



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

*Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : biologie appliquée*

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master.
Filière : Sciences biologiques.
Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle.

Intitulé

**Essai de formulation d'un biopesticide à base d'inoculant
actinobactérien possédant une activité antifongique vis-à-vis
de *Fusarium* phytopathogène de blé**

Par : ZAHRI Khaoula

MBOYA Evarist Julius

Jury d'évaluation :

Président :	Pr. BOULAHROUF, A.	Université des Frères Mentouri. Constantine1.
Rapporteur :	Pr. KACEM CHAOUCHE, N.	Université des Frères Mentouri. Constantine1.
Examineur :	Mme. CHERFIA, R.	Université des Frères Mentouri. Constantine1.
Tutrice :	M ^{me} . ALLOUN, W.	Doctorante au LaMyBAM, U.F.M.Constantine1

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « Allah » le miséricordieux et le tout puissant qui nous a donné la force, la bravoure, la volonté et la patience pour effectuer ce modeste travail.

Nous adressons notre gratitude et nos remerciements les plus sincères à notre encadreur, Professeur KACEM-CHAOUCHE Noredine, Chef de Département de la Biologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour son encadrement, ses encouragements, sa confiance, sa patience, sa gentillesse et son soutien ainsi que ses conseils.

Nous tenons à exprimer notre profond remerciement au Professeur BOULAHROUF Abderrahmen pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce modeste travail malgré ses nombreuses préoccupations. Ainsi que Mme. CHERFIA Radia qui a bien voulu faire partie de cet honorable jury, et pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par ses remarques et ses propositions.

Nous tenons à remercier chaleureusement et du fond du cœur, la doctorante ALLOUN Wiem, notre adorable tutrice, qui nous a appris les méthodes de travail. Ainsi que pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ses conseils, ses encouragements et ses suggestions pour réaliser un travail de valeur.

Nos remerciements vont également à tous les membres du LaMyBAM, enseignants et doctorants, notamment, Mme. Kara Ali Mounira, Mme. Youcef Ali Mounia, M^{elle}Gares Maroua, M^{elle} Meghlaoui Feirouz, M^{elle}Djelid Hadjer, Mme. Toufouti Hadjer. Ainsi que tout le personnel et ingénieurs de la faculté SNV, M^{elle}Aioune Hanane, Mme Leila, Mr. Slougi Sadek , Mr. Ibrahim.

Finalement nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment.

Merci

Dédicaces

Je dédie ce travail

*À l'esprit de mon cher père Zahri Ramdan qui a toujours cru en moi et a eu
confiance en moi,*

*A ma chère mère Bouguerra Rabia qui n'a jamais cessé de prier pour ma
réussite,*

*A mes chères sœurs Amina, Marya et leurs maris qui m'ont toujours aidé et
soutenu,*

A mon adorable sœur Ahlem,

A mes chers frères Zaki et Abdelhakim,

*A mes adorables amies Malak, Fatima, Yasmine, Wiem et Kenza qui m'ont
soutenu dans les moments difficiles,*

A toute ma famille,

A tous mes autres amis.

Khaoula

Dédicaces

Je dédie ce travail

A tous ceux qui étaient là pour moi,

A tous ceux qui m'ont soutenu,

A tous ceux qui me souhaitent le meilleur,

*A Mlle Zahri Khaoula pour m'avoir accepté comme son binôme, pour sa
patience, son aide et ses encouragements durant toutes ces années*

À ma famille bien aimée, mes amis et mes collègues.

MBOYA, E. Julius

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Revue bibliographique	
1. Phytopathogènes du blé dur du genre <i>Fusarium</i>	3
2. Actinobactéries	4
2.1. Caractéristiques morphologiques et culturales	4
2.2. Taxonomie	4
2.3. Ecologie et physiologie	4
3. Pouvoir de phytostimulation et de biocontrôle des actinobactéries	5
3.1. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPB	5
3.1.1. Mécanismes directs	5
3.1.1.1. Fixation biologique de l'azote	5
3.1.1.2. Solubilisation du phosphate	5
3.1.1.3. Solubilisation du potassium	6
3.1.1.4. Production des sidérophores	6
3.1.1.5. Production de phytohormones et régulateurs de croissance	7
3.1.2. Mécanismes indirects	7
3.1.2.1. Antibiose	8
3.1.2.2. Compétition	8
3.1.2.3. Enzymes lytiques de la paroi fongique	8
3.1.2.4. Résistance systémique induite RSI	9
3.1.2.5. Gestion du stress abiotique	9
4. Formulation des biopesticides et phytostimulants à base d'actinobactéries	9
4.1. Définitions	9
4.1.1. Biopesticides	9
4.1.2. Biostimulants	9
4.1.3. Agents de biocontrôle ABC	10
4.2. Pesticides chimiques et biopesticides	10
4.3. La Formulation	10
4.3.1. Types de formulations	10
4.3.2. Agents de biocontrôle commercialisés à base de <i>Streptomyces</i>	11
Matériel et méthodes	
1. matériel biologique	12
1.1. Pathogène fongique	12
1.1.1. Réactivation des souches fongiques	12
1.1.2. Observation microscopique des souches fongiques	12

1.2. Agent antagoniste	12
1.3. Matériel végétal	12
2. Screening bactérien et activité antagoniste vis-à-vis de <i>Fusarium</i>	14
2.1. Cylindres d'Agar	14
2.2. Technique du trait	15
3. Caractérisation micro et macromorphologique des isolats actifs	16
3.1. Etude macroscopique	16
3.2. Etude microscopiques	16
4. Equipement enzymatique	16
4.1. Hydrolyse de l'amidon	16
4.2. Hydrolyse de la cellulose	17
5. Potentiel phytostimulant des isolats actifs	17
5.1. Production de l'AIA (Acide indole-3-acétique)	17
5.2. Production d'ammoniac (NH ₃)	17
6. Caractères biochimiques de l'isolat sélectionné	17
6.1. Recherche de la catalase	18
6.2. Recherche de l'oxydase	18
6.3. Utilisation du citrate comme seule source de carbone	18
6.4. Utilisation du mannitol	18
6.5. Utilisation du lactose	18
6.6. Hydrolyse de la caséine	18
6.7. Réduction de sulfates	19
7. Effet de la bactérie sur la germination des graines	19
7.1. Désinfection des graines	19
7.2. Inoculation des graines avec le phytostimulant et germination	19
8. Essai de formulation d'un phytostimulant à base de l'isolat S28	19
8.1. Production de Biomasse et croissance bactérienne	19
8.1.1. Suivre de l'évolution de la biomasse	20
8.1.2. Suivre de la consommation du substrat	20
8.2. Essai de formulation de l'isolat S28	21
8.2.1. Production de biomasse	21
8.2.2. Formulation en poudre et séchage de la biomasse	21
8.2.3. Vérification de la viabilité du produit final	22
Résultats et discussion	
1. Caractères macroscopiques et microscopiques de <i>Fusarium</i>	23
2. Screening bactérien et activité antagoniste vis-à-vis de <i>Fusarium</i>	24
3. Caractérisation micro et macromorphologique des isolats actifs	29
3.1. Etude macroscopique	29
3.2. Etude microscopique avec la technique de la coloration de Gram	34
4. Equipement enzymatique	35
4.1. Hydrolyse de l'amidon et de la cellulose	35

5. Potentiel phytostimulant des isolats actifs	37
5.1. Production de l'AIA (Acide indole-3-acétique)	37
5.2. Production d'ammoniac NH ₃	38
6. Caractères biochimiques de l'isolat sélectionné	42
7. Effet de la bactérie sur la germination des graines <i>In vitro</i> (indice Vigor)	42
8. Essai de formulation d'un phytostimulant à base de l'isolat S28	44
8.1. Production de biomasse et suivie de l'évolution de la croissance bactérienne	44
8.2. Vérification de la viabilité de la biomasse produite	48
8.3. Vérification de la viabilité du produit final	49
Conclusion et perspective	51
Références bibliographiques	52
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

ABC	Agent de biocontrôle
PGPB	Plant growth promoting bacteria
RSI	Résistance systémique induite
IOBC	Institut de contrôle biologique
PDA	Potato dextrose agar
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
CCLS	Centre national de contrôle et de certification des semences et plantes
CMC	Carboxyméthylcellulose
AIA	Acide indole-3-acétique
YT	Yeast-tryptone
BCP	Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol
VF	Gélose viande foie
DNS	Acide dinitrosalicylique

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure.01	Confrontation directe entre <i>F. oxysporum</i> ou <i>F. culmorum</i> ou <i>F.solani</i> et l'antagoniste potentiel. Technique de cylindre d'agar.	15
Figure.02	<i>F. oxysporum</i> ou <i>F. culmorum</i> ou <i>F.solani</i> en absence de l'antagoniste (Témoin).	15
Figure.03	Confrontation directe entre la souche d'actinomycète et la souche de <i>Fusarium</i> par la technique du trait.	16
Figure.04	Potentiel d'activité antifongique des actinobactéries sélectionnées exprimé en pourcentage d'inhibition (Technique du trait)	25
Figure.05	Potentiel d'activité antifongique des actinobactéries sélectionnés exprimé en pourcentage d'inhibition (Cylindres d'agar)	25
Figure.06	Hydrolyse de l'amidon (résultat positif et négatif).	36
Figure.07	Hydrolyse de la cellulose par la souche Pt-2 (+).	37
Figure.08	Test positif de production d'AIA par quelques isolats antagonistes.	37
Figure.09	Courbe de croissance de la souche S28 sur bouillon ISP2 Incubation à 30 ± 2 °C et 140 rpm/ 9 jours.	44
Figure.10	Consommation du glucose par la souche S28. Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 140 rpm.	44
Figure.11	Courbe de croissance de la souche S28. Culture sur bouillon ISP2 à 35 ± 2 °C et 150rpm	45
Figure.12	Consommation du glucose par la souche S28. Culture sur bouillon ISP2 à 35 ± 2 °C et à 150 rpm	45
Figure.13	Courbe de croissance de la souche S28. Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 150rpm.	46
Figure.14	Consommation du glucose par la souche S28. Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 150rpm.	46
Figure.15	Types morphologiques de <i>Streptomyces olindensis</i> en culture immergée (Pamboukian et al., 2002).	47
Figure.16	Taille des pellets. Incubation à 30 °C (A) à 140 rpm au 9 ème jour et (B) à 150 rpm au 10 ème jour.	47
Figure.17	Aspect microscopique de l'isolat S 28 en culture immergée (G x 40). Incubation à 30°C à 150 rpm.	48
Figure.18	Aspects microscopiques des colonies obtenues par le test de viabilité de produit fini obtenu par la méthode 2(G x 100) : (A) formulation avec CMC, (B) formulation avec l'amidon.	50
Figure.19	Viabilité du produit final de la méthode 2 (A) effectué avec le CMC et (B) effectué avec l'amidon après 2 jours d'incubation à 30°C.	50

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Biopesticides célèbres à base de <i>Streptomyces</i> .	11
Tableau 02	Caractéristiques du <i>Triticum durum</i> génotype Cirta.	13
Tableau 03	Préparation d'une gamme d'étalon à partir d'une solution mère du glucose 2M.	20
Tableau 04	Caractères macroscopiques de <i>Fusarium</i> .	23
Tableau 05	Aspect microscopique des <i>Fusarium</i> (X40)	24
Tableau 06	Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis de <i>F. oxysporum</i> (méthode du trait et cylindres d'agar)	26
Tableau 07	Test d'activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis <i>F. culmorum</i> (méthode du trait et cylindres d'agar)	27
Tableau 08	Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis, <i>F. solani</i> (méthode du trait et cylindres d'agar)	28
Tableau 09	Pourcentages des isolats actifs contre les <i>Fusarium</i> .	29
Tableau 10	Caractères macroscopiques des isolats bactériens d'actinobactéries.	29
Tableau 11	Caractères macroscopiques de quelques isolats actinobactériens.	33
Tableau 12	Caractères microscopiques des actinobactéries sélectionnées.	34
Tableau 13	Production de cellulase et d'amylase par les isolats sélectionnés.	35
Tableau 14	Production de l'AIA par les actinobactéries antagonistes.	37
Tableau 15	Production de l'ammoniac NH ₃ par les actinobactéries antagonistes.	39
Tableau 16	Quelques caractères biochimiques de l'isolat S28.	42
Tableau 17	Effet de l'inoculation de différentes concentrations de l'isolat S28 sur le pourcentage de germination et l'indice Vigor des graines de blé germées sur le milieu GLM.	42
Tableau 18	Effet de l'inoculation de différentes concentrations de l'isolat S28 sur le pourcentage de germination et l'indice Vigor des graines de blé germées sur le coton.	43
Tableau 19	Viabilité post-fermentaire de l'isolat S28. Incubation à 30°C à 150 rpm/6jours.	49
Tableau 20	Viabilité des produits finaux.	49

Introduction

L'emploi excessif d'engrais chimiques et de pesticides a causé le développement de la résistance des pathogènes, la dissémination dans l'environnement de produits chimiques à haute toxicité, la pollution des ressources naturelles en eaux (eaux de surfaces et nappes phréatiques) et l'augmentation de coût de revient des récoltes. Le véritable défi, en effet, consiste à réduire l'emploi de ces fertilisants et pesticides chimiques afin d'améliorer la productivité tout en protégeant l'environnement et la santé publique. En effet, différentes méthodes écologiques mieux appropriées sont en cours de développement afin de contrôler les pathogènes des grandes cultures comme le blé dur. Ces méthodes dites de biocontrôle représentent une approche alternative aux produits agrochimiques pour une agriculture durable. Parmi ces approches, (i) l'exploitation des bactéries associées aux plantes (bactéries rhizosphériques et endophytes), (ii) la recherche des microorganismes antagonistes permettant de contrôler les phytopathogènes et promouvoir la croissance des plantes de manière écologique et rentable (Fan et *al.*, 2015). Parmi ces microorganismes sélectionnés, les actinobactéries, sont largement étudiées pour le développement de biofertilisants et d'agents de biocontrôle (ABC) des phytopathogènes. Ce sont des bactéries filamenteuses à Gram positif très répandues dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Ludwig et Klenk, 2005 ; Vyas, 2018). Les actinobactéries du sol jouent un rôle important dans la rhizosphère de la plante. Elles participent à la minéralisation des composés organiques complexes et au recyclage des nutriments. Cet intérêt pour les actinobactéries est dû à leur capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires tels que les composés agroactifs, les antibiotiques, les enzymes lytiques extracellulaires, les composés antitumoraux, etc. Parmi les actinobactéries, le genre *Streptomyces* semble être la principale source de ces métabolites.

Les actinobactéries constituent, non seulement, un outil de lutte biologique prometteur, mais également des candidats potentiels pour améliorer la croissance des plantes (Winding et *al.*, 2004; Compant et *al.*, 2005; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006 ; Goudjal et *al.*, 2018) à travers plusieurs mécanismes tels que (i) la contribution à l'absorption d'eau et de nutriments, comme la fixation biologique de l'azote, la solubilisation du phosphate et du potassium (ii) la compétition par la colonisation des racines des plantes hôtes (iii) la production de sidérophores et de phytohormones. La formulation des produits à base d'actinobactéries bénéfiques constitue, de ce fait, une alternative prometteuse et écologique aux produits agrochimiques toxiques.

L'objectif principal de ce travail est la contribution à l'essai de formulation d'un produit de biocontrôle et de phytostimulation à base d'isolat actinobactérien possédant une

activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium*, agent phytopathogènes du blé dur. Le travail s'oriente sur le criblage *in vitro* et la sélection d'actinobactéries possédant une activité antagoniste vis-à-vis de trois espèces de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum* et *F. solani*), l'identification préliminaire des souches actives par l'étude des caractères macro et microscopiques, l'évaluation de l'effet de l'inoculation des graines de blé par la bactérie sur leur germination, et enfin un essai de préparation d'un produit de biocontrôle et de phytostimulation contenant l'inoculum bactérien comme principal ingrédient actif.

1. Phytopathogènes du blé dur du genre *Fusarium*

Fusarium représente le plus important des phytopathogènes sur le plan économique causant des pertes en rendement des cultures de blé dur en raison de la réduction du taux de germination des graines, la pourriture du collet et des racines, les maladies foliaires et en qualité des graines par la présence de toxines fusariennes considérés comme des contaminants dangereux pour la santé humaine et animale. Les espèces du genre *Fusarium* sont des mycètes filamenteux disposant d'un mycélium septé d'un aspect cotonneux, duveteux et aux macro et microconidies fusiformes et cloisonnées.

Plusieurs espèces fusariennes coexistent et coopèrent ensemble formant un complexe fongique dont la composition est dynamique (Köhl et al., 2007) et sont, de ce fait, impliquées dans l'apparition des symptômes et le développement des maladies céréalières. La prédominance et les interactions entre les espèces fusariennes au sein du complexe fongique dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Les facteurs abiotiques sont principalement liés à que la zone géographique et aux conditions climatiques comme la température et l'humidité (Logrieco et al., 2002; Van der Lee et al., 2015). Les facteurs biotiques sont représentés par les interactions intra et interspécifiques avec les autres microorganismes du sol par divers mécanismes comme la compétition spatiale et la concurrence sur les nutriments ainsi que l'antagonisme. Ces interactions sont particulièrement importantes car elle influencent la production de mycotoxines et de métabolites secondaires mais aussi l'augmentation ou la diminution du risque de développement de maladies fongiques chez les plantes et particulièrement le blé.

En général, les espèces les plus prédominante impliquées dans le processus d'infection de la pourriture racinaire sont: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Microdochium nivale* (syn. *Fusarium nivale*) et *F. verticillioides*. Le cycle infectieux de la pourriture racinaire par *Fusarium* est constitué de trois phases distinctes, l'infection initiale dans laquelle le pathogène prolifère autour du site infectieux (racines). Une phase de latence, dans laquelle on observe l'augmentation de la biomasse fongique et l'apparitions des premiers symptômes et une phase nécrotique caractérisée par la colonisation des tissus internes par le développement de lésions et nécroses et le noircissement des racines (Stephens et al., 2008; Beccari et al., 2011).

2. Actinobactéries

2.1. Caractéristiques morphologiques et culturales

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses à Gram positif avec un pourcentage très élevé en bases G+C (71% à 73%) (Lo et *al.* 2002). Elles sont d'une grande diversité morphologique et physiologique et de capacités métaboliques. Elles se développent par extension de la pointe et la ramification des hyphes formant ainsi un mycélium typique, complexe, générateur des spores enveloppées dans un sporange (Hasley et Leclerc, 1993 ; Horinouchi, 2002). Chez les *Streptomyces* le mycélium est développé et caractérisé par sa persistance, contrairement aux autres genres dont le mycélium est rapidement transformé en une masse de formes irrégulières (Agrawal, 2002).

Les colonies d'actinobactéries formées sur milieux solides résultent de l'accumulation d'hyphes ramifiés et non pas de cellules. Ces hyphes sont soit dispersés soit en forme de pellets (Perry et *al.*, 2004), et qui sont habituellement divisés par des septums en longues cellules polynucléées ($\geq 20\mu\text{m}$) (Prescott et *al.*, 2003). Le diamètre des colonies varie de 1 à 4 mm, elles sont d'un aspect compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contour lisse ou échancré. Très souvent elles sont pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris...etc. (Perry et *al.*, 2004). Les spores se forment par la division des extrémités des filaments. Elles sont soit isolées, soit groupées en chaînes, soit enfermées dans un sporange (sporangiospores) ou bien des conidies (conidiospores). La plupart sont immobiles et lorsqu'il y a mobilité, elle est limitée aux spores flagellés (Prescott et *al.*, 2003).

2.2. Taxonomie

Les actinobactéries appartiennent au phylum des *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, ordre *Actinomycetales* (Lechevalier et Lechevalier 1981; Ludwig et *al.* 2012) et à la famille *Actinomycetaceae*. Les membres de ce groupe forment des mycéliums et des spores asexuées (Balagurunathan et Radhakrishnan 2010).

2.3. Ecologie et physiologie

Les actinobactéries sont des bactéries ubiquitaires, colonisant différentes niches écologiques et largement répandues dans les écosystèmes terrestres et marins (Macagnan et *al.* 2006). Elles sont généralement hétérotrophes ou chimio-hétérotrophes possédant un équipement enzymatique très diversifié leur permettant de s'adapter et de coloniser la rhizosphère. La plupart des actinobactéries sont aérobies, mésophiles avec une température optimale de croissance comprise entre 25 et 30°C. La majorité des actinobactéries se développent dans des sols à pH compris entre 6 et 9, avec une croissance maximale autour de

la neutralité. Cependant, quelques souches de *Streptomyces* ont été isolées de sols acides (pH 3,5) (Kim et *al.* 2003).

3. Pouvoir de phytostimulation et de biocontrôle des actinobactéries

L'interaction entre les PGPB (de l'anglais : Plant growth promoting bacteria) et leurs plantes hôtes est définie par l'interaction entre la bactérie et les racines des plantes qui contribuent positivement à la protection phytosanitaire et à la croissance en stimulant de nombreux paramètres de croissance tels que la germination des graines, la longueur des tiges et des racines et la biomasse. Les actinobactéries ont été considérés comme contributeurs bénéfiques à la plante hôte en développant des associations symbiotiques ou non symbiotiques. Ils constituent des agents de biocontrôle prometteurs pour la gestion des phytopathogènes et la promotion de la croissance des plantes. Certains d'entre eux ouvrent des perspectives prometteuses pour la formulation de biopesticides pouvant être utilisés dans l'agriculture dans le cadre du développement durable et de la protection de l'environnement.

3.1. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPB

Une PGPB peut affecter la santé des plantes par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs mécanismes (Amaresan et *al.*, 2018), directs ou indirects.

3.1.1. Mécanismes directs

La promotion directe de la croissance des plantes s'exprime par la contribution à l'acquisition des éléments nutritifs du sol par les mécanismes suivants.

