hind, Hamza et Zine dîne) pour la confiance et l'espoir qu'ils ont mis en moi et pour leur encouragements incessants.*

*Pour les moments extraordinaires passés ensemble je tiens à remercier mes amis et mes collègues (Imen, Sameh, Latifa, Sarah, Fadja, Amel) Pour leur fidèle soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs.*

*A tous ce que j'ai oubliés, mais qui se reconnaîtront ici.*

*Hamida*

*<< La phytopathologie est aux plantes ce que la médecine est à l'homme et la médecine vétérinaire aux animaux. Chacune de ces disciplines étudie les causes, les mécanismes et le contrôle des maladies affectant les organismes auxquelles elles se rapportent. >>*

# Table des matières

Liste de figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale .....	01

## Revue bibliographique

### CHAPITRE I : Propriétés générales de la rhizosphère

1. Définition de la rhizosphère.....	02
2. Rôle de la rhizosphère.....	03
3. La flore de la rhizosphère.....	03
4. Les différentes interactions dans la rhizosphère.....	04
4.1. Les interactions entre les microorganismes.....	05
4.1.1. La symbiose .....	05
4.1.2. L'amensalisme .....	05
4.1.3. Le commensalisme .....	05
4.1.4. Le parasitisme .....	05
4.1.5. L'antagonisme .....	05
4.2. Les interactions plantes-microorganismes.....	06

### CHAPITRE II : Bactéries promotrices de croissance des plantes.

1. Les principaux rôles des bactéries promotrices de croissance des plantes.....	07
2. Les actinomycètes.....	08
2.1. Caractères généraux.....	08
2.2. Morphologie des actinomycètes.....	08
2.3. Physiologie des actinomycètes .....	09
2.4. Diversité métabolique des actinomycètes .....	10
2.5. Structure pariétale des actinomycètes.....	10
2.6. Structure de l'ADN des actinomycètes.....	11
2.7. Rôle des actinomycètes dans le sol et dans la rhizosphère.....	11

2.7.1. La production d'antibiotiques .....	12
2.7.2. La production des phosphates .....	12
2.7.3. La production de phytohormones .....	12
3. Le genre <i>Pseudomonas sp.</i> .....	13
3.1. Caractères généraux .....	13
3.2. Le genre <i>Pseudomonas sp</i> en association avec les plantes.....	14
3.3. Le genre <i>Pseudomonas sp</i> comme promoteur de croissance de plantes.....	15
3.3.1. Inhibition de phytopathogènes .....	15
3.3.2. Solubilisation de phosphate .....	15
3.3.3. La synthèse de phytohormones .....	15
3.3.4. La dénitrification .....	16
3.3.5. La production des sidérophores .....	16

### **CHAPITRE III : Champignons phytopathogènes**

1. Généralités .....	17
2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	17
2.1. Caractères généraux .....	17
2.2. Identification de l'espèce <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
2.3. Cycle de vie de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
2.4. Pouvoir phytopathogène de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	20
2.5. Maladies causées par <i>Fusarium oxysporum</i> .....	20
2.5.1. Flétrissure fusarienne ( <i>Fusarium wilt</i> ) .....	20
2.5.2. Pourriture racinaire ( <i>Fusarium crown and root rot</i> ) .....	21

### **Matériel et méthodes**

1. Matériel biologique et produits chimiques .....	23
2. Etude de l'activité inhibitrice des souches d'actinomycètes.....	23
2.1. Techniques des cylindres d'agar .....	23
2.1.1. Culture des souches testées .....	23
2.1.2. Réalisation du test .....	24
2.2. Techniques des puits .....	24

2.2.1. Préparation des extraits .....	24
2.2.2. Réalisation du test .....	26
2.3. Séparation des molécules bioactives par chromatographie en couche mince .....	26
2.3.1. Préparation du système de migration .....	27
2.3.2. Préparation des plaques CCM .....	27
2.3.3. Test de bio-autographie directe .....	27
3. Etude de l'activité inhibitrice des souches de <i>Pseudomonas sp</i> .....	28
3.1. Purification et conservation des souches.....	28
3.2. Réalisation du test.....	28
3.3. Identification des souches de <i>Pseudomonas sp</i> .....	28
3.3.1. Coloration de Gram .....	29
3.3.2. Recherche de l'oxydase .....	29
3.3.3. Recherche de la catalase .....	29
3.3.4. Identification phénotypique par la galerie Api 20 ne .....	30
4. Analyse statistique .....	31

## **Résultats et discussion**

1. Etude de l'activité inhibitrice des souches d'actinomycète.....	32
1.1. Technique des cylindres d'agar .....	32
1.2. Technique des puits.....	35
1.3. Séparation des molécules bioactives présentes dans les extraits de la souche MR <sub>5</sub> par chromatographie en couche mince .....	37
1.3.1. Activité inhibitrice des composants séparés par CCM (bio-autographie directe) .....	38
2. Etude de l'activité inhibitrice des souches de <i>Pseudomonas sp</i> .....	40
2.1. Technique des stries.....	40
2.2. Identification des souches de <i>Pseudomonas sp</i> .....	43
2.2.1. Coloration de Gram .....	43
2.2.2. Recherche de la catalase .....	43
2.2.3. Recherche de l'oxydase .....	43
2.2.4. L'identification phénotypique par la galerie API20ne .....	44
Conclusion .....	46
Références bibliographiques.....	47

Annexes

Résumé et mots clés

## Liste des figures

N° de Figure	Titre de figure	N ° de page
<b>01</b>	La zone rhizosphérique	02
<b>02</b>	Structure Schématique de la rhizosphère	03
<b>03</b>	Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère	06
<b>04</b>	Principaux groupes d'actinomycètes	09
<b>05</b>	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens associés aux <i>Pseudomonas</i>	13
<b>06</b>	Schéma représentant le cycle de vie du <i>Fusarium oxysporum</i>	19
<b>07</b>	Culture de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA	24
<b>08</b>	Filtration des extraits	25
<b>09</b>	Evaporation des extraits par rotavapeur (R-210 BUCHI)	26
<b>10</b>	Alvéoles remplis avec l'eau du fond de la galerie	30
<b>11</b>	Inoculation de la galerie et mode de remplissage	31
<b>12</b>	Activité inhibitrice des souches d'actinomycètes (MR <sub>5</sub> , C <sub>15</sub> , MR <sub>6</sub> , C <sub>noir</sub> ) par la technique des cylindres d'agar	34
<b>13</b>	Activité inhibitrice des extraits de la souche MR <sub>5</sub>	36

### Liste des figures

<b>N ° de Figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>N ° de page</b>
<b>14</b>	Séparation des extraits de la souche MR <sub>5</sub> par différents systèmes de migration visualisée sous les UV	38
<b>15</b>	Test de bio-autographie directe des différents spots obtenus par le système de migration 9,5 / 0,5	39
<b>16</b>	Test d'inhibition du <i>Fusarium oxysporum</i> par les quatre souches les plus performantes (T <sub>3</sub> , T <sub>2</sub> , J <sub>8</sub> , Fb)	42
<b>17</b>	Coloration de Gram des souches T <sub>2</sub> et T <sub>3</sub>	43

### Liste des tableaux

N ° du tableau	Titre du tableau	N ° de page
<b>I</b>	Effet inhibiteur des souches d'actinomycètes sur la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i>	32-34
<b>II</b>	Effet inhibiteur des extraits de la souche MR <sub>5</sub> sur la croissance mycélienne du <i>Fusarium oxysporum</i>	36
<b>III</b>	Révélation des plaques chromatographiques des extraits de la souche MR <sub>5</sub>	37
<b>IV</b>	Effet inhibiteur des composants séparés par CCM à partir des extraits de la souche MR <sub>5</sub>	40
<b>V</b>	Effets inhibiteurs des souches de <i>Pseudomonas sp</i> sur la croissance mycélienne du <i>Fusarium oxysporum</i>	41-42
<b>VI</b>	Identification des souches testées (T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> ) du genre <i>Pseudomonas</i> par galerie API 20 NE	44

## Liste des abréviations

<b>AIA :</b>	Acide Indole-3-acétique
<b>ACC :</b>	1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate
<b>CCM :</b>	Chromatographie en couche mince
<b>DAP:</b>	Acide 2,6-diaminopimélique
<b>DAPG :</b>	2,4- diacetylphloroglucinol
<b>GC:</b>	Coefficient de Chargaff
<b>HPLC:</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>ISR:</b>	Induced Systemic Resistance
<b>RMN:</b>	Resonance Magnétique Nucléaire
<b>PDA:</b>	Potato Dextrose Agar
<b>PGPR:</b>	Plant growth-promoting rhizobacteria.
<b>YMEA:</b>	Malt Yeast Extract Agar

*Revue*  
*bibliographique*

# *Introducción*

## INTRODUCTION

*Fusarium oxysporum* est un champignon d'origine tellurique très ubiquiste dans tous les types de sols, qui présente une très grande diversité génétique et écologique et qui a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées d'intérêt économique tel que les cultures maraichères, précisément les tomates (Si mohammed, 2009). Comme d'autres agresseurs phytopathogènes, plusieurs fongicides sont utilisés pour leur suppression, cependant, l'abondante utilisation de la lutte chimique en agriculture provoque des changements négatifs sur la composition de la flore bénéfique du sol, de même, plusieurs études ont montré les effets de l'utilisation de différents pesticides sur la santé humaine. De ce fait, plusieurs études à travers le monde sont consacrées à la recherche des autres alternatives moins dangereuses pour l'homme et l'environnement. La lutte biologique est l'une des méthodes les plus prometteuse dans ce domaine, principalement par l'utilisation des rhizobactéries promotrices de croissance de plantes et qui en parallèle protègent les plantes soit, directement par la suppression du bio-agresseur, ou indirectement pas des effets compétitifs. Ce groupe de bactérie colonise la rhizosphère et un grand nombre d'entre eux sont capables de réaliser des relations symbiotiques avec les plantes. Parmi les rhizobactéries les plus connues et les plus actives, elle figure les bactéries appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et les différentes souches du genre *Pseudomonas sp.*

Les actinomycètes rhizosphériques sont parmi les candidats les plus prometteuses pour une utilisation en lutte biologique, où environ 60 % des antifongiques naturels développés en agriculture ont pour origine des actinomycètes du genre *Streptomyces sp* (Smaoui, 2010).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas spp.* fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60 % de la microflore bactérienne totale du sol. D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Mezaache, 2012).

L'objectif assigné à ce travail est l'étude, *in vitro*, de l'activité inhibitrice de *Fusarium oxysporum* par des souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas spp.* fluorescents, ainsi que la séparation des molécules bioactives des souches les plus prometteuses des actinomycètes et l'identification phénotypique des souches des *Pseudomonas sp* par galerie api 20 ne.

*Chapitre I :*  
*Propriétés générales de la*  
*rhizosphère*

### 1. Définition de la rhizosphère

D'une manière pratique, le terme rhizosphère désigne le sol restant attaché aux racines quand on déterre une plante (figure 01), ce volume de sol est variable selon le développement racinaire, en effet, il représente entre 0,1 et 01% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des sols des prairies (Bazot, 2005).

Du point de vue composition, la rhizosphère représente un milieu complexe et hétérogène, où les exsudats racinaires des plantes permettent le développement d'une flore microbienne particulière, ce qui conduit à des propriétés structurales (porosité-agrégation) et physico-chimiques (pH, O<sub>2</sub>, minéraux, potentiel hydrique) singulières (Bazot, 2005).



**Figure 01.** La zone rhizosphérique [1].

Par rapport au voisinage des racines, la rhizosphère peut être divisée à trois zones distinctes (figure 02) (David et McNear, 2013).

- **L'endorhizosphère**

Comprend des parties du cortex et l'endoderme dans lesquelles les microbes et les cations peuvent occuper l'espace libre entre les cellules (espace apoplastique), de ce fait, le contact entre la plante et les microorganismes aura lieu à l'intérieur des racines (David et McNear, 2013).

- **Le rhizoplan**

Il représente la zone médiane directement adjacente à la racine, y compris l'épiderme racinaire et le mucilage (David et McNear, 2013).

### • L'ectorhizosphère

Il représente la zone extérieure qui se trouve directement après le rhizoplan (David et McNear, 2013).

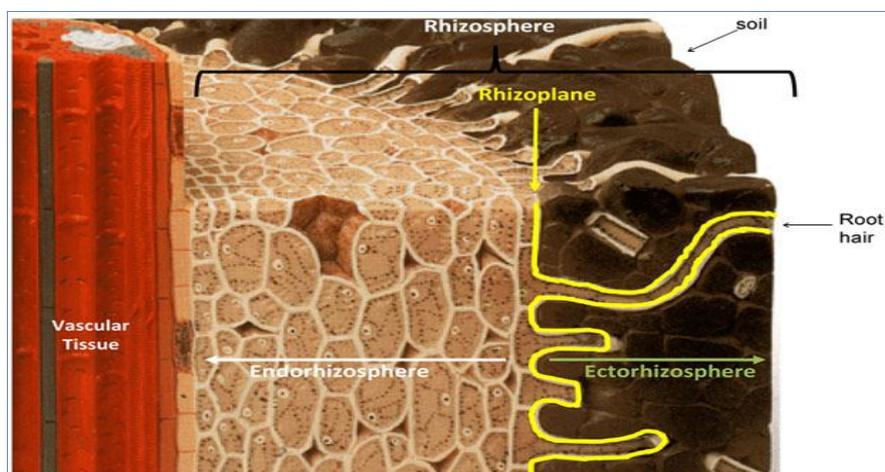


Figure 02. Structure Schématique de la rhizosphère (David et McNear, 2013).

## 2. Rôle de la rhizosphère

La rhizosphère est le siège d'intenses activités biologiques et de processus physico-chimiques (Bravin, 2008) :

- C'est une zone de vie, où les exsudats racinaires permettent le développement d'une faune et d'une flore spécifiques ;
- Les exsudats racinaires permettent le développement d'une flore symbiotique qui assure une bonne croissance aux plantes, en produisant de substances bénéfiques à la croissance comme les phytohormones et des antibiotiques assurant la protection contre des phytopathogènes ;
- C'est une niche écologique qui éveille et stimule diverses activités microbiennes, en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, le phosphore, le fer, etc. (De Carné-Carnalet, 2010).

## 3. La flore de la rhizosphère

La flore désigne l'ensemble des espèces végétales ou microbiennes présentes dans un espace géographique ou un écosystème déterminé [1].

## CHAPITRE I : Propriétés générales de la rhizosphère

La flore rhizosphérique est constituée principalement d'une microflore très hétérogène, en fait, plusieurs études ont montré une densité et une activité microbienne très intense à proximité des racines de plantes, cette microflore se compose majoritairement des bactéries, des actinomycètes et des champignons [1].

La composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante, car cette composition est favorisée par les exsudats racinaires, qui diffèrent selon les familles et les espèces des plantes (Aouar (a), 2013). Elle est constituée d'un grand nombre d'espèce qui sont parfois difficiles à observer et surtout à isoler.

- **Les bactéries** : elles sont extrêmement nombreuses et elles ont un rôle très important dans la lyse des polymères végétaux (cellulose, lignine) et dans la dégradation et la fixation des éléments minéraux (fixation de l'azote) (Coineau, 1995).
- **Les actinomycètes** : ce sont des bactéries filamenteuses, et qui participent principalement dans la protection des plantes contre les différents agresseurs (Coineau, 1995).
- **Les champignons** : ce trouvent sous la forme des moisissures qui participent dans la décomposition des débris organiques, de mêmes, il y a certains champignons qui sont capables de construire des relations symbiotiques avec les racines de plantes (mycorhizes) qui ont un rôle complexe dans les échanges nutritifs entre la plante et le milieu (Coineau, 1995).

