

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275
en vue de l'obtention du diplôme de Master
et diplôme startup –diplôme brevet

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Formulation d'un biofongicide à partir d'actinobactéries
contre *Fusarium sp.* de la tomate « *Lycopersicon esculentum* »**

Présenté par : TRAORE Lassina
TRAORE Adama

Le 09/07/2023

Jury d'évaluation :

Encadreur : Zermane Ferial (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Président : Boudemagh Alaoueddine (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur : Harrat Wahiba (MRB - INRAA).
Incubateur : Bellil Iness (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Cati : Bethina Soumeya (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Partenaire Socio-économique : Benlatreche Salim (Catalyse Lab)

Année universitaire
2022 - 2023

Remerciements

C'est avec un réel plaisir et une grande reconnaissance que nous réservons ces premières lignes à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Nous remercions notre encadrante Mme **Férial Zermane** pour nous avoir fourni de son savoir et savoir-faire tout au long de l'élaboration de ce modeste travail. Ses conseils, suggestions, et exigences ainsi que sa patience et disponibilités nous ont permis de découvrir avec passion le merveilleux domaine de la recherche. Nous sommes très heureux de lui exprimer toute notre gratitude.

Nous exprimons également du plus profond de nos cœurs notre remerciement à Mr **Boudemagh Alaoueddine** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce travail malgré ses nombreuses préoccupations. Ainsi que Mme **Haraat Wahiba** ayant bien voulu nous faire l'honneur de faire partie de cet honorable jury, et pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par ses remarques et ses propositions.

Nous tenons chaleureusement à remercier tous les membres du Laboratoire de Zoologie notamment Mr **Nadjid** ; ainsi qu'à tous le personnel, Ingénieurs et enseignants de la faculté de SNV ; Mr **Brahim**, Mme **AIOUNNE**, Mme **Saoudi Mouna**, Mme **Benkahoul Malika** et Mr **Oumar**.

Aw ni tié / Choukran

DEDICACES

Je dédie ce travail à toute la famille TRAORE et particulièrement à mes chers parents, qui n'ont cessé de me soutenir tout au long de mon cursus ;

Egalement sans omettre mes oncles Abdoulaye Traoré et Lamine Traoré qui par leurs précieux conseils m'ont inspiré davantage en persévérance.

A tous ceux, qui m'ont soutenu, à ma chère patrie le Mali

A tous mes promotionnaires de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) de l'UFMC1 et ainsi qu'à ceux du Lycée Monseigneur Didier de Montclos de Sikasso (LMMS)

Mention spéciale à mes biens aimés en ALLAH : Hali, Abdoumoumine, Hamza, Djibril, Ala, Cheick Saleh celui qui m'encourage toujours, Nadir et Moundir ainsi que leurs parents. Ce travail est également le vôtre, puisse ALLAH nous réunir ensemble avec notre bien aimé Mohamed (Paix et Salut soient sur lui) au Paradis.

Ameen

Egalement à Adama Traoré pour ses efforts fournis.

Traoré Lassina

DEDICACES

J'aimerais dédier mon travail à tous les membres de ma famille et spécialement à mes merveilleux parents qui m'ont toujours accompagnés et soutenus dans mes choix mieux que n'importe qui dans ce monde.

Spéciale dédicace à tous mes compatriotes, amis et camarades d'ici et du Mali pour leur soutien moral dans les périodes difficiles.

Un grand merci à Mme Ouarda pour ses conseils, son incroyable bienveillance, sa bonne humeur, sa sympathie envers tous les étrangers en Algérie.

Je remercie profondément mon oncle Madou pour son soutien de toujours, à mon binôme Lassina Traoré pour tous les efforts fournis depuis le début de notre mémoire.

Traoré Adama

Résumé

Notre travail a porté sur la production d'un pesticide bio, qui peut être un produit de biocontrôle et phytostimulation pour les cultures. Le travail consiste à tirer avantage du caractère antagoniste des actinomycètes envers le phytopathogène *Fusarium* ravageur de plusieurs cultures. Le test a été effectué sur une totalité de 8 souches d'actinobactéries, parmi celles-ci 2 souches ont montré un antagonisme élevé et prometteur vis-à-vis du *Fusarium* et les 6 restants ont été assez inefficace. La biomasse, issue de chacune des 2 souches performantes (**A12** et **G3**), est récupérée par filtration puis lyophilisée pour avoir un aspect poudreux. Après lyophilisation, des tests de viabilité des cellules ont montré de très bons résultats. L'additif utilisé pour notre biopesticide est composé de la paille de blé broyée sous forme de poudre à laquelle 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (**CaCO₃**) sont ajoutés. Le produit final sera le mélange de la biomasse lyophilisée, paille de blé en poudre, 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (**CaCO₃**), ce qui permet une bonne conservation de notre produit pour une longue durée de temps. L'étude macroscopique et microscopique de la souche **A12** a permis de la rapprocher au genre *Micromonospora*.

Mots clés : pesticide bio, biocontrôle, *Fusarium*, actinobactérie, *Micromonospora*.

Abstract

Our work focused on the production of a bio pesticide, which can be a biocontrol and phytostimulation product for crops. The work consists in taking advantage of the antagonistic nature of actinomycetes towards the phytopathogen *Fusarium*, a pest of several crops. The test was carried out on a total of 8 strains of actinobacteria, among these 2 strains showed a high and promising antagonism towards *Fusarium* and the remaining 6 were quite ineffective. The biomass, from each of the 2 high-performance strains (**A12** and **G3**), is recovered by filtration and then freeze-dried to have a powdery appearance. After freeze-drying, cell viability tests showed very good results. The additive used for our biopesticide is composed of crushed wheat straw in powder form to which 10g of starch and 1.5g of calcium carbonate (**CaCO₃**) are added. The final product will be the mixture of freeze-dried biomass, powdered wheat straw, 10g of starch and 1.5g of calcium carbonate (**CaCO₃**), which allows good preservation of our product for a long period of time. The macroscopic and microscopic study of the **A12** strain made it possible to bring it closer to the genus **Micromonospora**.

Keywords: Bio pesticide, biocontrol, Fusarium, actinobacteria, **Micromonospora**.

ملخص

ركز عملنا على إنتاج مبيد عضوي يمكن أن يكون منتجًا للتحكم البيولوجي والتحفيز النباتي للمحاصيل. يتركز العمل على الاستفادة الشخصية من الفطريات الشعاعية تجاه الآفات الممرضة للنباتات المتمثلة في المغزلاوية *Fusarium* (جنس من الفطريات الخيطية) ونوع من الآفات التي تصيب الكثير من المحاصيل الزراعية. تم إجراء الاختبار على مجموعة تتكون من 8 سلالات من البكتيريا الشعاعية ، 2 منها أظهرت سلالات عدائية عالية وواعدة تجاه *Fusarium* و 6 المتبقية كانت غير فعالة تماما. الكتلة الحيوية لكل من السلالتين عاليتي الأداء **A12** و **G3** يتم استعادتها بالترشيح ثم تجفيفها بالتجميد للحصول على مسحوق. بعد التجفيد ، أظهرت اختبارات صلاحية الخلية و نتائج جيدة جدًا. حيث ان المادة المضافة التي تستخدم في مبيدات الآفات الحيوية لدينا تتكون من قش القمح على شكل مسحوق ليتم إضافة 10 غرام من النشاء و 1.5 غرام من كربونات الكالسيوم (CaCO_3) ، المنتج النهائي سيكون خليط الكتلة الحيوية المجففة بالتجميد ، بالإضافة الى قش القمح المسحوق ، 10 غرام من النشا و 1.5 غرام من كربونات الكالسيوم (CaCO_3) ، مما يسمح بالحفاظ على منتجنا بشكل جيد و لفترة طويلة من الزمن. الدراسة المجهرية والميكروسكوبية لسلالة A12 سمح لنا بتقريبه من جنس *Micromonospora*

الكلمات المفتاحية : المبيدات العضوية ، المكافحة الحيوية ، الفيوزاريوم ، البكتيريا الشعاعية ، الكائنات الدقيقة.

Table des matières

Résumé

Liste des Abréviations

Listes des figures

Liste des Tableaux

Introduction 1

Revue bibliographique

I. La tomate	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. Description morphologique.....	3
I.3. Physiologie	5
I.4. Variétés	6
I.4.1. Croissance déterminée.....	6
I.4.2. Croissance indéterminée	6
I.5. Production de la tomate dans le monde	7
I.6. Production de la tomate au mali.....	8
I.7. Importance de la production de la tomate.....	9
I.8. Ravageurs et maladies de la tomate	9
I.8.1. Ravageurs	9
I.8.2. Les maladies	10
II. Les Actinobacteries	11
II.1. Caractéristiques morphologiques et culturelles	11
II.2. Taxonomie.....	12
II.3. Ecologie et physiologie	12
II.4. Pouvoir de phytostimulation et de biocontrôle des actinobactéries.....	13
II.4.1. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPB	13
➤ Mécanismes directs.....	13
➤ Mécanismes indirects	15
II.4.2. Les actinomycètes agents de production des biopesticides	16
III. Fusarium	17
III.1. Classification du <i>Fusarium</i>	17
III.2. Physiologie du <i>Fusarium</i>	17
III.3. Principales espèces pathogènes (tableau 4)	17

Matériels et Méthodes

I. Matériels biologique	19
I.1. Phytopathogène fongique	19
I.2. Réactivation.....	19
I.3. Agent antagoniste.....	20
II. Activité antagoniste des actinobactéries vis-à-vis du fusarium	20
III.1. Production de la biomasse.....	21
IV. Vérification de viabilité et pureté de la biomasse	23
V. Test d'antagonisme par les produits de la biomasse.....	23
VI. Pré identification des souches actives par la technique des lamelles	24

Résultats et Discussions

I. Caractères macroscopique et microscopique de l'agent phytopathogène (<i>fusarium</i>)	25
II. Agents antagonistes	26
III. Activité antagoniste d'actinobactéries vis-à-vis du fusarium.....	27
VI. Test d'antagonisme par les produits de la biomasse	32

Conclusions et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Abréviations

PDA: POTATO DEXTROSE AGAR

PGPR: PLANT GROWTH PROMOTING RHYZOBIA

PGPB: PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA

TMV: TOBACCO MOSAIC VIRUS

CMV: LE CYTOMEGALOVIRUS

PVY: POTATO VIRUS Y OU POTYVIRUS

TCWV: TOMATO SPOTTED WILT VIRUS

PVMV: PEPPER VEINAL MOTTLE VIRUS

CVMV: CUCUMBER MOSAIC VIRUS

TYLCV: TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS

ISP2 : INTERNATIONAL STREPTOMYCES PROJECT

ABA : ACIDE ABSCISSIQUE

INRAA : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGROALIMENTAIRE EN ALGERIE