3.1.1.1. Fixation biologique de l'azote

L'azote est un macronutriment essentiel à la croissance des plantes. Bien qu'il constitue environ 78% des gaz de l'atmosphère (Singh et *al.*, 2019), cet azote atmosphérique insoluble (N₂) ne peut pas être utilisé par le système racinaire de la plante (Amaresan et *al.*, 2018). Les plantes peuvent absorber les formes d'azote associées à l'oxygène ou à l'hydrogène, à savoir l'ammoniac (NH₃) et le nitrate (NO₃⁻) (Jia et *al.*, 2013) généralement ajoutés au sol sous forme d'engrais. Cette conversion biologique fait appel à l'enzyme nitrogénase pour la fixation biologique de l'azote atmosphérique (Amaresan et *al.*, 2018 ; Singh et *al.*, 2019). L'inoculation du sol agricole par des actinobactéries diazotrophes/fixatrices d'azote est utile pour faciliter l'absorption d'azote par les racines des plantes (Amaresan et *al.*, 2018).

3.1.1.2. Solubilisation du phosphate

Les actinobactéries peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes en solubilisant du phosphate inorganique à partir de phosphate tricalcique, de phosphate dicalcique,

d'hydroxyapatite ou de composés organiques (Hamdali et *al.*, 2008a ; Singh et *al.*, 2019) et améliorer son absorption par la plante lorsque sa biodisponibilité est faible dans le sol (Hamdali et *al.*, 2008 ; Goudjal et *al.*, 2018). La bio-inoculation des plantes avec ces actinobactéries stimule la croissance végétale et réduit les besoins en engrais chimiques. Elles augmentent l'indice de Vigor, le pourcentage de germination, la biomasse végétale et soutiennent une production agricole respectueuse de l'environnement. Palaniyandi et *al.*, 2013c, 2013a, Hamdali et *al.*, 2008a; Passari et *al.*, 2015a, 2016b, ont signalé que divers genres d'actinobactéries sont impliqués dans la solubilisation du phosphate. Parmi eux, *Streptomyces*, *Micrococcus* et *Micromonospora* qui sécrètent des acides organiques, ainsi que le pouvoir chélateur des substances sidérophores (Sharma et Salwan, 2018).

3.1.1.3. Solubilisation du potassium

Après l'azote et le phosphore, le potassium est le troisième macronutriment essentiel à la croissance et au développement des plantes. Le potassium est généralement ajouté comme engrais en raison de la faible concentration de sa forme soluble. (Parmar et Sindhu, 2013 ; Gouda, 2018). Il joue un rôle important dans la photosynthèse, l'activation d'enzymes et la synthèse des protéines (Armengaud et *al.*, 2009 ; Basak et Biswas, 2009 ; Lin, 2010, Amaresan, 2018). La carence en potassium dans les sols agricoles entraîne une faible production de semences, une croissance lente et un rendement plus faible (Gouda, 2018). L'exploitation des PGPB solubilisant le potassium en tant que biofertilisants diminue les risques liés aux engrais chimiques (Setiawati et Mutmainnah, 2016 ; Gouda, 2018) et facilite l'absorption du potassium par les plantes (Kumar et Dubey, 2012 ; Gouda, 2018). *Streptomyces* a été prouvé capable de solubiliser du potassium à partir de minéraux silicatés (Liu et *al.*, 2012 ; Gouda, 2018 ; Amaresan, 2018).

3.1.1.4. Production des sidérophores

De nombreuses espèces d'actinobactéries notamment de *Streptomyces* sont des producteurs de sidérophores (Wang et *al.*, 2014). Ces molécules sont élaborées par les microorganismes comme métabolites secondaires en réponse aux faibles concentrations de fer. Ce sont des chélateurs de faible poids moléculaire (200-2000 Da) d'une grande affinité spécifique aux ions de fer facilitant son absorption (Ruanpanun et *al.*, 2010; Chu et *al.*, 2010 ; Hider et Kong, 2010 ; Goswami et *al.*, 2016). Les sidérophores actinobacériens sont de haute affinité pour le fer et assurent, de ce fait, la protection des plantes par le contrôle des phytopathogènes rendant la rhizosphère un environnement concurrentiel limitant ainsi la

disponibilité du fer pour les espèces pathogènes fongiques qui produisent des sidérophores de faible affinité (Glick, 2012 ; Wang et *al.*, 2014).

3.1.1.5. Production de phytohormones et régulateurs de croissance

Les phytohormones ou régulateurs de croissance végétale sont des substances organiques qui agissent comme des messagers chimiques impliqués dans différents processus physiologiques des plantes, principalement l'élongation des cellules, l'extension des racines (Glick, 2014 ; Kaur et *al.*, 2016), la formation et le développement de feuilles et des fleurs et la maturation des fruits (Khalid et *al.* 2006). La gestion des stress abiotiques et la stimulation de l'immunité des plantes ont également été rapportées (Waadt et *al.*, 2015; Wani et *al.*, 2016).

Les actinobactéries se révèlent être d'importants producteurs de substances régulatrices de croissance telles que les phytohormones, les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscisique. Ces substances influent directement sur la croissance des plantes et augmentent de manière significative la biomasse, la longueur des tiges et la biomasse sèche/humide des racines. (El-Tarabily et *al.*, 2009; Compant et *al.*, 2013; Goudjal et *al.*, 2013, Goudjal et *al.*, 2018).

De nombreuses espèces de *Streptomyces* sont considérées comme productrices de différentes phytohormones. Parmi elles, *S. nobilis*, *S. kunmingensis*, *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei*, *S. griseoviridis*, *S. lydicus*, *S. djakartensis*, *S. griseorubens*, *S. globisporus*, *S. caviscabies* et *S. enissocaesilis* (Mahadevan et Crawford, 1997; El-Tarabily et *al.*, 2009 ; Gopalakrishnan et *al.*, 2015a, 2015b, 2015c; Anwar et *al.*, 2016).

3.1.2. Mécanismes indirects

Les actinobactéries peuvent influencer indirectement la croissance des plantes par le contrôle des pathogènes par la compétition, l'antibiose (Zamoum et *al.*, 2015, Goudjal et *al.*, 2018) et la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaires des pathogènes fongiques telles que les chitinases et les glucanases (De-Oliveira et *al.*, 2010 ; Passari et *al.*, 2015, Goudjal et *al.*, 2018) ainsi que la gestion des stress abiotiques (El-Tarabily et Sivasithampam, 2006; Glick, 2012; Bouizgarne, 2013; Dey et *al.* 2014). La diversité des composés bioactifs produits par le genre *Streptomyces* les classe parmi les outils de biostimulation et de biocontrôle les plus prometteurs pour la commercialisation de biopesticides. De nombreuses études ont rapporté l'efficacité d'utilisation du genre *Streptomyces* en tant que traitement d'enrobage de semences de blé et de riz. De plus, la

croissance était significativement stimulée/améliorée chez les plantes inoculées par *Streptomyces* par rapport aux témoins non traités.

3.1.2.1. Antibiose

L'antibiose repose sur la production de métabolites secondaires ayant des activités antifongiques pour contrôler les phytopathogènes (Harman et Shores., 2007 ; Weyens et *al.*, 2010). Parmi ces composés bioactifs, l'aminoside, la streptomycine, l'actinomycine et la tétracycline (Barrios-Gonzalez et *al.* 2005; El-khawaga et Megahed 2012). La majorité de ces composés ont été isolés à partir des *Streptomyces*, distribués dans les écosystèmes terrestres et marins (Pathom Aree et *al.*, 2006; Manivasagan et *al.*, 2014). Les actinobactéries, et en particulier les *Streptomyces*, ont été considérés comme antagonistes vis-à-vis de plusieurs phytopathogènes appartenant aux genres *Alternaria*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*. D'après Li et *al.* (2012), la souche *Streptomyces globisporus JK-1* productrice de substances volatiles est capable d'inhiber la croissance de *Botrytis cinerea*. Selon Couillerot et *al.* (2014), la souche *Streptomyces anulatus S37* isolée de la rhizosphère de *Vitis vinifera* protège la vigne par l'induction de la défense naturelle contre des différents phytopathogènes et la synthèse de la streptochlorine qui inhibe la croissance de *Botrytis cinerea*.

3.1.2.2. Compétition

La compétition sur les nutriments est un mécanisme important de lutte biologique, car la carence en nutriments peut provoquer la mort automatique du pathogène (Beauchamp, 1993; Benitez et *al.*, 2004). La colonisation des racines par l'agent de biocontrôle est importante pour instaurer une compétition sur les nutriments dans la rhizosphère et réduire ainsi le nombre des sites habitables pour les pathogènes (Podile et Kishore, 2006). Les *Streptomyces* semblent concurrencer plus efficacement de nombreux microorganismes présents dans la rhizosphère en raison de leur aspect filamenteux et la production des spores qui leur permet de résister aux conditions environnementales défavorables.

3.1.2.3. Enzymes lytiques de la paroi fongique

La majorité des actinobactéries du sol sont des saprophytes décomposeurs de la matière organique. Ils produisent une large gamme d'enzymes extracellulaires, notamment les nucléases, les lipases, les glucanases, les xylanases, les protéases, les peptidases, les peroxydases, les chitinases, les cellulases, les ligninases, les pigninases, l'hémicellulase et la kératinase. Ces enzymes contribuent à son potentiel de biocontrôle contre un large spectre de phytopathogènes fongiques et bactériens dont la paroi est constituée de polymères tels que la

chitine, le glucane, la cellulose, les protéines et les lipides (Gupta et al. 1995; Fodil et al. 2011). De ce fait, de nombreuses espèces de *Streptomyces* productrices de chitinases inhibent efficacement les agents pathogènes fongiques et les insectes nuisibles (Tahmasebet al. 2014; Karthik et al. 2015; Yandigeri et al. 2015)

3.1.2.4. Résistance systémique induite RSI

La stimulation des processus des défenses naturelles de la plante par certains PGPB face aux pathogènes est appelée « Résistance systémique induite » (de l'anglais : ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon et al., 1998). Selon Couillerot et al., (2014), la souche *Streptomyces anulatus* S37 isolée de la rhizosphère de la vigne *Vitis vinifera*, est capable d'induire la résistance systémique de la vigne contre *Botrytis cinerea*.

3.1.2.5. Gestion du stress abiotique

Les facteurs de stress abiotique tels que les hautes températures, la sécheresse, les inondations, la salinité, les métaux lourds sont susceptibles d'engendrer des pertes en rendements des cultures. Aly et al. (2003, 2012) a affirmé que l'inoculation de *Streptomyces* sp. stimule de façon significative la croissance du maïs et du blé dans des conditions salines. D'autre part, *Streptomyces padanus* met en jeu différentes stratégies de résistance à la sécheresse comme l'induction d'une pression osmotique plus élevée dans les cellules végétales et la lignification des parois cellulaires (Hasegawa et al. 2004, 2005).

4. Formulation des biopesticides et phytostimulants à base d'actinobactéries

4.1. Définitions

4.1.1. Biopesticides

Selon Thakore (2006) les biopesticides sont définis comme des organismes vivants (animaux, végétaux ou microorganismes) ou produits issus de ces organismes ayant la particularité de limiter ou de supprimer les pathogènes des cultures (Chandler et al., 2011 ; Leng et al., 2011).

4.1.2. Biostimulants

Selon Nardi et al. (2016) les biostimulants sont définis comme des matériaux contenant une ou plusieurs substances et/ou microorganismes capables de stimuler l'absorption des nutriments et l'efficacité de leur utilisation par les plantes, d'augmenter la tolérance des plantes au stress biotique et abiotique et d'améliorer la qualité des cultures lorsqu'ils sont appliqués en petites quantités.

4.1.3. Agents de biocontrôle ABC

Selon l'institut de contrôle biologique (IOBC), un agent de biocontrôle (ABC) est un antagoniste naturel ou une entité biotique qui réduit la densité de population d'un autre organisme vivant le plus souvent pathogène (IOBC, 2012).

4.2. Pesticides chimiques et biopesticides

Les pesticides chimiques présentent plusieurs avantages mais leur emploi excessif entraîne la résistance des pathogènes et la réduction de la biodiversité. Ainsi, les biopesticides représentent une alternative sûre pour la préservation de l'environnement et le développement durable. La sécurité offerte par les pesticides microbiens, du fait de leur sélectivité contre les autres microorganismes, contrairement aux pesticides chimiques représente leur plus grand atout. Ils peuvent être utilisés dans les habitats où les pesticides chimiques sont interdits d'emploi. De plus, les résidus des pesticides chimiques sont plus dangereux et toxiques que ceux des biopesticides. Cependant, les contraintes liées à la viabilité et à la résistance aux conditions environnementales constituent les majeures préoccupations et défis pour leur formulation (Koul., 2011).

4.3. La Formulation

Le processus de formulation joue un rôle important dans l'efficacité et la stabilité du produit, en optimisant la survie et l'efficacité de l'agent microbien constituant le principal ingrédient actif (Martinez-Alvarez et *al.*, 2016, Goudjal et *al.*, 2018).

4.3.1. Types de formulations

Il existe différentes manières de préparer un inoculum bactérien à base de spores d'actinobactéries en tant qu'ingrédient actif pour des essais sur le terrain et en serre. Les plus courantes sont les formulations sèches (en poudres ou en granulés) et les formulations liquides. Les formules sèches sont plus appropriées que les formules liquides en raison (i) de la facilité du stockage et du transport, (ii) la durée de conservation prolongée, et (iii) elles peuvent facilement être transformées en suspensions à base d'eau selon les besoins de pulvérisation ou d'applications par trempage des racines (Lumsden et *al.*, 1995 ; Goudjal et *al.*, 2018). En outre, la préparation, la production en grandes quantités et la distribution des formulations dépendent du site d'application (traitement des semences, application foliaire et sol) (Sabaratnam et Traquair, 2002 ; Sharma and Salwan, 2018).

Toutefois, l'effet sur terrain des bio-inoculants à base des spores d'actinobactéries peut ne pas être aussi efficace que leur potentiel lors des essais en laboratoire et en serre et peut être influencé par plusieurs facteurs externes, comme la morphologie du sol, la température, le

pH, la disponibilité de l'eau et des nutriments, ainsi que les facteurs internes liés aux interactions avec les microorganismes du sol (Sharma and Salwan, 2018 ; Goudjal et *al.*, 2018). Afin d'optimiser l'efficacité des formulations d'actinobactéries sur terrain, plusieurs techniques ont été envisagées pour une utilisation accrue dans la production agricole durable. (Goudjal et *al.*, 2018).

Les formulations sont constituées **d'un principe actif** (micro-organisme ou spores), **un support inerte**, permettant l'administration du principe actif densément peuplé, **des adjuvants** (composés favorisant le maintien et la fonction du principe actif en le protégeant contre les rayons UV, la pluie, la rétention d'humidité ou la dessiccation, ou favoriser la propagation et la dispersion du biopesticide (Burgess, 1998; Boyetchko et *al.*, 2002)

Les ingrédients d'un biopesticide doivent assurer (i) la stabilité pendant la production, le traitement et le stockage des biopesticides, faciliter l'application, (ii) le protéger contre les conditions environnementales défavorables, et enfin (iii) promouvoir son efficacité.

4.3.2. Agents de biocontrôle commercialisés à base de *Streptomyces*

Parmi les formulations commercialisées à base des spores d'actinobactéries, le genre *Streptomyces* est à l'origine d'environ 60% des insecticides et herbicides d'origine naturelle recensés au cours des cinq dernières années (Sharma, 2014 ; Suzuki et *al.*, 2000). Le tableau ci-dessous présente les biopesticides commercialisés les plus importants à base de *Streptomyces*.

Tableau 1. Biopesticides célèbres à base de *Streptomyces*.

Produit	Formulation	Pathogène / maladie	Références
<i>S.melanosporofaciens</i> EF-76	Chitosane et chitosane-polyphosphate	Gale de la pomme de terre causée par <i>S. scabies</i>	(Beausejour et <i>al.</i> , 2003; Jobin et <i>al.</i> , 2005)
<i>S. pseudovenezuelae</i> 13.4.2	Charbon de bois ou os d'animaux	<i>F. oxysporum sp.</i>	(Postma et <i>al.</i> , 2013).
<i>S.griseoviridis</i> K61 (MycostopR)		<i>Ceratocystis radicola</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Verticillium dahlia</i>	(Suleman et al., 2002 chapter 8) Minuto et <i>al.</i> , 2006).
<i>S.lydicus</i> WYEC108 (ActinovateR)	Poudre mouillable	<i>Phytophthora ramorum</i>	Elliott et al., 2009 (White et <i>al.</i> , 1990).
Arzentt composé de 4 souches différentes de <i>S. hygroscopicus</i>			(Hamby and Crawford, 2000)

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Pathogène fongique

Trois phytopathogènes fongiques, appartenant au genre *Fusarium*, nous ont été aimablement remis par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) lieu du stage. Il s'agit de *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum* et *F. solani*, isolés à partir d'une culture de blé dur présentant les symptômes de la fusariose.

1.1.1. Réactivation des souches fongiques

La réactivation des souches fongiques est effectuée par une série de repiquages par pique centrale et par stries à l'aide d'une anse de platine sur gélose PDA (Potato dextrose agar) en prélevant aseptiquement le mycélium d'une colonie pure. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 5 à 7 jours. Une observation régulière est effectuée pour vérifier la pureté de la souche fongique.

1.1.2. Observation microscopique des souches fongiques

L'examen microscopique d'un mycélium prélevé à partir de colonies jeunes à l'aide d'un microscope optique a été réalisé par l'observation à l'état frais par la technique de scotch en utilisant du lactophénol.

1.1.3 Agent antagoniste

57 actinobactéries isolées à partir des sédiments marins et de la rhizosphère du blé dur ont été fournies par le LaMyBAM. Pour la réactivation, les actinobactéries ont été repiquées par des stries sur gélose ISP2 et GLM jusqu'à l'obtention des souches pures et performantes. Les boîtesensemencées ont été incubées à 30°C pendant 21 jours.

1.2. Matériel végétal

Les graines de blé dur utilisées pour l'étude *in vivo* appartiennent à la variété Cirta. Elles nous ont été aimablement fournies par le CCLS El Khroub Constantine. Ainsi, le tableau 2 présente les caractéristiques de cette variété (Bulletin des variétés de céréales autogames (Centre national de contrôle et de certification des semences et plantes, Edition 2015).

Tableau 2. Caractéristiques du *Triticum durum* génotype Cirta

	Origine	Algérie
	Pédigrée	KB214-OKB-20KB-0KB-0KB-1KB-1KB
	Obtenteur	ITGC-Elkhroub
	Demandeur	ITGC
Caractérisation au champ		
Coléoptile		
	Pigmentation anthocyanique	Nulle ou très faible
Première feuille		
	Pigmentation anthocyanique	Nulle ou très faible
Plante		
	Port au taillage	Demi-dresse à demi-étale
Fréquence des plantes ayant la dernière feuille		
	Retombante	Nulle ou très faible
	Hauteur (tige, épi et barbes)	Moyenne
Dernier feuille		
	Glaucescence de la gaine	Forte
	Glaucescences du limbe	Moyenne
	Epoque d'épiaison (1er épillet visible sur 50% des plantes)	Tardive
Barbes		
	Pigmentation anthocyanique	Nulle ou très faible
Tige		
	Pilosité du dernier nœud	Faible
	Glaucescence du col de l'épi	Faible
Epi		
	Glaucescence	Moyenne
Caractérisation sur épi sec		
Barbes		
	Distribution des barbes	Sur toute la longueur
	Longueur par rapport à l'épi	Plus longues
	Couleur	Noire
Epi		
	Longueur à l'exclusion des barbes	Moyen
	Pilosité du bord du 1er article du rachis	Nulle ou très faible
	Couleur (à maturité)	Blanc
	Forme en vue de profil	Pyramidale
	Compacité	Moyenne
Paille		
	Moelle en section transversal	Moyenne
Glume inférieure		
	Forme de la glume	Allongée
	Forme de la troncature	Echancrée
	Largeur de la troncature	Etroite
	Longueur du bec	Court
	Forme du bec	Droit
	Pilosité de la face externe	Absente
Grain		
	Forme	Demi-allongé
	Longueur des poils de la brosse vue dorsale	Courts

Coloration au phénol	Nulle ou très faible
Type de développement	Hiver
Caractéristiques agronomiques et technologiques	
Rendement	Elevé
Poids de mille grains (PMG)	Elevé
Qualité semoulière	Bonne
Mitadinage	Résistance
Teneur en protéines :	15,19%
Resistance aux maladies	
Oïdium sur feuille	Faiblement sensible
Oïdium sur épi	Résistante
Rouille brune	Moyennement sensible
Charbon	*
Fusariose	*
Septoriose	Moyennement sensible

* : inconnue

2. Screening bactérien et activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium*

L'activité antifongique des isolats actinobactériens vis-à-vis de *Fusarium* a été évaluée par confrontation directe de l'antagoniste et du pathogène selon la technique des cylindres d'Agar (Benhamou et Chet, 1996) et la technique du trait.

2.1. Cylindres d'Agar

Deux disques de 6 mm de diamètre contenant le pathogène-test et l'agent antagoniste ont été prélevés à l'aide d'un perforateur aseptisé à la flamme du bec bunsen, à partir d'une colonie jeune (fongique et/ou bactérienne) et déposés sur une gélose PDA sur une équidistance de 3cm (figure1). Les boîtes ont été, ensuite, incubées à 30 °C à pendant 7 jours (Tortorano et *al.*, 1979 ; Boughachiche et *al.*, 2005) et observées régulièrement. Chaque souche a été testée contre les trois *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani*). Un disque contenant l'agent pathogène a été placé seul, en l'absence d'agent antagoniste constituant le témoin (figure 2). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule de Wang et *al.*, (2002) qui est la suivante :

$$PI (\%) = (R \text{ témoin} - R \text{ test}) / R \text{ témoin} \times 100$$

Où :

PI (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique confronté à l'agent antagoniste ;

R témoin : distance radiale maximale de croissance du champignon ;

R test : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

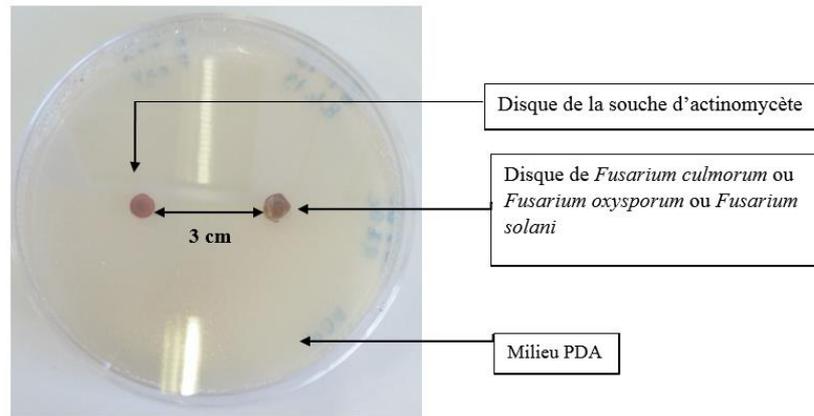


Figure 1. Confrontation directe entre *F. oxysporum* ou *F. culmorum* ou *F. solani* et l'antagoniste potentiel. Technique de cylindre d'agar.