### 4. Les différentes interactions dans la rhizosphère

Il existe différentes interactions dans la rhizosphère (symbiose, parasitisme, compétition, prédation), qui constituent le moteur des différents processus qui se déroulent entre les microorganismes et les plantes (Djigal, 2003).

En effet, les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés structurales, propres à la rhizosphère, résultent d'interactions qui ont lieu entre la plante, le sol et les microorganismes. Les processus racinaires impliqués dans ces interactions sont entre autres la rhizodéposition, la respiration de la racine, l'absorption d'eau et des nutriments (Bazot, 2005).

### 4.1. Les interactions entre les microorganismes

#### 4.1.1. La symbiose

D'une manière générale, la symbiose est une relation permanente entre deux organismes d'espèces différentes et qui se traduit par des effets bénéfiques aussi bien pour l'un que pour l'autre. L'exemple le plus représentant sur cette relation entre les bactéries et les plantes c'est la nodosité racinaire, les bactéries vivent à l'intérieur des cellules corticales où ils forment des nodules caractéristiques. Compte tenu de leur capacité à fixer l'azote et de le fournir sous forme réduite de  $\text{NH}_4^+$  à la plante-hôte, cette symbiose a une grande importance pratique [2].

En réalité la symbiose entre les microorganismes et les plantes peut être divisée en deux groupes [3] :

- **L'ectosymbiose** : le symbiote (le microorganisme) vit à la surface de l'hôte (la plante).
- **L'endosymbiose** : le symbiote est situé dans l'espace intercellulaire, intracellulaire, intra vacuolaire ou libre dans le cytoplasme des cellules de la plante.

#### 4.1.2. L'amensalisme

C'est une interaction biologique entre deux espèces dans laquelle une espèce inhibe le développement de l'autre [3].

#### 4.1.3. Le commensalisme

Le commensalisme est un type d'interaction biologique naturelle entre deux êtres vivants dans laquelle l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal, et il n'obtient en revanche aucune contrepartie évidente de ce dernier (le bénéfice de cette relation n'est pas réciproque) [3].

#### 4.1.4. Le parasitisme

C'est une relation biologique symbiotique dont un des protagonistes (le parasite) tire profit (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) aux dépens d'un hôte. Les organismes qui ne sont pas des parasites sont qualifiés de « libres » [3].

#### 4.1.5. 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.

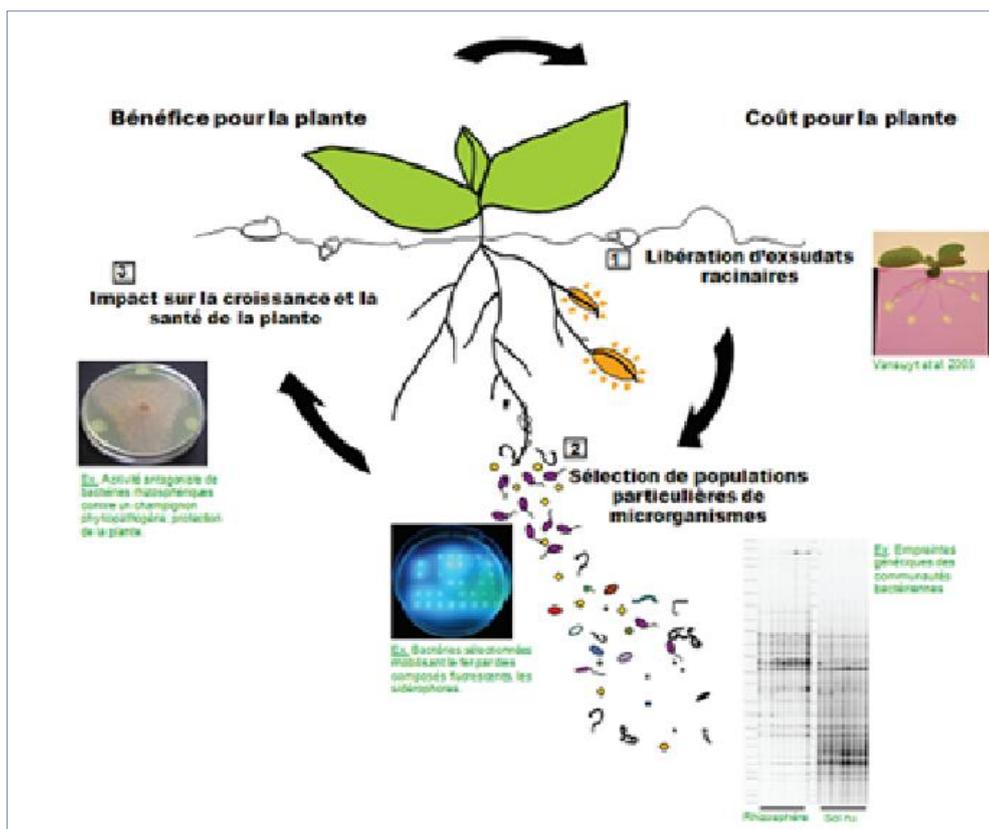
## CHAPITRE I : Propriétés générales de la rhizosphère

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition (soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux), un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose (Lemanceau *et al.*, 2007).

### 4.2. Les interactions plantes-microorganismes

L'ensemble de ces exemples illustre la boucle de rétroaction à laquelle peuvent être assimilées les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2007). Cette boucle de rétroaction schématisée sur la figure 03 :

- La libération d'exsudats racinaires (1) ;
- Ces exsudats favorisent des populations microbiennes particulières au sein de la communauté tellurique (2) ;
- En retour, certaines de ces populations favorisent la croissance (exemple présenté : nutrition en fer) et la protection (exemple présenté : antagonisme microbien) de la plante-hôte (3) ; ces effets bénéfiques compensent le coût représenté par les exsudats racinaires pour la plante.



**Figure 03.** Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Aouar (a), 2013).

*Chapitre II :*  
*Bactéries promotrices de la*  
*croissance des plantes*

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries que vivent dans le sol et précisément dans la rhizosphère des plantes [4]. Certaines bactéries de la rhizosphère (exemple de *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Enterobacter*) exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes en stimulant des mécanismes de défense inductibles chez l'hôte, rendant celle-ci moins susceptible vis-à-vis d'une infection ultérieure par un agent pathogène. Ce phénomène appelé résistance systémique induite (ISR) a été mis en évidence chez plusieurs plantes pour lutter contre une gamme relativement large de pathogènes fongiques, bactériens ou viraux (Adam, 2008).

### 1. Les principaux rôles des bactéries promotrices de croissance des plantes

Les échanges dans la rhizosphère entre microorganismes et plantes ont permis le développement et l'apparition de plusieurs effets bénéfiques [4], tels que :

- **La fixation de l'azote**

L'exemple le plus représentatif c'est la nodulation chez les légumineuses qui est favorisée par des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium sp*) et de même, d'autres microorganismes sont dits (fixateurs libres ou fixateurs non symbiotiques) capables de fixer librement l'azote ce qui le rend indirectement disponible pour les plantes [4].

- **Aide à la nodulation**

En fait, le processus de nodulation est assez complexe et nécessite de nombreuses hormones et des enzymes produites par une grande variété de microorganismes du sol [4].

- **La production d'hormones**

Les hormones de croissance des plantes ou phytohormones, produites par les bactéries comprennent les auxines, gibbérellines, cytokinines, ces hormones participent directement dans la bonne croissance des plantes [4].

- **L'absorption des éléments nutritifs**

Les PGPR peuvent améliorer la disponibilité des éléments nutritifs dans le sol en permettant aux nutriments d'être absorbés et utilisés plus efficacement par les plantes [4].

- **La production des sidérophores**

Les sidérophores sont de petites molécules peuvent lier au fer disponible dans le sol, ces chélateurs peuvent exercer une action inhibitrice sur la flore pathogène, en diminuant la disponibilité du fer dans le sol [4].

- **La lutte biologique**

Les PGPR sont capables de protéger les plantes contre différents agresseurs. Cette efficacité est notamment liée à leur la capacité à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes en produisant ainsi différents métabolites qui peuvent inhiber le développement des phytopathogènes [4].

## **2. Les actinomycètes**

### **2.1. Caractères généraux**

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif avec un coefficient de Chargaff (%GC) élevé, saprophytes, largement distribuées dans le sol et dans l'eau, comme ils montrent une diversité chimique et morphologique marquée (Kerbab, 2010).

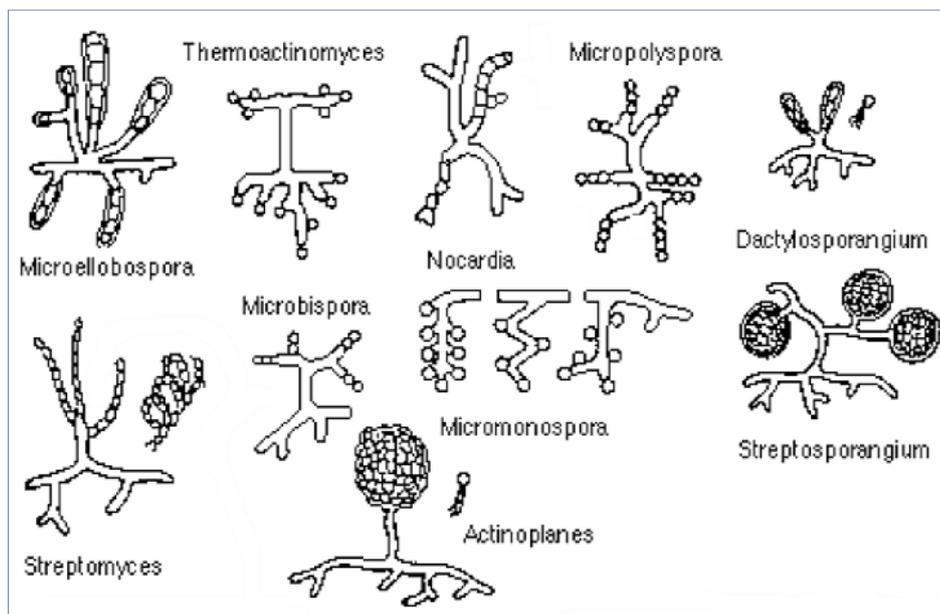
Bien que les actinomycètes soient des microorganismes procaryotes, leur morphologie ressemble fortement à celle des micro-organismes eucaryotes principalement les champignons filamenteux (Kerbab, 2010).

### **2.2. Morphologie des actinomycètes**

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridée, etc (figure 04). Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires (Boudemech, 2007).

Les colonies qu'elles se forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies

est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc (Boudemech, 2007).



**Figure 04.** Principaux groupes d'actinomycètes (Kerbab, 2010).

### 2.3. Physiologie des actinomycètes

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes, leur présence est significativement influencée par des conditions environnementales tels que : l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (Djaballah, 2010).

- **Le taux d'humidité**

En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Djaballah, 2010).

- **La température**

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50° et 60°C (Djaballah, 2010).

- **Le pH**

La plupart des actinomycètes du sol sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (Djaballah, 2010).

- **Rapport avec l'oxygène**

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies strict comme le cas du genre *Actinomyces* (Djaballah, 2010).

### 2.4. Diversité métabolique des actinomycètes

C'est grâce à leur diversité métabolique, c'est-à-dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. D'ailleurs, grâce à cette diversité métabolique, les actinomycètes jouent un rôle extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par la fertilisation du sol (Djaballah, 2010).

Ainsi, il a été prouvé que les actinomycètes dégradent de manière intensive la chitine qui rentre dans la constitution de la paroi des moisissures et la carapace des arthropodes. En outre, certains dégradent activement les pesticides tels que certaines souches du genre de *Streptomyces sp* (Djaballah, 2010).

### 2.5. Structure pariétale des actinomycètes

Les parois cellulaires des actinomycètes sont extraordinairement variées, cependant parmi les groupes, les parois ont souvent une composition constante conférant un rôle majeur dans la taxonomie de ces bactéries. L'étude de la paroi cellulaire des actinomycètes, montre qu'elle ne renferme ni chitine ni cellulose elle est composée soit de :

-Glycoprotéine contenant de la lysine (ce type de paroi est rencontré chez la forme fermentative) (Boudemech, 2007).

-Glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide diaminopimélique (DAP), ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives. Les chaînes des glycanes sont reliées entre elles par des sub-unités peptidiques dont la composition en acides aminés ainsi que les liaisons entre

ces derniers sont variables, ce qui explique l'existence de différents peptidoglycanes chez les actinomycètes (Boudemech, 2007).

### 2.6. Structure de l'ADN des actinomycètes

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 répliation de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales 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. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir 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 (Boudemech, 2007).

### 2.7. Rôle des actinomycètes dans le sol et dans la rhizosphère

Dans le sol, la densité des actinomycètes, essentiellement représentés par les genres *Nocardia* et *Streptomyces*, est en général 3 à 15 fois plus faible que celle des bactéries non filamenteuses et varie entre  $10^5$  et  $10^8$  unités /g de sol. Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroît dans les sols submergés. Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les autres bactéries, et à produire des substances probiotiques et antibiotiques. Les premiers stades de la dégradation de la matière organique sont le fait de bactéries et de champignons. Les actinomycètes ne se développent pas durant ces premiers stades en raison de leur inaptitude à la compétition, par contre, ils se développent relativement bien sur une matière organique partiellement dégradée et inapte à porter une microflore fongique et bactérienne (Colin et Pussemier, 1984).

Dans la rhizosphère, les actinomycètes filamenteux jouent aussi un rôle capital dans la croissance de plusieurs plantes, en fait, ces bactéries sont capables de produire plusieurs substances qui ont une relation directe avec la croissance de plantes, tels que les phytohormones de type auxines, gibbérellines, etc. De même, les actinomycètes sont capables de protéger les plantes grâce à leur capacité à produire différents types de

substances antimicrobiennes assurant ainsi une protection contre différentes maladies phytopathogènes.

### 2.7.1. La production d'antibiotiques

Parmi tous les microorganismes qui existent dans le sol, les actinomycètes sont le groupe le plus connu pour son production des antibiotiques, dont 75% de ces molécules actives sont produites par les différentes espèces de *Streptomyces sp* (Colin et Pussemier, 1984).

Les antibiotiques des actinomycètes sont utilisés dans plusieurs pathologies humaines et animales et même dans le traitement de certaines maladies des plantes, à titre d'exemple, La blasticidine, qui est active contre *Piricularia oryzae*, un pathogène du riz (Colin et Pussemier, 1984).

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 et des enzymes hydrolytiques, cependant, le rôle de ces composés est plus prononcé quand les souches productrices sont en contact direct avec la plante cible (Colin et Pussemier, 1984).

### 2.7.2. La solubilisation des phosphates

Généralement, le contenu de phosphore dans le sol est de 0,05%, cependant seule une très faible proportion des phosphates est disponible aux plantes, la majeure partie est complexée par l'aluminium, le calcium et le magnésium. Malgré qu'il n'est pas requis en grande quantité mais il représente un facteur important et même limitant de la croissance des plantes. Dans le sol, ce substrat est susceptible d'être solubilisé par l'action de microorganismes. La littérature décrit que plusieurs souches d'actinomycètes est capables de solubiliser le phosphate et de le rendre disponible à la plantes (Colin et Pussemier, 1984).