URC : UNITE DE RECHERCHE CONSTANTINE

PI : POURCENTAGE D'INHIBITION

Listes des figures

Figure 1 : Structure de la plante de tomate (<i>Tomato Plant Journal-Taka Vegetable</i> , 2021)	5
Figure 2 : Production/quantité de rendement de la tomate dans le monde (FAOSTAT, 2023). 7	
Figure 3 : Production mondiale de tomate par continent (FAOSTAT, 2023).....	8
Figure 4 : Production de tomate au Mali (FAOSTAT, 2023)	8
Figure 5 : Infections de <i>Fusarium</i> (la fusariose)	11
Figure 6 : Aspect macroscopique d'une souche actinomycète	12
Figure 7 : Logo à l'entrée du laboratoire de Recherche	19
Figure 8 : Souche de <i>Fusarium</i> fournit par l'unité de recherche	19
Figure 9 : Confrontation entre l'antagoniste bactérien et le phytopathogène fongique par la technique de trait.	20
Figure 10 : Test témoin ; disque de <i>fusarium</i> en absence de l'antagoniste bactérien	21
Figure 11 : Production de la biomasse	22
Figure 12 : Etapes de formulation du biopesticide.....	23
Figure 13 : Technique des lamelles.....	24
Figure 14 : Aspect macroscopique du <i>Fusarium</i>	25
Figure 15 : Observation microscopique du <i>Fusarium</i>	25
Figure 16 : image de quelques souches pures obtenues	26
Figure 17 : Résultats du test de confrontation directe	27
Figure 18 : Diagramme du Pourcentage d'inhibition.....	28
Figure 19 : Test de viabilité après la production de biomasse	29
Figure 20 : Biomasse lyophilisée	30
Figure 21 : Les produits finaux (prototype)	30
Figure 22 : Test de viabilité des souches après lyophilisation	31
Figure 23 : Test d'antagonisme par le filtrat.....	32
Figure 24 : Aspect macroscopique des souches actives.....	33
Figure 25 : Aspect microscopique de la souche A12	33

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Description des différentes parties de la plante de tomate	4
Tableau 2 : Quelques agents de biocontrôle produits par les actinomycètes et leurs rôles ou effets (Saloni <i>et al.</i> , 2022)	15
Tableau 3 : Liste de quelques biopesticides commercialisés à base d'actinobactéries (Guilherme da <i>et al.</i> , 2022)	16
Tableau 4 : Exemples de principales maladies causées par les espèces de <i>Fusarium</i>	18

Introduction

Le terme pesticide est utilisé pour décrire tout produit issu du mélange de plusieurs substances chimiques différentes (pesticide chimique) ou à partir d'organismes vivants animales, végétales ou microbiennes (dans notre cas biopesticide). Toutefois les pesticides chimiques peuvent avoir plusieurs effets néfastes pouvant être létaux sur la santé humaine et animale dont les effets peuvent être aigus ou chroniques. En effet l'ONU estime que « les pesticides causent près de 385 millions de cas annuels d'intoxication accidentelle non mortelle, auxquels viennent s'ajouter environ 11 000 décès. Il existe également une forte corrélation entre l'exposition professionnelle ou résidentielle aux pesticides et la survenue de problèmes de santé, notamment de cancers et d'effets sur les systèmes neurologique, immunologique et reproductif » (*United Nations Environment Programme, 2023*). Les pesticides chimiques peuvent, à cause d'une utilisation excessive, non contrôlée ou inefficace, polluer l'environnement causant ainsi beaucoup de dégâts sur la fertilité des sols, des eaux de surfaces et souterraines, une diminution de la biodiversité, un déclin des pollinisateurs indispensables à certaines plantes.

Au vu des différents problèmes engendrés par ces derniers il est de notre devoir d'y remédier. Plusieurs solutions de lutte s'offrent à l'humanité dont l'une d'entre elles est le recours aux biopesticides. C'est là qu'intervient notre travail qui vise à utiliser des actinobactéries pour produire un biopesticide pouvant à la fois jouer un rôle dans la protection, la croissance et le rendement des cultures contre des champignons pathogènes (dans notre cas *Fusarium*) et participer à la bioremédiation des sols pollués.

Notre travail consiste à formuler un produit capable de faire le biocontrôle de la culture de tomate et bien d'autres cultures pouvant être infecté par *Fusarium* à travers l'activité antagoniste de souches d'actinobactéries sur ce dernier. Ces souches d'actinobactéries subissent différents tests et expériences afin de déterminer ceux qui ont l'activité antagoniste la plus élevée sur le phytopathogène et le produit sera formulé.

Revue bibliographique

I. La tomate

I.1. Généralités

La tomate fait partie des cultures les plus répandues et les plus consommées dans le monde entier. Elle contient des éléments nutritifs et bénéfiques pour le corps humain comme des minéraux, des vitamines B et C, du fer, du phosphore, des acides aminés essentiels et beaucoup de fibres alimentaires. Elle est originaire des Andes d'Amérique du Sud. Elle fut domestiquée au Mexique, puis arriva en Europe en 1544 et sa culture atteignît de cette façon les continents en Asie (Asie du Sud et de l'Est), en Afrique et en Moyen Orient. Plus récemment, la tomate sauvage a été introduite dans d'autres régions de l'Amérique du Sud et au Mexique (Naika *et al.*, 2005).

La tomate, aussi appelée *Solanum lycopersicum* (Carl Von Linné en 1753) ou *Lycopersicon esculentum* (Philip Miller en 1768), appartient à la famille des Solanacées, au genre *Solanum* qui regroupe aussi d'autres espèces de tomate et des cultures très connues comme la pomme de terre, le tabac, le poivron et l'aubergine (Naika *et al.*, 2005).

I.2. Description morphologique

La plante de la tomate est composée de plusieurs éléments comme la racine, la tige, les fleurs, les feuilles, les fruits et les graines (tableau1, figure1).

Tableau 1 : Description des différentes parties de la plante de tomate

La tige	Le port de croissance de la tige peut être érigée ou prostrée. Sa taille peut atteindre une longueur de 2 à 4 m et elle est pleine, fortement poilue et glandulaire (Naika <i>et al.</i> , 2005).
Les feuilles	Organisées sous forme de spirale et leurs tailles varient de 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires mais les grandes folioles sont parfois pennatifides à la base. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm (Naika <i>et al.</i> , 2005).
Les fleurs	Bisexuées, régulières et entre 1,5 et 2 cm de diamètre. Grandissent entre les feuilles ou dans un sens opposé à celles-ci. Le tube possède un calice court et velu, les sépales sont persistants. En générale il y a 6 pétales (jaunes et courbées lorsqu'elles sont mûres de longueur pouvant atteindre 1cm), 6 étamines et des anthères avec une couleur jaune vif et entourant le style qui a une extrémité stérile allongée. En général la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu. Les abeilles et les bourdons sont les principaux pollinisateurs (Naika <i>et al.</i> , 2005).
Les fruits	fruit charnue, forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Un fruit non mûr est vert et poilu mais le fruit mûr varie de la couleur jaune au rouge avec un passage par l'orange. En général les fruits sont ronds et réguliers ou côtelés (Naika <i>et al.</i> , 2005).
Les graines	Plusieurs graines en forme de rein ou de poire et poilues avec une longueur variant de 3 à 5 mm et une largeur 2 à 4mm. L'embryon est enroulé dans l'albumen (Naika <i>et al.</i> , 2005).

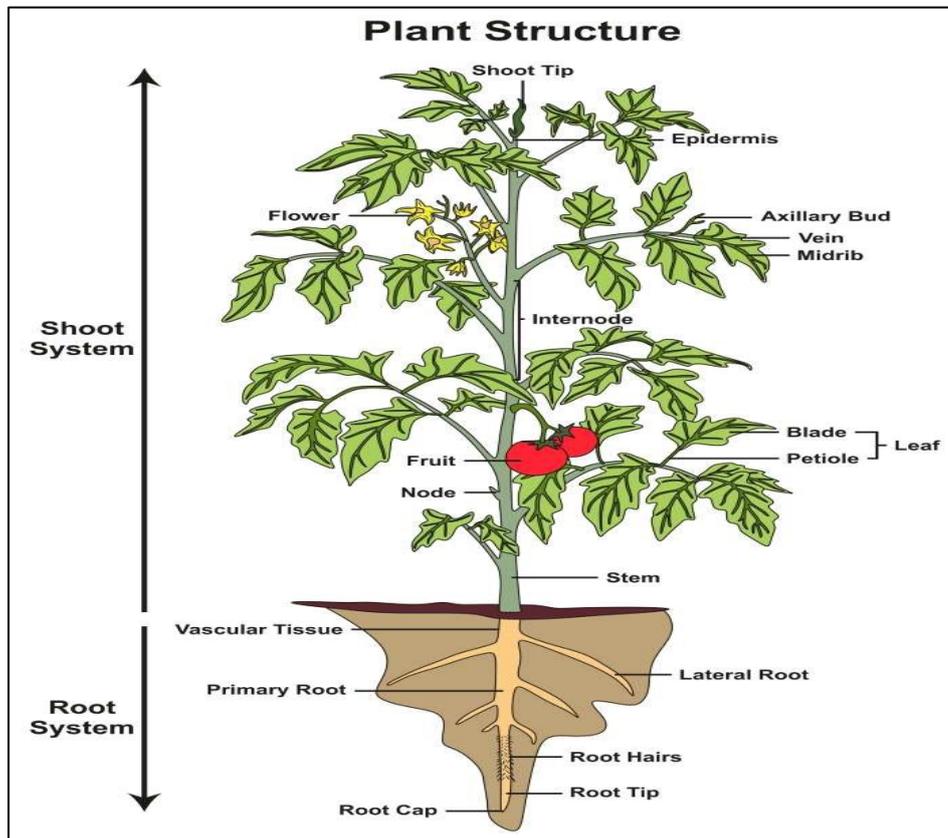


Figure 1 : Structure de la plante de tomate (*Tomato Plant Journal-Taka Vegetable, 2021*)

I.3. Physiologie

La tomate cultivée possède une floraison qui n'est pas influencée par le rapport durée jour/nuit appelé « photopériodisme» (**Garner et Allard., 1920**). Cette capacité lui a permis de s'adapter sous diverses latitudes.