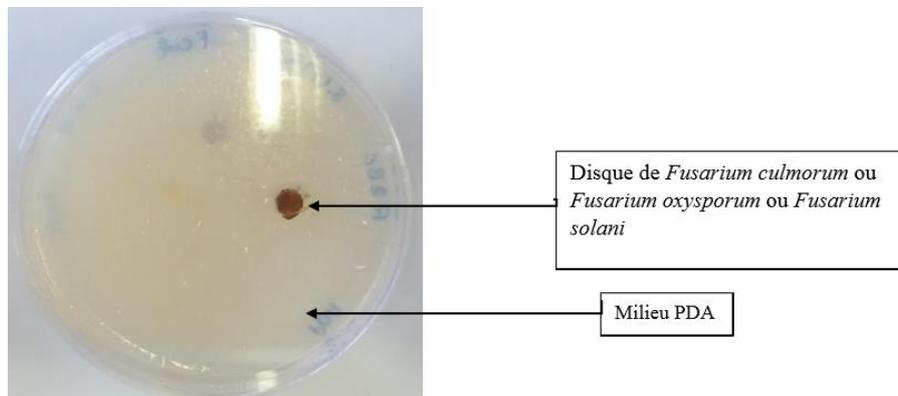


Figure 2. *F. oxysporum* ou *F. culmorum* ou *F. solani* en absence de l'antagoniste (Témoin).

2.2 Technique du trait

Cette technique consiste à confronter l'antagoniste ensemencé en trait sur milieu PDA et incubé à 30°C pendant 3 jours avec un cylindre du phytopathogène placé sur une équidistance de 3 cm du trait bactérien (figure3). Les témoins ont été réalisés par le placement de disques fongiques en l'absence d'antagoniste. Les boîtes ont été incubées encore une fois à 30°C pendant 10 jours et observées régulièrement. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été calculé selon la formule préalablement citée (Wang et al., 2002).

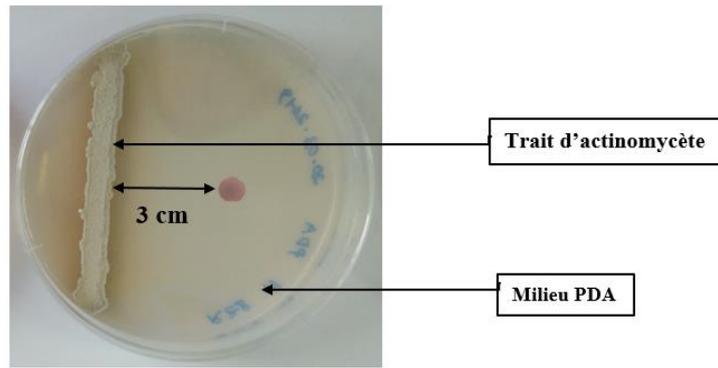


Figure 3 Confrontation directe entre la souche d'actinomycète et la souche de *Fusarium* par la technique du trait.

3. Caractérisation micro et macromorphologique des isolats actives

3.1. Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des isolats potentiellement actives vis-à-vis de *Fusarium*, c'est-à-dire possédant une activité antagoniste, ont été déterminés selon la méthode de Shirling et Gottlieb (1966) sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 et ISP7 après 7 à 14 jours d'incubation à 30 °C. Les caractères étudiés sont : l'aspect, la couleur et la forme des colonies ; la couleur du mycélium aérien (MA) et du mycélium primaire/de substrat (MS), la production de pigments diffusibles.

3.2. Etude microscopiques

L'examen microscopique de l'antagoniste a été réalisé par l'observation de frottis de colonies de 7 jours après coloration de Gram (annexe 2), pour permettre l'observation des spores ainsi que le mycélium.

4. Equipement enzymatique

4.1. Hydrolyse de l'amidon

La mise en évidence de l'activité amylasique a été effectuée sur une gélose contenant de l'amidon soluble (annexe 1) comme seule source de carbone selon la méthode modifiée de Kurup et Fink (1975). Après 5 à 7 jours d'incubation à 30°C, les boîtes ont été inondées avec une solution de Lugol. Les zones colorées en violet indiquent la présence d'amidon tandis que les halos (zone claire autour de la colonie) indiquent son absence et donc la présence d'une activité amylasique.

4.2. Hydrolyse de la cellulose

Les isolats ont été ensemencées par spots (touches) à la surface de la gélose contenant du carboxyméthylcellulose CMC à partir d'une culture de 3 jours. Après 4 jours d'incubation à 30 °C, les boîtes sont inondées par le rouge de Congo. L'hydrolyse de la cellulose a été révélée par l'apparition d'un halo autour de la colonie bactérienne (Budihal et *al.*, 2015).

5. Potentiel phytostimulant des souches actives

5.1. Production de l'AIA (Acide indole-3-acétique)

La mise en évidence de la production de l'agent régulateur de croissance des plantes (Acide indole-3-acétique) AIA par les antagonistes a été réalisée selon la méthode de Berríos, Illanes et Aroca (2004) et Khamna et *al.* (2010) avec quelques modifications. Des erlenmeyers de 100 ml contenant 15 ml du bouillon YT à base d'extrait de levure et de tryptone (annexe 1) additionné de 0.6 ml d'une solution de L-tryptophane 0.1 M ont été inoculés avec un volume égal à 1ml d'une suspension sporale d'une densité de 10^6 c/ml puis incubés à 30°C pendant 5 jours dans un incubateur agité de type IKA KS 4000 i control à 150 rpm. Après incubation, le surnageant de chaque culture a été récupéré par centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 min (Toumatia et *al.*, 2016). La révélation de la production de l'AIA a été réalisée par l'ajout de 2 ml du réactif de Salkowski à 1 ml de surnageant. Le virage de couleur vers le rose après 30 min à l'obscurité indique la présence de l'acide indole-3-acétique. La densité optique a été lue à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV-1280 SHIMADZU. La DO a été, par la suite, comparée à la courbe d'étalonnage d'AIA (Acros Organics) (annexe 3) pour déterminer la quantité d'AIA produite (Passari et *al.*, 2015).

5.2. Production d'ammoniac (NH₃) :

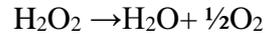
La production d'ammoniac a été mise en évidence par inoculation de tubes à essai contenant 10 ml d'eau peptonée inoculés avec la bactérie (Cappuccino et Sherman, 1992). Après 3 jours d'incubation à 30 °C, 0.5 ml du réactif de Nessler a été additionné et le virage de couleur vers le brun à jaune indique la production d'NH₃ (Test positif).

6. Caractères biochimiques de l'isolat sélectionnée

Parmi les isolats d'actinomycètes ayant une activité anti-fusarienne, l'isolat S28 a été sélectionné pour la réalisation du reste du travail.

6.1. Recherche de la catalase

La production de catalase est révélée par un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles issues de la production d'O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂ selon la réaction suivante (Delarras, 2007).



Pour cela, une colonie bactérienne a été frottée énergiquement contre une lame contenant une goutte d'H₂O₂ (10 volumes). L'absence de mousse/ bulles indique l'absence de catalase.

6.2. Recherche de l'oxydase

Le test oxydase consiste à humecter un disque oxydase par une goutte d'eau distillée stérile puis l'étaler sur une colonie bactérienne. L'apparition d'une coloration violet foncé qui vire au noir après 10 min indique la production d'oxydase (Camille, 2007).

6.3. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

L'utilisation de citrate est étudiée par ensemencement par stries de la bactérie sur le milieu Citrate de Simmons (annexe 1) Après incubation à 30°C pendant 7 jours, l'utilisation du citrate est révélée par l'alcalinisation du milieu et l'apparition d'une couleur bleue. (Simmons, 1926)

6.4. Utilisation du mannitol

L'utilisation du mannitol est mise en évidence par l'ensemencement de la bactérie sur milieu gélosé Mannitol-Mobilité en tube par piqûre centrale. Après 7 jours d'incubation à 30°C, le virage de couleur au jaune l'acidification du milieu et donc l'utilisation du mannitol. (Test positif).

6.5. Utilisation du lactose

L'utilisation du lactose est mise en évidence par l'ensemencement en spot de la bactérie sur gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP). Après l'incubation à 30° C pendant 7 jours, l'utilisation du lactose est révélée par le virage de la couleur bleue du milieu au jaune.

6.6. Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est mise en évidence par l'ensemencement en spot de la bactérie sur gélose contenant 20% de lait écrémé avec incubation à 30°C pendant 14 jours. L'hydrolyse de la caséine est confirmée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (Williams et Cross, 1971 ; Gordon et Smith, 1953).

6.7. Réduction de sulfates

La réduction des sulfates est testée sur la gélose viande foie (VF). Un résultat positif se traduit par une couleur noire de la colonie après 7 jours d'incubation à 30 °C.

7. Effet de la bactérie sur la germination des graines

7.1. Désinfection des graines

Afin d'éliminer les contaminants préexistants, les graines sont trempées dans de l'éthanol pendant 5 min puis transférées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 min avant d'être rincées 4 fois à l'eau distillé stérile pour éliminer les traces d'éthanol.

7.2. Inoculation des graines avec le phytostimulant et germination

Des suspensions sporales de différentes concentrations bactériennes ont été préparées (7×10^5 cellule/ml ; 3×10^6 cellule/ml ; 6×10^6 cellule/ml ; 8×10^6 cellule/ml ; 10×10^6 cellule/ml ; 3×10^7 cellule/ml) pour le traitement des graines avant germination. La germination a été réalisée selon le protocole modifié de Tamreihao et *al.* (2016). 200 graines ont été trempées dans chaque suspension sporale (C1, C2...à C6) et maintenues sous agitation pendant 2h. 100 graines traitées par ces concentrations cellulaires ont été déposées sur gélose GLM à raison de 20 graines par boîte. Les 100 autres graines ont été déposées sur du coton stérile imbibé d'eau distillée stérile à raison de 20 graines par boîte. Le témoin consiste en l'utilisation de graines désinfectées non traitées avec la bactérie sur GLM et coton (100 graines à raison de 20 graines par boîte). Après 3 jours d'incubation à l'obscurité à 30°C le nombre des graines germées a été calculé et la longueur des racines et la longueur des tiges mesurées en millimètre et comparés aux témoins. L'indice Vigor a été calculé selon la formule de Baki et Anderson (1973).

$$\text{Indice Vigor} = \text{Pourcentage de germination} \times \text{longueur de la plantule}$$

Longueur de la plantule = longueur de la tige + longueur de la racine.

8. Essai de formulation d'un phytostimulant à base de l'isolat S28

8.1. Production de Biomasse et croissance bactérienne

Afin d'étudier le comportement de l'isolat S28 et la production de biomasse en culture immergée, une pré-culture a été réalisée dans 9ml d'eau peptonée stérile à partir de colonies jeunes de l'isolat S28 cultivé sur une gélose ISP2 et bien homogénéisé à l'aide d'un vortex. Par la suite, des flacons de 250 ml contenant 100 ml du bouillon ISP2 ont été inoculés avec

1ml de la pré-culture. Les flacons ont été incubés dans un incubateur agité de type IKA KS 4000 i control. Trois cultures ont été menées, en modifiant la température d'incubation et la vitesse de rotation.

- **Culture 1** : à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une vitesse d'agitation de 140 rpm pendant 9 jours.
- **Culture2** : à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une vitesse d'agitation de 150 rpm pendant 6 jours.
- **Culture3** : à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une vitesse d'agitation de 150 rpm pendant 10 jours.

8.1.1. Suivre de l'évolution de la biomasse

Chaque jour, un flacon a été sacrifié, tout au long de la période d'incubation, pour récupérer la biomasse produite par l'isolat S28 dans les conditions précédemment citées et ce, par filtration de la culture liquide sur papier Wattman. La biomasse récupérée a été ensuite séchée à 105°C pendant 48h puis pesée. Le poids sec de chaque culture a été noté, en tenant compte du poids sec du papier filtre. L'aspect microscopiques des pelletes est également observé sous microscope optique.

8.1.2. Suivre de la consommation du substrat

La consommation du substrat est un indice de croissance bactérienne. Ainsi, la détermination quotidienne de la concentration du glucose dans les cultures a été déterminée par une réaction colorimétrique due à la présence de l'acide dinitrosalicylique (DNS) selon la méthode modifiée de Miller (1959). 1ml de chaque échantillon récupéré par filtration des cultures correspondant à chaque jour d'incubation a été additionné d'un volume égal à 1 ml de DNS dans des tubes à essai. Le mélange obtenu, homogénéisé, a été porté à ébullition pendant 5 min dans un bain marie à 100°C puis refroidi immédiatement. Ensuite, 8ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube et la densité optique a été lue à 550 nm.

Une gamme d'étalons a été préparée à partir d'une solution mère de glucose de concentration de 2M selon le tableau 3. La concentration en glucose a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue (annexe 3).

Tableau 3. Préparation d'une gamme d'étalon à partir d'une solution mère du glucose 2M

Tube	Blanc	1	2	3	4	5
Glucose (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNS (ml)	1	1	1	1	1	1
Ebullition pendant 5 min						
Eau distillée (ml)	8	8	8	8	8	8
Agitation. Lecture de l'absorbance à 550 nm						

8.2. Essai de formulation de l'isolat S28

8.2.1. Production de biomasse

Des erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml du bouillon ISP2 ont été inoculés avec 2ml de préculture à partir d'une colonie jeune de l'isolat S28. Après incubation à 30°C pendant 6 jours sous agitation permanente à 150rpm, la viabilité cellulaire a été évaluée par comptage du nombre d'unités formant colonies (ufc)/ml sur gélose ISP2 effectuée par une série de dilutions avec incubation à 30 °C pendant 5 jours.

8.2.2. Formulation en poudre et séchage de la biomasse

Le processus de formulation est inspiré de des travaux de Sabaratnam et Traquair (2002). Deux techniques de séchage de biomasse ont été utilisées, à savoir la lyophilisation et le séchage à 40°C en utilisant la paille de blé comme support solide de la biomasse mélangé soit à la CMC soit à l'amidon et du carbonate de calcium (CaCO₃).

Méthode 1

Dans la première méthode, la biomasse récupérée par filtration est mélangée à deux préparations préalablement autoclavées contenant 30g de paille de blé broyée, 10 g de CMC (première préparation) ou d'amidon (deuxième préparation), 1.5g de carbonate de calcium (CaCO₃). Les deux préparations sont bien mélangées puis réparties en boîtes de pétri stériles à raison de 2 boîtes par préparation. Les boîtes sont congelées à -20 °C pendant une nuit puis lyophilisées dans un lyophilisateur de laboratoire FREEZONE pendant 7 h.

Méthode 2

La deuxième méthode consiste à mélanger l'une des deux préparations additionnées du glycérol comme agent cryoprotecteur directement aux cultures liquides sans filtration pour conserver les propriétés du milieu de culture et de la biomasse. Les deux préparations ont été bien homogénéisées puis réparties en micro-tubes de 1.5 ml. Les micro-tubes ont été congelés à -20 °C pendant une nuit puis lyophilisés dans un lyophilisateur de laboratoire FREEZONE pendant 18 h.

Méthode 3

La troisième méthode consiste à mélanger l'une des deux préparations directement aux cultures liquides sans filtration. Les deux préparations ont été bien homogénéisées puis réparties en boîtes de pétri stériles à raison de 2 boîtes par préparation puis séchées à 40°C pendant 3 jours dans un four pasteur.

8.2.3. Vérification de la viabilité du produit final

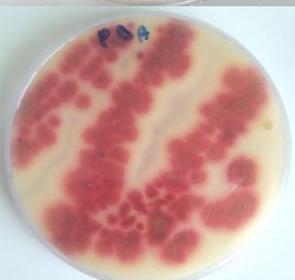
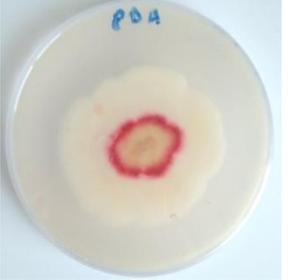
L'évaluation de la viabilité cellulaire a été réalisée par comptage du nombre d'unités formant colonies (ufc)/g sur gélose ISP2 après 5 jours d'incubation à 30°C à raison de trois répétitions par préparation et par méthode de séchage. Les colonies développées sur le milieu sont observées sous microscope optique après coloration de Gram pour confirmer la pureté de la souche.

Résultats et discussion

1. Caractères macroscopiques et microscopiques de *Fusarium*

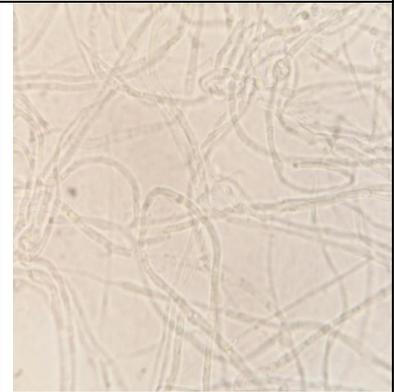
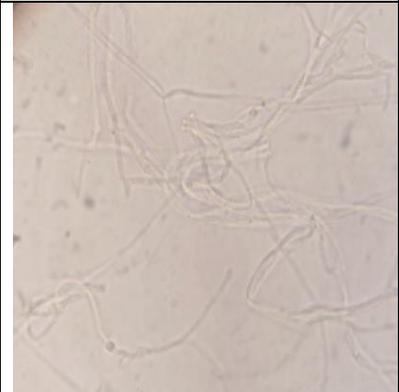
Le repiquage réalisé par des stries serrées et par piqûre centrale sur PDA, considéré comme milieu favorable pour le développement et la sporulation des *Fusarium* (Botton et al.,1990) a permis d'avoir des colonies pures. Le tableau 4 représente l'aspect macroscopique des trois souches de *Fusarium* à savoir *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani*. Cependant, le tableau 5 présente l'aspect microscopique des isolats fongiques par la technique de scotch en utilisant du lactophénol.

Tableau 4. Caractères macroscopiques de *Fusarium*

Souche fongiques	Aspect macroscopique		Caractères macroscopiques
	Par piqure centrale	Par stries	
<i>F. oxysporum</i>	 	 	<p>Tapis mycélien à croissance lente. Les colonies sont volumineuse cotonneux. Le mycélium aérien est abondant, dense, de pigmentation rose homogène et le mycélium de substrat est de pigmentation rose foncé.</p>
<i>F. culmorum</i>	 	 	<p>Tapis mycélien fin à croissance lente. Les colonies sont cotonneuses. Le mycélium aérien est blanc à jaunâtre et le mycélium de substrat est beige jaunâtre à rouge.</p>

<p><i>F. solani</i></p>			<p>Tapis mycélien fin à croissance rapide. Le mycélium aérien est rose saumon et le mycélium de substrat est saumon pâle qui vire au noir au fur et à mesure de la croissance.</p>
-------------------------	---	--	--

Tableau 5. Aspect microscopique des *Fusarium* (X40)

<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. culmorum</i>
		

2. Screening bactérien et activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium*

L'exploration des interactions entre les agents antagonistes et leurs comportements vis-à-vis des pathogènes permet de mieux comprendre leur comportement dans la rhizosphère (Larkin et Fravel, 1999). Le test d'antagonisme *In vitro* par confrontation direct (technique de trait et les cylindres d'agar) et le calcul du pourcentage d'inhibition demeure un critère de présélection des souches potentiellement actives.

Dans ce travail, 57 isolats d'actinobactéries testés contre trois *Fusarium* ont donné les pourcentages d'inhibition illustrés par les figures 4 et 5 et les tableaux 6, 7 et 8.