### 2.7.3. La production de phytohormones

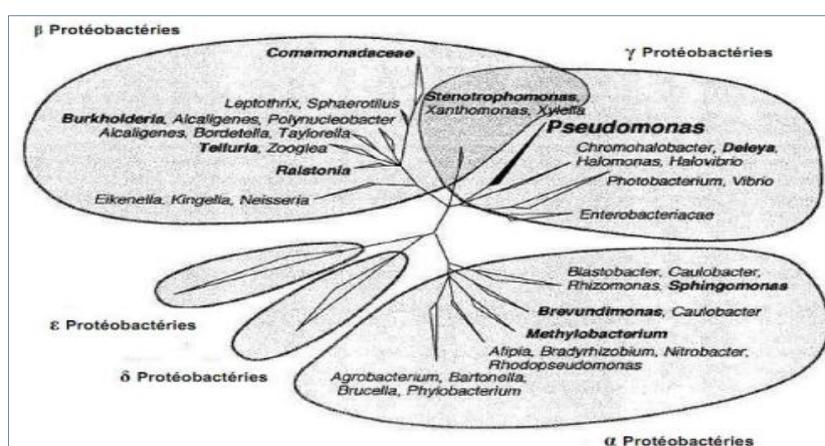
Les phytohormones sont de petites molécules régulatrices de la croissance végétale qui régissent la croissance et le développement en agissant sur la division, l'élongation et la différenciation cellulaires, la régulation de l'activité enzymatique et l'induction de la germination des racines. Les auxines sont un groupe qui a la capacité d'améliorer la

croissance des plantes en stimulant l'élongation des cellules, l'initiation des racines, la germination des graines et la croissance des semis. En utilisant les exsudats racinaires de plantes, les actinomycètes rhizosphériques sont capables de synthétiser plusieurs phytohormones participant à la bonne croissance des plantes (Colin et Pussemier, 1984).

### 3. Le genre *Pseudomonas* sp

#### 3.1. Caractères généraux

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sp sont ubiquistes et appartiennent aux  $\gamma$ -protéobactéries (figure 05).



**Figure 05.** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens associés aux *Pseudomonas* (Mezaache, 2012).

Le genre *Pseudomonas* de la famille des *Pseudomonaceae* comprend une soixantaine d'espèces pouvant répondre aux caractères suivants [5,6] :

- Bacilles à Gram négatif, de 0,5 à 1,0  $\mu\text{m}$  de longueur ;
- Aérobies à métabolisme strictement respiratoire ;
- Capables de se multiplier sur milieux usuels peptonés ;
- Mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*) ;
- Odeur caractéristique des cultures et présence de pigments ;
- Capables de produire l'oxydase et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons ;
- La dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose) ;
- La capacité à croître à des températures extrêmes (4 °C ou 41 °C), permet de caractériser certaines espèces.

Comme il a été cité ci-dessus, les espèces du genre *Pseudomonas sp* peuvent produire des pigments hydrosolubles diffusant dans les milieux de culture. La présence ou l'absence d'un pigment fluorescent (pyoverdine) permet de séparer les espèces du genre en deux groupes, les *Pseudomonas* « fluorescents » (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) et les *Pseudomonas* non-fluorescents (*P. stutzeri*). La pyoverdine est un pigment de couleur jaune-verte, soluble dans l'eau. Sa synthèse dépend de la concentration en ions  $Fe^{2+}$ , dans les milieux carencés en fer sa production est abondante, de ce fait, le milieu B de King et la gélose cétrimide (milieu sélectif des *Pseudomonas*) favorisent la production de pyoverdine [6].

### 3.2. Le genre *Pseudomonas sp* en association avec les plantes

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *Pseudomonas syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (Mezaacche, 2012). Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet promoteur de croissance qui promouvaient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et elles sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires. Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques. En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des antifongiques tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4- diacetylphloroglucinol) qui sont les antifongiques les plus fréquemment détectés. Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines, ces derniers molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux, en réalité, elles élicitent les réactions de défenses des plantes et, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (Mezaacche, 2012).

### 3.3. Le genre *Pseudomonas sp* comme promoteur de croissance de plantes

#### 3.3.1. Inhibition de phytopathogènes

De nombreuses souches de bactéries de *Pseudomonas sp* sont capables de supprimer une gamme de maladies comme les fontes de semis, les pourritures de racines et les fusarioses causées par des champignons telluriques pathogènes des plantes comme *Fusarium oxysporum* [7].

De nombreuses souches de *Pseudomonas sp* sont des agents potentiels de lutte biologique en raison de leur capacité de biosynthèse de métabolites antimicrobiens ayant un effet inhibiteur direct sur le développement des champignons phytopathogènes [7].

#### 3.3.2. Solubilisation de phosphate

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes. Les espèces de *Pseudomonas sp* comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate [7].

#### 3.3.3. La synthèse de phytohormones

- **Acide Indole-3-acétique (AIA)**

Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines, et de leurs élargissements. Communément produite par les rhizobactéries. Les bactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines, cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. Patten et Glick (2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *P. putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire [7].

- **Cytokinines**

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent les divisions cellulaires, l'élargissement et le développement des tissus. Ce sont des signaux impliqués dans la médiation du stress environnemental des racines vers les parties supérieures de la plante. La production de cytokinines a été rapportée chez *P. fluorescens* [7].

- **La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

L'éthylène est la seule phytohormone gazeuse. Il est connu pour être l'hormone des blessures, parce que sa production dans la plante peut être induite par n'importe quelle perturbation physique ou chimique des tissus. Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick *et al* (1998) ont émis, une théorie selon laquelle le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une AAC-désaminase. Cette enzyme clive l'AAC précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements [7].

Les *Pseudomonas sp* sont des producteurs d'AAC-désaminase, en stimulant l'élongation des racines, cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations, ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds [7].

### 3.3.4. La dénitrification

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. La dénitrification est composée de quatre réactions par lesquelles les nitrates sont réduits en di-nitrogène ( $N_2$ ), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas sp* sont les dénitrifiant les plus communs des sols des régions tempérées. Ils sont capables de s'adapter au manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons. La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches de *Pseudomonas sp* dans le sol [7].

### 3.3.5. La production des sidérophores

La majorité des espèces de *Pseudomonas sp* produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes  $Fe^{3+}$  [8].

Les sidérophores jaunes-verts sont nommés « properdines » ou « pseudobactines » [2]. A côté de la pyoverdine, *P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le  $Fe^{3+}$ . D'autres espèces produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (Mezaache, 2012).

*Chapitre III :*  
*Champignons phytopathogènes*

### 1. Généralités

La phytopathologie se définit comme étant l'étude des micro-organismes et des facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, des mécanismes par lesquels ces différents éléments agissent et des méthodes de prévention ou de contrôle des maladies. Les maladies des plantes sont divisées généralement en deux classes (Knudsen et Dandurand, 2013) :

- Des maladies physiologiques : elles sont dues principalement aux conditions environnementales non favorables à la croissance de plantes, tels que le manque de substances nutritives, l'inondation, etc.
- Des maladies infectieuses : elles sont dues à l'infection par des organismes pathogènes comme : les champignons, les bactéries, les virus, les nématodes, etc.

Les maladies dues aux champignons sont très répandues et leur émergence cause des dégâts graves chaque année. En effet, Il existe deux types de champignons pathogènes de plantes, les pathogènes virulents qui causent des maladies sévères et les non agressifs qui causent des symptômes légers. On distingue aussi les champignons biotrophes qui peuvent vivre sur la plante lorsqu'elle est en vie et les champignons nécrotrophes qui tuent leur hôte et se nourrissent des matières mortes, comme par exemple : *Botrytis cinerea*. Enfin les biotrophes obligatoires ont besoin de garder la plante en vie pour poursuivre l'infection. Ces derniers ne sont généralement pas capables de pousser sans leur hôte ce qui complique leur étude au niveau moléculaire [9].

### 2. *Fusarium oxysporum*

#### 2.1. Caractères généraux

*Fusarium oxysporum*, est un champignon d'origine tellurique très ubiquiste, et le plus agressif causant des flétrissements et des pourritures racinaires de plusieurs espèces végétales cultivées d'intérêt économique (Hibar *et al* (a), 2007).

En effet certaines souches de *F. oxysporum* dites pathogènes engendrent des fusarioses sur les plantes hôtes (Hibar *et al* (a), 2007) et comme une grave pathogène émergent de l'homme en raison du nombre croissant de cas graves rapportés et à sa large résistance aux médicaments antifongiques disponibles (Ito *et al.*, 2007). Deux formes spéciales sont inféodées à la tomate :

### CHAPITRE III : Champignons phytopathogènes

*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* qui provoque des trachéomycoses, alors que *Fusarium oxysporum f.sp radialis lycopersici* engendre des nécroses racinaires. Dans les deux cas, la fusariose se traduit par un flétrissement de la plante pouvant aller jusqu'au dessèchement des feuilles.

#### 2.2. Identification de l'espèce *Fusarium oxysporum*

L'identification est assez difficile, elle est basée sur la morphologie des spores asexuées.

- **Microconidies**

*F. oxysporum* est caractérisé par la présence abondante de microconidies fusiformes à réniformes, présentant 0 à 2 septa, agglomérés en fausses têtes produites par de petits phialides (5-12 x 2,2-3,5µm).

Des observations microscopiques ont montrées qu'une population de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* est constituée de plusieurs propagules dont les microconidies à elles seules constituent plus de 90% de cette population (Si Mohammed, 2009).

- **Macroconidies**

Légèrement arquées, présentant 3 à 4 septa, la cellule basale pédicellée, la cellule apicale en crochet, produite par des phialides sur des conidiophores ramifiés ou en sporodochie (27-46 x 3-4,5 µm) (Si Mohammed., 2009).

- **Chlamydospores**

Hyalines, lisses ou rugueuses, globuleuses, terminales ou intercalaires (5-15µm de diamètre).

Les chlamydospores sont des organes de conservation, résultant de l'accumulation de réserves dans une région qui se dilate quelque peu et s'entoure finalement d'une membrane épaisse de teinte généralement foncée. Après trois semaines de culture, de nombreuses chlamydospores intercalaires apparaissent sur le mycélium (Knudsen et Dandurand, 2013)

#### 2.3. Cycle de vie de *Fusarium oxysporum*

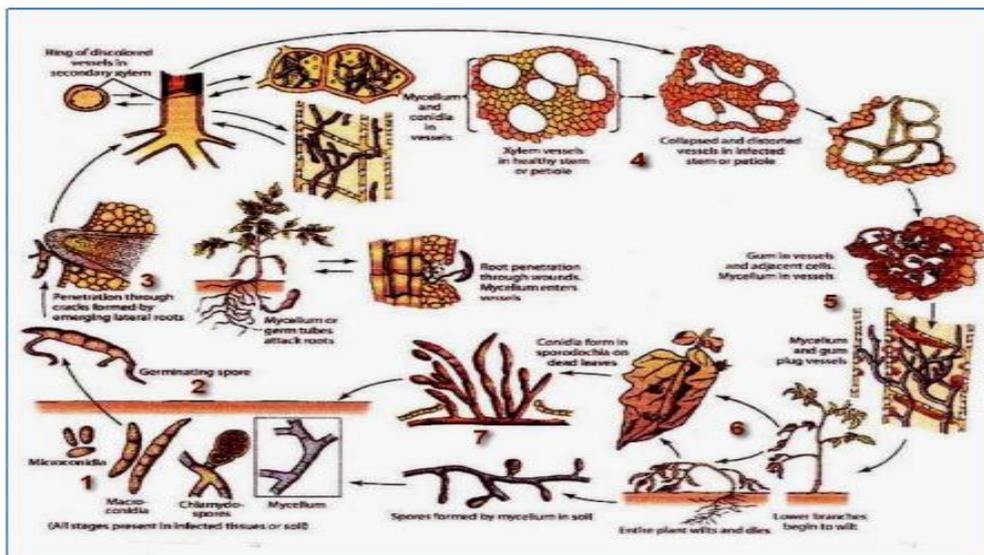
Les *F. oxysporum* ne sont pas des parasites obligatoires, en absence de la plante hôte, ils mènent une vie de saprophyte sur des débris végétaux et des matières organiques, ces champignons persistent dans le sol principalement sous forme de spores de résistance (chlamydospores) en état de dormance.

### CHAPITRE III : Champignons phytopathogènes

En contact de l'hôte et une fois les conditions favorables, les chlamydospores germent et les jeunes filaments pénètrent au niveau des racines, après pénétration dans la cellule épidermique, le mycélium se ramifie, colonisent ainsi toutes les cellules avoisinantes. Les hyphes mycéliens progressent à l'intérieur des cellules puis colonisent le cortex, arrivé au niveau du cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème d'où il se propagera dans la tige par l'intermédiaire des microconidies aisément véhiculées par la sève dans toutes les parties de la plante, ensuite, à la surface des feuilles, se forment des organes fructifères appelés sporodochies qui produisent des macroconidies qui vont à leur tour contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes (Karkachi, 2013).

En général, le cycle de vie de *Fusarium oxysporum* peut être résumé dans les étapes suivantes (figure 06) :

- 1- Conidies, chlamydospores ou mycélium vivant dans le sol ;
- 2- Germination des spores ;
- 3- Pénétration du tube germinatif à l'intérieur des racines ;
- 4- Invasion des vaisseaux par les conidies et/ou mycélium ;
- 5- Production de gomme à l'intérieur des vaisseaux ;
- 6- Flétrissement et mort de la plante ;
- 7- Sporodochies ou mycélium produisant des conidies (Karkachi, 2013).



**Figure 06.** Schéma représentant le cycle de vie du *Fusarium oxysporum* (Karkachi, 2013).

### 2.4. Pouvoir phytopathogène de *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées, d'intérêt économique. En effet, certaines souches de *F. oxysporum* sont dites pathogènes et engendrent des fusarioses (trachéomyose, nécrose, fonte de semis) sur des plantes hôtes. Ces souches pathogènes ont une grande spécificité d'hôte et sont ainsi regroupées en formes spéciales (Karkachi, 2013).

Les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* s'attaquent à la plupart des plantes cultivées mono et dicotylédones. Cependant, certaines formes spéciales ne présentent plus de réel problème agronomique, c'est le cas de la forme spéciale *lycopersici*, pour laquelle la plupart des variétés de tomate cultivées sont résistantes, malgré que des variétés sensibles sont toujours cultivées dans de nombreux pays, notamment en Afrique du Nord comme l'Algérie où, pour des raisons économiques, en parallèles, il existe toujours des problèmes causés par *F.oxysporum f.sp radidis lycopersici*, responsable de pourriture racinaire sur la tomate dans de nombreux pays du bassin méditerranéen (Si Mohammed., 2009).

Dans la littérature, trois races de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ont été rapportées, elles se distinguent entre elles par leur degré de virulence vis-à-vis des cultivars de tomate contenant un seul gène de résistance.

**La race 1**, la plus cosmopolite a été initialement décrite en 1886 ;

**La race 2**, a été d'abord découverte en 1945 à Ohio ;

**La race 3**, a été observée en Australie en 1978 et a été successivement rapportée aux Etats unis : en Californie, Floride, Géorgie, Arkansas et Nord Carolina et au Tennessee. Elle a également été retrouvée au Mexique. Actuellement, peu de cultivars résistants à la race 3 sont commercialisés (Si Mohammed, 2009).

### 2.5. Maladies causées par *Fusarium oxysporum*

#### 2.5.1. Flétrissure fusarienne (*Fusarium wilt*)

Est une maladie dévastatrice pour les cultures de tomate partout dans le monde, elle est causée par *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*.

Ce champignon terricole qui pénètre dans la plante par les racines envahit les tissus ligneux et provoque le jaunissement, la flétrissure puis la mort de la plante (Si Mohammed, 2009).