La tomate possède des fleurs hermaphrodites qui la permettent d'être autofertile et principalement autogame et cela résulte de la morphologie de la fleur, le style est en effet inséré dans le tube formé par les étamines, les stigmates n'apparaissant généralement pas à l'extérieur. Cela limite fortement la pollinisation croisée, sans l'interdire totalement. La pollinisation nécessite toutefois l'intervention d'un agent extérieur, le vent, certains insectes comme les bourdons, voire un vibreur, capable de faire vibrer les anthères et de libérer le pollen.

Chez la tomate, « la photosynthèse est du type en **C3**, c'est-à-dire qu'en première étape elle produit des glucides à trois atomes de carbone » (**Benton Jones., 1999**).

I.4. Variétés

La tomate est le type de culture qui peut croître selon deux types de croissance possible : une croissance déterminée et une croissance indéterminée et la pratique de la culture est effectuée selon le type de croissance.

I.4.1. Croissance déterminée

Généralement les variétés à croissance déterminées n'ont pas besoin d'être tuteurées car elles se tiennent elles-mêmes et résistent à une éventuelle cassure de leurs tiges par les vents. Dès la fin de la floraison, la croissance de cette variété s'arrête. Elles sont utilisées pour la culture commerciale car la nécessité de beaucoup de main d'œuvre est minimale. Elles donnent des fruits en deux ou trois semaines et ces derniers mûrissent plus rapidement que ceux des variétés à croissance indéterminée (**Naika et al., 2005**).

I.4.2. Croissance indéterminée

La croissance continue même après la floraison contrairement aux variétés à croissance déterminée ce implique une plus longue période de récolte. Cependant, sous des conditions tropicales, les maladies et les attaques d'insectes peuvent ralentir la croissance. Cette variété possède beaucoup de feuilles ce qui protège les fruits du soleil et mûrissage plus lente. Cette particularité mûrissage lent couplé au rapport feuille/fruit élevé donne un meilleur goût sucré. Les variétés à croissance indéterminée nécessitent des tuteurs, des cages ou des treillis pour les appuyer (**Naika et al., 2005**).

I.5. Production de la tomate dans le monde

La tomate est l'une des productions les importantes dans le monde tant sur le plan économique, santé qu'alimentaire ce qui explique pourquoi sa surface de culture et son taux de production ne cessent d'augmenter dans les différents continents du globe au fil des années.

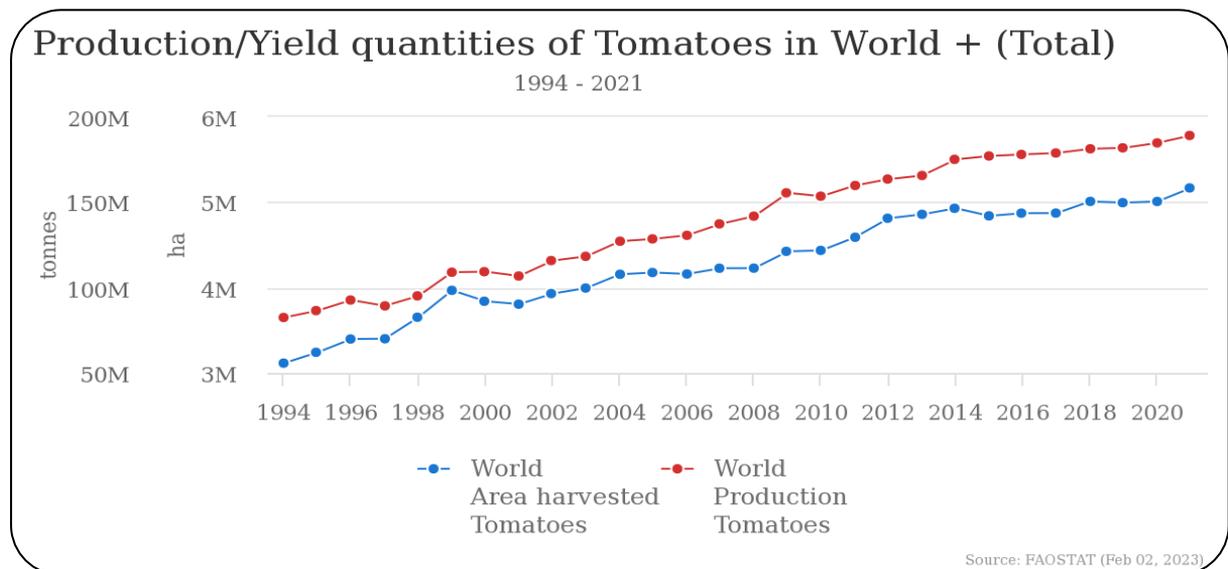


Figure 2 : Production/quantité de rendement de la tomate dans le monde (FAOSTAT, 2023)

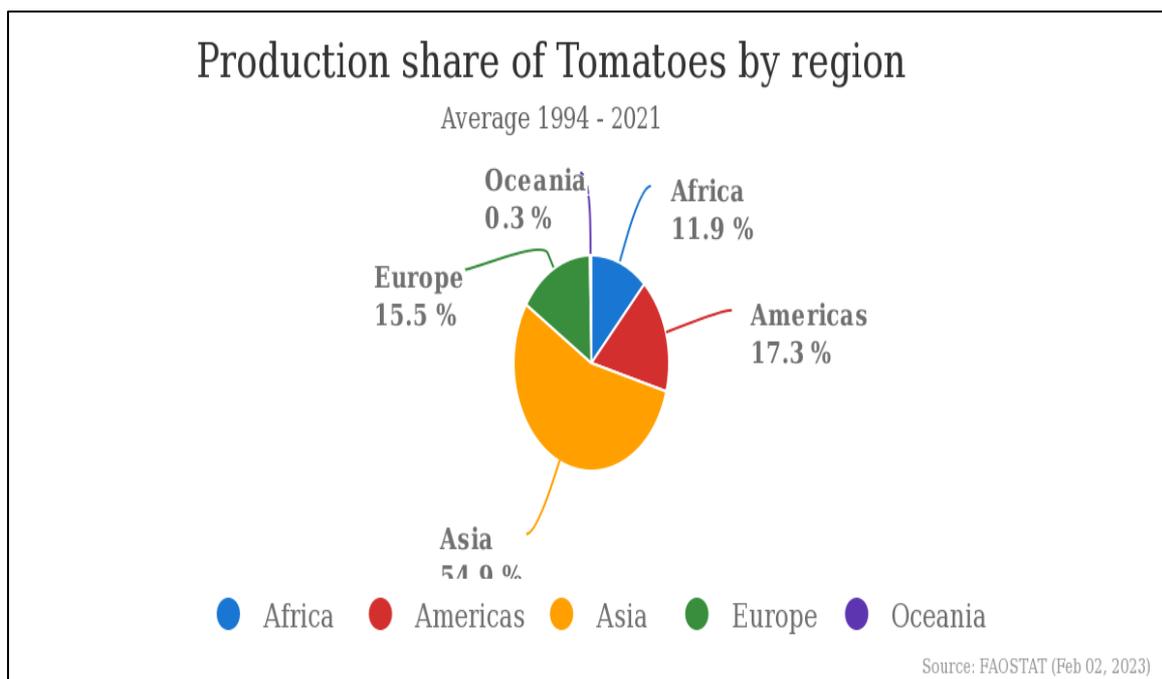


Figure 3 : Production mondiale de tomate par continent (FAOSTAT, 2023)

I.6. Production de la tomate au Mali

La tomate est l'une des cultures les plus importantes et les plus produites au Mali. Son taux de production augmente au fil des années au vu de la demande sur le marché et la consommation de la population. La tomate est utilisée dans presque tous les plats maliens.

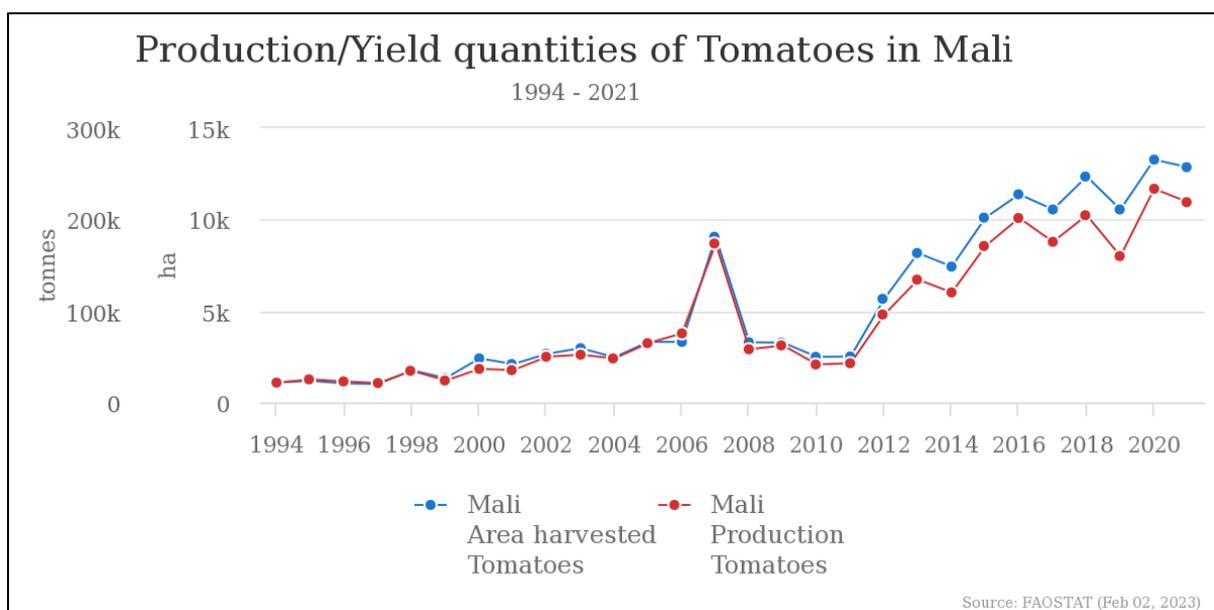


Figure 4 : Production de tomate au Mali (FAOSTAT, 2023)

I.7. Importance de la production de la tomate

La tomate représente l'une des cultures les produites et répandues dans le monde de par sa capacité à être cultivée sous diverses latitudes ce qui lui permet d'être cultivée dans plusieurs pays du globe. Elle a une importance sur plusieurs plans :

❖ Sur le plan alimentaire

La tomate présente une grande diversité dans son utilisation. Elle peut être utilisée à l'état frais en cuisine en la cuisant dans une sauce ou en conserve (ketchup ou concentré de tomate). Le légume apporte beaucoup d'éléments nutritifs comme des vitamines, des acides aminés essentiels, des fibres alimentaires...