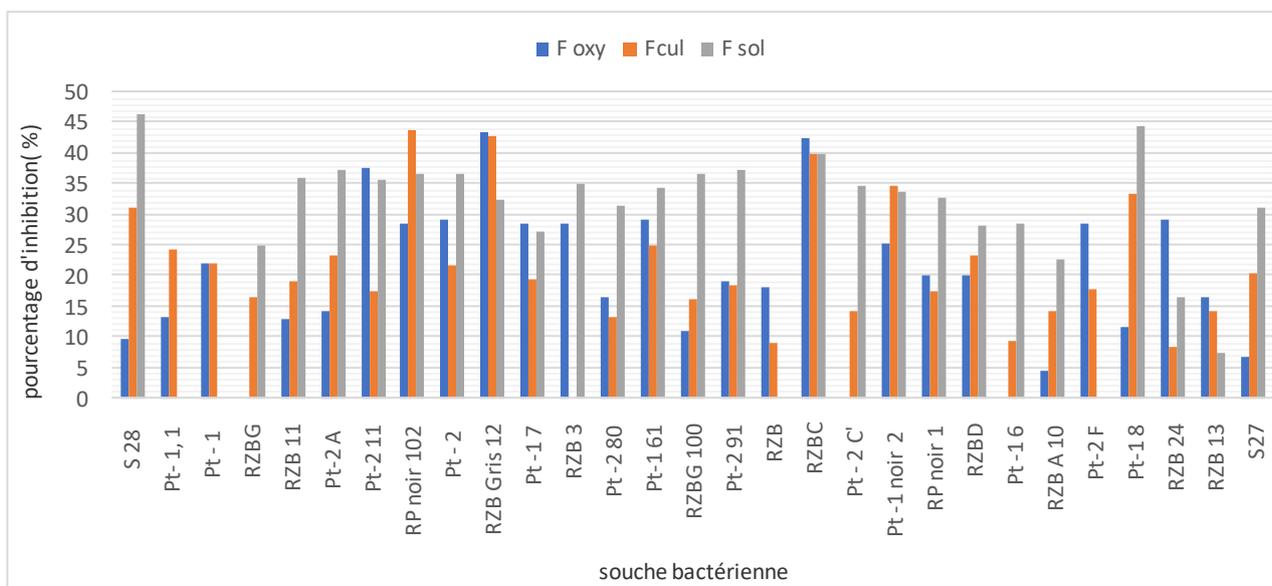


Figure 4. Potentiel d'activité antifongique des actinobactéries sélectionnées exprimé en pourcentage d'inhibition (Technique du trait)

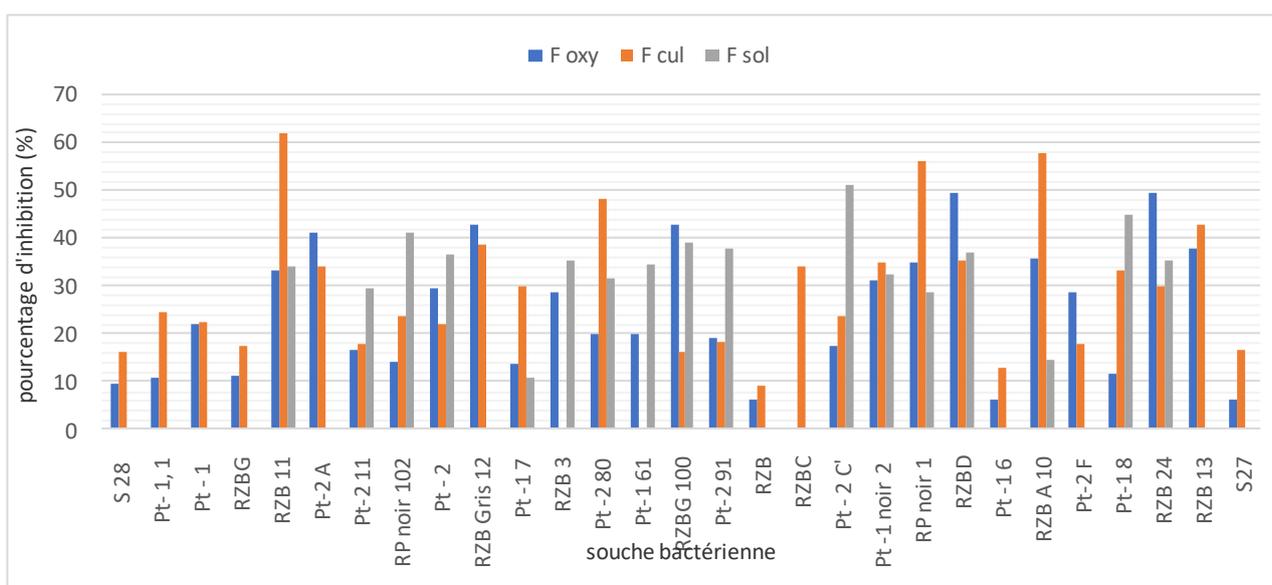


Figure 5. Potentiel d'activité antifongique des actinobactéries sélectionnés exprimé en pourcentage d'inhibition (Cylindres d'agar)

57 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du blé ont été criblées pour leur propriétés de biocontrôle des pathogènes du blé du genre *Fusarium*. 29 isolats ont présenté une activité antagoniste vis-à-vis de ce phytopathogène avec des pourcentages d'inhibition qui varient selon l'isolat bactérien, l'espèce de *Fusarium* testée et la technique utilisée. Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique PI% pour *F. oxysporum* varie de 4.45 % à 43.66 % (méthode du trait) et de 6.25 % à 49.39% (cylindres d'agar). Pour *F. culmorum*, il varie de 8.33 % à 43.75 % (méthode du trait), et de 9.09 % à 61.53 % (cylindres d'agar), et de 7.4 % à 46.42 % (méthode du trait) et de 10.97 % à 51 % (cylindres d'agar)

pour *F. solani*. (Figures 6 et 7). Le pourcentage des souches actives est recensé dans le tableau 9.

Tableau 6. Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis de *F. oxysporum* (méthode du trait et cylindres d'agar)

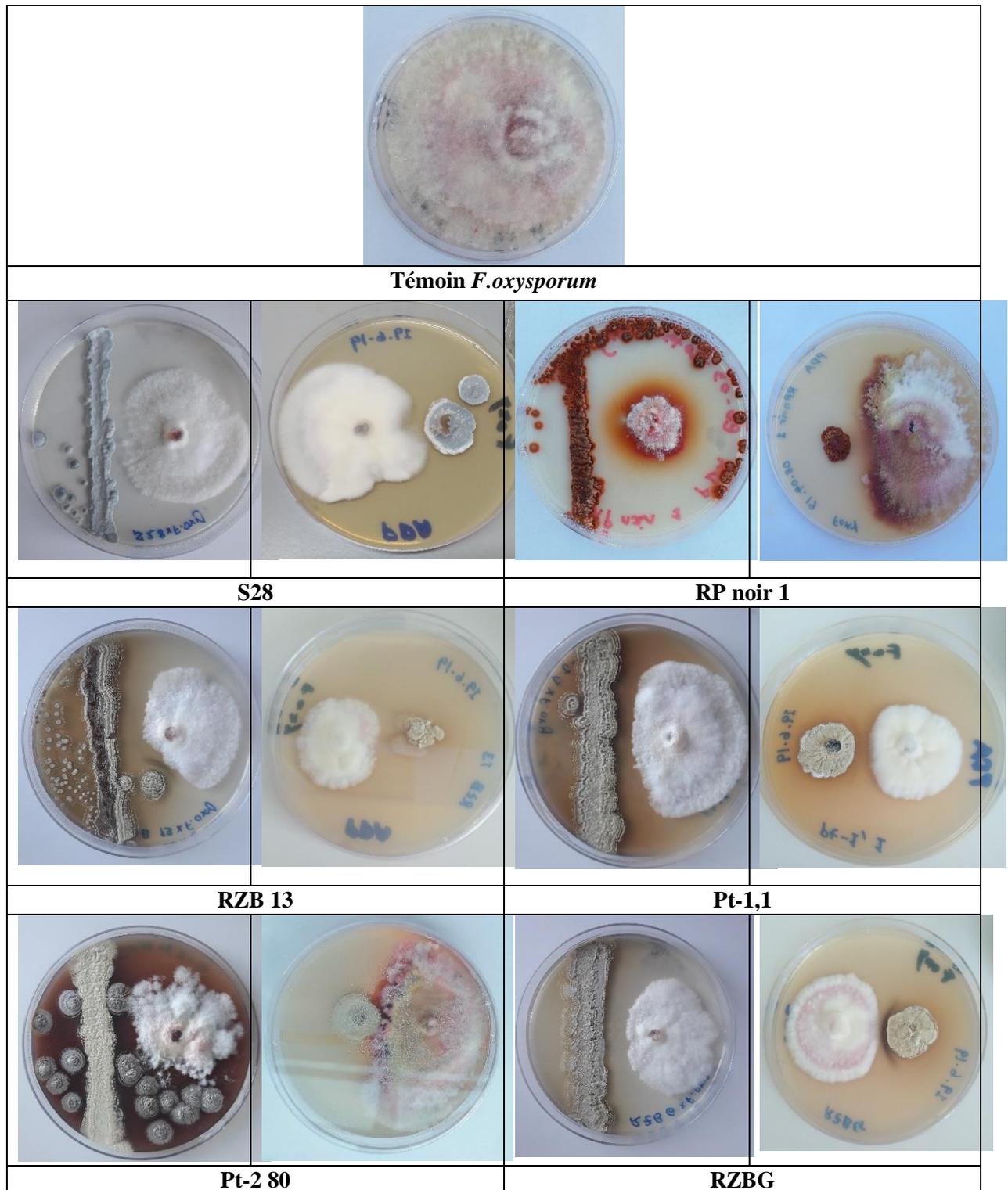


Tableau 7. Test d'activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis *F. culmorum* (méthode du trait et cylindres d'agar)

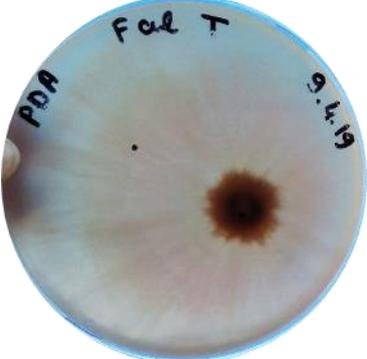
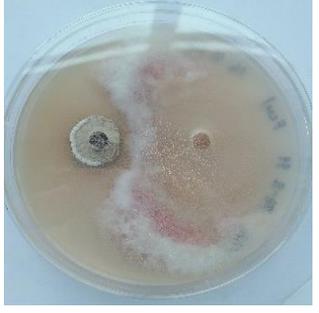
			
<i>F.culmorum</i> Témoin			
			
Pt-2 C'		Pt-2 11	
			
Pt-1 6		RZBG100	
			
Pt-2 80	Pt-1 noir 2	Pt-1 8	RZB 13

Tableau 8. Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis, *F. solani* (méthode du trait et cylindres d'agar)

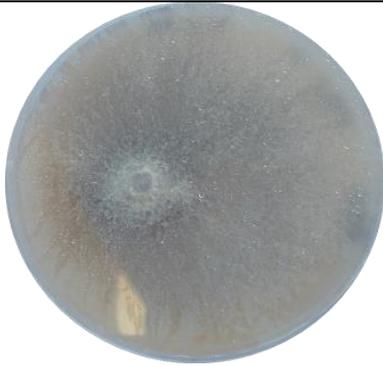
			
<i>F. solani</i> Témoin			
			
RP noir 1		RZB 13	
			
Pt-1 6		RP noir 102	
			
Pt-2 C'	Pt-1 noir 2	RZBC	RZB 24

Tableau 9. Pourcentages des souches actives contre les *Fusarium*

Méthode		Vis-à-vis trois <i>Fusarium</i>	Vis-à-vis deux <i>Fusarium</i>	Vis-à-vis un <i>Fusarium</i>
Trait	Nombre des souches actives	21 Exemple : Pt-2A, RZB Gris 12, RZBC	8 Exemples : Pt-1,1, Pt-1, REB 3	0
	% des souches actives	72.4%	27.6%	0 %
Cylindre d'agar	Nombre des souches actives	15 Exemple : RZB 11, Pt-2 80, RP noir 1	13 Exemples : S 27, Pt-1 6 RZB	1 RZBC
	% des souches actives	51.7 %	44.8 %	3.4%

Les isolats testés ont exhibé des pourcentages élevés d'inhibition de la croissance fongiques vis-à-vis des trois *Fusarium* testés (72.4% des isolats par la méthode de trait et 51.7 % par la méthode des cylindres d'agar) et, par conséquent, ils s'avèrent être des agents de lutte biologique prometteurs. Le potentiel de biocontrôle de ces isolats pourrait être dû à l'antibiose, la production de sidérophores, de cyanure d'hydrogène (HCN) et d'enzymes extracellulaires hydrolytiques telles que les chitinases et les glucanases (De-Oliveira et *al.*, 2010; Passari et *al.*, 2015).

3. Caractérisation micro et macromorphologique des isolats actifs

3.1. Etude macroscopique

L'étude macromorphologique des isolats d'actinobactéries, potentiellement actifs vis-à-vis de *Fusarium*, effectuée sur différents milieux (ISP2, ISP4, ISP5 et ISP7) selon Shirling et Gottlieb (1966) est récapitulée dans le tableau suivant.

Tableau 10. Caractères macroscopiques des isolats bactériens d'actinobactéries

Isolat	Milieu	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MS	Pig. mélanoides
S28	ISP2	(+)(+)(+)	Gris clair	Beige	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Gris	Beige crème	(-)
	ISP5	(+)(+)	Gris	Beige crème	(-)
	ISP7	(+)(+)	Gris claire	Beige foncé	(-)
Pt-1 noir 2	ISP2	(+)(+)(+)	Gris	Bourgandy a noir	(+)
	ISP4	(+)(+)(+)	Gris à violet	Violet	(-)
	ISP5	(+)(+)(+)	Gris à rose	Cris a rose	(-)
	ISP7	(+)(+)	Taupe	Crevette	(-)
RZB 24	ISP2	(+)(+)(+)	Blanc grisâtre	Orange	(-)
	ISP4	(+)	Gris	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Gris	Gris	(-)
	ISP7	(+)(+)	Gris	Beige	(-)
RAB 11	ISP2	(+)(+)(+)	Beige	Beige foncé	(-)
	ISP4	(+)	Beige	Beige foncé	(-)
	ISP5	(+)	Beige	Transparent à Beige	(-)

	ISP7	(+)(+)	Gris	Verdâtre	(-)
Pt-2 80	ISP2	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Marron verdâtre	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige	Beige foncé	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige /crème	Beige /jaunâtre	(-)
Pt-2 91	ISP2	(+)(+)(+)	Beige	Beige a marron	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige	Beige foncé	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige /crème	Beige /jaunâtre	(-)
Pt-1 61	ISP2	(+)(+)(+)	Beige claire	Beige	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Blanc à crème	Crème	(-)
Pt-2 C'	ISP2	(+)(+)(+)	Beige foncé	Beige foncé	(-)
	ISP4	(+)(+)	Vert	Vert	(-)
	ISP5	(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Beige verdâtre	(-)
RZBG 100	ISP2	(+)(+)(+)	Beige à marron	Beige verdâtre	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
RZBG	ISP2	(+)(+)(+)	Beige foncé	Marron	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige verdâtre	Beige verdâtre	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
Pt-1 7	ISP2	(+)(+)(+)	Gris marron	Marron	(+)
	ISP4	(+)(+)	Beige	Crevette	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
Pt-1 6	ISP2	(+)(+)(+)	Beige à marron	Marron	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Beige foncé	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige claire	Beige claire	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
RZB 13	ISP2	(+)(+)	Beige à bleu	Beige jaunâtre	(-)
	ISP4	(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Blanc à crème	Blanc a crème	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
S27	ISP2	(+)(+)(+)	Gris verdâtre	Verdâtre	(-)
	ISP4	(+)	Crème	Crème	(-)
	ISP5	(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige verdâtre	Crème	(-)
RZB GRIS 12	ISP2	(+)(+)(+)	Gris foncé	Orange	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige grisâtre	Beige foncé	(-)
	ISP5	(+)	Transparent à Grisâtre	Transparent	(-)
	ISP7	(+)(+)	Gris	Crème	(-)
RZB 3	ISP2	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Beige verdâtre	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige verdâtre	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Beige jaunâtre	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige jaunâtre	Transparent	(-)
RZB	ISP2	(+)(+)(+)	Gris verdâtre	Vert	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Gris à bleu	Gris	(-)
	ISP5	(+)(+)	Gris	Beige	(-)
	ISP7	(+)	Gris	Beige	(-)

Pt-1 8	ISP2	(+)(+)(+)	Beige verdâtre	Marron verdâtre	(+)
	ISP4	(+)	Crème / transparent	Transparent	(-)
	ISP5	(+)	Beige à transparent	Beige à transparent	(-)
	ISP7	(+)	Beige à crème	Transparent	(-)
RZBC	ISP2	(+)(+)(+)	Gris	Marron	(+)
	ISP4	(+)(+)	Beige grisâtre	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Gris	Transparent	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Gris	Gris	(-)
RZBD	ISP2	(+)(+)(+)	Gris	Marron	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige grisâtre	Marron claire	(-)
	ISP5	(+)	Gris	Transparent	(-)
	ISP7	(+)(+)	Gris	Beige grisâtre	(-)
Pt – 2 11	ISP2	(+)(+)(+)	Blanc à crème	Marron	(+)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige	Beige foncé a marron	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Beige à crème	Beige à crème	(-)
RP noir 1	ISP2	(+)(+)(+)	Orange	Orange	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Rose foncé	Orangé	(-)
	ISP5	(+)	Orange	Orange	(-)
	ISP7	(+)(+)	Orangé	Orangé	(-)
Pt-2	ISP2	(+)(+)	Blanc jaunâtre	Transparent	(-)
	ISP4	(+)(+)	Marron	Marron	(-)
	ISP5	(+)	Orange	Orange	(-)
	ISP7	(+)	Transparent	Transparent	(-)
Pt-1 1	ISP2	(+)(+)(+)	Marron grisâtre	Marron foncé	(+)
	ISP4	(+)(+)(+)	Beige claire	Beige	(-)
	ISP5	(+)(+)(+)	Beige à crème	Beige à crème	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige	Marron claire	(-)
Pt-2 F	ISP2	(+)(+)	Gris pourpre	Gris verdâtre	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige à marron	Marron	(-)
	ISP5	(+)	Transparent grisâtre	Transparent grisâtre	(-)
	ISP7	(+)	Transparent	Transparent	(-)
Pt -2 A	ISP2	(+)(+)(+)	Gris	Marron foncé	(-)
	ISP4	(+)(+)	Beige à gris	Beige	(-)
	ISP5	(+)	Gris	Beige à gris	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Gris	Beige foncé	(-)
RZB A 10	ISP2	(+)(+)(+)	Taupe	Marron verdâtre	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Taupe	Marron	(-)
	ISP5	(+)(+)	Taupe	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)	Beige à crème	Beige	(-)
Pt-1	ISP2	(+)(+)(+)	Blanc grisâtre	Beige foncé	(-)
	ISP4	(+)(+)(+)	Gris claire	Beige à gris	(-)
	ISP5	(+)(+)	Beige à crème	Beige	(-)
	ISP7	(+)(+)(+)	Gris foncé gris	Gris	(-)
RP noir 102	ISP2	(+)(+)(+)	Blanc grisâtre	Marron	(-)
	ISP4	(+)(+)	Blanc	Blanc	(-)
	ISP5	(+)	Blanc	Beige claire	(-)
	ISP7	(+)(+)	Blanc	Beige	(-)

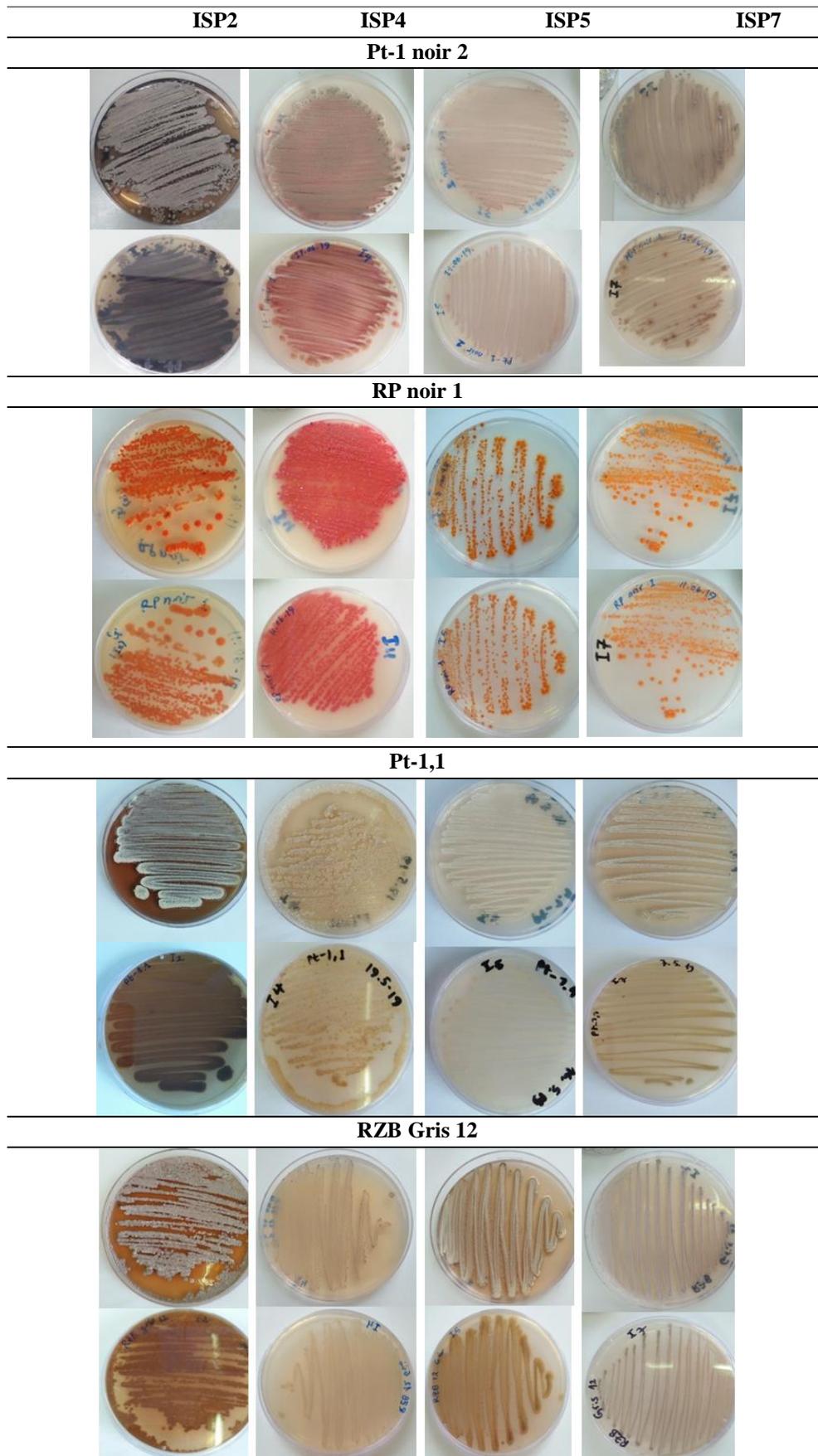
La plupart des souches étudiées se développent lentement sur tous les milieux de culture. La croissance est optimale sur ISP2 avec le glucose comme source de carbone et l'extrait de Malt comme source d'azote produisant une couche dense de spores dont la couche externe est hydrophobe. Certaines d'entre elles produisent des exsudats muqueux,

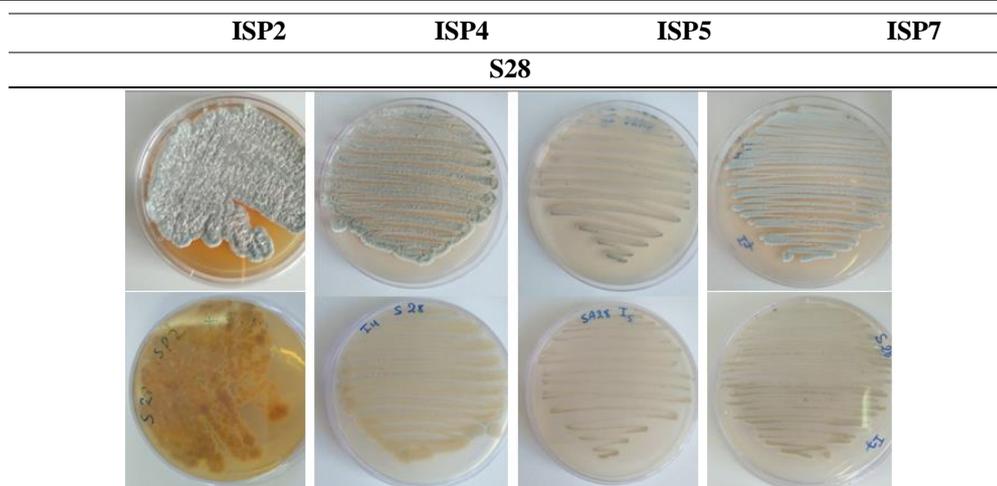
d'autres sont purulentes. Sur les milieux ISP4, 5 et 7, le développement est plus lent encore, les colonies sont moins denses, plus fines et le taux de sporulation diminue significativement. Seules les souches RZBC, RZBD et RP noir 1 pouvaient croître d'une manière optimale sur ces milieux surtout sur ISP4. Ces souches sont donc capables d'utiliser d'autres sources de carbone tel que l'amidon présent dans le milieu ISP4, la tyrosine dans ISP7 et l'asparagine dans ISP5.