Les symptômes de cette maladie peuvent être classés en :

### CHAPITRE III : Champignons phytopathogènes

- **Symptômes Externes**

- La maladie évolue très rapidement, les parties des limbes touchés flétrissent comme par manque d'eau, c'est le flétrissement rapide ;
- Les feuilles asséchées gardent leur chlorophylle et apparaissent avec un aspect gris verdâtre;
- Il s'ensuit un jaunissement puis une nécrose d'une partie ou de la totalité du limbe avec des éclaircissements au niveau des nervures ;
- L'atteinte des feuilles se fait progressivement de bas en haut ce qui fait que les feuilles se trouvant à la base de la plante sont déjà mortes ;
- Il arrive fréquemment qu'un seul rameau soit atteint et ceci avant l'apparition des symptômes de la maladie sur le reste de la plante ;
- Au niveau de la tige de la plante atteinte, apparaît une dépression longitudinale qui part du collet puis remonte unilatéralement ;
- Les tissus au niveau de la dépression sont de couleur brune. D'autres symptômes peuvent parfois apparaître à savoir ;
- L'inclinaison et la courbure progressive vers le sol des pétioles et des limbes (épinastie), le ralentissement de la croissance et la formation de bourrelets adventives sur la tige (Si Mohamed, 2009).

- **Symptômes Internes**

- Une coupe longitudinale au niveau de la tige des plantes atteintes, présente dans la partie ligneuse et adjacente au cortex vert, une coloration brune sombre des tissus conducteurs ;
- Des coupes transversales laissent apparaître également des tissus bruns foncés contenant souvent des fragments mycéliens (Si Mohamed, 2009).

#### **2.5.2. Pourriture racinaire (*Fusarium crown and root rot*)**

C'est une maladie causée par *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*. Cette maladie a été découverte pour la première fois au Japon en 1969.

Cette maladie terricole causée par *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* s'attaque aux plantules et entraîne leur mort. Elle peut s'exprimer surtout à maturité lorsque les plantes sont chargées de fruits (Si Mohammed, 2009).

Les principaux symptômes de cette maladie sont les suivants :

### CHAPITRE III : Champignons phytopathogènes

- **Symptômes externes**

-Contrairement aux maladies vasculaires notamment, des flétrissements peuvent être soudains, plus ou moins importants apparaissent sur les folioles du sommet de la tige et peuvent évoluer très rapidement vers la nécrose et le dessèchement de ces folioles et des feuilles, dans cette zone, la tige est fortement amincie et peuvent aussi conduire à la mort des plantes ;

-Apparition de jaunissements foliaires situés à la périphérie du limbe des vieilles feuilles. Ceux-ci sont suivis de la nécrose des pétioles et de la chute des feuilles ;

-Quelle que soit la gravité des flétrissements, les symptômes primaires sont à rechercher sur les racines et le collet des plantes ;

-Sur les racines apparaissent de nombreuses lésions brun rougeâtres, humides, évoluant rapidement en pourriture. Plus le diamètre des racines est faible, plus celles-ci pourrissent et se décomposent rapidement (Si Mohammed, 2009).

- **Symptômes internes**

-Le système vasculaire présente aussi quelques symptômes, bien que nous n'ayons pas à faire à une maladie uniquement vasculaire. D'une manière générale, le cylindre central des grosses racines révèle des brunissements assez marqués. Il en est de même pour les tissus vasculaires du pivot et ceux situés de part et d'autre de ces derniers ;

-Le brunissement peut s'étendre jusqu'à la tige sur plusieurs dizaines de centimètres au-dessus du collet. Des racines adventives se développent parfois sur la tige pour faire face à l'attaque du champignon (Si Mohammed, 2009).

*Matériel et  
méthodes*

## Matériel et méthodes

Ce travail de recherche, rentrant dans le cadre d'un projet de fin d'étude, a été réalisé pendant une période de quatre mois. Il est subdivisé en parties, principalement : l'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique, contre *Fusarium oxysporum sp*, par l'utilisation de la technique des cylindres d'agar pour des souches d'actinomycètes rhizosphériques et par la technique des stries pour des souches de *Pseudomonas sp*. En deuxième partie, l'évaluation des extraits des souches d'actinomycètes les plus promotrices ainsi qu'une séparation du principe actif des extraits par une chromatographie en couche mince et étude de l'activité des taches séparées par une bio-autographie directe.

### 1. Matériel biologique et produits chimiques

Des souches d'actinomycètes rhizosphériques et de *Pseudomonas sp* ainsi qu'une souche phytopathogène du *Fusarium oxysporum* sont fournis par le laboratoire de génie microbiologique et application de l'université Constantine 1.

L'isolat de *Fusarium oxysporum* a été obtenu à partir des racines d'une culture de tomate présentant des symptômes de flétrissement et de pourriture du collet.

Les produits chimiques utilisés dans ce travail ont été fournis par le laboratoire de l'université 8 Mai 1945, Guelma, Algérie.

### 2. Etude de l'activité inhibitrice des souches d'actinomycètes

#### 2.1. Technique des cylindres d'agar

L'activité antifongique de 43 souches différentes d'actinomycètes rhizosphériques ont été testées contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* (Boubrit et Bousad, 2007).

##### 2.1.1. Culture des souches testées

La culture *in vitro* du *Fusarium oxysporum* est réalisée sur milieu PDA (annexe 01) (Abou al fadil, 2006). La croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores sont maximales après 5 à 7 jours à 30 °C (figure 07) (Attrassi *et al.*, 2005).

## Matériel et méthodes



**Figure 07.** Culture de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA.

La culture des souches actinomycètes est réalisée sur milieu YMEA (annexe 01), les souches sont maintenues à une température de 30°C pendant 7 jours [16].

### 2.1.2 Réalisation du test

Des disques de 08 mm de diamètre issus d'une culture pure de *Fusarium oxysporum* et sont déposés au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Attrassi *et al.*, 2005). Ensuite, deux disques de 08 mm de diamètre des différentes souches d'actinomycètes sont placés, en parallèles, dans ces boîtes, avec une distance de 03 cm du disque de champignons. Ces boîtes sont incubées dans l'étuve à 30°C pendant 14 jours. Des boîtes contrôles sont réalisées, contenant juste le disque de champignon. Deux répétitions sont réalisées pour chaque souche (Azouaoui-Ait Kettout *et al.*, 2007).

Après 14 jours l'évaluation de l'inhibition exercée par le cylindre d'agar est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hibar *et al* (b)., 2006) :

$$\% I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

**C** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte contrôle.

**T** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte test.

## 2.2. Technique des puits

### 2.2.1 Préparation des extraits

Seulement la souche d'actinomycète montrant le plus grand pourcentage d'inhibition dans le test précédant (Kitouni, 2007).

## Matériel et méthodes

Quatre boîtes de la souche d'actinomycète MR<sub>5</sub> sont incubées pendant 7 jours à 30°C l'extraction. L'extraction est réalisée par des solvants organiques choisis selon la littérature et selon leur disponibilité, il s'agit de dichlorométhane et du chloroforme (Kholkhal, 2006).

Le contenu des boîtes est coupé en petit morceaux, ensuite mélangé avec 20 ml de solvant. Le mélange est incubé durant une nuit, pour une durée de 18 heures au minimum, à une température ambiante (Bérubé-Gagnon, 2006).

Dans le but d'éliminer les particules solides issues de la biomasse cellulaire de la souche. Le mélange est subi une filtration (figure 08) à travers un papier wattman (N° 1) (Ferhat, 2009).

Les filtrats obtenus subissent une évaporation sous vide dans un rotavapeur (rotavapor R-210 BUCHI) jusqu'à l'obtention d'extraits sec (figure 09). Le contenu du ballon obtenu est récupéré dans 3 ml de méthanol. Les extraits obtenus sont conservés dans des tubes Eppendorfs à une température de 04 °C (Ferhat, 2009).



**Figure 08.** Filtration des extraits.



**Figure 09.** Evaporation des extraits par rotavapeur (R-210 BUCHI).

### 2.2.2 Réalisation du test

À l'aide des embouts stériles, des puits de 08 mm de diamètre chacun sont creusés dans le milieu PDA, les puits sont éloignés du centre par 3 cm. Des cylindres de 08 mm de *Fusarium oxysporum* sont placés au centre des boîtes de Pétri contenant les puits déjà creusés. Une quantité de 100 µl des extraits des actinomycètes est déposée dans chaque puits à l'aide d'une micropipette. Les boîtes sont laissées à une température de 04 °C au réfrigérateur pendant 04-05 heures pour la diffusion de l'extrait dans le milieu, puis incubées à 37°C pendant 07-10 jours. Les diamètres d'inhibition sont mesurés et les pourcentages d'inhibition sont calculé selon la formule suivante (Hibar *et al* (b)., 2006):

$$\% I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

**C** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte contrôle ;

**T** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte test.

### 2.3. Séparation des molécules bioactives par chromatographie en couche mince

La chromatographie en couche mince sur gel d'agarose est basée sur le partage des solutés entre l'adsorbant solide fixe et la phase mobile qui est un solvant [17].

### 2.3.1 Préparation du système de migration

Des tests sur CCM ont permis de déterminer qu'un mélange de 30 ml de deux solvants organiques de polarité différente (Chloroforme/Méthanol). Différents systèmes de migration sont utilisés afin d'obtenir une bonne séparation (Bérubé-Gagnon, 2006).

V (Chloroforme/Méthanol) :

- V1 : 6 / 4
- V2 : 8 / 2
- V3 : 9 / 1
- V4 : 9,5 / 0,5
- V5 : 9,75 / 0,25

### 2.3.2 Préparation des plaques CCM

Des plaques de (10 cm X 10 cm) sont utilisés pour la séparation des constituants des extraits, la ligne de dépôt de l'extrait est tracée à 1 cm du bord inférieur de chaque plaque. Le mélange de chaque solvant est déposé dans une cuve à chromatographie avec une profondeur de 0,5 cm.

Des points de dépôt des échantillons sont précisés avec un crayon, ensuite, 10µl de chaque extrait est déposé sur un point, en réalisant aussi un point control par le solvant d'extraction (le méthanol).

Après migration, le front de migration de solvant est tracé afin de calculer le rapport frontal. Les plaques sont séchées. Les taches sont visualisées à l'œil nu et avec une lampe à UV (365 nm) (Mezaache, 2012). Le rapport frontal des taches obtenues est calculé comme suivant :

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} < 1$$

### 2.3.3 Test de bioautographie directe

La bioautographie est un moyen pratique et simple pour tester l'efficacité de taches obtenues par CCM, afin de purifier le composant actif d'extrait brut (OkusaNdjolo, 2012).

Chaque bande de silice visualisée sous UV et/ou à l'œil nu est grattée puis collecter, les bandes de silice obtenu sont déposées, chacune, à une distance de 3 cm d'un disque de

## Matériel et méthodes

*Fusarium oxysporum*. Les boîtes sont incubées à 30 °C à l'étuve pendant une semaine et leur pourcentage d'inhibition est calculer selon la formule suivante (Hibar *et al* (b)., 2006):

$$\% \mathbf{I} = \frac{\mathbf{C} - \mathbf{T}}{\mathbf{C}} \times \mathbf{100}$$

**C** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte contrôle.

**T** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte test.

### 3. Etude de l'activité inhibitrice des souches de *Pseudomonas sp*

#### 3.1. Purification et conservation des souches

17 souches de *Pseudomonas sp* font l'objet d'une étude sur leur activité inhibitrice contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Les souches sont purifiées et repiquer sur milieu gélose nutritive (annexe 01), la conservation des souches est réalisée à 4 °C (Kholkhal, 2006).

#### 3.2. Réalisation du test

Des disques de 08 mm du champignon *Fusarium oxysporum* sont placés au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), ensuite à l'aide d'une pipette Pasteur, les isolats bactériens issus d'une culture de 18 h de *Pseudomonas sp* sontensemencées par stries, deux traits à une distance de 01 cm du bord de la boîtes de Pétri. Des boîtes contrôles sont réalisées contenant juste le disque de champignon (Mansoureh Sadat et Halimi Mohd, 2012).

Les boîtes test et contrôles sont incubées pendant 72 h à 30 °C. La croissance mycélienne est exprimée en pourcentage d'inhibition (Azouaoui-Ait Kettout *et al.*, 2007) selon la formule suivante (Hibar *et al* (b)., 2006):

$$\% \mathbf{I} = \frac{\mathbf{C} - \mathbf{T}}{\mathbf{C}} \times \mathbf{100}$$

**C** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte contrôle.

**T** : Diamètre de croissance de *Fusarium oxysporum* dans la boîte test.

#### 3.3. Identification des souches de *Pseudomonas sp*

Pour une identification préliminaire des souches rhizosphériques de *Pseudomonas sp*, nous nous sommes basés sur les études suivantes :

## Matériel et méthodes

- Test de confirmation de coloration de Gram
- Test catalase et d'oxydase
- test d'orientation par l'utilisation d'une Galerie Api.

### 3.3.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est le premier caractère à étudier pour l'identification phénotypique des souches bactériennes (Mami, 2013).

La première étape consiste à réaliser des frottis de la manière suivante : une goutte de suspension bactérienne est déposée sur une lame stérile, la goutte est ensuite étalée sur la lame de façon à obtenir un étalement mince, homogène, de l'ordre de 0,5 à 2 cm<sup>2</sup>. Une fixation par dessiccation est réalisée en chauffant fortement deux à trois fois une demie seconde le frottis tenu à la pince (Guenoune, 2009).

La deuxième étape consiste à réaliser une coloration par le violet de gentiane, laissé agir de 01 minute. Rincer à l'eau distillée, après étaler le Lugol et laisser agir 01 minute puis rincer à l'eau distillée. La décoloration (rapide) par l'ajout d'alcool goutte à goutte sur la lame puis laissé agir pendant 30 secondes et rincer sous un filet d'eau distillée, ensuite, une contre coloration est réalisée par une solution de fuchsine pendant 30 secondes [10].

### 3.3.2. Recherche de l'oxydase

Le test oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C (Vézina *et al.*, 2010). L'oxydase est recherchée par la méthode des disques. A partir d'un milieu solide, une colonie est déposée sur un disque oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée (Guenoune, 2009). Après environ 10 minutes, si la colonie prend une teinte rose, violette apparaît sur le disque puis vire au noir (virage de couleur) (Tabak et Bensoltane, 2012). Le germe possède une oxydase : le test est positif, si la réaction est tardive ou la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif [11].

### 3.3.3. Recherche de la catalase

L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène (Vézina et Lacroix, 2010). Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène 3%) sur une lame

stérile. Après environ 2 minutes le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase et qu'il y a eu destruction du peroxyde d'hydrogène et libération d'oxygène, alors que l'absence des bulles indique l'absence de l'enzyme (Tabak et Bensoltane, 2012).

### 3.3.4. Identification phénotypique par la galerie Api 20 ne

Seulement les souches bactériennes qui ont le grand pourcentage d'inhibition sont identifiées par la galerie Api 20 ne (Guenoune, 2009), cette galerie est standardisée pour l'identification des bacilles à Gram négatif et à oxydase positif, en combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données [12].

Ce système comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries croissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification [12].

- **Préparation de la galerie**

Le fond et le couvercle de la boîte d'incubation sont réunis, l'eau distillée stérile est déposée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite, la galerie est déposée stérilement dans la boîte d'incubation [13].



**Figure 10.** Alvéoles remplies avec l'eau du fond de la galerie.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum représente une suspension bactérienne, elle est préparée dans une ampoule de NaCl à 0,85%, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mc Farland [13].