❖ Sur le plan médical

Les tomates jaunes ont une teneur en vitamine A plus élevée que les tomates rouges, mais les tomates rouges contiennent du lycopène, un antioxydant qui contribue possiblement à la protection vis-à-vis des substances carcinogènes (**Naika et al., 2005**).

❖ Sur le plan économique

La production de tomate peut être une source de revenu aux pays qui ont des taux de production élevés grâce à l'exportation dans d'autres pays.

I.8. Ravageurs et maladies de la tomate

I.8.1. Ravageurs

○ Nématodes

Ce sont des vers d'une taille minuscule qui ont pour habitat les sols humides autour des racines des plantes et vivent en se nourrissant de la sève plantaire qui aura un effet réducteur sur la productivité de la plante. Les nématodes qui infectés par des virus ou des moisissures sont les plus dangereux car leur pénétration, via la bouche du nématode, dans la plante peut être létale pour celle-ci. Généralement trois types de nématodes (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica* et *M. arenaria*) infectent les cultures de tomate en provoquant la galle des racines (**Naika et al., 2005**). « D'après **Naika et al., (2005)**, Environ 30% de la récolte de tomates des pays tropicaux est perdu à cause des nématodes. »

○ **Les insectes et leurs effets sur la plante de tomate**

De nombreux insectes comme les mouches blanches (*Bemisia tabaci*), les thrips(*Thripidae*) et les pucerons (*Aphidae*) sont capables de ravager les cultures de tomate en se nourrissant de la sève des feuilles ou provoquer des maladies, par transmission de virus pathogènes, qui engendrent encore plus de dégât (Naika et al., 2005).

I.8.2. Les maladies

Les cultures de tomates peuvent subir de vrais ravages à cause de certains microorganismes pathogènes pouvant provoquer la destruction partielle voir totale de la culture

○ **Maladies provoquées par des bactéries**

Les plantes de tomate sont victimes de plusieurs maladies causées par les pathogènes bactériens. Les bactéries sont capables d'infecter la plante seulement dans les parties affaiblies comme les blessures physiques (cicatrices, les stomates et les lenticelles, petits pores à la surface des tiges et des racines). Les maladies fréquemment rencontrées sont le flétrissement causé par *Ralstonia solanacearum*, le feu bactérien par *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*, le chancre bactérien par *Clavibacter michiganense* (Naika et al., 2005).

○ **Maladies provoquées par des virus**

La tomate est infectée par les virus via les insectes et les nématodes (précédemment cités) qui leur servent de vecteur. Cette infection se traduit par la déformation et/ou le changement de couleur des feuilles vers une couleur blanche claire ou vert foncé, la déformation des tiges. Quelques virus responsables de maladie de la tomate sont le TMV, le CMV, le PVY, le TCWV, le PVMV, le CVMV, le TYLCV, le virus de la mosaïque de la tomate (Naika et al., 2005).

○ **Maladies provoquées par les champignons**

Les moisissures tout comme les bactéries infectent la tomate à travers les blessures ou les pores des feuilles et des tiges. Cette infection survient quand les spores fongiques arrivent à passer à travers une cicatrice, germent et pénètrent à l'intérieur de la plante (organes, tissus, cellules) et est identifiable grâce aux taches sur les feuilles. Quelques moisissures et les maladies quelles provoquent d'après (Naika et al., 2005) : l'alternariose causé par *Alternaria*

solani, le mildiou par *Phytophthora infestans*, la fusariose par *Fusarium oxysporum*, la verticilliose par *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahlia*.



Figure 5 : Infections de *Fusarium* (la fusariose)

II. Les Actinobacteries

II.1. Caractéristiques morphologiques et culturelles

Les actinomycètes sont des bactéries Gram positif ayant un pourcentage élevé en G+C dans leur génome (57-75%) (Asma *et al.*, 2017). Malgré leur procaryocité, ils sont dépourvus de parois cellulaires distinctes et produisent un mycélium non cloisonné et plus mince. (Ranjani *et al.*, 2016).

Ils se reproduisent par fission binaire ou en produisant des spores ou conidies, ainsi cette sporulation des actinomycètes s'effectue par fragmentation et segmentation ou formation des conidies. Leur aspect morphologique est compact, poudreuse (Saloni *et al.*, 2021) parfois coriace formant un aspect conique avec une surface sèche sur les milieux de culture. Ils sont aussi fréquemment recouverts de mycélium aérien. (Ranjani *et al.*, 2016).

Le mycélium est divisé en mycélium de substrat et mycélium aérien selon la différence de morphologie ainsi de fonction. Certains actinomycètes ont la capacité de former des structures complexes telles que les spores, chaînes de spores, des sporanges et des sporangiospores. (Qinyuan *et al.*, 2016). Les caractéristiques culturelles sont généralement déterminées après 14 jours d'incubation à 28°C strictement selon les méthodes utilisées dans

le *Projet International Streptomyces*. Les colorations du mycélium aérien sporulant mature (blanc, gris, rouge, vert, bleu et violet). (Qinyuan *et al.*, 2016).



Figure 6 : Aspect macroscopique d'une souche actinomycète

II.2. Taxonomie

Tous les actinomycètes font partie de l'ordre des actinomycètes, qui est divisé en quatre familles : les *Streptomycetaceae*, les *Actinomycetaceae*, les *Actinoplanaceae* et les *Mycobacteriaceae* (Ranjani *et al.*, 2016).

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au fil du temps avec l'avancée de la biologie moléculaire. Ainsi une taxonomie mise à jour du phylum *Actinobacteria* basée sur les arbres d'ARNr 16S a été rapportée éliminant les rangs taxonomiques des sous classes et sous ordres et les élever ainsi aux rangs des classes et ordres. L'ordre des *Actinomycetales* est désormais limité aux membres de la famille des *Actinomycetaceae*. (Essaid *et al.*, 2015).

II.3. Ecologie et physiologie

Les actinomycètes sont ubiquitaires et retrouvés dans le sol, les milieux aquatiques et dans les environnements extrêmes soit avec un pH acide ou basique, une haute ou basse température. (Ali *et al.*, 2018). Bien que la plupart soient chimioorganohétérotrophes, plusieurs parmi eux utilisent le H_2 atmosphérique comme donneur d'électron lorsqu'ils croissent dans des conditions d'aérobies pauvres en nutriments. (Willey *et al.*, 2018).

La plupart des actinobactéries (*Streptomyces* en particulier) sont des organismes saprophytes vivant dans le sol. Cependant le phylum s'est adapté à un large éventail d'environnement écologique : elles sont présentes dans les sols, les eaux douces et salées et l'aérosol. Les actinobactéries peuvent être trouvées à la surface du sol comme 2m de profondeur de celui-ci. Comme les autres bactéries telluriques, les actinobactéries sont majoritairement mésophiles avec une croissance optimale à des températures entre 25 et 30° C. Cependant elles peuvent thermophiles et se développer à des températures allant de 50 à 60°C. (Essaid *et al.*, 2015). La plupart pousse dans les sols à pH neutre, ils poussent mieux à un pH compris entre 6 et 9, avec une croissance maximale autour de la neutralité. A noter que certaines souches de *Streptomyces* ont été isolées de sols acides (pH 3,5).

II.4. Pouvoir de phytostimulation et de biocontrôle des actinobactéries

Les microorganismes les plus fréquents dans l'écosystème du sol sont principalement des bactéries (actinomycètes), champignons, et algues. Parmi ces derniers, les actinomycètes constituent la partie prépondérante avec un pourcentage de 70% de *Streptomyces*.

Ces microorganismes établissent des interactions avec les plantes en assurant leur protection contre des phytopathogènes et stimuler leur croissance par synthèse de métabolites. Les actinomycètes sont considérés comme d'excellents agents de biocontrôle et prometteur de croissance des plantes.

II.4.1. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPB

Les bactéries favorisant la croissance des plantes (**PGPB**) sont des bactéries ayant la capacité d'améliorer la croissance des plantes et de les protéger contre les maladies et les stress abiotiques au moyen d'une grande variété de mécanisme. (Rocheli *et al.*, 2015).

➤ Mécanismes directs

❖ Fixation de l'azote

L'azote, constituant central de plusieurs structures moléculaires des plantes, inclus dans divers processus du métabolisme est considéré comme un élément primordial pour la croissance de la plante. Particulièrement gazeux, ce caractère le rend inassimilable par la plante qui nécessite alors une conversion biologique. Environ 60% de l'azote atmosphérique est fixé par des bactéries fixatrices d'azote. (Ajar *et al.*, 2020)

Cette fixation renvoi à l'assimilation de l'azote atmosphérique en acide aminés nécessitant l'enzyme nommée la nitrogénase qui réduit l'azote en ammoniac (**Reshma et al. 2017**).

❖ Solubilisation du phosphore

Le phosphore (**P**), macronutriment essentiel pour les plantes, sa quantité dans le sol naturel est inaccessible par les plantes et est principalement fournit comme fumier phosphaté dans le sol. Cependant la majeure quantité du phosphate est directement immobilisé et par ce fait non accessible à la plante due à l'agencement d'un complexe métallique avec l'aluminium (**Al**), le Fer (**Fe**) et le Silice (**Si**). Plusieurs microorganismes du sol effectuent la solubilisation du phosphate et favorisent la croissance de la plante. La solubilisation est la largement répandue chez *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Thermobifida*. (**Reshma et al., 2017**).

❖ Production des sidérophores

Le sidérophore, synthétisé par des bactéries, des champignons et des plantes, est une molécule protéique chélatrice de poids moléculaire (200-2000 Da) qui facilite l'absorption du Fer (**Fe**). (**Wang et al., 2014**). Il est utilisé par les **PGPRs** (*Plant Growth Promoting Rhizobia*) et les actinomycètes comme moyen de biofertilisation et de biocontrôle des phytopathogènes Les actinomycètes fournissent un environnement à la fois protégé et nutritionnel aux plantes. (**Ajar et al, 2020 ; Reshma et al, 2017**).

❖ Production de phytohormones ou régulateurs de croissance

Les phytohormones sont des substances organiques produites lors du métabolisme de la plante. Elles causent à faible dose un effet physiologique important sur la croissance des plantes. Divisées en 5 catégories qui sont : les auxines, les cytokines, l'éthylène, les gibbérellines (**GA**) et l'acide abscissique **ABA** (**Tian-Qiong et al., 2016**). Les actinomycètes produisent l'acide indole 3 acétique qui favorise la croissance des plantes. (**Asma et al., 2017**).