La couleur du mycélium de substrat et le mycélium aérien de quelques souches varie selon les constituants du milieu de culture comme la souche Pt-1 noir 2 qui est de masse sporale grise sur ISP2 et un mycélium de substrat grenat à noir qui vire vers le violet sur ISP4 et vers le gris à rose sur ISP5 et en fin vers le saumon sur ISP7.

La plupart des souches présentent un aspect poudreux dû à l'abondance des spores. Les colonies sont plates ou bombées de tailles moyennes à grandes, sèches, ridées et en choux fleur, ces caractères les rapprochent *Streptomyces*. Chez d'autres souches, les colonies sont très dures, rugueuses et rocheuses comme la souche RP noir 1. Pour tous les isolats, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Après 7 jours d'incubation, les colonies deviennent légèrement poudreuses et pigmentées. Quelques photos de l'aspect macroscopiques de souches étudiées sont illustrées dans le tableau 11.

Tableau 11. Caractères macroscopiques de quelques isolats actinobactériens

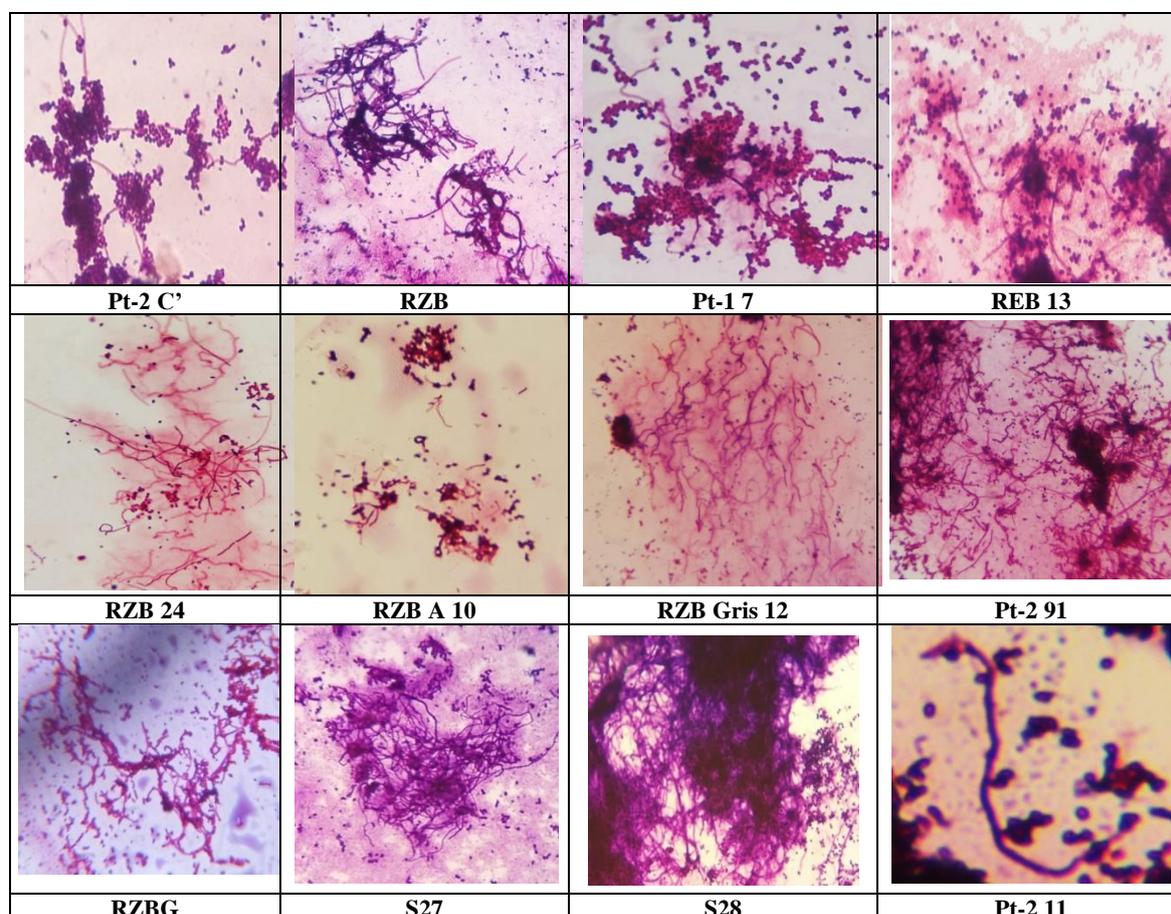


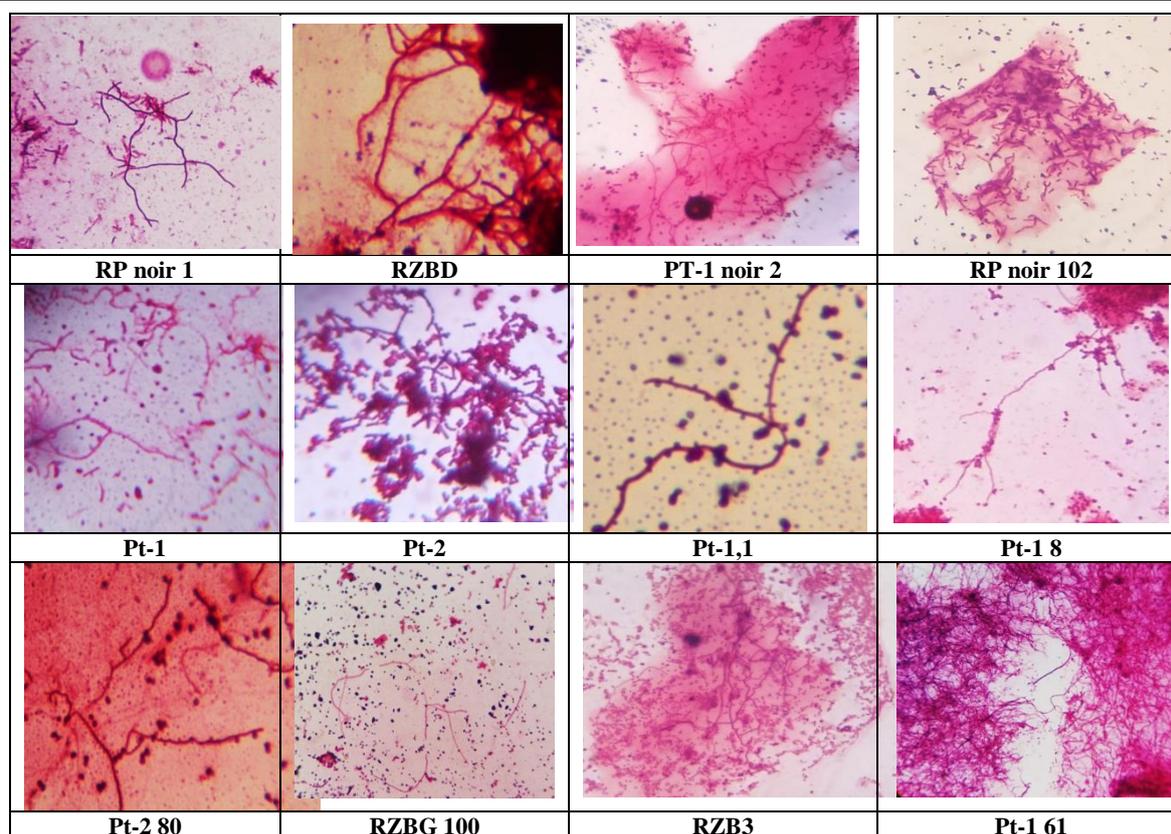


3.2. Etude microscopique avec la technique de la coloration de Gram

Le résultat de l'observation microscopique des frottis colorés par la technique de Gram de quelques isolats étudiés est présenté dans le tableau 12. Cette observation microscopique a confirmé que ces isolats sont des bactéries filamenteuses à Gram positif. Cet aspect filamenteux avec présence de spores en chaînettes plus ou moins longues mais également de spores dispersées ou rassemblées en amas, les rapproche aux actinobactéries filamenteux (Flärdhet Bruttner., 2009).

Tableau 12. Caractères microscopiques des actinobactéries sélectionnées (G x 100).





4. Equipement enzymatique

4.1. Hydrolyse de l'amidon et de la cellulose

Le tableau 13 représente le résultat concernant la production d'amylase et de cellulase par les isolats sélectionnés.

Tableau 13. Production de cellulase et d'amylase par les isolats sélectionnés.

Isolat	Hydrolyse d'amidon		Hydrolyse de la cellulose	
	Résultat	Diamètre du halo (mm)	Résultat	Diamètre du halo (mm)
Pt-2 F	(+)	15	(-)	00
Pt-1 6	(+)	34	(-)	00
RZB 24	(+)	25	(+)	33
Pt-1	(+)	20	(+)	30
RZB A 10	(+)	37	(-)	00
RZB 11	(+)	30	(-)	00
RP noir 1	(+)	30	(-)	00
RZBD	(+)	20	(-)	00
Pt-1 8	(+)	17	(-)	00
Pt - 2 A	(+)	21	(-)	00
S 27	(+)	28	(-)	00
Pt - 2 11	(+)	31	(-)	00
Pt-1 noir 2	(+)	33	(+)	28
RZBG	(+)	38	(+)	14
RZBC	(+)	27	(+)	36
Pt-1 7	(-)	00	(-)	00
RZB	(+)	13	(-)	00
Pt-2 80	(+)	37	(-)	00
Pt-2 C'	(+)	33	(-)	00
RZBG 100	(+)	35	(-)	00

RZB 13	(+)	42	(-)	00
RP noir 102	(-)	00	(-)	00
Pt-1, 1	(+)	30	(-)	00
Pt-2 91	(+)	35	(-)	00
RZB 3	(+)	32	(-)	00
Pt-1 61	(+)	45	(-)	00
RZB Gris 12	(+)	24	(+)	33
S28	(+)	21	(+)	25
Pt-2	(+)	25	(+)	25

Le tableau montre que tous les isolats étudiés à l'exception de l'isolat RP noir 102 et Pt-1 7 produisent l'amylase. Cette production est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (figure 6). Le diamètre de la zone d'hydrolyse d'amidon varie d'un isolat à un autre selon la quantité de l'enzyme produite. La zone la plus importante est notée chez l'isolat Pt-1 61 et l'isolat RZB 13 avec, respectivement, 45 mm et 42 mm de diamètre. Contrairement à l'isolat RZB qui a présenté le plus petit diamètre correspondant à 13 mm.

Parmi les 29 isolats sélectionnés, 8 d'entre eux seulement disposent de cellulase ce qui se traduit par un halo autour de la colonie (figure 7). La meilleure production a été notée chez l'isolat RZBC avec un diamètre de lyse égal à 36 mm et la plus petite zone de lyse a été notée chez l'isolat RZBG avec un diamètre algal à 14 mm. Plusieurs études se sont intéressées à la cellulase des actinobactéries comme Mohanta (2014), Cirigliano *et al.* (2013) et Sarita *et al.* (2013). Des actinobactéries à potentiel cellulolytique ont été isolés à partir de différentes niches écologiques y compris le sol forestier (Goyari *et al.*, 2014), déchets municipaux (Prasad *et al.*, 2012), et sols du Jordan (Jaradat *et al.*, 2008).

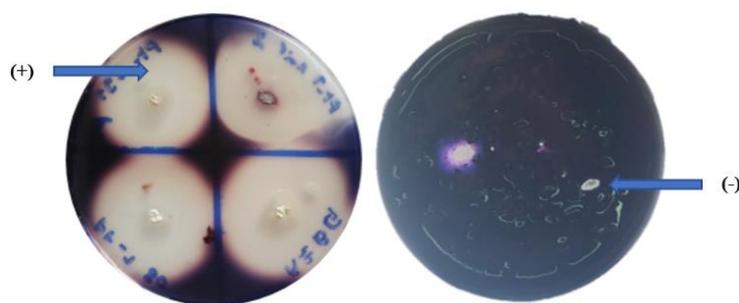


Figure 6. Hydrolyse de l'amidon (résultat positif et négatif).

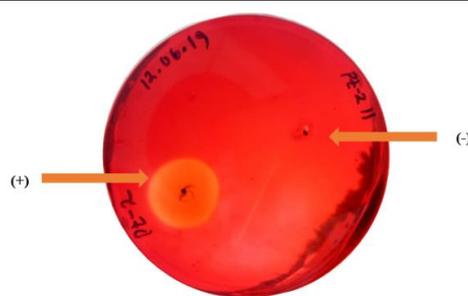


Figure 7. Hydrolyse de la cellulose par la souche Pt-2 (+).

5. Potentiel phytostimulant des isolats actifs

5.1. Production de l'AIA (Acide indole-3-acétique)

Parmi les mécanismes par lesquels les actinobactéries peuvent améliorer la germination des graines et l'élongation des racines est la production de phytohormones (Goudjal *et al.*, 2013 ; Khamna *et al.*, 2010). La production d'AIA (Acide indole-3-acétique) par les isolats antagonistes sélectionnés a été évaluée d'abord par un test colorimétrique dont l'apparition de la couleur rose indique la présence d'AIA et son intensité dépend de la quantité d'AIA produite, comme il est montré dans la figure 8. Puis par la mesure des quantités d'AIA produites présentées dans le tableau 14.



Figure 8. Test positif de production d'AIA par quelques isolats antagonistes.

Tableau 14. Production de l'AIA par les actinobactéries antagonistes.

Isolat	Production de IAA	Quantité de IAA produite (µg/ml)	Isolat	Production de IAA	Quantité de IAA produite (µg/ml)
Pt-1 7	(+) (+)	58.75	Pt-2 F	(+) (+) (+)	473.5
RZB	(+) (+)	50.12	Pt-1 6	(+) (+) (+)	420.5
Pt-2 80	(+) (+)	58.75	RZB 24	(+) (+) (+)	319.87
Pt-2 C'	(+) (+)	49.37	Pt-1	(+) (+) (+)	309
RZBG 100	(+) (+)	43.12	RZB A 10	(+) (+) (+)	192.25
RZB 13	(+) (+)	43.12	RZB 11	(+) (+) (+)	182.5
RP noir 102	(+) (+)	40.75	RP noir 1	(+) (+) (+)	170
Pt-1, 1	(+) (+)	38.87	RZBD	(+) (+) (+)	170
Pt-2 91	(+)	37.5	Pt-1 8	(+) (+) (+)	159
RZB 3	(+)	25.5	Pt - 2 A	(+) (+)	96.62
Pt-1 61	(+)	19.37	S 27	(+) (+)	95
RZB Gris 12	(+)	14.5	Pt - 2 11	(+) (+)	91.62
S28	(+)	14.12	Pt-1 noir 2	(+) (+)	82.37
Pt-2	(+)	12	RZBG	(+) (+)	66.12
RZBC	(+) (+)	59.87	-	-	-

L'analyse du surnageant des cultures des isolats sélectionnés a révélé la production de concentrations variables d'AIA allant de 12 à 473.5µg/ml. Tous les isolats d'actinobactéries se sont révélées aptes à produire l'AIA. La concentration maximale de 473.5µg/ml de la phytohormone a été produite par l'isolat Pt-2 F tandis que la plus faible concentration a été produite par l'isolat Pt-2 (12 µg/ml). Les quantités de phytohormones étaient supérieures à celles rapportées dans d'autres études similaires, ainsi Anwar et *al* (2016) ont obtenu des concentrations allant de 10 à 79.5 µg/ml chez différentes souches Streptomycetales avec une production maximale chez la souche *Streptomyces nobilis* WA-3 (79.5 µg/ml). D'autre part, Goudjal et *al.* (2013) ont rapporté une augmentation significative du taux de germination des graines et l'allongement des racines de la tomate inoculées avec des souches actinobactériennes endophytes isolées de plantes aborigènes du Sahara algérien produisant de l'AIA *In vitro* avec une valeur maximale de 127 µg/mL chez la souche *PTL2* de *S. rochei*. Ces résultats montrent que ces bactéries possèdent un potentiel phytostimulant. Dans le même contexte, Zamoum et *al.* (2015) ont signalé une production maximale d'acide indole-3-acétique par la souche *ZL2* de *S. caeruleatus*. Ces actinobactéries endophytes ont considérablement amélioré la longueur des racines et le poids sec et humide des plantules de tomates. Toumatia et *al.* (2016) ont décrit le rôle de *Streptomyces sp. IA1* produisant de AIA et de l'acide gibbérellique dans la stimulation de la croissance des plantes de blé. Amara et *al.* (2015) ont confirmé l'augmentation significative du taux de croissance des plantes inoculées avec des rhizobactéries productrices d'AIA par rapport au témoin non inoculés. En fin l'inoculation de plants de tomate avec la souche *SNL2* de *S. neopeptinius* isolée à partir de truffes de sable du désert algérien et productrice d'AIA et de l'acide gibbérellique *in vitro* a considérablement amélioré la longueur et le poids sec des plantes.

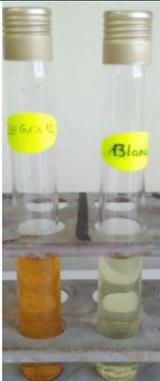
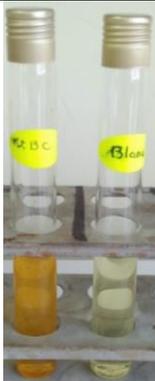
5.2. Production d'ammoniac NH₃

D'après les résultats illustrés dans le tableau 15, la production d'ammoniac a été détectée qualitativement chez 26 isolats actinomycétales parmi les 29 isolats sélectionnés. Les trois isolats incapables de produire l'NH₃ sont RZB 11, Pt-2 11 et RP noir 1. La concentration de NH₃ produite varie d'un isolat à un autre, elle se traduit par l'intensité de la couleur jaune à brune apparue. Marques et *al.* (2010) ont signalé l'importance des bactéries diazotrophes/fixatrices d'azote atmosphérique et leur effet bénéfique sur la croissance des plantes hôte du fait de l'importance de l'azote dans différents processus physiologiques tel que l'augmentation de la biomasse de la plante par l'élongation des racines et des tiges.

Tableau 15. Production de l'ammoniac NH₃ par les actinobactéries antagonistes

Isolat	Production de NH ₃	Isolat	Production de NH ₃	Isolat	Production de NH ₃
Pt-2 F	(+) (+) (+)	Pt-1	(+) (+) (+)	RP noir 1	(-)
Pt-1 6	(+) (+) (+)	RZB A 10	(+) (+)	RZBD	(+) (+) (+)
RZB 24	(+) (+) (+)	RZB 11	(-)	Pt-1 8	(+) (+)
Pt-1 7	(+) (+)	Pt-2 A	(+) (+)(+)	Pt-2 C'	(+) (+)

RZB	(+) (+)		S 27	(+) (+)		RZBG 100	(+) (+)	
Pt-2 80	(+) (+)		Pt - 2 11	(-)		RZB 13	(+) (+)	
RP noir 102	(+) (+)		RZB 3	(+)(+) (+)		Pt-1 noir 2	(+) (+)	
Pt-1, 1	(+) (+)		Pt-1 61	(+)(+)		RZBG	(+) (+)	

<p>Pt-2 91</p>	<p>(+)(+)</p>		<p>RZB Gris 12</p>	<p>(+)(+) (+)</p>		<p>RZBC</p>	<p>(+) (+)</p>	
<p>S28</p>	<p>(+)(+) (+)</p>		<p>Pt-2</p>	<p>(+)(+)</p>				

6. Caractères biochimiques de l'isolat sélectionné

Les caractères biochimiques de l'antagoniste S28 présentant une activité antifongique *In vitro* vis-à-vis des trois *Fusarium*, doté d'une capacité à hydrolyser l'amidon et la cellulose, la production d'ammoniac NH₃ et de l'AIA sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Quelques caractères biochimiques de l'isolat S28

Test	Résultat
Catalase	(-)
Oxydase	(-)
Utilisation du Mannitol	(-)
Réduction de sulfates	(-)
Hydrolyse de la caséine	(-)
Utilisation du lactose	(-)
Utilisation du Citrate	(+)

L'isolat S28 est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, il ne possède pas la catalase ou l'oxydase. Il n'est pas susceptible de réduire les sulfates ni d'utiliser le lactose et le mannitol.

7. Effet de la bactérie sur la germination des graines *In vitro* (indice Vigor)

L'inoculation des graines de blé de la variété Cirta par différentes concentrations de l'isolat S28 et leur effet sur la germination des graines a permis d'obtenir les résultats présentés dans les tableaux 17 et 18.