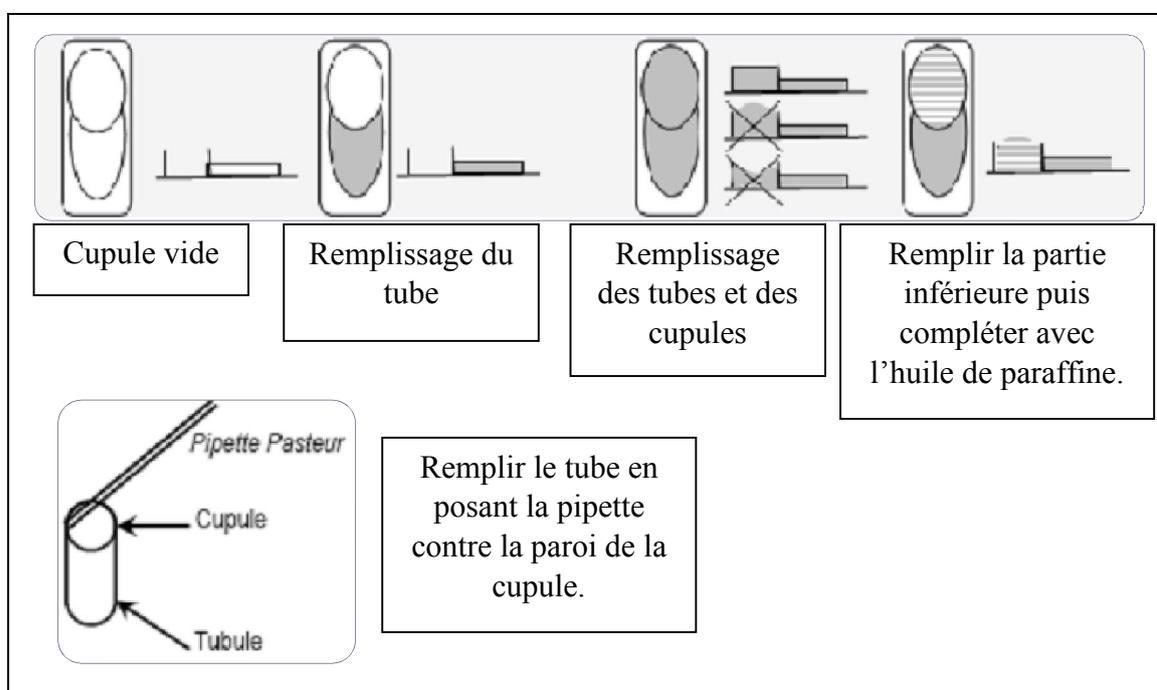
### • Inoculation de la galerie

- Les tubes des tests NO<sub>3</sub> à PNPG sont remplis avec la suspension précédente, de façon à éviter la formation de bulles (figure 11).

-200 µl (4 à 8 gouttes) sont de la suspension précédente sont transférés, dans une ampoule « AUX Medium ». Homogénéiser, ensuite le contenu de l'ampoule est utilisé pour remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.

- A l'aide d'une huile de paraffine, les cupules des trois tests GLU, ADH, URE sont couvertes.

- La galerie est ensuite incubée 24-48 heures à 30°C [13].



**Figure 11.** Inoculation de la galerie et mode de remplissage (Guenoune, 2009).

### • Lecture et Identification

Après incubation, la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture (annexe 02). Les tests sont regroupés en groupe de 3 et une valeur (1,2 ou 04) est indiquée pour chacun ; le code obtenu à la fin est identifié à l'aide d'un logiciel « Apiweb » [13].

## 4. Analyse statistique

Les moyennes et les écarts types ainsi que l'analyse de la variance à un seul facteur sont réalisés par un logiciel de statistique, origine version 6.

*Résultats et  
discussion*

## 1. Etude de l'activité inhibitrice des souches d'actinomycètes

### 1.1. Technique des cylindres d'agar

Les résultats du test d'inhibition *in vitro* du *Fusarium oxysporum*, selon la technique des cylindres d'agar sont résumés dans le tableau I.

Selon ces résultats, parmi les 43 souches d'actinomycètes testés, 04 souches sont avérés actives contre le phytopathogène, avec ces quatre souches une diminution dans la croissance mycélien du champignon est observée, dont l'inhibition la plus importante est enregistrée pour la souche MR<sub>5</sub> avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 54,11% et le faible taux d'inhibition est produit par la souche C<sub>noir</sub> (35,29%) (Figure 12).

**Tableau I.** Effet inhibiteur des souches d'actinomycètes sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*.

Souches d'actinomycète testés	Boîte contrôle (mm)	Boîtes tests		Pourcentage d'inhibition %
		1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte	
MR <sub>5</sub>	85	41	37	54,11± 3,33%
C <sub>15</sub>	85	42	40	51,76± 1,66%
MR <sub>6</sub>	85	49	50	41,76± 0,83%
C <sub>noir</sub>	85	55	55	35,29± 00%
T <sub>15</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>9</sub>	85	85	85	00,00%
SR <sub>1</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>11</sub>	85	85	85	00,00%
C <sub>17</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>2</sub>	85	85	85	00,00%
SRB <sub>1</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>7</sub>	85	85	85	00,00%
MNR <sub>7</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>5</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>8</sub>	85	85	85	00,00%

## Résultats et discussion

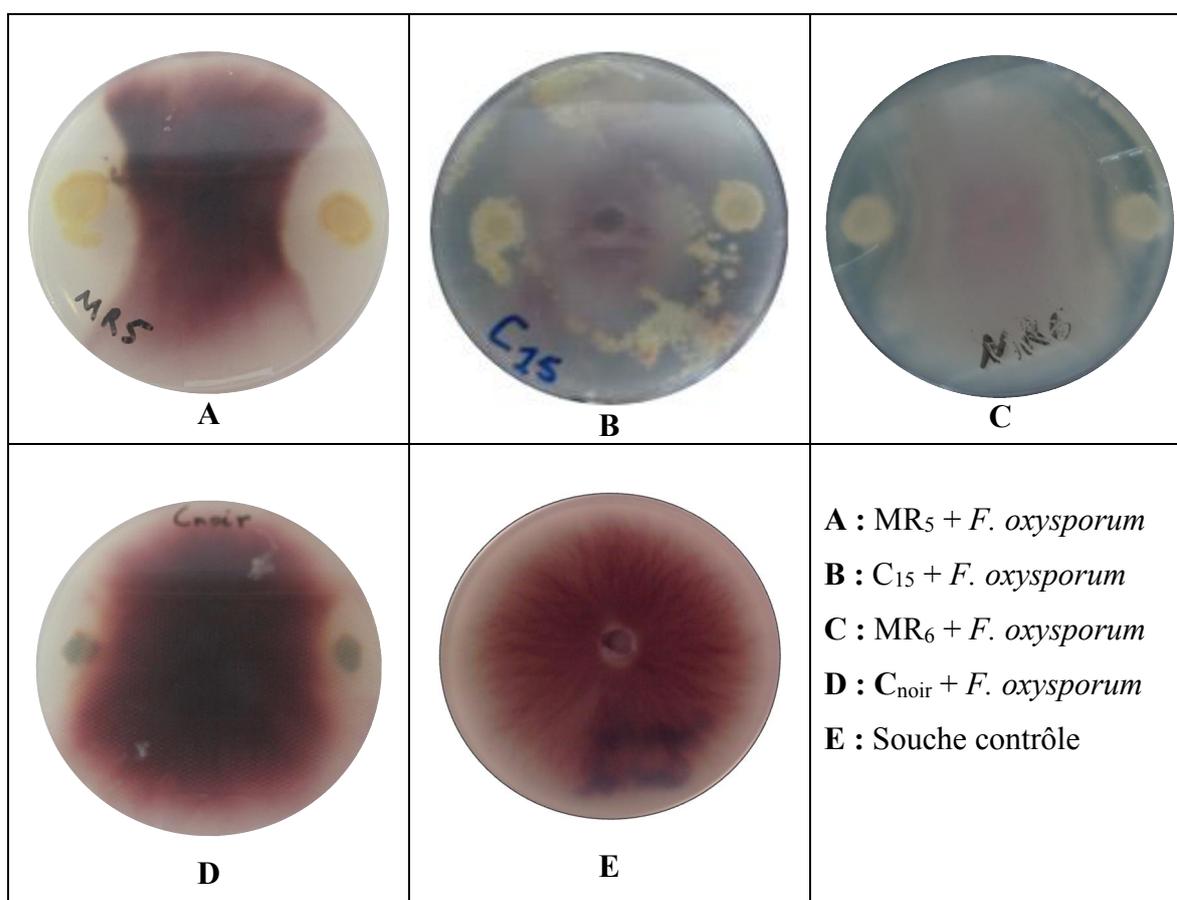
**Tableau I.** Effet inhibiteur des souches d'actinomycètes sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* (suite).

Souches d'actinomycète testés	Boîte contrôle (mm)	Boîtes tests		Pourcentage d'inhibition %
		1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte	
F <sub>4</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>5</sub>	85	85	85	00,00%
MNR <sub>16</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>8</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>10</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>8</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>6</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>6</sub>	85	85	85	00,00%
MR <sub>7</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>15</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>7</sub>	85	85	85	00,00%
C <sub>19</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>4</sub>	85	85	85	00,00%
MR <sub>10</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>5</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>9</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>13</sub>	85	85	85	00,00%
C <sub>18</sub>	85	85	85	00,00%
SR <sub>3</sub>	85	85	85	00,00%
C <sub>15</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>1</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>3</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>1</sub>	85	85	85	00,00%
T <sub>1</sub>	85	85	85	00,00%
SRB <sub>2</sub>	85	85	85	00,00%

## Résultats et discussion

**Tableau I.** Effet inhibiteur des souches d'actinomycètes sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* (suite).

Souches d'actinomycète testés	Boîte contrôle (mm)	Boîtes tests		Pourcentage d'inhibition %
		1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte	
T <sub>2</sub>	85	85	85	00,00%
J <sub>2</sub>	85	85	85	00,00%
F <sub>7</sub>	85	85	85	00,00%



**Figure 12.** Activité inhibitrice des souches d'actinomycètes (MR<sub>5</sub>, C<sub>15</sub>, MR<sub>6</sub>, C<sub>noir</sub>) par la technique des cylindres d'agar.

L'activité inhibitrice des quatre souches peuvent être liées à différents paramètres, les résultats *in vitro* peuvent indiquer que les actinomycètes inhibent la croissance du champignon en utilisant des composés antifongiques, par l'hyper parasitisme, par la production de sidérophores qui sont impliqué dans la suppression de plusieurs forme spéciales de *Fusarium oxysporum*, ou à travers la production des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire du champignon (Tlemsani, 2010).

## Résultats et discussion

En se basant sur ces paramètres, il est possible de donner les arguments suivants :

- Pour les 04 souches sélectionnées aucun contact direct n'a été établi entre le mycélium fongique et les colonies bactériennes des actinomycètes rhizosphériques, donc l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* a été à travers une substance qui se diffuse dans le milieu de culture.
- Les substances diffusibles peuvent être de différentes natures, telle que, des substances antifongiques, des enzymes tels que les chitinases,...
- Le milieu PDA est riche en nutriment et une compétition des nutriments est à exclure.

Plusieurs études ont montrées la capacité des souches d'actinomycètes filamenteux à inhiber la croissance de différentes espèces du genre *Fusarium sp.* Parmi les 133 souches d'actinomycètes filamenteux isolés par Yekkour *et al* (2012), un pourcentage de 25 % des souches isolées a une grande activité contre *Fusarium culmorum*, de même, ils ont démontré l'effet supprimeur de ce phytopathogène, *in vivo*, avec un pourcentage d'inhibition de 95 %. Dans un autre travail une inhibition de 54 % de *Fusarium oxysporum* est observée avec des actinomycètes filamenteux isolés par Aouar (2013).

### 1.2. Technique des puits

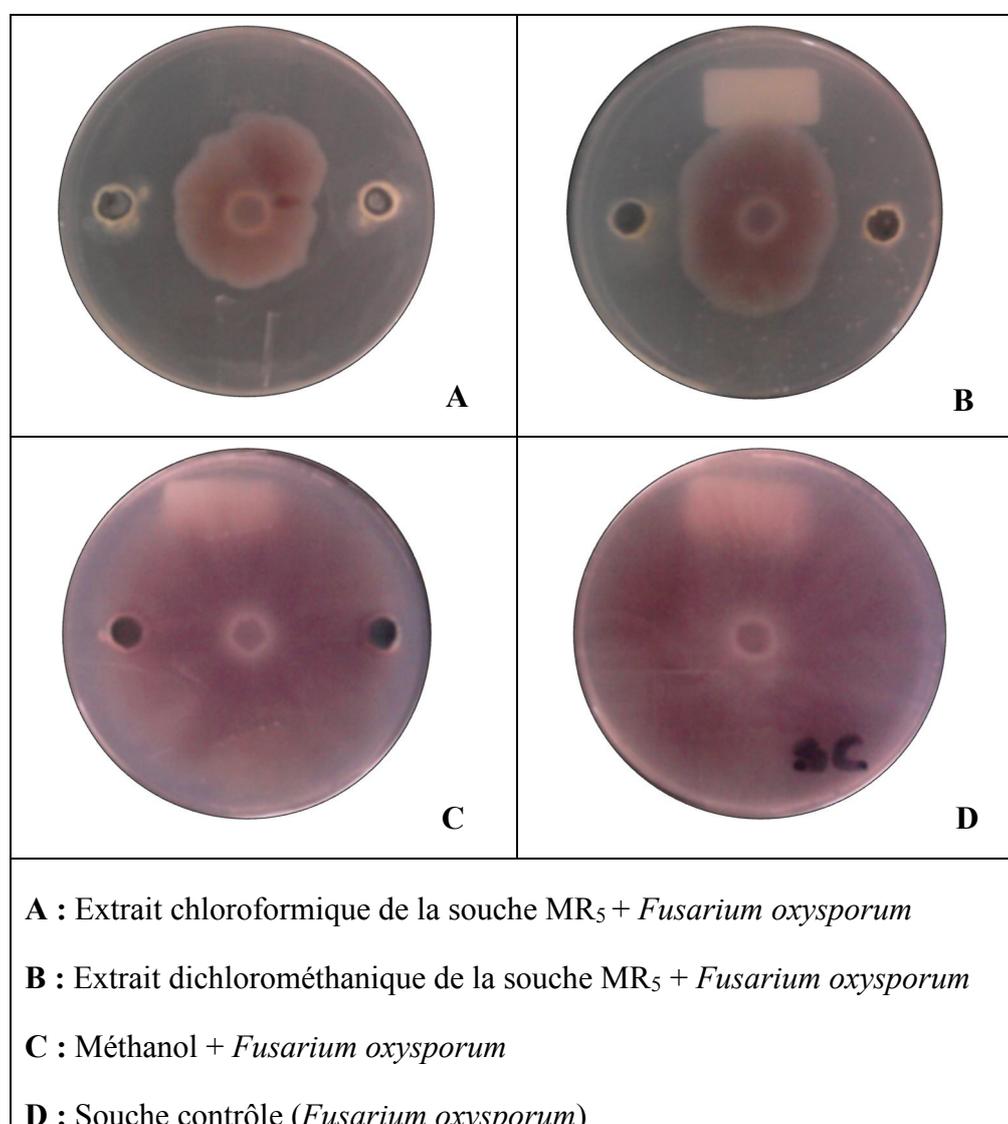
Les résultats du test d'inhibition par les deux extraits de la souche MR<sub>5</sub> sont notés dans le tableau II.