Tableau 2 : Quelques agents de biocontrôle produits par les actinomycètes et leurs rôles ou effets (Saloni *et al.*, 2022)

Agents	Actinomycètes	Rôle ou effets
Eléments antibactériens et antifongiques	<i>Streptomyces</i> sp.	Réduit la croissance de <i>Rhizoactania solani</i> , un champignon pathogène de la tomate
Protéases	<i>Streptomyces</i> sp . souche A6	Contrôle l'antracnose sur les fruits de tomates et inhibe les maladies à <i>fusarium udum</i>
Acide indole acétique	<i>Nocardiosis</i> , <i>Streptomyces atroviens</i> , <i>S. olivaceoviris</i> , <i>S. rochei</i> et <i>S. viridis</i>	Amorce la germination des graines, l'élongation des racines avec la croissance

➤ Mécanismes indirects

Ces mécanismes démontrent la capacité des **PGPRs** à réduire les effets néfastes des pathogènes sur la croissance.

❖ Production d'antibiotique et enzymes lytiques

Elle suggère la production d'enzymes lytiques telles que : chitinases, cellulases, 1,3-glucanases, protéases et lipases. Les phytopathogènes sont détruits par la sécrétion de plusieurs antibiotiques. Les actinomycètes ont la capacité de produire plus d'un antibiotique jouant un effet antagoniste sur les phytopathogènes. (Ajar *et al.*, 2020).

❖ Compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition de biocontrôle est définie comme étant l'habilité des **PGPRs** de rentrer en compétition avec les organismes pathogènes pour se procurer la majorité des nutriments et coloniser les niches appropriées afin de constituer la majeure proportion de la population rhizoshérique. Les **PGPRs** antagonistes ont la faculté de réprimer la croissance de certains agents pathogènes en entrant en compétition pour des nutriments essentiels comme l'azote, le carbone, des macro ou micronutriments. (Ajar *et al.*, 2020).

❖ Résistance systémique induite (RSI)

La résistance systématique consiste à rendre la plante hôte plus résistante aux agressions futures pathogènes. Elle stimule le mécanisme de défense de la plante.

Après interaction des **PGPRs** avec les plantes, un changement morphologique et physiologique survient conduisant à la synthèse de molécules impliquées dans les mécanismes de défenses de la plante. Le lipopolysaccharide bactérien, les sidérophores et l'acide salicylique sont les majeurs déterminants de la **RSI**. (Ajar et al. 2020).

II.4.2. Les actinomycètes agents de production des biopesticides

Par définition, un biopesticide est étymologiquement défini comme étant tout pesticide issu de la biologie, c'est-à-dire des organismes vivants ou des substances d'origines naturelles synthétisées par ces derniers, ainsi que tout produit non chimique qui protège les plantes. (Catherine et al., 2002).

Les actinomycètes possèdent cette particularité de synthétiser des composés bioactifs (antibiotiques, enzymes, modulateurs de croissance des plantes et des biopesticides) qui favorisent la croissance des plantes et la protection contre les phytopathogènes. Plusieurs expériences sont faites afin d'utiliser ces êtres fascinants qui sont les actinomycètes comme biopesticides en vue d'atténuer l'application des engrais et pesticides chimiques nocifs pour la santé et l'environnement. (Shivlata et Satyanarayana, 2017).

Tableau 3 : Liste de quelques biopesticides commercialisés à base d'actinobactéries (Guilherme da et al., 2022)

Nom commercial	Agent actif	Quelques pathogènes cibles	Mécanisme de biocontrôle	Pays Producteur
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i> souche K61	<i>Alternaria spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Pythium spp.</i>	Compétition, hyperparasitisme et antibiose	Canada
Actinovate	<i>Streptomyces lydicus</i> souche WYEC108	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Sclerotinia spp.</i>	Antibiose et hyperparasitisme	Union Européenne
Rhizovit	<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Pythium spp.</i> , <i>R. solani</i> , <i>A. brassicola</i>	Antibiose	Union Européenne

III. Fusarium

Les espèces de *Fusarium* sont bien connues pour être des contaminants communs et des pathogènes des plantes ; elles peuvent aussi causer diverses infections chez l'homme. Elles sont surtout reconnues en tant que productrices de puissants mycotoxines.

III.1. Classification du *Fusarium*

La classification systématique récente est essentiellement basée sur la phylogénie moléculaire (Leslie et Summerell, 2006).

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-Classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Fusarium</i>

III.2. Physiologie du *Fusarium*

Le *Fusarium* se développe de façon optimale sur le milieu PDA, milieu essentiellement à base de pomme de terre. Le pH optimal de croissance est entre 6,0 et 7,0. La température de croissance minimale se pointe entre 7°C et 12°C, elle est optimale entre 21°C et 27,5°C et s'arrête à 37°C. Le glucose et la peptone sont les sources carbonées et azotées les plus facilement assimilables. (Leslie et Summerell, 2006).

III.3. Principales espèces pathogènes (tableau 4)

Les espèces pathogènes du genre *Fusarium* sont nombreuses et sont nuisibles à l'homme, les animaux et aux plantes. L'écologie des phytopathogènes de ce genre est généralement le sol, l'eau, l'air ainsi que les tissus végétaux. Ces phytopathogènes affectent considérablement l'économie du fait qu'ils attaquent un important nombre de plante. L'American Psychological Society (APS) affirme que les espèces de *Fusarium* causent des

maladies à au moins quatre-vingt plante sur cent et qu'une plante cultivée sur cent est économiquement importante. (Perez Vicente *et al.*, 2014).

Tableau 4 : Exemples de principales maladies causées par les espèces de *Fusarium*

Maladies	Agents causals	Références
Fusariose des épis de maïs	<i>F.graminearum</i>	(David Miller & Christopher Young, 1985)
Malformation florale du manguier	<i>F.mangiferae</i>	(Marasas et al., 2006)
Pourriture racinaire de la tomate	<i>F.commune</i> et <i>F.redolens</i>	(Hamini-Kadar et al., 2010)
Dépérissement de la canne à sucre	<i>F.sacchari</i>	(Viswanathan et al., 2011)
Maladie du Panama	<i>F.oxysporum f. sp. cubense</i>	(Zhang et al., 2013)
Bakanae du riz	<i>F.fujikuroi</i>	(Hossain et al., 2016)
Galle verte du cacaotier	<i>F. decemcellulaire</i>	(Perez Vicente et al., 2014)

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologique

I.1. Phytopathogène fongique

Le phytopathogène fongique nous a été fourni par Madame **Haraat Wahiba**, chercheuse à l'institut national de la recherche agroalimentaire en Algérie (**INRAA**) – Unité de recherche Constantine – URC. Ce champignon fut isolé à partir de tomate présentant des symptômes de la fusariose.



Figure 7 : Logo à l'entrée du laboratoire de Recherche

I.2. Réactivation

A travers une série de repiquage dans des conditions de stérilité, la réactivation de la souche fut effectuée par piqure centrale à l'aide d'anse de platine sur milieu **PDA**. Les boîtes sont ensuite mises en incubation dans une étuve réglée à 30°C pour une durée de 5 jours. La pureté de la souche est régulièrement vérifiée. (Figure 7)

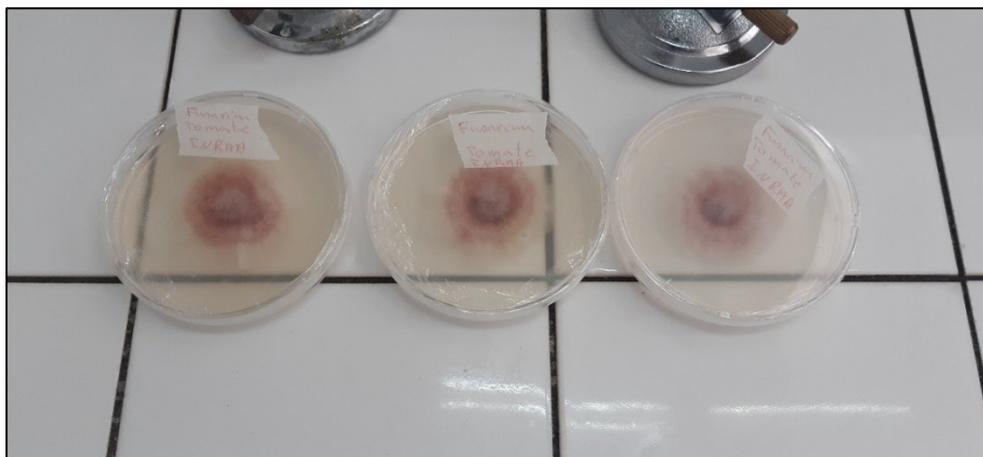


Figure 8 : Souche de *Fusarium* fournit par l'unité de recherche

I.3. Agent antagoniste

Plusieurs souches d'actinobactéries nous ont été généreusement fournies par notre encadrante. Afin d'obtenir des cultures jeunes, nous avons procédé à une série de repiquage par la méthode des stries à l'aide d'anse de platine sur gélose **ISP2**. Les boîtes sont marquées et incubées à 30°C pendant 14 jours

II. Activité antagoniste des actinobactéries vis-à-vis du fusarium

Afin d'évaluer le pouvoir antagoniste de nos souches d'actinobactéries, une confrontation directe sur boîte de Pétri est réalisée selon la technique du trait. (**Wang *et al.*, 2002**).

Cette dernière consiste à mettre en contact (confronter) la bactérie ensemencé en trait et un disque du phytopathogène sur le milieu **PDA**. Les échantillons étant distants l'un par rapport à l'autre d'une distance de 3cm. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 à 5 jours.

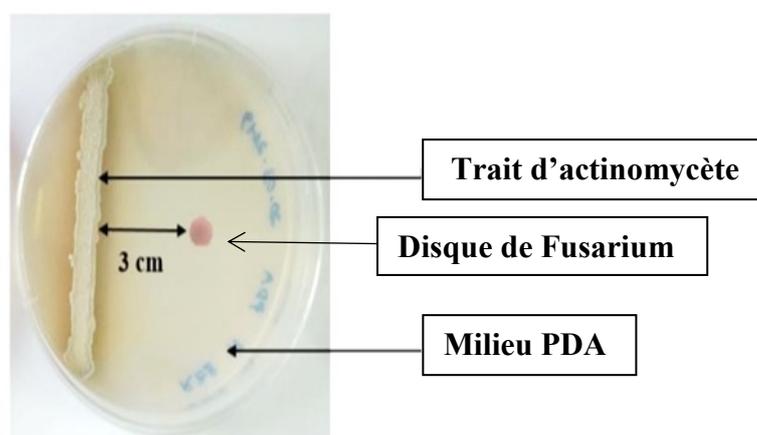


Figure 9 : Confrontation entre l'antagoniste bactérien et le phytopathogène fongique par la technique de trait.

Des boîtes témoins ont aussi été réalisées par un simple ensemencement du disque fongique en l'absence de l'antagoniste. Ces boîtes sont mises en incubation à 30°C pendant 10 jours et observées régulièrement.