Tableau 17. Effet de l'inoculation de différentes concentrations de l'isolat S28 sur le pourcentage de germination et l'indice Vigor des graines de blé germées sur le milieu GLM

	GLM				
	Pourcentage de germination (%)	Longueur de la racine (cm)	Longueur de la tige (cm)	Longueur de la plantule (cm)	Indice de Vigor
Témoin	34	1.77 ±0.68	0.39 ±0.18	2.16	73.44
7 x 10⁵ c/ml	57	1.89±0.75	0.67±0.47	2.57	146.9
3 x 10⁶ c/ml	75	1.43 ±0.75	0.29±0.29	1.72	129.5
6 x 10⁶ c/ml	64	1.48±0.47	0.34±0.18	1.82	117.1
8 x 10⁶ c/ml	30	2.53±0.80	0.50±0.33	3.03	91.13
10 x 10⁶ c/ml	68	1.57±0.51	0.31±0.17	1.88	128.21
3 x 10⁷ c/ml	44	2.8 0 ±0.82	0.82 ±0.63	3.62	159.6

Tableau 18. Effet de l'inoculation de différentes concentrations de l'isolat S28 sur le pourcentage de germination et l'indice Vigor des graines de blé germées sur le coton

Coton					
	Pourcentage de germination (%)	Longueur de la racine (cm)	Longueur de la tige (cm)	Longueur de la plantule (cm)	Indice de vigor
Témoin	30	3.88±1.22	1.33±0.79	5.22	156.6
7 x 10⁵ c/ml	34	3.50±0.91	1.41±0.90	4.92	167.5
3 x 10⁶ c/ml	46	2.40±1.32	1.37±0.81	3.78	173.9
6 x 10⁶ c/ml	47	2.03±0.81	0.46±0.25	2.49	117.29
8 x 10⁶ c/ml	36	4.03±0.88	1.81±0.62	5.85	210.6
10 x 10⁶ c/ml	37	2.20±0.89	0.52±0.22	2.72	101
3 x 10⁷ c/ml	23	3.71 ±0.71	1.89 ±0.81	5.60	129

Parmi les différentes concentrations d'inoculum utilisées, la concentration correspondant à 8 x 10⁶ C/ml a été la plus efficace sur le taux de germination des graines de blé de la variété Cirta et a donné l'indice de Vigor le plus élevé (210.6) pour les graines germées sur le coton. Pour les graines germées sur le milieu GLM, l'indice de Vigor le plus élevé (159.6) correspond à la concentration de 3x10⁷ C/ml.

Les deux tableaux montrent que l'inoculation des graines avec différentes concentrations de l'isolat S28 a eu un effet considérable sur leur taux de germination en comparaison avec les graines témoins non inoculées. Ainsi les meilleurs taux de germination des graines traitées sur le milieu GLM a été obtenu par la concentration de 3 x 10⁶ C/ml pour atteindre 75% face à 34% chez les graines témoins. Sur le coton, le pourcentage de germination passe de 30% chez les graines témoins à 47% chez les graines traitées par la concentration 6 x 10⁶ c/ml. Ces données décrivent un effet positif de l'inoculation des graines de blé par l'isolat S28 et ceci se traduit par l'augmentation significative de leur taux de germination, mais aussi sur la taille des plantules mesurées par la longueur de la tige et de la racine. Cet isolat exprime, par conséquent, un effet phytostimulant considérable et pourrait être exploitée dans d'autres expérimentations pour mieux étudier son potentiel de biocontrôle et de stimulation de la croissance des plantes. D'après les travaux effectués dans le même contexte, la souche *Streptomyces corchorusii* UCR3-16 utilisée comme traitement des semences de riz a stimulé leur germination (Tamreihao et al., 2016).

8. Essai de formulation d'un phytostimulant à base de l'isolat S28

8.1. Production de biomasse et suivi de l'évolution de la croissance bactérienne

Culture à 30 ± 2 °C

La culture immergée sur bouillon ISP2 de l'isolat S28 incubé à 30 ± 2 °C sous agitation permanente à 140 rpm pendant 9 jours a permis de tracer la courbe de croissance par le suivi de l'évolution de la biomasse exprimée en poids sec après filtration puis séchage (figure9) ainsi que la consommation du substrat glucosé par la DNS (figure10).

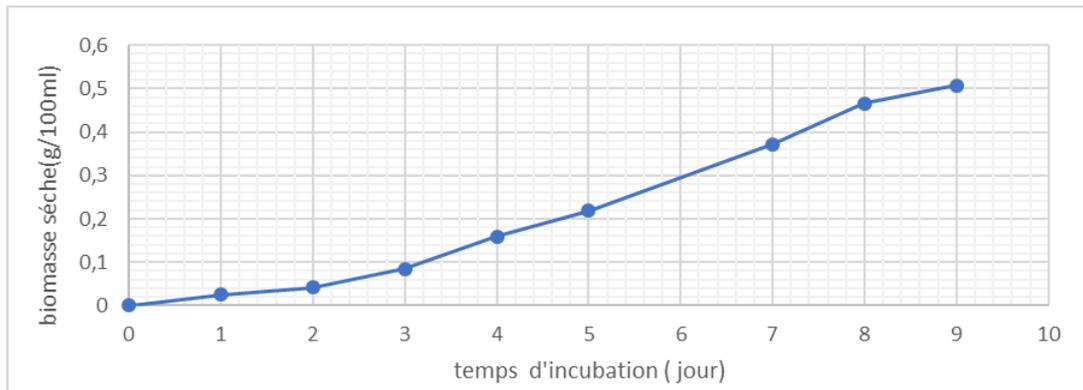


Figure 9. Courbe de croissance de la souche S28 sur bouillon ISP2
Incubation à 30 ± 2 °C et 140 rpm/ 9 jours.

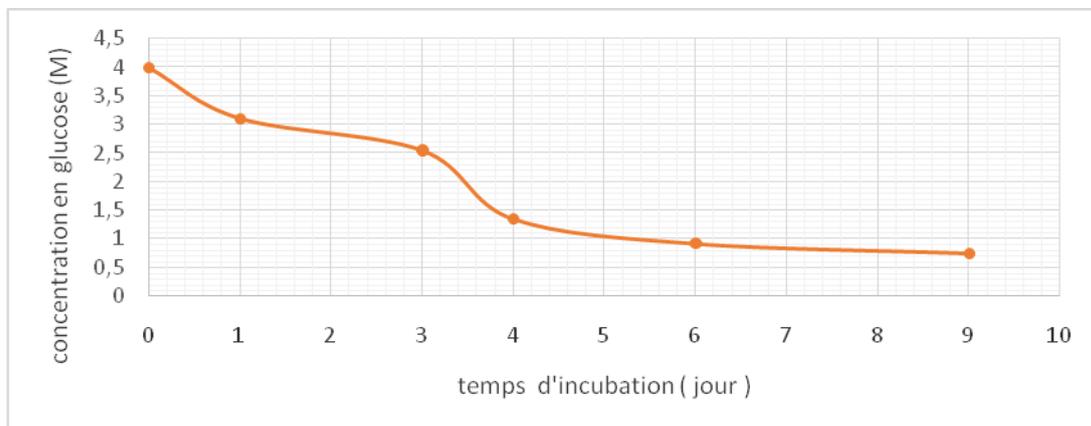


Figure 10. Consommation du glucose par la souche S28.
Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 140 rpm.

D'après les résultats obtenus, la croissance de l'isolat S28 est lente. La biomasse maximale obtenue après 9 jours d'incubation est de 5g/l. La phase d'accélération correspond à la période comprise entre le deuxième et le troisième jour de culture et la phase exponentielle est comprise entre le troisième et le neuvième jour d'incubation au cours de laquelle on remarque une croissance bactérienne plus ou moins rapide avec évolution de la

biomasse. Par ailleurs, il est constaté que les quantités de glucose diminuent lentement dans le milieu de culture (figure10). La comparaison des deux courbes de la figure 9 et 10 confirme que cette diminution est liée à l'augmentation continue de la biomasse produite. Ainsi les concentrations de glucose mesurées tout au long de la période d'incubation sont inversement proportionnelles au poids sec de la biomasse produite. Au neuvième jour d'incubation, la concentration de glucose atteint 0.7M, une valeur minimale correspondant à la valeur maximale de la biomasse, donc l'isolat se développe dans le milieu en utilisant le glucose comme seule source de carbone disponible dans le milieu.

Culture à 35 ± 2 °C à 150 rpm

La culture immergée sur bouillon ISP2 de l'isolat S28 pendant 6 jours d'incubation à 35 ± 2 °C sous agitation permanente à 150rpm dans un système fermé a permis d'obtenir les résultats illustrés dans les figures11 et 12.

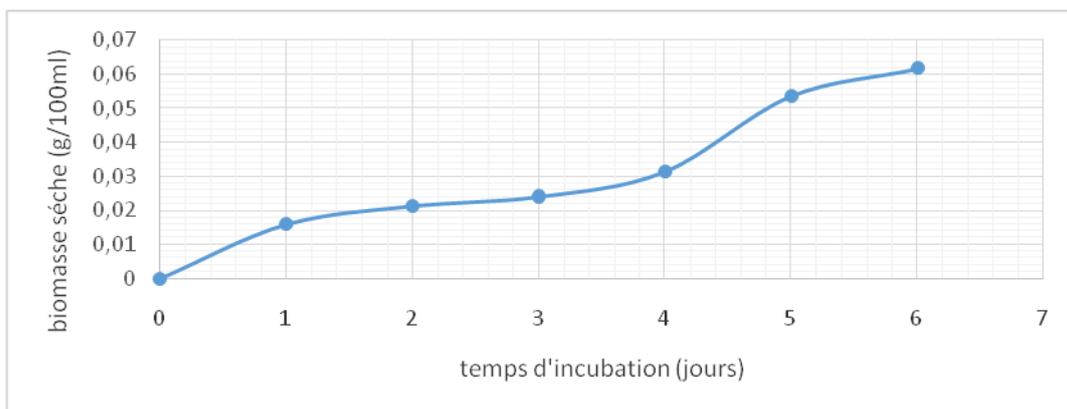


Figure11. Courbe de croissance de la souche S28.
Culture sur bouillon ISP2 à 35 ± 2 °C et 150rpm

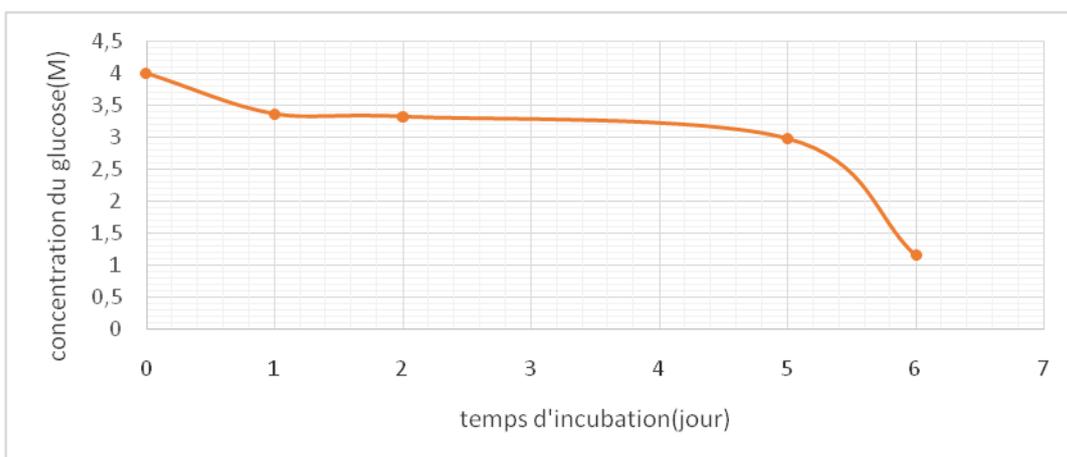


Figure12. Consommation du glucose par la souche S28.
Culture sur bouillon ISP2 à 35 ± 2 °C et à 150 rpm

Ces résultats montrent que la croissance de l'isolat S28 est plus lente encore à 35 ± 2 °C. La biomasse maximale obtenue est de 0.6 g/l au sixième jour d'incubation. Le rendement en biomasse est très faible par rapport à la période d'incubation, elle demeure plus ou moins stable jusqu'au quatrième jour d'incubation. De plus, la consommation de glucose varie de manière négligeable au cours de la période d'incubation et n'est que de 2.98M au cinquième jour. Cette culture a confirmé que l'incubation à 35 ± 2 °C n'est pas adéquate pour la croissance de l'isolat S28 et la production de biomasse.

Culture à 30 ± 2 °C à 150rpm

La culture dans un bouillon ISP2 de l'isolat S28 pendant 10 jours dans un incubateur agité à 30 ± 2 °C dans un système fermé a permis d'obtenir les résultats rapportés dans les figures 13 et 14 suivantes.

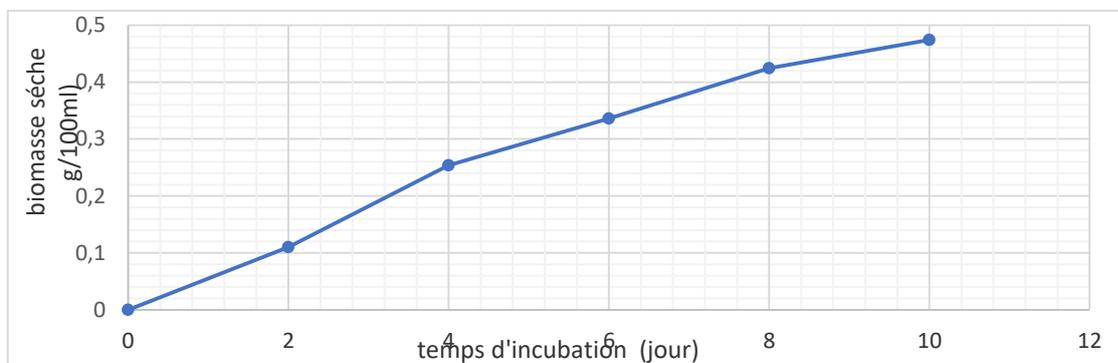


Figure 13. Courbe de croissance de la souche S28.
Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 150rpm.

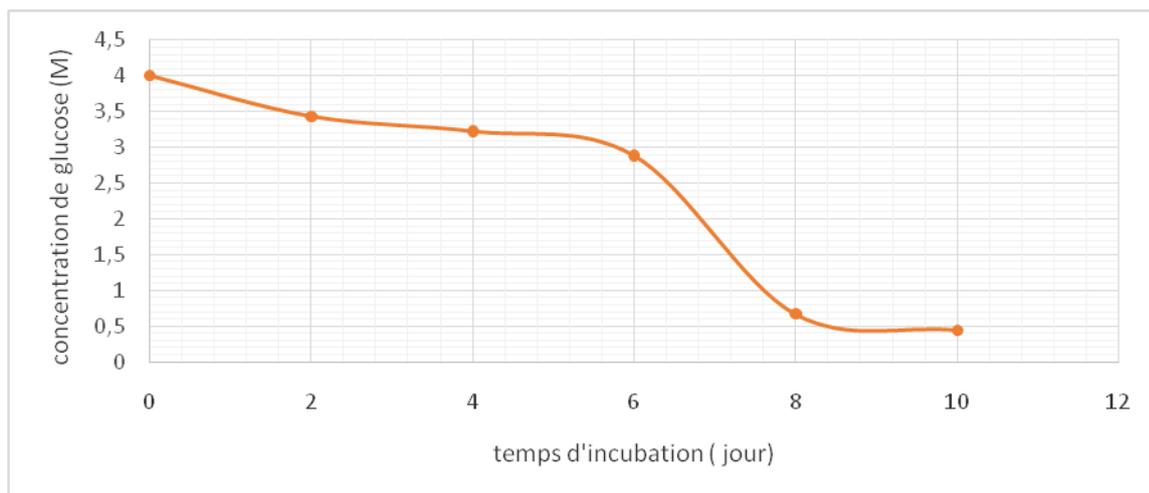


Figure 14. Consommation du glucose par la souche S28.
Culture sur bouillon ISP2 à 30 ± 2 °C et 150rpm.

D'après ces résultats, on remarque que l'isolat S28 était capable de produire une quantité significative de biomasse atteignant la valeur maximale de 4.7 g/l au dixième jour de

fermentation à 30°C et à 150rpm. Ces résultats sont similaires aux résultats précédemment présentés. La consommation de glucose diminue au fur et à mesure de l'évolution de la biomasse jusqu'à atteindre 0.4M au dixième jour. La concentration de 3.6 M a été consommée par l'isolat bactérien à partir d'une concentration initiale de 4M. Une production optimale de biomasse en culture liquide a été obtenue à 30±2 °C.

Morphologie de l'isolat S28 en culture liquide

D'après la littérature, les bactéries du genre *Streptomyces* sont de morphologie variable en culture liquide. Les formes habituelles observées dans les cultures immergées sont classées sous trois formes : des hyphes, branchés ou non, un mycélium dispersé et ramifié appelé enchevêtrement (clump) ou d'agrégats constitués de réseaux d'hyphes ramifiés et entrelacés appelés pelotes ou pellets (Figure 15). Ainsi l'aspect macroscopique des pellets de l'isolat S28 à 140rpm et 150rpm à 30±2°C est représenté par la figure 16. Par ailleurs, la figure 17 représente l'aspect microscopique de l'isolat S28 en culture immergée à 30±2 °C et à 150 rpm.

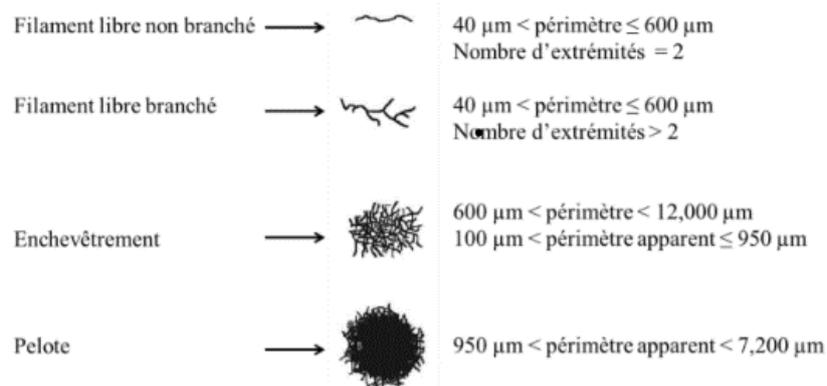


Figure 15. Types morphologiques de *Streptomyces olindensis* en culture immergée (Pamboukian et al., 2002).

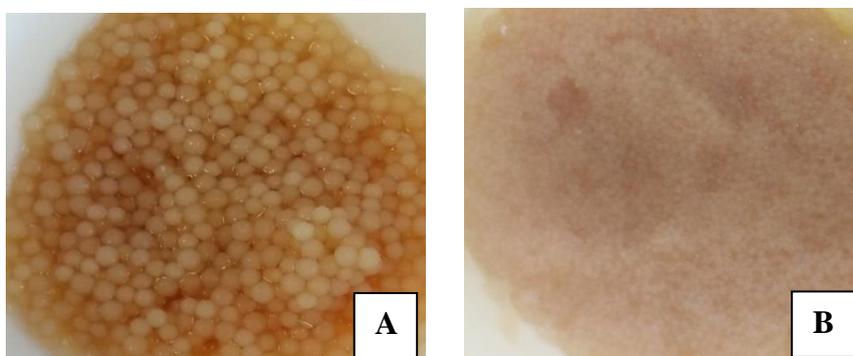


Figure16. Taille des pellets. Incubation à 30 °C (A) à 140 rpm au 9^{ème} jour et (B) à 150 rpm au 10^{ème} jour.

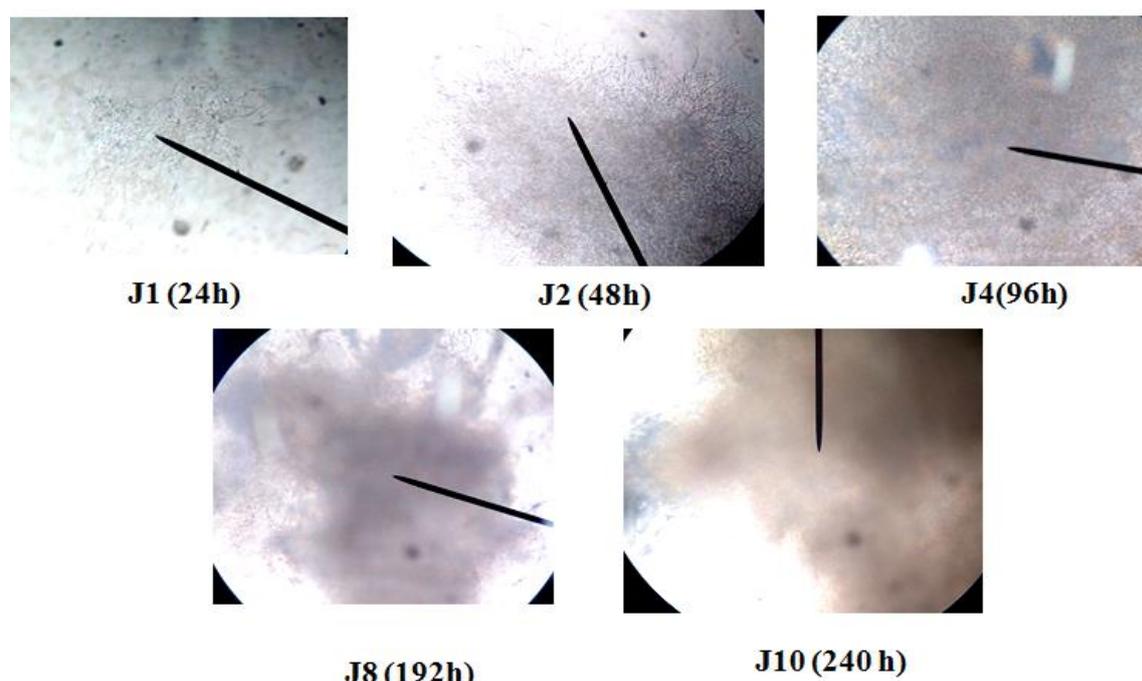


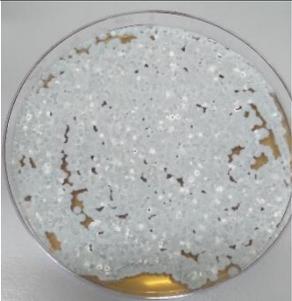
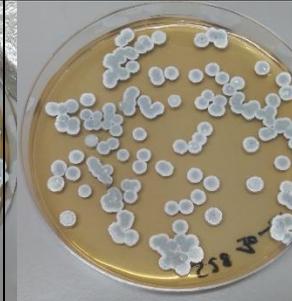
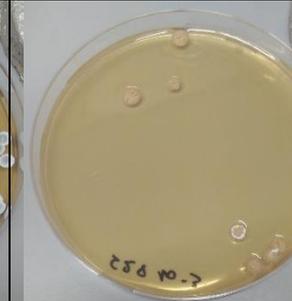
Figure 17. Aspect microscopique de l'isolat S 28 en culture immergée (G x 40).
Incubation à 30°C à 150 rpm.