D'après ces résultats, les deux extraits ont une activité inhibitrice vis-à-vis le phytopathogène. Aucune inhibition n'a été observée avec le méthanol, qui est le solvant de récupération des extraits (figure 13). L'analyse de la variance montre une probabilité supérieure à 5 % ( $P= 0,71$ ), ce qui signifie que les deux solvants utilisés ont le même effet pour l'extraction des métabolites d'intérêt.

## Résultats et discussion

**Tableau II.** Effet inhibiteur des extraits de la souche MR<sub>5</sub> sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum*.

Solvant d'extraction	Boite Contrôle (mm)	Boites Test (mm)			Pourcentage d'inhibition
		1 <sup>ère</sup> boite	2 <sup>ème</sup> boite	3 <sup>ème</sup> boite	
Chloroforme	85	40	46	46	48,23± 2,35%
Dichlorométhane	85	35	45	47	50,2± 7,56 %
Control négatif (méthanol)	85	85	85	85	00%



**Figure 13.** Activité inhibitrice des extraits de la souche MR<sub>5</sub>.

## Résultats et discussion

Plusieurs travaux ont rapportés l'activité antifongique des actinomycètes filamenteux et le but à chaque fois, c'est de découvrir de nouvelles souches et de nouvelles molécules antifongique, Kitouni (2007) a étudié l'activité inhibitrice de 45 souches d'actinomycètes et il a noté que 04 souches ont une activité antifongique contre *Fusarium oxysporum*, comme il a démontré que ces souches possèdent aussi une activité inhibitrice vis-à-vis d'autres souches telles que *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*,...

### 1.3. Séparation des molécules bioactives présentes dans les extraits de la souche MR<sub>5</sub> par chromatographie en couche mince

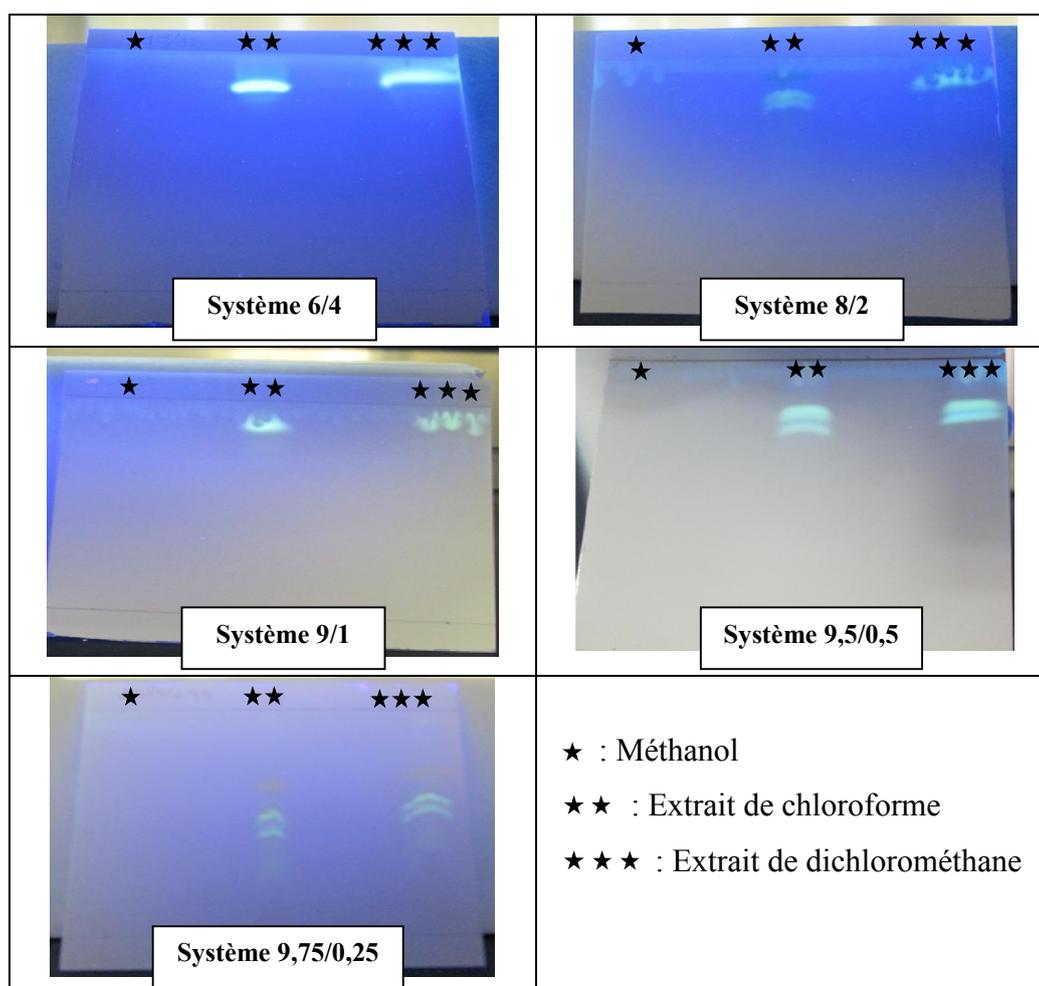
Les résultats de la séparation des composés des extraits de la souche MR<sub>5</sub> par différents système de migration sont résumés dans le tableau III.

**Tableau III.** Révélation des plaques chromatographiques des extraits de la souche MR<sub>5</sub>.

Systèmes de solvant (Chloroforme / Méthanol) (V/V)	Extrait de la souche MR <sub>5</sub>	Nombre de spots	Rapports frontaux
6 / 4	Extrait de chloroforme	01	0,87
	Extrait de dichlorométhane	01	0,93
8 / 2	Extrait de chloroforme	01	0,91
	Extrait de dichlorométhane	01	0,93
9 / 1	Extrait de chloroforme	01	0,8
	Extrait de dichlorométhane	01	0,93
9,5 / 0,5	Extrait de chloroforme	02	0,86
			0,93
	Extrait de dichlorométhane	02	0,90
			0,97
9,75 / 0,25	Extrait de chloroforme	02	0,65
			0,47
	Extrait de dichlorométhane	02	0,65
			0,52

## Résultats et discussion

Les résultats des rapports frontaux de la séparation des composés présents dans les extraits de la souche MR<sub>5</sub> par CCM montrent que le meilleur système de migration pour obtenir une bonne séparation sont les systèmes (9,5/0,5 ; 9,75/0,25) (Figure 14), car on a obtenu 02 spot séparés pour chaque extrait, alors que les autres systèmes (8/2 ; 6/4 ; 9/1) permettent la séparation d'un seul spot.



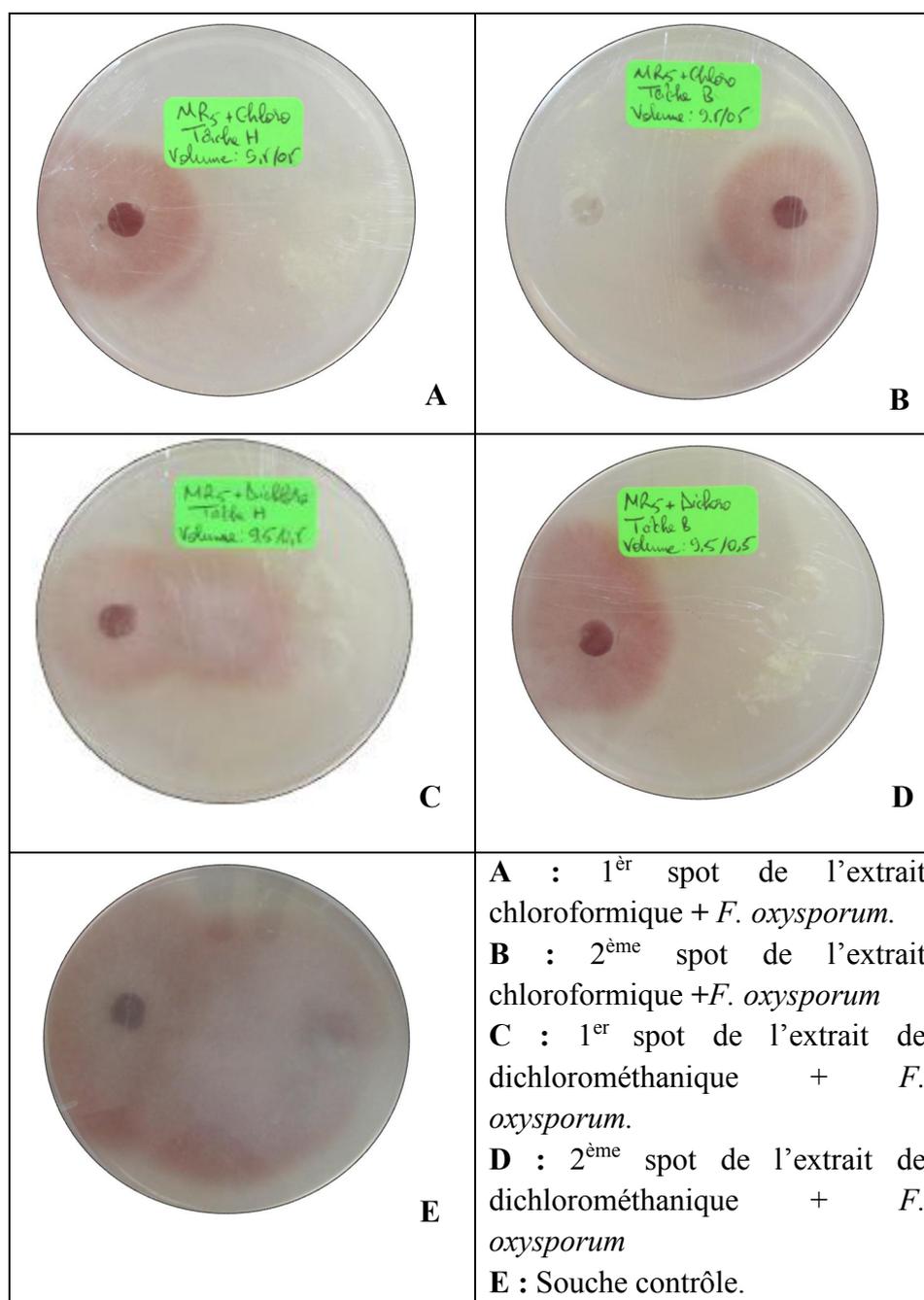
**Figure 14.** Séparation des extraits de la souche MR<sub>5</sub> par différents systèmes de migration visualisée sous les UV.

### 1.3.1. Activité inhibitrice des composants séparés par CCM (bio-autographie directe)

La bio-autographie des spots obtenus par le système (9,5 / 0,5) révèle une activité importante pour quelques spots, en effet, l'extrait dichlorométhanique révèle deux spots ; une active avec un rapport frontal de 0,90 et une autre inactive avec un rapport frontal de 0,97, alors que l'extrait chloroformique révèle deux spots actives ; la 1<sup>ère</sup> avec un rapport frontal de 0,86 et la 2<sup>ème</sup> avec un rapport frontal de 0,93.

## Résultats et discussion

De ce fait, il est possible de déduire que le principe actif de la souche MR<sub>5</sub> est constitué, au moins, de deux composés bioactifs et dont leurs rapports frontaux sont situés entre (0,86-0,93) (Figure 15).



**Figure 15.** Test de bio-autographie directe des différents spots obtenus par le système de migration 9,5 / 0,5.

## Résultats et discussion

**Tableau IV.** Effet inhibiteur des composants séparés par CCM à partir des extraits de la souche MR<sub>5</sub>.

Solvant d'extraction	Tache testée	RF	Pourcentages d'inhibition	P
Chloroforme	1	0,86	32,50±01,42%	0,006
	2	0,93	36,25±00,00%	
Dichlorométhane	1	0,90	35,00±00,00%	0,000
	2	0,97	00,00%	

D'après le tableau IV, le grand pourcentage d'inhibition est révélé pour le spot avec le rapport frontal 0,93 de l'extrait de chloroforme. L'analyse de la variance des résultats précédents révèle une différence significative ( $P < 0,05$ ).

## 2. Etude de l'activité inhibitrice des souches de *Pseudomonas sp*

### 2.1. Technique de stries

Les résultats du test d'inhibition des souches supposées *Pseudomonas sp*, sont résumés dans le tableau V. Ces résultats permettent de déduire que toutes les souches testées ont une activité inhibitrice vis-à-vis *Fusarium oxysporum* avec différents pourcentages d'inhibitions, dont les souches T<sub>3</sub>, T<sub>2</sub>, J<sub>8</sub> et Fb sont les plus actives (figure 16) et qui possèdent des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 47,64 % ; 33,52 % ; 31,76 % ; 30,58 %, respectivement, alors que, le reste des souches testées présentent des pourcentages d'inhibition inférieure à 30 % (Tableau V).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas spp.* fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60 % de la microflore bactérienne totale du sol. D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes. Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court, leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments, et à chélater les ions ferriques par la production de plusieurs types de sidérophores comme la pyoverdine (Mezaache, 2012).

## Résultats et discussion

*In vitro*, l'inhibition causée par ces souches peut être attribuée à plusieurs paramètres comme la production d'une large gamme de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis-à-vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Mezaache, 2012).

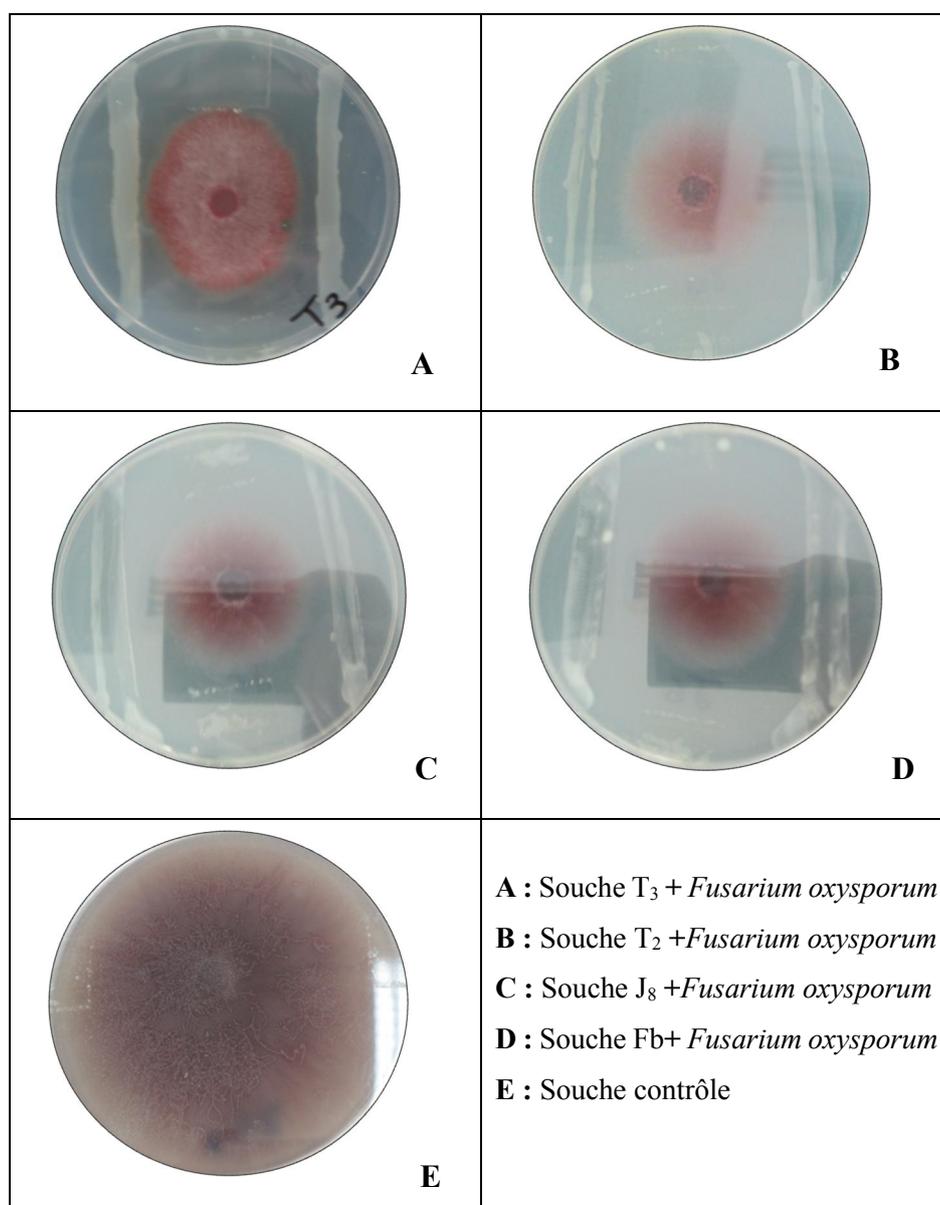
**Tableau V.** Effets inhibiteurs des souches de *Pseudomonas sp* sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum*.