Figure 10 : Test témoin ; disque de *fusarium* en absence de l'antagoniste bactérien
Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule de **Wang et al. 2002.**

$$PI\% = \frac{R_{\text{témoin}} - R_{\text{test}}}{R_{\text{témoin}}} \times 100$$

Où : **PI%** est le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique confronté à l'antagoniste ;

Rtémoin est la distance radiale maximale de croissance du champignon

Rtest est la distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

III. Formulation du biopesticide

Les actinobactéries ayant présenté un grand pouvoir antagoniste vis-à-vis du *fusarium* sont sélectionnées pour la formulation de biopesticide.

III.1. Production de la biomasse

Elle débute au préalable par la mise au point d'une préculture de l'échantillon.

A partir d'une culture jeune sur milieu **ISP2** d'une souche d'actinobactérie, une préculture est effectuée en inoculant quelques colonies dans 9ml d'eau peptonée stérile ; puis homogénéisée à l'aide du Vortex pendant un laps de temps.

Après avoir mise au point la préculture, des erlenmeyers de 500ml contenant 200ml du bouillon **ISP2** ont été inoculés avec 2 ml de préculture. Après une incubation continue à 30°C pendant 6 jours sous agitation permanente à 150 tours par minute ; la viabilité des

cellules est évaluée par un comptage de nombre d'unité formant colonie ufc/ml sur gélose **ISP2** après une série de dilution et incubation à 30°C pendant 5 jours. **(Figure 10)**

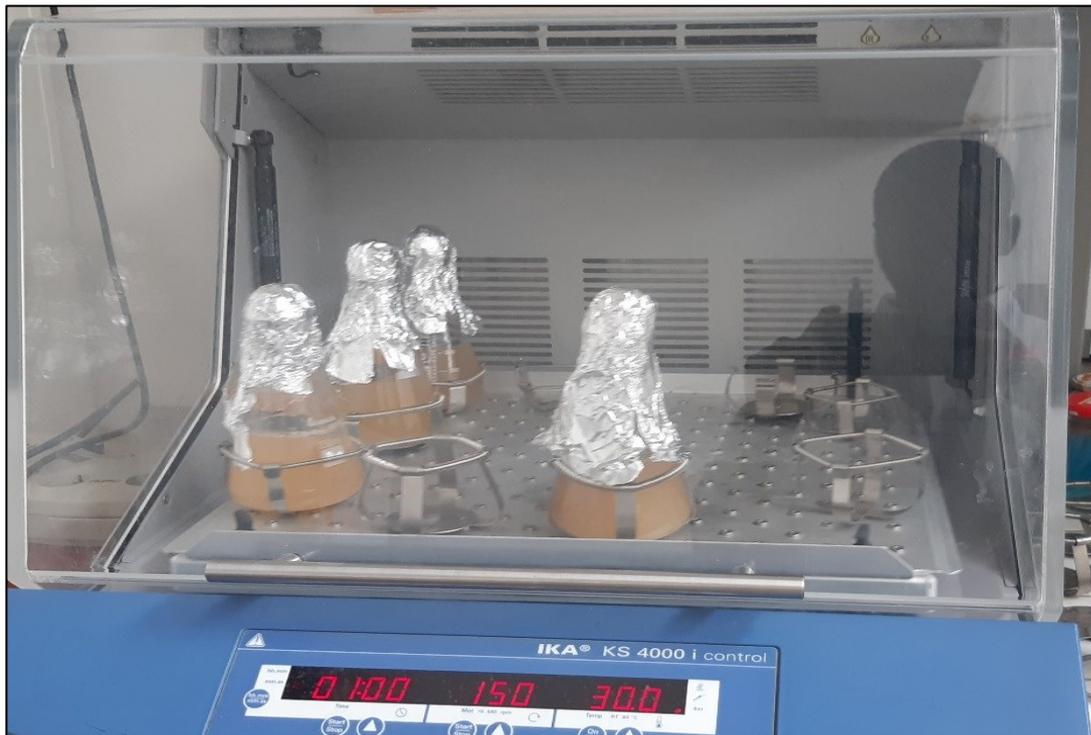


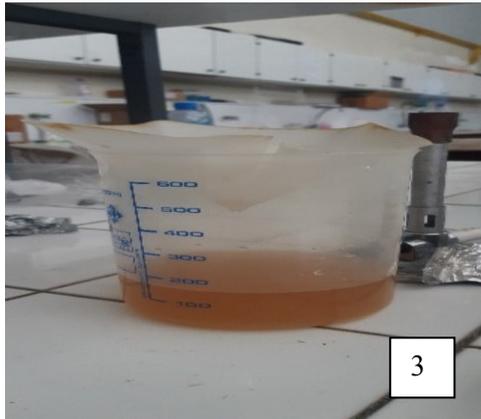
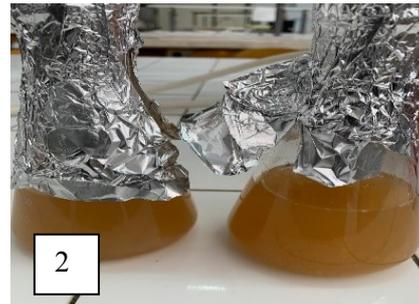
Figure 11 : Production de la biomasse

III.2. Préparation d'additif de formulation : paille de blé + amidon + carbonate de calcium

Elle est réalisée par un broyage de la paille de blé pour ensuite y peser 30g. Ensuite mélanger ces dernières avec 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium. Passer ensuite à l'autoclave pour stériliser **(Vidhyasekaran et Muthamilan., 1995)**.

III.3. Lyophilisation en poudre de la biomasse

Dans cette étape, la biomasse récupérée par filtration est mélangée avec l'additif. Ensuite la préparation est répartit entre plusieurs boîtes de pétri stériles. Les boîtes sont mis dans un congélateur à -20 °C pour une nuit puis lyophilisées dans un lyophilisateur de laboratoire FREEZONE pendant 7 h. **(Sabaratnam et Traquair, 2002)**



1 : Paille broyée en poudre

2 : Biomasse récupérée

3 : Filtration de la biomasse

4 : Lyophilisation

Figure 12 : Etapes de formulation du biopesticide

IV. Vérification de viabilité et pureté de la biomasse

Elle a été réalisée par comptage du nombre d'unités formant colonies (ufc)/g sur la gélose ISP2 après au moyen d'une série de dilutions décimales. Ensuite une incubation à 30°C pendant 5 jours est effectuée.

V. Test d'antagonisme par les produits de la biomasse

Le filtrat obtenu est testé pour son pouvoir antagoniste vis-à-vis de *Fusarium* par la technique des puits, pour cela une pré-culture du champignon est ensemencée sur toute la surface de la

gélose **PDA**. Ensuite un puit est creusé au centre de la gélose pour y verser une quantité du filtrat puis incubé à 30°C pendant 5 jours.

VI. Pré identification des souches actives par la technique des lamelles

Le pré identification par technique des lamelles (**Figure 12**) se fait sur le milieu **ISP2** en enfonçant délicatement à un angle de 45° des lamelles dans la gélose. Ensuite inoculer une quantité de l'échantillon dans l'espace créé entre les lamelles et la gélose. Incuber pendant 5-7 jours à 30°C.



Figure 13 : Technique des lamelles

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Caractères macroscopique et microscopique de l'agent phytopathogène (*Fusarium*)

La série de repiquage effectuée par pique centrale a permis d'obtenir des colonies pures. En culture, la colonie présente un tapis mycélien avec une croissance lente et un aspect cotonneux et volumineux de couleur rose homogène. L'aspect microscopique présente un mycélium septé et incolore. (Figure 13,14)



Figure 14 : Aspect macroscopique du *Fusarium*

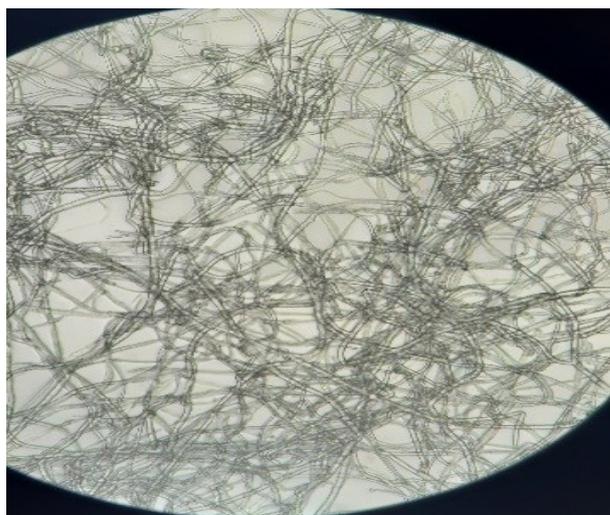


Figure 15 : Observation microscopique du *Fusarium*

II. Agents antagonistes

Après une multitude série de repiquage des souches d'actinobactéries, on a pu avoir des colonies pures afin de pouvoir passer aux prochaines étapes de notre travail. Ces souches purifiées sont différentes les unes par rapport aux autres du point de vue d'aspect macroscopique, microscopique, ainsi que par leur mode de développement (**figure 16**).