La biomasse produite par l'isolat S28 en culture immergée est sous formes de pellets dont la taille varie en fonction de la vitesse d'agitation. Metz et Kossen (1977) et Yin et *al.* (2008) ont montré que la taille des pellets dans le milieu de fermentation peut influencer l'activité métabolique du microorganisme. Les petites tailles sont préférées aux plus grandes car elles favoriseront l'activité métabolique et la production de molécules d'intérêt. D'autre part, la viabilité des cellules est directement influencée par la taille des pellets. En effet, plus la taille des pellets est grande, plus la viabilité diminue (Lin et *al.*, 2010 ; Driouch et *al.*, 2012).

8.2. Vérification de la viabilité de la biomasse produite

Avant la formulation du produit final, la vérification de la viabilité post-fermentaire de la biomasse produite est une étape cruciale et a pour but de (i) confirmer la pureté de la culture et l'absence de contaminants (ii) la formulation d'un produit viable et que toute perte de viabilité du produit finale est due au processus de formulation appliqué (iii) avoir une idée sur la densité cellulaire utilisée dans le processus de formulation. Les résultats du test sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19. Viabilité post-fermentaire de S28. Incubation à 30°C à 150 rpm/6jours

Biomasse produite	Viabilité			Nombre d'unités formant colonies(ufc)/ml
Biomasse produite le sixième jour de culture	(+)(+)			10.3×10^4
				
10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	

Par ce résultat on a pu confirmer la viabilité, la pureté de la souche S28 présentant une densité cellulaire égale à 10.3×10^4 ufc/ml ainsi que l'absence de contaminants. Cette culture peut, donc, être utilisée dans le protocole de formulation.

8.3. Vérification de la viabilité du produit final

Tableau 20. Viabilité des produits finaux.

Méthode	Récupération de la biomasse par filtration	Technique de séchage	Additifs	Présence d'un cryoprotecteur	Viabilité
1	Avec filtration	Lyophilisation	CMC	-	(-)
			Amidon	-	(-)
2	Sans filtration		CMC	+	(+)
			Amidon	+	(+)
3	Sans filtration	Séchage au four pasteur	CMC	-	(-)
			Amidon	-	(-)

NB. Toutes les préparations ont comme additif commun la paille de blé broyée et le carbonate de calcium, la différence entre elles est la CMC ou l'amidon.

Les résultats présentés dans le tableau 20 montrent que la méthode 3 effectuée par séchage au four pasteur ne convient pas à la formulation d'un produit à base de la souche S28. La bactérie n'a pas pu résister à la température de séchage 40 °C et par conséquent elle a perdu sa viabilité. Dans la méthode 1, la souche S28 a également perdu sa viabilité en raison de l'absence de cryoprotecteur.

Par contre, dans la méthode 2, la viabilité et la pureté de la souche a pu être confirmée bien que le taux de viabilité étant est très réduit par rapport aux taux notés dans le test de viabilité post-fermentaire.

La différence des résultats des méthodes 1 et 2 effectuées par la lyophilisation peut être due à la présence de glycérol, un cryoprotecteur, dans la formule 2 qui a assuré la protection de la biomasse conservant ainsi sa viabilité. D'autre part, la lyophilisation de l'intégralité du milieu de culture dans la méthode 2 prenant en considération la présence de la totalité de la biomasse c'est-à-dire, mycélium et spores a assuré sa viabilité, tandis que la filtration du produit 1 avant lyophilisation pourrait avoir réduit le nombre de spores.

Les résultats obtenus par la méthode 2 sont illustrés dans les figures 18 et 19.

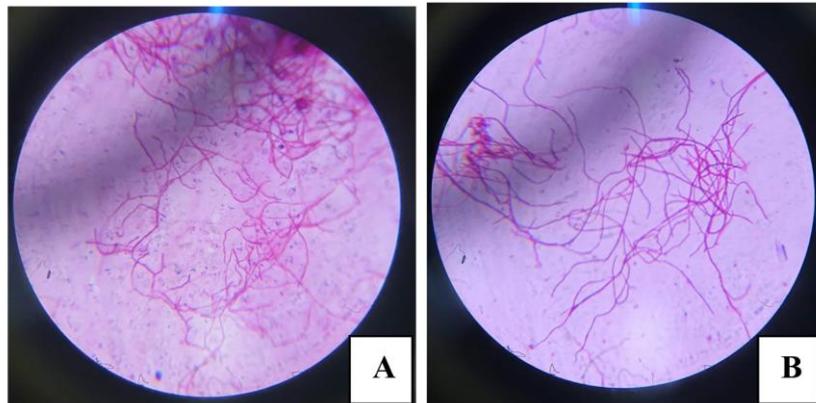


Figure 18. Aspects microscopiques des colonies obtenues par le test de viabilité de produit fini obtenu par la méthode 2 (G x 100) : (A) formulation avec CMC, (B) formulation avec l'amidon.

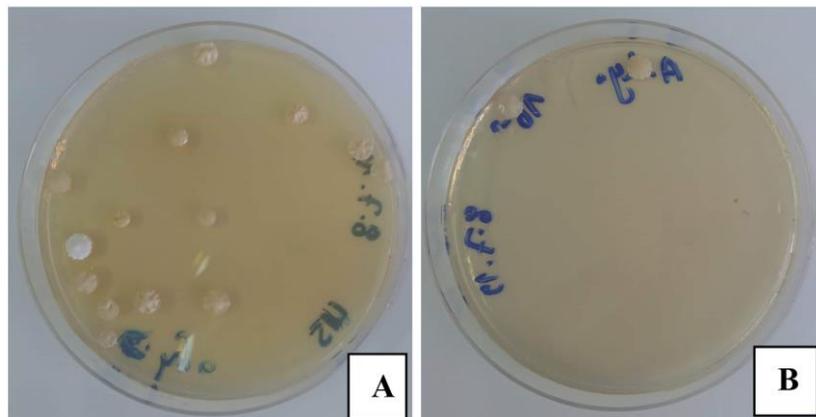


Figure 19. Viabilité du produit final de la méthode 2 (A) effectué avec le CMC et (B) effectué avec l'amidon après 2 jours d'incubation à 30°C.

Conclusion et perspectives

Ce travail est une contribution et essai de formulation d'un agent de biocontrôle à base d'un inoculum actinobactérien à activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium*, agent phytopathogène du blé. 72.4% des isolats actinobactériens sélectionnés se sont révélés antagonistes, *in vitro*, vis-à-vis de trois *Fusarium* (*F. oxysorum*, *F. culmorum*, *F. solani*). L'étude micro et macromorphologiques des isolats actifs les rapprochent des *Streptomyces* filamenteux à Gram positif. La plupart des isolats étudiés produisent de la cellulase et de l'amylase comme ils développé une activité phytohormonale (AIA) et ammoniacale (NH₃) considérable. Ce travail a permis, en outre, d'explorer l'effet de l'inoculation des graines de blé dur par différentes concentrations cellulaires de l'antagoniste S28 sur le taux de germination ainsi que la longueur de la plantule. La biomasse produite par l'isolat S28 en culture liquide a été utilisée comme principal ingrédient actif constituant avec des additifs (la paille de blé broyée, CMC/Amidon, carbonate de calcium) le produit final de biocontrôle et de phytostimulation. Cette formulation a été effectuée par lyophilisation et par séchage au four pasteur. La viabilité de la cellule a été maintenue dans le produit lyophilisé contenant la CMC, bien que le taux de viabilité a été réduit.

De cette étude plusieurs constatations peuvent être fixées comme perspectives de recherches entre autres :

- 1- Développement de la meilleure formule assurant la meilleure viabilité ;
- 2- Etude *in vivo* de la formule développée sur tout le cycle biologique du blé.

Références bibliographiques

A

- Agrawal, V.P., (2002). Biodiversity of region population study of Actinomycetes Éd. Submitted to royal Nepal academy for science and technology. Algerian journal of arid environment. Vol. (6). N°2: 32-42.
- Aly, MM., El Sayed, HEA., Jastaniah, SD., (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* spp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. J Am Sci 8:667–676.
- Aly ,MM., El-Sabbagh ., El-Shouny ,WA., Ebrahim, MKH .,(2003). Physiological response of Zea mays to NaCl stress with respect to *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces niveus*. Pak J Biol Sci 6:2073–2080 .
- Amara, U., Khalid, R., Hayat, R., (2015). Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. Bact. Metab. Sustain. Agroecosyst.: Springer 87–103.
- Amaresan, N., Kumar Krishna., Jinal, H., Naik., Kiran Gandhi .,Bapatla and Raj Kumar Mishra., (2018). *Streptomyces* in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00008-4>.
- Amarger, N., (2002). Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie. 84 (11): 1061-72.
- Anwar, S., Ali, B., & Sajid, I.,(2016). Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. Frontiers in microbiology, 7, 1334. doi:10.3389/fmicb.2016.01334
- Armengaud P, Sulpice R, Miller AJ, Stitt M, Amtmann A, Gibon ,Y., (2009) .Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for glycolysis and nitrogen assimilation in arabidopsis roots. Plant Physiol 150:772–785. doi:10.1104/pp.108.133629.

B

- Baki, A.A., Anderson, J.D., (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *CropSci.*13,630–633.
- Balagurunathan ,R., Radhakrishnan, M., (2010). Biotechnological, genetic engineering and nano technological potential of actinomycetes. In: Maheshwari DK, Dubey RC, Saravanamurthu R (eds) *Industrial exploitation of microorganisms*. IK International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, pp 302–321.
- Baltz, R.H., (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 557_563.
- Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, FJ., Tomasini, A., Megia, A., (2005). Secondary metabolites production by solidstate fermentation. *Malays J Microbiol* 1:1–6.
- Baskaran ,R., Vijayakumar ,R., Mohan ,PM., (2011). Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands. *Malays J Microbiol* 7:26–32 .
- Basak, B.B., Biswas, D.R., (2009). Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant Soil* 317, 235-255.
- Bashan, Y., et de-Bashan, L.E., (2005). Plant growth-promoting. In D. Hillel (dir.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (vol 1, p. 103-115). Elsevier, Oxford, U.K.
- Bashan, Y., Puente, M. E., de Bashan, L.E., et Hernandez, J.P., (2008). Environmental use of plant growth-promoting bacteria. In A.E. Barka et C. Clément. *Plant-Microbe interactions* (p. 69-93).
- Beauchamp ,C.J., (1996). Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique, *Phytoprotection*, 74: 19-27.
- Beausejour, J., Clermont, N., Beaulieu, C., (2003). Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant Soil* 256, 463-468.

- Beccari, G., Covarelli, L., Nicholson, P., (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671-684.

- Behal, V., (2000). Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* 47 : 113-157.

- Benhamou, N., et Chet, I., (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultra structural and cytochemical aspects of the interaction. *phytopathology* 86.p405-416

- Benítez, T., Rincón, M.A., Limón, M.C., and Codón, C.A., (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology* 7: 249–260.

- Berríos, J., Illanes, A., & Aroca, G., (2004). Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters*, 26, 67 –70.

- Botton, R., Breton, A., Fevre, M., Guy, P.H., Larpent, J.P., Veau, P., (1985). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. *Biotechnologies*. Masson, p139 à 145.

- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., and Boularhouf, A., (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebka d'Ain M'Lila. *Sciences et Technologies*. Cn° 23 pp. 5 -42.

- Bouizgarne, B., (2013). Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiolgy: disease management*. Springer, Berlin, pp 15–47.

- Boyetchko, S.M., Roskopf, E.N., Caesar, A.J., Charudattan, R., (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. In: Khachatourians, G.G., Arora, D.K. (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology Agriculture and Food Production*, vol. 2. Elsevier Sciences, Amsterdam, pp. 239–274.

- Budihal, S R., Agsar, D., and Patil, S R., (2016). Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. *Bioresource Technology*. 200, 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.098>

- Bulletin des variétés de céréales autogames. Centre nationale de contrôle et de certification des semences et plantes, Edition 2015.
- Burges, H.D., (1998). In: Burges, H.D. (Ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1–6.

C

- Cappuccino, J.C., Sherman, N., (1992). In: *Microbiology: A Laboratory Manual*, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125–179.
- Chandler, D., et al., (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, 366(1573), 1987–1998.
- Chen ,YP., Rekha, PD., Arun, AB., Shen ,FT., Lai, WA., Young ,CC .,(2006) .Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34(1):33–41.
- Chu, B.C., Herrero, A.G., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., Peacock, R.S., Slavinskaya, Z., Vogel, H.J.,(2010). Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird’s eye view. *Biometals* 23, 601–611.
- Cirigliano, M.N.F., Rezende, R.D.C., Oliveira, M.N.G., Pereira, P.H.F., Nascimento, R.P. D., Bon, E.P.D.S., Macrae, A., Coelho, R.R.R., (2013). *Streptomyces misionensis* PESB25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. Hindawi Publishing Corporation Biomed Research International (ID 584137, pp. 1–9).
- Compant ,S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Ait Barka, E., (2005) .Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4951–4959.

- Compant, S., Muzammil, S., Lebrihi, A., Mathieu, F., (2013). Visualization of grapevine root colonization by the Saharan soil isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 using DOPE-FISH microscopy. *Plant Soil* 370 (1), 583-591.
- Couillerot, O., Loqman ,S., Toribio ,A., Hubert, J., Gandner, L., Nuzillard, J.-M., Ouhdouch, Y., Clément ,C., Ait Barka ,E., and Renault ,J.-H., (2014) .Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography, *J. Chromatography B*, 944: 30–34.

D

- Delarras, C., (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques*. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- Delarras, Camille., (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. P : 128, 129, 269, 271.
- De-Oliveira, M. F., Da Silva, M. G., & Van Der Sand, S. T., (2010). Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18, a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*, 161, 565–572.
- Dey, R., Pal ,KK., Tilak ,KVBR., (2014) .Plant growth promoting rhizobacteria in crop protection and challenges. In: Goyal A, Manoharachary C (eds) *Future challenges in crop protection against fungal pathogens*. Springer Science, New York, pp 31–58.
- Driouch, H., Hänsch, R., Wücherpfennig, T., Krull, R. and Wittmann, C. (2012). Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 462–471.

E

- Edwards, C., (1993). Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Appl Biochem Biotechnol* 42:161–179. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02788050>.

- El-khawaga ,MA., Megahed ,M., (2012). Antibacterial and insecticidal activity of actinomycetes isolated from sandy soil of Cairo-Egypt. *Egypt Acad J Biol Sci* 4 (1):53–67.
- Elliott, M., Shamoun, S. F., Sumampong, G., James, D., Masri, S., & Varga, A. (2009). Evaluation of several commercial biocontrol products on European and North American populations of *Phytophthora ramorum*. *Biocontrol Science and Technology*, 19(10), 1007–1021. doi:10.1080/09583150903243870
- El-Tarabily ,KA., Sivasithamparam ,K., (2006) .Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 38:1505–1520.
- El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E., Sivasithamparam, K., (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 106, 13-26.

F

- Flärdh, K., et Bruttner , M.J., (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature. Rev.* 7: 36-49.
- Fodil, D., Badis ,A., Jaouadib ,B., Zarai ,N., Ferradji ,FZ., Boutoumi ,H .,(2011) .Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:470–478.

G

- Glick, BR., (2012) .Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012:15.
- Glick, B.R., (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30-39.

- Gordon R.E. et Smith M.M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* .J.Bact.,66.41-48.

- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Laxmipathi Gowda, C.L., Krishnamurthy, L.,(2015a). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech 5, 355 377.

- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Alekhya, G, Prakash, B., Kudapa, H., Varshney, R.K., (2015c). Evaluation of *Streptomyces* sp. obtained from herbal vermicompost for broad spectrum of plant growth-promoting activities in chickpea. Org. Agric. 5, 123-133.

- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Alekhya, G., Prakash, B., Kudapa, H., Rathore, A., et al., (2015b). The extent of grain yield and plant growth enhancement by plant growth-promoting broad-spectrum *Streptomyces* sp. in chickpea. Springerplus 4, 31.

- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food Agric. 2 (1), 1127500.

- Goudaa S., Kerryb R G, Dasc G., Paramithiotisd S., Shine, HS., and Patrac ,JK., (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research 206 (2018) 131–140.

- Goudjal Y., Zamoum M., Sabaou N., and Zitouni ,A., (2018). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00007-2>.

- Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., Zitouni, A., (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants-growth-promoting activity. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 1821-1829.

- Goyari, S., Devi, S.S., Kalita, M.C., Talukdar, N.C., (2014). Population, diversity and characteristics of cellulolytic microorganisms from the Indo-Burma Biodiversity hotspot. Springer Plus. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-700>.

- Gupta, R., Saxena ,RK., Chaturvedi ,P., Virdi ,VS ,(1995) .Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. J Appl Bacteriol 78:378–383.

- Gupte, M., Kulkarni, P., Ganguli, BN., (2002). Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:46–57.

H

- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., & Deschamps, A., (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 55, 301–322.
- Hamby, MK., Crawford, DL., (2000). The enhancement of plant growth by selected *Streptomyces* species. American Society for Microbiology, 100th general meeting, Los Angeles, CA. Abstract no : 567.
- Hamdali, H., Smirnov, A., Esnault, C., Ouhdouch, Y., Virolle, MJ., (2010). Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of Actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Appl Soil Ecol* 44:24–31.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.J., Ouhdouch, Y., (2008a). Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38, 12_19.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M.J., Ouhdouch, Y., (2008). Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil Ecol.* 40, 510_517.
- Harman, GE et Shores, M., (2007). The Mechanisms and Applications of Symbiotic Opportunistic Plant Symbionts.. In Vurro M. and Gressel J. (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. P.131-155.
- Haslay, C., et Leclerc, H.. (1993). *Microbiologie des eaux d'alimentation. Technologie et documentation*. Éd. Lavoisier, France.

- Horinouchi, S., (2002). Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Éd. *Frontiers in Biosciences*. 7: 2045-57.

I

- IOBC., (2012). International Organization for Biological Control, IOBC Internet Book of Biological Control, version 6.
http://www.iobcglobal.org/download/IOBC_InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf [accessed on 01 June 2016].

J

- Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q., Saadoun, I., (2008). Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). *Jordan J. Biol. Sci.* 1, 141–146.
- Jeffrey, L.S.H., Azriral, M.R.,(2007). Screening of cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of peninsular malaysia. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 35, 153–157.
- Jia ,SH., Anand Gururani ,M., Chun ,SC .,(2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol Res*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>.
- Jobin, G., Couture, G., Goyer, C., Brzezinski, R., Beaulieu, C.,(2005). *Streptomyces* spores entrapped in chitosan beads as a novel biocontrol tool against common scab of potato. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 104-110.
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., Rajkumar, S., (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 160, 778-788.
- Jones, K.A., Burges, H.D., (1998) . Technology of formulation and application. In: Burges, H.D. (Ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial*

Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 7–30.

K

- Karthik, N., Binod, P., Pandey, A., (2015) .Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. Bioresour Technol 188:195–201.
- Kaur, H., Kaur, J., Gera, R., (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Boon to Agriculture.
- Khalid, S., Akhtar, M. J., Mahmood, M. H., & Arshad, M. (2006). Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. Microbiology, 75, 231–236.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsian Journal of BioSciences, 4, 23.
- Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C-N., Goodfellow, M.. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al. 1997. Antonie Van Leeuwenhoek 83: 107–116. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023397724023>.
- Koaze, Y.,(1958). Germination Promotant for Rice Plant Seeds, produced by *Streptomyces* sp. S-580 culture condition and extraction of the active crude syrup (A.C.S.).Bull.Agric.Chem.Soc.Jpn.22,91–97.
- Köhl, J., De Haas, B.H., Kastelein, P., Burgers, S., Waalwijk, C., (2007). Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. Phytopathology. 97:971–978. doi: 10.1094/PHYTO-97-8-0971.
- Koul, O., (2011). Microbial biopesticides: opportunities and challenges. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6, No. 056. doi: 10.1079/PAVSNNR20116056.
- Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol. Res. 167 (8), 493–499.

- Kurup, U. P., J. J. Barboriak, J. N. Fink, and M. P. Lechevalier.,(1975).
Thermocactinomyces candidus, a new species of thermophilic *antimomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol. 25:150-154.

L

- Larkin, R. P., Fravel,D. R., (1999). Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium. Wilt of tomato, Dis. 82, 1022-1028.
- Lechevalier, HA., Lechevalier ,MP., (1981) .Introduction to the order Actinomycetales. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) The prokaryotes. Springer, Berlin, pp 1915–1922.
- Leng ,P., Zhiming ,Z., Guangtang, P. & Maojun ,Z., (2011). Applications and development trends in biopesticides. Afr. J. Biotechnol., 10(86), 19864-19873.
- Li, Q., Ning, P., Zheng ,L., Huang, J., Li, G., and Hsiang, T., (2012) .Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of Botrytis cinerea on tomato fruit, Biological Control, 61:113–120.
- Lin, P. J., Scholz, A. and Krull, R., (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 49(2), 213-220.
- Lin, Y.H., (2010). Effects of potassium behaviour in soils on crop absorption. Afr. J. Biotechnol. 9, 4638-4643.
- Liu, D., Lian, B., Dong, H., (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. J. Geomicrobiol. 29, 413–421.
- Lo, CW., Lai ,NS., Cheah ,HY., Wong,NKI., Ho, CC .,(2002) .Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker range Sabah. Asean Rev Biodivers Environ Conserv 9:1–7.

- Logrieco, A., Mulè G., Moretti, A., Bottalico, A., (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize Ear Rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:597–609. doi: 10.1023/A:1020679029993.

- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Buss, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whiteman, W.B., (2012). Road map of the phylum Actinobacteria, p 1–28. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo M.E., Suzuki K.I., Ludwig W, Whitman W.B. (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY.

- Lumsden, R.D., Leis, J.A., Fravel, D.R., (1995). Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soil-borne plant pathogens. In: Hall, F.R., Barry, J.W. (Eds), *Biorational pest control agents*. Am Chem Soc, Washington DC.

M

- Macagnan, D., Romeiro, R.D.S., de Souza, J.T., Pomella, A.W.V., (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* 3:122–132. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02981312>.

- Mahadevan, B., Crawford, D., (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 489–493.

- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K., (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol. Res.* 169 (4), 262–278.

- Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira H., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L., (2010) Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol Biochem.* 42: 1229–1235.