Souches testées <i>Pseudomonas sp</i>	Boîtes contrôles (mm)	Boîtes Test (mm)		Pourcentage d'inhibition
		1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte	
T3	85	46	43	47,64±2,49%
T2	85	58	55	33,52±2,49%
J8	85	58	58	31,76±00%
FB	85	58	60	30,58±1,66%
T5	85	55	64	30±7,48%
T1	85	70	50	29,41±16,6%
J5	85	65	55	29,41±3,33%
FC1	85	60	65	26,47±4,16%
J6	85	60	67	25,29±5,82%
F3	85	67	60	25,29±5,82%
FA	85	65	65	23,52±00%
J7	85	64	67	22,94±2,49%
T4	85	65	68	21,76±3,91%
F1	85	65	72	19,41±5,81%
FD	85	72	70	16,47±1,66%

## Résultats et discussion

**Tableau V.** Effets inhibiteurs des souches de *Pseudomonas sp* sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* (suite).

Souches testées <i>Pseudomonas sp</i>	Boîtes contrôles (mm)	Boîtes Test (mm)		Pourcentage d'inhibition
		1 <sup>ère</sup> boîte	2 <sup>ème</sup> boîte	
J4	85	70	72	16,47±1,66%
FC2	85	76	73	12,35±2,49%



**Figure 16.** Test d'inhibition du *Fusarium oxysporum* par les quatre souches les plus performantes (T<sub>3</sub>, T<sub>2</sub>, J<sub>8</sub>, Fb).

## 2.2. Identification des souches de *Pseudomonas sp*

Cette étape est basée sur une identification phénotypique des souches isolées et considérées comme des souches appartenant au groupe de *Pseudomonas spp.* fluorescents. Cette identification est réalisée juste aux souches possédant le grand pourcentage d'inhibition, il s'agit de la souche T<sub>3</sub> et T<sub>2</sub>.

### 2.2.1. Coloration de Gram

L'observation microscopique des lames après une coloration de Gram a confirmé que les deux souches sont des bacilles à Gram négatif (figure 17).

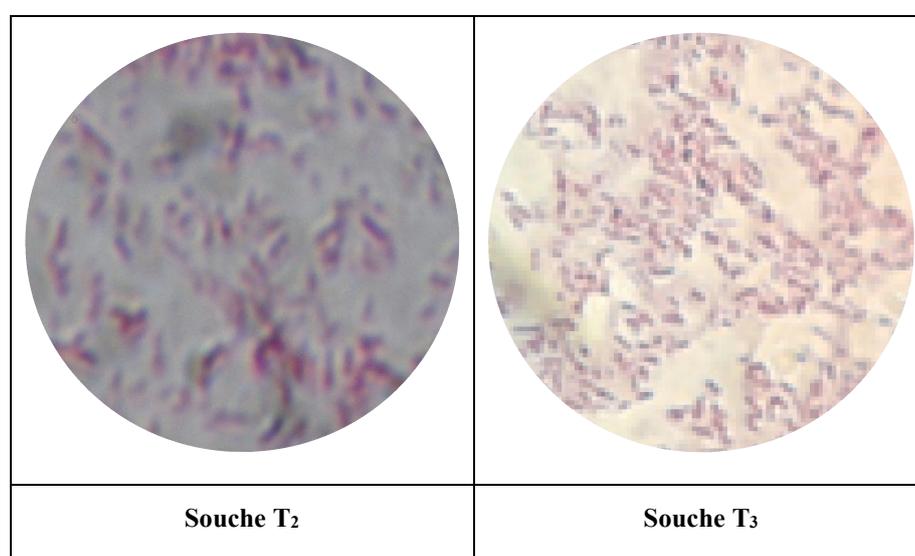


Figure 17. Coloration de Gram des souches T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub>.

### 2.2.2. Recherche de la catalase

L'apparition des bulles d'air lors de l'addition de l'eau oxygénée a révélé la présence de la catalase chez les deux souches étudiées.

### 2.2.3. Recherche de l'oxydase

L'apparition d'une couleur violacée sur le disque a révélé la présence de l'oxydase chez les deux souches.

La recherche de l'oxydase est une étape indispensable pour le choix de la galerie Api utilisée, en réalité, ce test sépare les bacilles à oxydase négatif qui sont considérée phénotypiquement comme des entérobactéries pour lesquels la galerie Api 20e est utilisée, par rapport aux autres bacilles à oxydase positif pour lesquels la galerie api 20ne est utilisée pour l'orientation phénotypique vers les genres et les espèces.

## Résultats et discussion

### 2.2.4. L'identification phénotypique par la galerie API20ne

Les résultats d'identification des deux souches bactériennes T<sub>3</sub> et T<sub>2</sub> sont résumés dans le tableau VI. D'après ces résultats les deux souches sont phénotypiquement classées comme *Pseudomonas fluorescens*.

**Tableau VI.** Identification des souches testées (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>) du genre *Pseudomonas* par galerie API 20 NE.

Souche Test	T <sub>3</sub>		T <sub>2</sub>	
	24 h	48 h	24 h	48 h
NO3	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-
GLU	-	-	-	+
ADH	-	+	+	+
URE	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-
PNPG	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+
MAL	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+
ADI	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
PAC	-	-	-	-
OX	+	+	+	+
<b>Profil numérique</b>	1047555	1147555	1147555	5147555
<b>Identification</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	

## Résultats et discussion

Toutes les souches appartenant au groupe de *Pseudomonas spp.* fluorescents sont connues pour leur grande capacité à coloniser les racines des plantes, l'espèce *Pseudomonas fluorescens* est parmi les espèces les plus importantes de ce groupe par sa grande aptitude à produire différents facteurs de croissance de plantes ainsi qu'à protéger leurs racines par la sécrétion de molécules bioactives, tels que les sidérophores principalement la pyoverdine. D'autres études comme Mezaache (2012) et Haas *et al* (2005) ont mis en évidence l'abondante présence de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* lors du criblage visant la recherche des souches promotrices de croissance de plantes et précisément, des souches capables de protéger les plantes contre les différents agresseurs.

*Conclusion et  
perspectives*

## Conclusion et perspectives

L'augmentation de l'utilisation d'un certain nombre de pesticides a eu des effets négatifs sur la santé humaine ainsi que sur la flore du sol et sur l'environnement ce qui a poussé à trouver des alternatives à la lutte chimique et la remplacée par une lutte biologique avec un minimum d'effets négatifs (Mezaache, 2012). Notre travail qui s'inscrit dans ce contexte a permis la mise en évidence de l'activité anti-phytopathogène, contre *Fusarium oxysporum* responsable de la pourriture des racines et du collet de la tomate, par des souches rhizosphériques appartenant à deux groupes, les actinomycètes filamenteux et les *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Parmi les 43 souches étudiées des actinomycètes filamenteux, 04 souches possèdent une activité inhibitrice avec un maximum de 54,11% pour la souche MR<sub>5</sub>. Pour les 17 souches de *Pseudomonas spp.* fluorescentes, une activité inhibitrice est obtenue avec toutes les souches avec un maximum de 47,64 et 33,52% avec les souches T<sub>3</sub> et T<sub>2</sub> respectivement, ces deux souches sont classées phénotypiquement comme *Pseudomonas fluorescens* par l'utilisation de la galerie Api 20 ne.

Les deux extraits obtenus à partir de la souche d'actinomycète la MR<sub>5</sub> ont une activité inhibitrice importante avec des pourcentages de l'ordre de 48 et 50% pour l'extrait chloroformique et dichlorométhanique, respectivement. La séparation des molécules par chromatographie en couche mince et l'étude des spots obtenus par bio-autographie a permis la révélation d'une activité inhibitrice avec 03 spots, deux issus de l'extrait chloroformique avec des pourcentages de 32 et 36%, et un issu de l'extrait dichlorométhanique avec une inhibition de l'ordre de 35%.

Dans le but de progresser dans cette étude il serait souhaitable dans les prochains travaux de :

- Utiliser d'autres solvants et d'autres systèmes de migration afin d'améliorer l'extraction des molécules bioactives.
- Etudier la capacité des souches les plus promotrices à inhiber la maladie *in vivo* ;
- Purifier complètement les molécules produites par ces isolats en utilisant d'autres techniques comme l'HPLC, RMN, etc ;
- Tester les isolats contre d'autres agresseurs phytopathogènes.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

- ADAM Akram**. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxgénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Microbiologie. Université de Liège, Belgique, 2008, 165 p.
- ABOU AL FADIL Taissir**. Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au collet et sur racines : approches génétiques et histologiques. Biosciences végétales. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2006, 185 p.
- ALLAIRE Mathieu**. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Microbiologie agricole. Université Laval, 2005, 79 p.
- AOUAR Lamia (a)**. Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Biochimie et microbiologie appliqué. Université Mentouri Constantine, 2013, 218 p.
- AOUAR Lamia (b)**. 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. Biochimie et microbiologie appliquées. Université Mentouri Constantine, 2006, 63 p.
- ATTRASSI Khaled, SELMAOUI Karima, OUAZZANI TOUHAMI Amina, BADOUC Alain, DOUIRA Allal**. Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine, 2005, 144, 47-62.
- AZOUAOU-AIT KETTOUT T, BOUCENNA B, AMGOUD M, RAHMANIA F**. Essai de lutte *in vitro* par le glyphosate contre des champignons telluriques phytopathogènes : *Fusarium* et *Pythium*. Sciences et technologie, 2007, 26, 75-80.
- BAZOT Stéphane**. Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne. Science agronomique. Ecole national supérieur d'agronomie et des industries alimentaires, 2005, 176 p.
- BÉRUBÉ-GAGNON Jérôme**. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Microbiologie. Université du Québec, 2006, 64 p.
- BOUBRIT Souhila, BOUSAD Naaf**. Détermination *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sariette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée, ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses. Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, 2007, 64 p.

## Références bibliographiques

- BOUDEMAGH Allaoueddine**. Isolement à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, 2007, 108 p.
- BRAVIN Matthieu Nicolas**. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Ecosystèmes. Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques (Montpellier SupAgro), 2008, 204 p.
- COINEAU Yves**. Le sol : un milieu de vie. Fondation pour la nature et l'homme- Repères pour l'éducation à l'environnement, 1995, 2, 02.
- COLIN J, PUSSEMIER L**. Emploi des antagonismes bactériens en phytopathologie, cas des *Pseudomonas Fluorescents*. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, 1984, 22 p.
- DAVID H, McNear Jr**. The rhizosphere, roots, soil and everything in between. Nature education knowledge, 2013, 4, 13.
- DE CARNE-CARNAVALET Christian**. Agriculture biologique, une approche scientifique. Edition : France agricole. Productions végétales et grandes cultures, 2010, 434 p. ISBN : 978-2-85557-211-6.
- DJABALLAH Chamsseddine**. Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'LILA. Ecologie microbienne. Université Mentouri Constantine, 2010, 74 p.
- DJIGAL Djibril**. Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéricivores : effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Université de DAKAR, 2003, 140 p.
- FERHAT Maroua**. Recherche de substances bio actives de *Centaurea microcarpa* coss et dur. Biochimie. Université de M'sila, 2009, 80 p.
- GUENOUNE Salima**. Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch. Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri Constantine, 2009, 72 p.
- HIBAR Khaled, DAAMI-REMADI Mejda, EL MAHJOUB Mohamed (a)**. Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, Tropicultura, 2007, 25, 146-152.
- HIBAR Khaled, DAAMI-REMADI Mejda, JABNOUN-KHIAREDDINE Hayfa, EL AKRAM ZNAIDI Ibrahim, EL MAHJOUB Mohamed (b)**. Effet des extraits de compost

## Références bibliographiques

sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, 2006, 10, 2, 101-108.

**-ITO Shin-ichi, IHARA Takashi, TAMURA Hideyuki, TANAKA Shuhei, IKEDA Tsuyoshi, KAJIHARA Hiroshi, DISSANAYAKE Chandrika, ABDEL-MOTAAL Fatma F, EL-SAYED Magdi A.**  $\alpha$ -Tomatine, the major saponin in in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. Ulf-Ingo Flugge, 2007, 581, 3217–3222.

**-KARKACHI Noureddine.** Evaluation de l'effet de Triazoles vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp albedinis. Phytopathologie. Université d'Oran, 2013, 167 p.

**-KERBAB Souhila.** Les actinomycètes d'un sol salé : rôle des osmoprotecteurs naturels. Génie microbiologique. Université Ferhat Abbas, Sétif, 2010, 89 p.

**-KHOLKHAL Wahiba.** Recherche de nouvelles souches fongicides productrices d'antibiotiques à partir du sol et des concrétions sédimentaires des grottes d'Ain Fezza. Produits naturels. Université Abou Bekr Belkaid, 2006, 62 p.

**-KITOUNI Mahmoud.** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes, identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine, 2007, 170 p.

**-KNUDSEN Guy R, DANDURAND Louise-Marie.** Phytopathologie : l'étude de la santé des plantes. Université d'Idaho Moscow. 1ère édition, 2013, 40 p.

**-LEMANCEAU Philippe, PIVATO Barbara, MOUGEL Christophe, AVOSCAN Laure, MAZURIER Sylvie.** Diversité et activités microbiennes dans la rhizosphère : des atouts majeurs en agroécologie, 2007, 42-45 p.

**-MAMI Anas.** Recherche des bactéries lactiques productrice de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Microbiologie appliquée. Université d'Oran, 2013, 164 p.

**-MANSOUREH SADAT Sharifi Noori, HALIMI MOHD Saud.** Differential gene expression in East African highland bananas (*Musa* spp.): Interactions between non-pathogenic *Fusarium oxysporum*V5w2 and *Radopholus similis*. ScienceDirect, 2012, 42, 297-304. ISSN : 0716-9760.