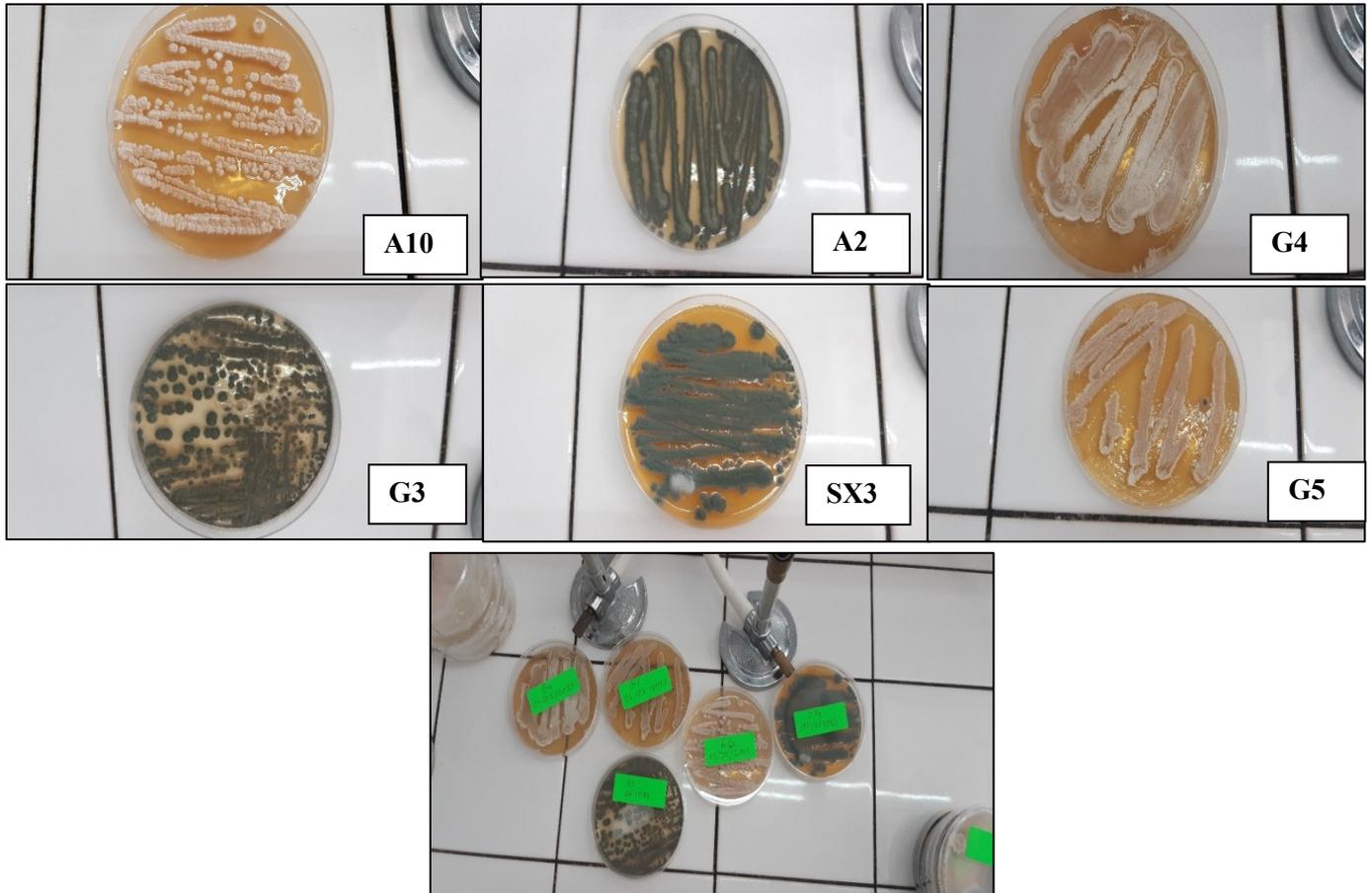


Figure 16 : image de quelques souches pures obtenues

III. Activité antagoniste d'actinobactéries vis-à-vis du fusarium

Le test de confrontation directe réalisée par la technique des traits et par une estimation par calcul du pourcentage d'inhibition (PI%) de l'agent antagoniste vis-à-vis du phytopathogènes fongique, nous permet de faire le tri entre les souches actives et non actives.

Dans notre travail, 8 isolats d'actinobactéries ont été confronté au *Fusarium* (figure 17).

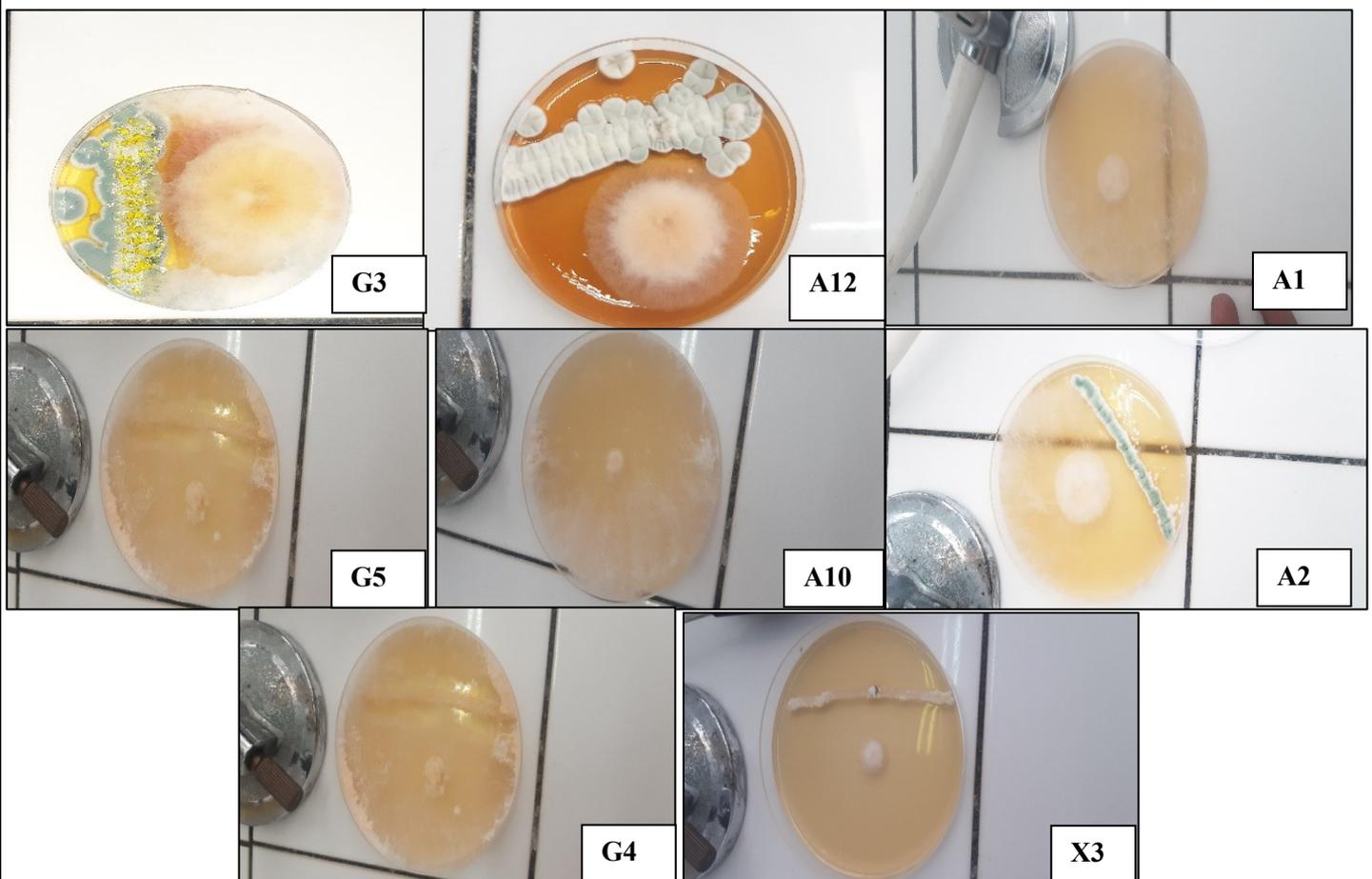


Figure 17 : Résultats du test de confrontation directe

Le calcul du Pourcentage d'inhibition a donné les résultats montrés sur l'histogramme présenté dans la **figure 18**.

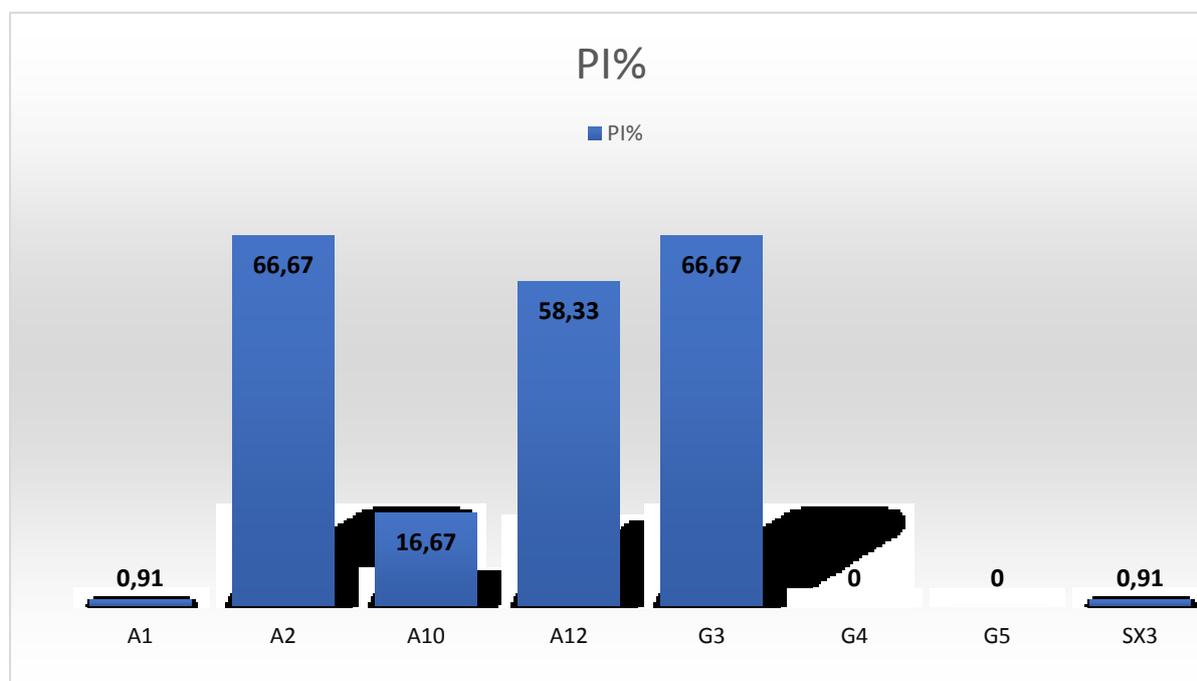


Figure 18 : Diagramme du Pourcentage d'inhibition

Parmi les souches d'actinomycètes confrontées directement à l'agent pathogène (*Fusarium*), plusieurs ont montré un effet antagoniste et d'autres pas.

Comme l'indique le diagramme qui précède, le pourcentage d'inhibition varie selon les souches avec un pourcentage minimum de 0,91% et un maximum de 66,67%.

Les souches **A10** et **A12** ont révélées respectivement 16,67% et 58,33% comme pourcentage d'inhibition. Les souches **G3** et **A2** montrent les pourcentages d'inhibition les plus élevés (66.67%) et les souches **A1** et **SX3** révèlent les plus faibles (0.91%). La plupart des souches testées montre une activité antifongique plus ou moins élevés et par conséquent cela démontre que ces isolats sont de potentiels agents de lutte biologique.

Le potentiel de biocontrôle pourrait être dû à la sécrétion par les souches actinomycètes de substances métaboliques antifongique et phytostimulatrice comme 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).