- Martinez-Alvarez, J.C., Castro-Martinez, C., Sanchez-Pena, P., Gutierrez-Dorado, R., Maldonado-Mendoza, I.E., (2016). Development of a powder formulation based on

Bacillus cereus sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. World J. Micorbiol. Biotechnol. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-2000-5>.

- Metz, B., and Kossen, N. W. F., (1977). The growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 781–799.
- Miller, G L., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*.VOL. 31, NO. 3, 426-428.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Prot.* 25, 468-475.
- Mohanta, Y.K., (2014). Isolation of cellulose degrading actinobacteria and evaluation of their cellulolytic potential. *Bioeng. Biosci.* 1, 1–5.
- Mohanta, Y.K., (2014). Isolation of cellulose degrading actinobacteria and evaluation of their cellulolytic potential. *Bioeng. Biosci.* 1, 1–5.
- Monika Singh., Divya Singh., Akanksha Gupta., Kapil Deo Pandey, P.K., Singh and Ajay Kumar., (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Application in Biofertilizers and Biocontrol of Phytopathogens. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Food Security and Environmental Management* (p.41-66).
- Monita ,V. Patel .,and Rajesh ,K. Patel., (2014) .Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, the little runn Of kutch. Centre for Info Bio Technology (CIBTech) *Journal of Microbiology*. Vol. 3 (2), pp. 17-28.

N

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., and Ertani, A. ,(2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73, 18–23. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0006

P

- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Damodharan, K., Suh, J.W., (2013a). Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. *J. Basic Microbiol.* 53, 985-995. germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *J. Appl. Microbiol.* 115, 207-217.
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L., Suh, J.W., (2013c). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth-promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9621-9636.
- Pamboukian, C., Guimarães, L., Facciotti, M., (2002). Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 17-21.
- Parmar, P., & Sindhu, S. S., (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*, 3(1), 25–31.
- Passari, A. K., Mishra, V. K., Gupta, V. K., Yadav, M. K., Saikia, R., Singh, B. P., & Virolle, M.-J. (2015). In vitro and in vivo plant-growth-promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS ONE*, 10, e0139468.
- Passari, A.K., Chandra, P., Zothanpuia, Mishra, V.K., Leo, V.V., Gupta, V.K., Kumar, B., Singh, B.P., (2016). Detection of biosynthetic gene and phytohormone production by endophytic actinobacteria associated with *Solanum lycopersicum* and their plant-growth promoting effect. *Res. Microbiol.* 167 (8), 692-705.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Saikia, V., Gupta, V.K., Singh, B.P., (2015b). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Front. Microbiol.* 6, 273. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00273>.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Yadav, M.K., Gupta, V.K., Saikia, R., Singh, B.P., (2016b). Distribution and identification of endophytic *Streptomyces* species from *Schima wallichii* as potential. *Pol. J. Microbiol.* 65 (3), 319-329.
- Patel, M V., et Patel, R K., (2014). Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline desert, the little runn Of kutch. Centre for Info Bio Technology (CIBTech) *Journal of Microbiology*. Vol. 3 (2), pp. 17-28.

- Pathom-Aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger deep sediment (10, 898 m) from the mariana trench. *Extremophiles* 10, 181_189.
- Perry ,J.J., Staley, J.T., Lory S., (2004). *Microbiologie*. Éd. Dunod.
- Podile, AR., et Kishore ,KG., (2006). Plant growth –promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, p195–230.
- Postma, J., Clematis, F., Nijhuis, E.H., Someus, E., (2013). Efficacy of four phosphate-mobilizing bacteria applied with an animal bone charcoal formulation in controlling *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* in tomato. *Biol. Control* 67, 284-291.
- Prasad, P., Bedi, S., Singh, T., (2012). In vitro cellulose rich organic material degradation by cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Malays. J. Microbiol.* 8 (3), 164–169.
- Prescott, L.M., Harley ,J.P., Klein ,D.A., (2003). *Microbiologie*. Éd. De Boeck et Larcier. France. p:507-13.

R

- Reddy ,NG., Ramakrishna ,DPN., Gopal SVR., (2011). A morphological, physiological and biochemical studies of marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) showing antagonistic activity against selective human pathogenic microorganisms. *Asian J Biol Sci* 4:1–14.
- Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K.D., Lumyong, S., (2010). Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1569-1578.

S

- Sabaratnam, S., & Traquair, J. A., (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23, 245–253.
- Sarita, M., Arora, A., Singh, S., Nain, L., (2013). *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresour. Technol.* 135, 12–17.
- Sellstedt, A., Richau, K.H., (2013). Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS Microbiol. Lett.* 342, 179_186.
- Sharma, A., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C., (2014). Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14 (2), 505-517.
- Shirling ,E.B. et Gottlieb, D., (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 3313-3340.
- Simmons, J. S., (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, (39): 209-214.
- Stephens ,AE., Gardiner ,DM., White ,RG., Munn ,AL., Manners, JM.,(2008). Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1571–1581.
- Suleman, P., Al-Musallam, A., Menezes, C.A., (2002). The effect of biofungicide Mycostop on *Ceratocystis radicola*, the causal agent of black scorch on date palm. *BioControl* 47, 207-216.
- Suzuki, S., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Nakanishi, N., Komatsubara, S., (2000). Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetologica* 14, 27-33.

T

- Tahmasebpour, B., Samimifar ,P., Dehnad ,A.,, Ebrahimi MA., Khaniki, B., (2014) Chitinase as the most important secondary metabolites of *Streptomyces* bacteria. Int J Sch Res Gate 2:306–315.
- Tamreihao, K., Ningthoujam, D.S., Nimaichand, S., Singh, E.S., Reena, P., Singh, S.H., et al., (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. Microbiol. Res. 192, 260_270.
- Thakore Y., (2006). The biopesticide market for global agriculture use. Ind. Biotechnol., 2, 194-208.
- Tortorano ,A.M., Cabrini,, E., Viviani M.A., (1979). Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques, *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.* Vol(8). p69-74.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., et al., (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. S. Afr. J. Bot. 105, 234-239.

V

- Van der Lee ,T., Zhang,, H., van Diepeningen A., Waalwijk ,C., (2015). Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: A review. Food Addit. Contam. A. 32:453–460. doi: 10.1080/19440049.2014.984244.
- Van Loon, LC, Bakker ,PAH M et Pieterse ,CMJ., (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453–483.
- Vivek Sharma and Richa Salwan ,(2018). Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. 93-108. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0>.
- Vyas, P., (2018). Endophytic Microorganisms as Bio-inoculants for Sustainable Agriculture. In: Singh J., Sharma D., Kumar G., Sharma N. (eds) Microbial Bioprospecting for Sustainable Development. Springer, Singapore. pp 41-60. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_3 .

W

- Waadt, R., Hsu, P.K., Schroeder, J.I.,(2015). Abscisic acid and other plant hormones: methods to visualize distribution and signaling. *Bioessays* 37 (12), 1338-1349.
- Wang, S. L., Hsiao, W.J., Changn, W.T.,(2002). Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCR31499 in a shrimp and carb shell powder medium. *J.Agric.Food.Chem.*,50,pp.2249-2255.
- Wang, W., Qiu ,Z., Tan ,H, Cao, L., (2014). Siderophore production by actinobacteria. *Biometals* 27:623–631.
- Wani, S.H., Vinay, K., Varsha, S., Saroj, K.S., (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J* 4, 162-176.
- Weyens, N., Monchy, S., Vangronsveld ,J., Taghari et Lelie ,DV., (2010). Plant-Microbe Partnerships (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 547-257.
- White, J.G., Linfield, C.A., Lahdenpera, M.L., Uoti, J., (1990). Mycostop-a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*, *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, vol. 1. British Crop Protection Council, pp. 221-226.
- Williams ,S.T., et Cross ,T., (1971). Actinomycetes in «*Methods in microbiology*» Academic Press, Éd. London. Vol. (4) : p295-334.
- Winding, A., Binnerup, S.J., Pritchard, H., (2004). Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 129-141.

Y

- Yandigeri ,MS., Malviya ,N., Solanki, MK., Shrivastava, P., Sivakumar, G ,(2015) .Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilikalake, India

enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1217–1225.

- Yin, P. Wang, Y.H., Zhang, S.L., Chu, J., Zhuang, Y.P., Chen, N., Li, X.F. and Wu, Y.B., (2008). Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39, 609–615.

Z

- Zamoum, M., Goudjal, Y., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., Zitouni, A., (2015). Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara. *J. Plant Dis. Prot.* 122, 215-223.

Annexe 1. Composition des milieux de cultures

ISP2
(International *Streptomyces* Project 2)

Glucose	4 g
Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Agar	18 g

GLM

Glucose	10 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Peptone	5 g
Agar	18 g

PDA(Potato-Dextrose-Agar)

Glucose	20 g
Extrait de pomme de terre	200g /eau distillée
Agar	20g

ISP 4
(International *Streptomyces* Project 4)

Amidon soluble	10 g
Di -potassium phosphate	1 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1 g
Chlorure de sodium	1 g
Sulfate d'ammonium	2 g
Carbonate de calcium	2 g
Sulfate ferreux heptahydraté	0,001 g
Chlorure de manganèse	0,001 g
Sulfate de zinc	0,001 g
Agar	20 g
pH	7,2 ± 0,2

ISP5
(International Streptomyces Project 5)

L. Asparagine	1g
Dipotassium phosphate	1g
Agar	20g
Solution des traces de sels	1ml
• Sulfate ferreux heptahydraté	0.001g
• Chlorure de manganèse tétrahydraté	0.001g
• Sulfate de zinc heptahydraté	0.001g
pH	7.6 ± 0.2

ISP7
(International Streptomyces Project 7)

L. Asparagine	1g
L. tyrosine	0.5g
Dipotassium phosphate	0.5g
Magnesium sulphate	0.5g
Sodium chloride	0.5g
Agar	20g
Solution des traces de sels	1g
• Sulfate ferreux .7 H ₂ O	1.36mg
• Chlorure de cuivre.2H ₂ O	0.027mg
• Chlorure de cobalt.6 H ₂ O	0.04mg
• Molybdate de sodium .2 H ₂ O	0.025mg
• Chlorure de zinc	0.02mg
• Acideborique	2.85mg
• Chlorure de manganèse. 4 H ₂ O	1.80mg
• Tartrate de sodium	1.77mg
pH	7.3 ± 0.1

Amidon caséine agar

Amidon soluble	10.00 g
Caséine (sans vitamine)	0.30 g
KNO ₃	2.00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
K ₂ HPO ₄	2.00 g
NaCl	2.00 g
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
Agar	18.00 g

CMC (carboxyméthylcellulose)

CMC	10 G
NaNO ₃	1.2 g
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	6 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.05 g
Mn SO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.001 G
Agar	18 g
pH	7

Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo	0.1g
Eau distillée	100ml

Bouillon typtone extrait de levure

Extrait de levure	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
pH	7.2

Réactif salcowski

FeCl ₃	1 ml
HClO ₄ 35% (w/v)	49 ml

Citrate de Simmons

Citrate de sodium	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Sulfate de magnésium	200 mg
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1g
Monohydrogénophosphate de potassium 1g Bleu de bromotymol	80 mg
Agar	13 g

Mannitol Mobilité

Peptone	20 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol	4 ml
Nitrate de sodium ou de potassium	1 g
Agar	1 g
pH	7.6

Gélose VF (viande foie)

Base viande foie	30 g
Glucose	2 g
Amidon	2 g
Agar	11 g
Sulfite de sodium	2.5 g
Sels de fer	0.5 g
pH	7.7 ± 0.1

Géloselait écrémé

Gélose nutritive additionnée à 45 °C d'un volume de lait stérile

BCP(Gélose lactosé au pourpre de bromocrésol)

Peptone	5 g
Extrait de viande de bœuf	3 g
Lactose	10 g
Pourpre de bromocrésol	25 mg
Agar	15 g
pH	6.8

Réactif DNS

Acide 3,4-dinitrosalicyclique	10 g
Tartrate de potassium et de sodium	300 g
NaOH	16 g

Préparation

- ↳ Dissolution de 10g d'acide 3,4-dinitrosalicyclique dans 200 ml d'H₂O. Puis, sous agitation continue, l'ajout lentement d'une solution de NaOH dissoute dans 150 ml d'eau distillée.
 - ↳ Incubation du mélange à 50 ° C sous agitation pour obtenir une solution limpide.
 - ↳ L'ajout de 300 g de tartrate tétra hydraté de sodium et de potassium en petites portions.
 - ↳ Filtration du mélange à l'aide d'un filtre en papier et l'ajustement du volume à 1000 ml avec de l'eau.
 - ↳ Conservation dans une bouteille en verre sombre à une température inférieure à 20 °C.
-

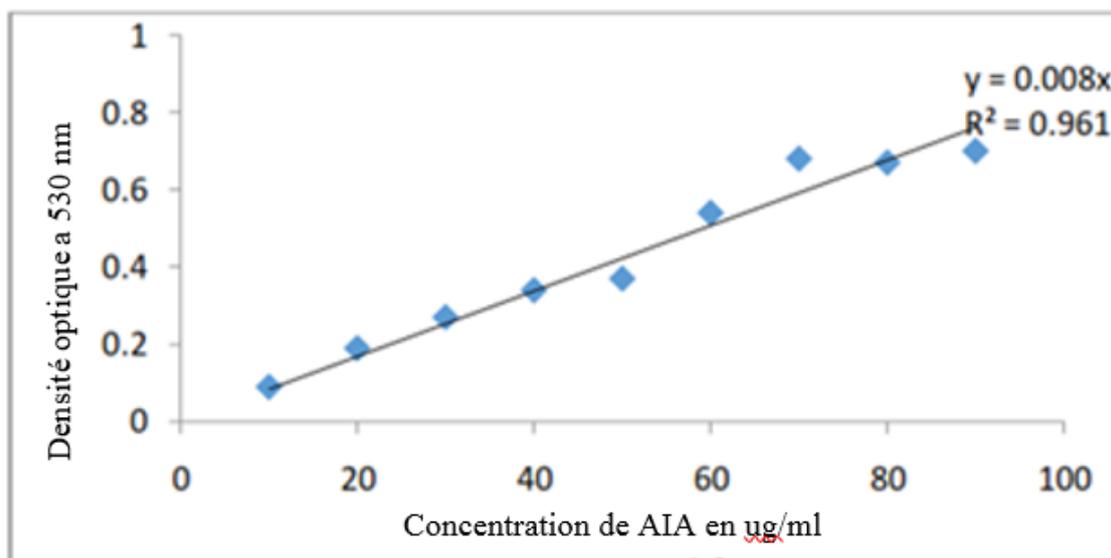
Annexe 2. La coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884.

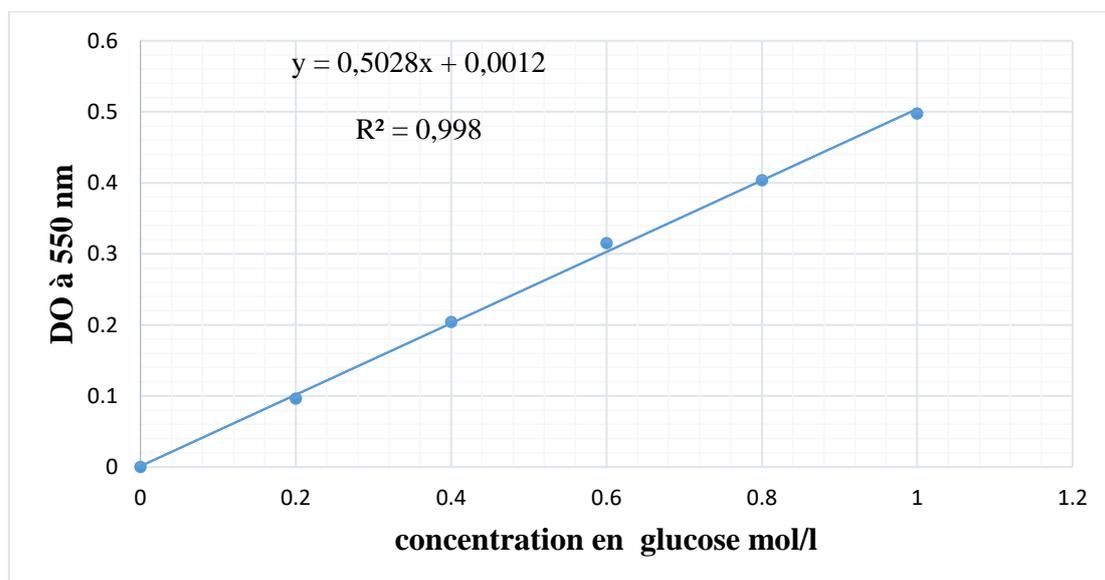
Cette technique s'effectue en trois principales étapes :

- ↳ Le frottis, séché et fixé à la chaleur, est recouvert de violet de Gentiane (crystal violet) phénolé, durant environ 1min, ensuite ce colorant est éliminé par un lavage à l'eau distillée, suivi par l'ajout de lugol pendant 30 sec, un deuxième lavage est effectué.
- ↳ Faire agir l'éthanol à 0.95% durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à décoloration, puis laver à l'eau distillée.
- ↳ Une Coloration à la Fuchsine phénolée est faite de quelques secondes à 1min selon sa concentration, puis un autre lavage à l'eau distillée.
- ↳ L'observation à l'immersion est réalisée après séchage de la lame, à l'objectif x100. La couleur violette due au violet de Gentiane est l'aspect caractéristique des bactéries à Gram positif, alors que les bactéries Gram négatif se colorent en rose par la Fuchsine.

Annexe 3. Courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage de AIA.



Courbe d'étalonnage de glucose

Résumé

Ce travail vise à contribuer à la formulation d'un produit de biocontrôle et de phytostimulation (biopesticide et biofertilisant) à partir d'un antagoniste actinobactérien vis-à-vis de *Fusarium*, phytopathogène du blé. Parmi 57 isolats actinobactériens testés, 29 isolats ont présenté une activité antagoniste *in vitro* inhibitrice de la croissance fongique de certaines espèces du genre *Fusarium*, responsables de la pourriture racinaire du blé. L'exploration du potentiel phytostimulant par la production des phytohormones a révélé l'aptitude de tous les isolats à produire l'AIA, ainsi que la capacité de la majorité à produire le NH₃. La plupart des isolats sont producteurs d'enzymes extracellulaires comme l'amylase et la cellulase. L'inoculation des graines par l'isolat S28 a augmenté de façon significative leur taux de germination ainsi que l'indice Vigor. La production maximale de biomasse de l'isolat S28 pour la formulation du biopesticide a été obtenue par incubation à 30°C/ 150 rpm. La biomasse récupérée a été, par la suite, lyophilisée dans la première formule et séchée à la chaleur dans la seconde. La viabilité de la biomasse a été maintenue par lyophilisation en utilisant un cryoprotecteur. En revanche, le taux de viabilité diminue considérablement lorsque la méthode de formulation utilisée passe par le chauffage de la biomasse actinobactérienne.

Mots-clés. Lutte biologique, *Fusarium*, actinobactéries, phytostimulation, formulation.

Abstract

This work aims to contribute to the formulation of a biopesticide and biofertilizer from an actinobacterial antagonist isolate against *Fusarium*, wheat pathogenic fungi. Among 57 bacterial isolates, 29 isolates exhibited *in vitro* antagonist activity and inhibited *Fusarium* growth. The exploration of phytostimulating potential by phytohormone production revealed the ability of all isolates to produce IAA, as well as the ability of most of them to produce NH₃. Most isolates were able to secrete extracellular lytic enzymes such as amylase and cellulase. Wheat seed treatment by isolate S28 significantly increased their germination rate as well as their Vigor index. Maximum biomass production of isolate S28 for the biopesticide formulation was obtained by incubation at 30°C / 150 rpm. The recovered biomass has been lyophilized in the first formula and heat-dried in the second. The viability of the biomass was maintained by lyophilization using glycerol as cryoprotectant. However, the viability rate was significantly reduced.

Keywords. Biological control, *Fusarium*, actinobacteria, growth promotion, formulation.

Nomet prénom: ZAHRI Khaoula MBOYA E. Julius	Soutenu le: 21/07/2019
Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Filière : Sciences biologiques. Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle	
<p align="center">Thème :Essai de formulation d'un biopesticide à base d'inoculant actinobactérien possédant une activité antifongique vis-à-vis de <i>Fusarium</i> phytopathogène de blé</p>	
<p>Résumé</p> <p>Ce travail vise à contribuer à la formulation d'un produit de biocontrôle et de phytostimulation (biopesticide et biofertilisant) à partir d'un antagoniste actinobactérien vis-à-vis de <i>Fusarium</i>, phytopathogène du blé. Parmi 57 isolats actinobactériens testés, 29 isolats ont présenté une activité antagoniste <i>in vitro</i> inhibitrice de la croissance fongique de certaines espèces du genre <i>Fusarium</i>, responsables de la pourriture racinaire du blé. L'exploration du potentiel phytostimulant par la production des phytohormones a révélé l'aptitude de tous les isolats à produire l'AIA, ainsi la capacité de la majorité à produire le NH₃. La plupart des isolats sont producteurs d'enzymes extracellulaires comme l'amylase et la cellulase. L'inoculation des graines par l'isolat S28 a augmenté de façon significative leur taux de germination ainsi que l'indice Vigor. La production maximale de biomasse de l'isolat S28 pour la formulation du biopesticide a été obtenue par incubation à 30°C/ 150 rpm. La biomasse récupérée a été, par la suite, lyophilisée dans la première formule et séchée à la chaleur dans la seconde. La viabilité de la biomasse a été maintenue par lyophilisation en utilisant un cryoprotecteur. En revanche, le taux de viabilité diminue considérablement lorsque la méthode de formulation utilisée passe par le chauffage de la biomasse actinobactérienne.</p>	
Mots clés. Lutte biologique, <i>Fusarium</i> , actinobactéries, phytostimulation, formulation.	
Laboratoire de recherche: Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).	
<p>Jury d'évaluation</p> <p>Président : Pr. BOULAHROUF. AU.F.M Constantine1. Rapporteur : Pr. KACEMCHAOUICHE. NU.F.M.Constantine1. Examineur: Mme. CHERFIA.RU.F.M. Constantine1. Tutrice : M^{elle}.ALLOUN. W (Doctorante au La My BAM) U.F.M. Constantine1.</p>	