## Références bibliographiques

- MEZAACHE Samia.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Microbiologie. Université Farhat ABBAS Sétif, 2012, 141 p.
- OKUSA NDJOLO Philippe.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Sciences biomédicales et pharmaceutiques. Université libre de Bruxelles, 2012, 201p.
- SI MOHAMED Abdeslem.** Etude de la compatibilité végétative chez des populations de *Fusarium oxysporum* isolées dans l'ouest Algérien. Microbiologie. Université d'Oran, 2009, 74 p.
- Smaoui Slim.** Purification et caractérisation de biomolécules à partir des microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Génie de procédés et environnement. Université de Toulouse, 2010, 207 p.
- TABAK Souhila, BENSOLTANE Ahmed.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Nature et Technologie, 2012, 06, 71-79.
- Tlemsani mokhetaria.** Contribution à l'étude du flétrissement vasculaire du pois chiche (*Cicer arietinum* L) causé par *Fusarium oxysporum* : caractérisation, lutte biologique et comportement variétal. Biotechnologie, intérêt des microorganismes, université d'Oran, 2010, 166 p.
- VEZINA Lise, LACROIX Michel.** Tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium* (*erwinia pectinolytiques*) et des *Pseudomonas fluorescents*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, 2010, 08 p.
- YEKKOUR A, SABAOU N, ZITOUNI A, ERRAKHI R, MATHIEU F, LEBRIHI A.** 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*. Letters in applied microbiology, 2012, 55, 427-435. ISSN: 0266-8254.

**Webgraphie:**

[1].

[http://www.chmbiodiv.nat.tn/index.php?option=com\\_content&task=view&id=57&Itemid=240](http://www.chmbiodiv.nat.tn/index.php?option=com_content&task=view&id=57&Itemid=240) Le : 05/04/2014

[2].

Kieffer Anna, ULLMANN Morgane. Les engrais azotés. <http://engraisazote.e-monsite.com/pages/la-symbiose.html> Le : 07/03/2014

[3].

<http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=15&cad=rja&uact=8&ved=0CEAQFjAEOAo&url=http%3A%2F%2Fwww.caseeworld.com%2Frentree%2Fco%2Fdownload.php%3Ff%3D74f06e0b86ec7080b114210e3d4041d7.pdf&ei=Ht4ZU4-aIMn8ywP3l4KACA&usg=AFQjCNFmMM505qV5hy0vv564BEe8flcF6Q>

Le : 7/3/2014

[4].

XiteBio Technologies Inc. <http://blog.xitebio.ca/6-ways-bacteria-promote-healthier-plants/#.Uu-EwPI5OSo> Le : 03/04/2014

[5]. **EUZEBY Hean P.** LPSN (Life of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr>. Le : 31/03/2014

[6].

[http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fanne.decoستر.free.fr%2Fbtelechar%2Fbpoly%2Fpseudo05.pdf&ei=1bA1U42LHY\\_whQf95YHgCg&usg=AFQjCNEzOir7t8L-sZz7JwMCtB06IvlHGg&bvm=bv.63808443,d.ZG4](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fanne.decoستر.free.fr%2Fbtelechar%2Fbpoly%2Fpseudo05.pdf&ei=1bA1U42LHY_whQf95YHgCg&usg=AFQjCNEzOir7t8L-sZz7JwMCtB06IvlHGg&bvm=bv.63808443,d.ZG4) Le : 28/03/2014

[7].

[https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&ved=0CGcQFjAJ&url=http%3A%2F%2Fnatres.psu.ac.th%2FLink%2FSoilCongress%2Fbdd%2Fsymp11%2F479t.pdf&ei=\\_MYAU\\_bBCobo4QSzr4CYCw&usg=AFQjCNGCDV7B028DAI\\_N33KxaIc9dz6vLA&bvm=bv.61535280,d.Yms](https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&ved=0CGcQFjAJ&url=http%3A%2F%2Fnatres.psu.ac.th%2FLink%2FSoilCongress%2Fbdd%2Fsymp11%2F479t.pdf&ei=_MYAU_bBCobo4QSzr4CYCw&usg=AFQjCNGCDV7B028DAI_N33KxaIc9dz6vLA&bvm=bv.61535280,d.Yms) Le : 16/02/2014

## Références bibliographiques

[8].

[http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/partie1/chap5\\_6c\\_symb\\_mycor.htm](http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/partie1/chap5_6c_symb_mycor.htm)

Le : 09/04/2014

[9].

[http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/partie1/chap5\\_6b\\_symb\\_phytopath.htm](http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/partie1/chap5_6b_symb_phytopath.htm)

Le : 11/03/2014

[10].

<http://fr.scribd.com/doc/32725009/TP-Gram> Le : 02/05/2014

[11].

**P Y Guillaume.** AC-LYON. [http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm) Le : 21/04/2014

[12].

[https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.techmicrobio.eu%2Fdocumentation\\_fabricants%2FBiomerieux%2520et%2520API%2FAPI%2520et%2520ID%2520galeries%2FAPI20NE%2FAPI20NE%2520NOT-20050H-FR.pdf&ei=n29VU5r8A4WI0AXSmYD4Bg&usg=AFQjCNE9MQ\\_D6lKqtXzOHe6ic9w\\_NrKHmA](https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.techmicrobio.eu%2Fdocumentation_fabricants%2FBiomerieux%2520et%2520API%2FAPI%2520et%2520ID%2520galeries%2FAPI20NE%2FAPI20NE%2520NOT-20050H-FR.pdf&ei=n29VU5r8A4WI0AXSmYD4Bg&usg=AFQjCNE9MQ_D6lKqtXzOHe6ic9w_NrKHmA)

Le : 21/04/2014

[13].

**DELAHAYE Arnaud.** Arnobio2. <http://www.arnobio2.com> Le : 20/04/2014

# *Annexes*

**Annexe 01**

**Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)**

<b>Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)</b>		<b>Milieu YMEA (Yeast Malt Extract Agar) + CaCO<sub>3</sub></b>	
Pomme de terre	200 g	Extrait de levure	04 g
Dextrose	20 g	Extrait de Malt	10 g
Agar	20 g	Glucose	04 g
PH = 6		Agar	20 g
		CaCO <sub>3</sub>	01 g
		PH = 7,3	
<b>Milieu G N (Gélose nutritive)</b>			
Peptone	6 g		
Extrait de bœuf	1 g		
Extrait de levure	2 g		
Chlorure de sodium	5 g		
Agar	14 g		
PH = 7, 3			

**Annexe 02**

**Tableau de lecture API 20 NE**

<b>Test</b>	<b>Composants actifs</b>	<b>QTE (mg/m)</b>	<b>Reactions/enzymes</b>	<b>Résultats négatif</b>	<b>Resultats positif</b>
<b>NO<sub>3</sub></b>	Potassium nitrate	0,136	Réduction des nitrates en nitrites	Incolore	Rose-rouge
			Réduction des nitrites en Azote	Rose	incolore
<b>TRP</b>	L-tryptophane	0,2	Formation d'indole (tryptophane)	Incolore/vertpale/ Jaune	Rose
<b>GLU</b>	D-glucose	1,92	Fermentation (Glucose)	Bleu à vert	Jaune
<b>ADH</b>	L-argenine	1,92	Arginine DIHydrolase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
<b>URE</b>	Urée	0,76	UREase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
<b>ESC</b>	Esculine citrate de fer	0,56 0,072	Hydrolyse (Bgalactosidase) ( ESCuline)	Jaune	Gris/marron/ Noir
<b>GEL</b>	Gélatine (origine bovine)	0,6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du piment noir
<b>PNPG</b>	4-nitrophényl-BD-galactopyranoside	0,22	B-galactosidase (para-nitrophényl-BD-galactopyranosidedase)	Incolore	Jaune
<b>GLU</b>	D-glucose	1,56	Assimilation (GLUCose)	Transparence	Trouble
<b>ARA</b>	L-arabinose	1,4	Assimilation ( arabinose)	Transparence	Trouble
<b>MNE</b>	D-mannose	1,4	Assimilation (mannose)	Transparence	Trouble
<b>MAN</b>	D-mannitol	1,36	Assimilation (mannitol)	Transparence	Trouble
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine	1,28	Assimilation (N-acétyl-glucosamine)	Transparence	Trouble
<b>MAL</b>	D-maltose	1,4	Assimilation (maltose)	Transparence	Trouble
<b>GNT</b>	Potassium gluconate	1,84	Assimilation (potassium gluconate)	Transparence	Trouble
<b>CAP</b>	Acide caprique	0,78	Assimilation (acide carpique)	Transparence	Trouble
<b>ADI</b>	Acide adipique	1,12	Assimilation (acide adipique)	Transparence	Trouble
<b>MLT</b>	Acide malique	1,56	Assimilation (malate)	Transparence	Trouble
<b>CIT</b>	Trisodium citrate	2,28	Assimilation (tri sodium citrate)	Transparence	Trouble
<b>PAC</b>	Acide phénylacétique	0,8	Assimilation (acide phénylacétique)	Transparence	Trouble

*Résumé et mots  
clés*

## تلخيص

يندرج هذا العمل ضمن نطاق مكافحة البيولوجية في المختبر ضد فطر *Fusarium oxysporum* المسؤول عن عفن جذور الطماطم. عن طريق استخدام سلالات من الريزوسفير. 43 ينتمون الى مجموعة البكتيريا الخيطية و 17 سلالة تنتمي الى مجموعة *Pseudomonas spp. fluorescents*.

التقييم المخبري لنشاط مضاد لهذا الفطر من سلالات ريزوسفيرية درس على وسط PDA بواسطة تقنية اسطوانات الاجار للبكتيريا الخيطية و تقنية الخطوط بالنسبة لمجموعة *Pseudomonas sp*.

تم استخراج الجزىء الاساسي النشط من سلالة البكتيريا الخيطية الاكثر نشاطا (MR<sub>5</sub>) باستخدام مذييين . dichlorométhane و chloroforme بعد ذلك تم تقييم نشاط هذه المستخرجات على وسط PDA. ثم فصل الجزيئات الحيوية النشطة باستخدام chromatographie en couche mince مع chloroforme/méthanol كنظام هجرة على نسب مختلفة. ثم تقييم البقع المتحصل عليها بواسطة bioautographie مباشرة على وسط PDA. ثم التعرف على نوع السلالتين الاكثر نشاطا من سلالات *Pseudomonas sp* باستخدام API 20 ne.

بالنسبة لسلالات البكتيريا الخيطية, 04 سلالات تمتلك نشاط تثبيطي مع اكبر نسبة 54% تظهر عند السلالة MR<sub>5</sub>. تم تسجيل نشاط تثبيطي مع جميع سلالات *Pseudomonas sp* باكبر نسب 47,64 و 33,52% مع السلالتين T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> اللتين صنفنا ظاهريا ب *Pseudomonas spp. fluorescents*. مستخرجات السلالة MR<sub>5</sub> الاثنتين لديهما نشاط تثبيطي بنسبة 48 و 54% للمستخلصين chloroformique و dichlorométhanique على التوالي. لوحظ بواسطة bioautographie نشاط مثبط لثلاث بقع، اثنتين من المستخلص chloroformique بنسب تثبيط 32 و 36%. والمستخلص dichlorométhanique مع تثبيط بنسبة 35%.

سمح هذا العمل بالكشف في المختبر عن سلالات ريزوسفيرية ذات نشاط ضد هذا الفطر وفصل الجزيئات النشطة بيولوجيا، وبالتالي فإنه من المستحسن التحقق من مفعولها مباشرة على النباتات وفصل وتحديد نوع الجزيئات المفصلة.

**كلمات المفتاح :** *Fusarium oxysporum*, بكتيريا خيطية, *Pseudomonas sp*, ريزوسفير

مكافحة بيولوجية.

## Abstract

This work falls within the scope of a test biological control against *Fusarium oxysporum* responsible for root rot of tomatoes, by the use of stem rhizosphere strains, 43 belonging to the group of filamentous actinomycetes and 17 strains belonging to the group of *Pseudomonas spp.* fluorescent.

The *in vitro* evaluation of the antifungal activity of the rhizospheric strains is studding in the PDA medium with the technical agar cylinders for filamentous actinomycetes and technique for streaks *Pseudomonas spp.* fluorescent. The extraction of the active principle of the most promising of the actinomycetes strain (MR<sub>5</sub>) is performing by rotation evaporation by the use of two solvents, dichloromethane and chloroform, the evaluation of the activity of these extracts was performing on PDA medium. The separation of bioactive molecules is performing by a thin layer chromatography with chloroform / methanol as migration system at different ratios. Evaluation of spots obtained was studding by direct bio-autography on PDA. The identification of the two most promising strains of *Pseudomonas sp* is realised by the API 20 gallery.

For filamentous actinomycetes strains, four strains possess inhibitory activity with a maximum of 54.11% for the strain MR<sub>5</sub>. Inhibitory activity is recording with all strains of *Pseudomonas sp* with a maximum of 47.64 and 33.52% with the stem T<sub>3</sub> and T<sub>2</sub> respectively; these two strains are phenotypically classifying as *Pseudomonas fluorescens*. Both extracts of strain MR<sub>5</sub> has a significant inhibitory activity with percentages in the range of 48 to 50% and the chloroform extract and dichloromethane, respectively. For bio-autography, inhibitory activity is observing with three spots, two from the chloroform extract with percentages of inhibition of 32 and 36%, and one from the dichloromethane extract with an inhibition of about 35 %.

This work allows the detection *in vitro* of anti-phytopathogenic rhizospheric strains and some of the partial purification of bioactive molecules activity, thus it is desirable to investigate their effect directly on plants and purify and identify the separate molecules.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum*, actinomycetes, *Pseudomonas sp*, rhizosphere, biocontrol.

## Résumé

Ce travail rentre dans le cadre d'un test de lutte biologique contre *Fusarium oxysporum* responsable de la pourriture des racines des tomates, par l'utilisation des souches rhizosphériques, 43 souches appartenant au groupe des actinomycètes filamenteux et 17 souches appartenant au groupe des *Pseudomonas spp.* fluorescents.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des souches rhizosphérique est étudiée sur le milieu PDA par la technique des cylindres d'agar pour les actinomycètes filamenteux et la technique des stries pour les *Pseudomonas spp.* fluorescents. L'extraction du principe actif de la souche la plus prometteuse des actinomycètes (MR<sub>5</sub>) est réalisée par rota-évaporation par l'utilisation de deux solvants, le dichlorométhane et le chloroforme, l'évaluation de l'activité de ces extraits est réalisée sur le milieu PDA. La séparation des molécules bioactives est effectuée par une chromatographie en couche mince par le chloroforme/méthanol comme système de migration à différents rapports. L'évaluation des spots obtenus est étudiée par bio-autographie directe sur milieu PDA. L'identification des deux souches les plus prometteuses des *Pseudomonas sp* est réalisée par galerie api 20 ne.

Pour les souches des actinomycètes filamenteux, 04 souches possèdent une activité inhibitrice avec un maximum de 54,11% pour la souche MR<sub>5</sub>. Une activité inhibitrice est enregistrée avec toutes les souches de *Pseudomonas sp* avec un maximum de 47,64 et 33,52% avec les souches T<sub>3</sub> et T<sub>2</sub> respectivement, ces deux souches sont classées phénotypiquement comme *Pseudomonas fluorescens*. Les deux extraits de la souche MR<sub>5</sub> ont une activité inhibitrice importante avec des pourcentages de l'ordre de 48 et 50% pour l'extrait chloroformique et dichlorométhanique, respectivement. Par bio-autographie, une activité inhibitrice est observée avec 03 spots, deux issus de l'extrait chloroformique avec des pourcentages d'inhibition de 32 et 36%, et un issu de l'extrait dichlorométhanique avec une inhibition de l'ordre de 35%.

Ce travail a permis la mise en évidence, *in vitro*, de l'activité anti-phytopathogène de quelques souches rhizosphériques et la purification partielle des molécules bioactives, de ce fait il est souhaitable d'étudier leur effet directement sur les plantes et de purifier et d'identifier les molécules séparées.

**Mots clés :** *Fusarium oxysporum*, actinomycète, *Pseudomonas sp*, rhizosphère, lutte biologique.