IV. Formulation du biopesticide

IV.1. Test de viabilité

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 confirmer la pureté de la culture et l'absence de contaminants avoir une idée sur la densité cellulaire utilisée dans le processus de formulation.

Après la production de la biomasse, le test de viabilité et pureté a été effectué (**figure 19**). Les résultats montrent que les souches sont viables avec une quantité importante et surtout pures. De ce constat, ces biomasses sont aptes pour une production pure et efficace et peuvent donc être utilisées dans le protocole de formulation.

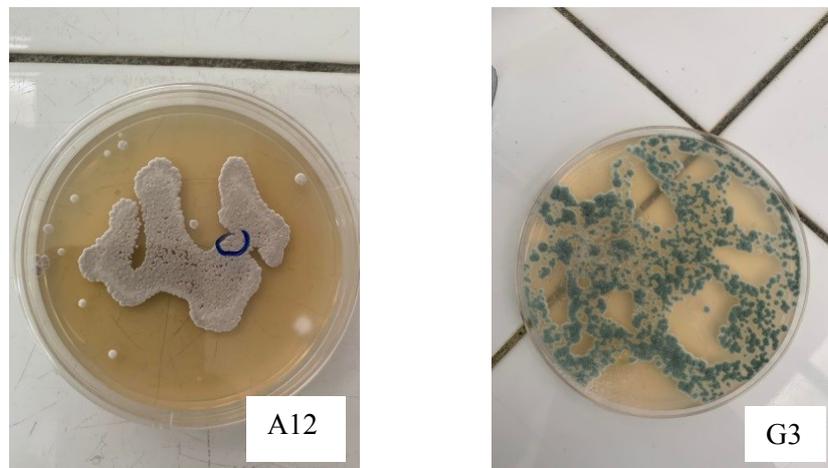


Figure 19 : Test de viabilité après la production de biomasse

IV.2. Lyophilisation de la biomasse et produit final

Les **figure 20** et **21** montrent le produit final lyophilisé puis mélangé avec de la paille broyée, 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (CaCO_3) et emballé des dans des petits flacons.



Figure 20 : Biomasse lyophilisée



Figure 21 : Les produits finaux (prototype)

V. Viabilité des souches après la lyophilisation

Le test a montré une bonne viabilité pour les deux souches après leurs lyophilisations, ce qui prouve l'efficacité de la méthode de formulation utilisée (**Figure 22**).

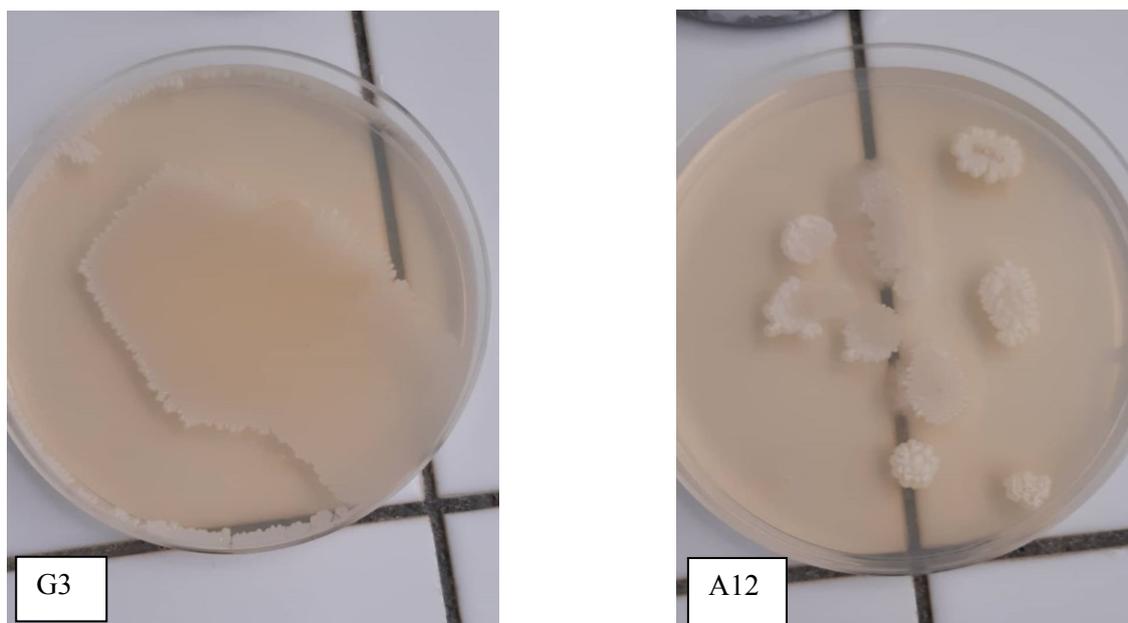


Figure 22 : Test de viabilité des souches après lyophilisation

VI. Test d'antagonisme par les produits de la biomasse

Le test d'antagonisme par le produit de la biomasse (le filtrat) est renseigné sur la **figure 23**.

Ce test confirme la production par les souches d'actinobactéries de substances métaboliques inhibitrices de la croissance fusarienne. Le halo blanc au centre nous montre que les produits de la biomasse sont ainsi capables d'inhiber le développement du champignon.

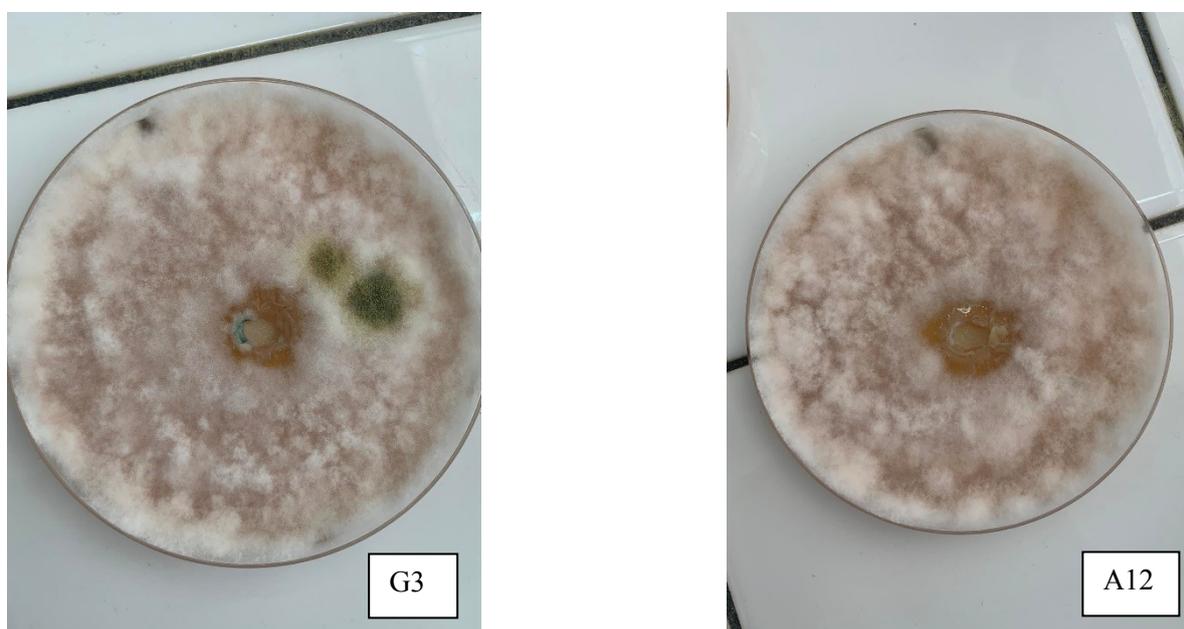


Figure 23 : Test d'antagonisme par le filtrat

VII. Caractéristiques morphologiques et microscopiques des souches sectionnées

Les deux souches actives **A12** et **G3** présentent un aspect poudreux dû à l'abondance des spores, de couleur blanche pour la souche **A12** et verte pour la souche **G3**. L'envers des colonies est jaune à marron pour les deux souches.

L'observation microscopique du mycélium de substrat de la souche **A12** montre des filaments très fins, très ramifiés, et non fragmentés. Le mycélium aérien est très ramifié et porte des spores singuliers qui permet de la rapproché selon *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2004* au genre *Micromonospora*.

La souche **G3** n'a pas pu être identifiée en raison des contaminations lors de la technique des lamelles.

Les espèces de *Micromonospora* sont connues par leur capacité de produire des substances antibactériennes et antifongiques, qui protègent les plantes des phytopathogènes. En effet **Shomura et al. (2003)** ont trouvé que *Micromonospora sp.* SF-1917 produit l'antibiotique dapiramicine, qui inhibe la croissance de *Rhizoctonia Solani* des racines du riz.



Figure 24 : Aspect macroscopique des souches actives



Figure 25 : Aspect microscopique de la souche A12

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

De nos jours, il existe un bon nombre de problèmes écologiques auquel notre planète fait face avec la pollution du sol, l'épuisement des ressources, la disparition massive des espèces végétales et animales, l'épuisement de la biodiversité...etc. Beaucoup de ces problèmes sont causés par une utilisation abusive et incontrôlée des pesticides chimiques qui détériorent la santé humaine, animale, végétale et surtout environnementale. D'un autre côté l'utilisation généralisée et la dépendance aux produits phytosanitaires chimiques a conduit à l'apparition de bio-agresseurs résistants. La mauvaise réponse pour lutter contre ceux-ci est d'augmenter la quantité et la fréquence d'application de ces produits. Il est primordial voir indispensable de faire quelque chose pour y remédier.

Notre travail consiste à produire un pesticide bio, capable d'effectuer le biocontrôle des cultures de tomate et aussi d'autres cultures. Pour atteindre cet objectif, on a utilisé l'activité antagoniste des actinobactéries vis-à-vis du phytopathogène (*Fusarium*) de la tomate. Grâce aux différents tests réalisés, 2 de nos 8 souches d'actinobactéries testées ont montré un antagonisme important contre ce phytopathogène. La biomasse, issue de chacune des 2 souches performantes (**A12** et **G3**), est récupérée par filtration puis lyophilisée pour avoir un aspect poudreux. Après lyophilisation, des tests de viabilité des cellules ont montré de très bons résultats. Il y a eu une bonne poussée des colonies sur le milieu. L'additif utilisé pour notre biopesticide est composé de la paille de blé broyée sous forme de poudre à laquelle 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (CaCO_3) sont ajoutés. Le produit final sera le mélange de la biomasse lyophilisée, paille de blé en poudre, 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (CaCO_3), ce qui permet une bonne conservation de notre produit pour une longue durée de temps.

Plusieurs constats sur la façon de produire le biopesticide qui pourraient être améliorés pour de futures recherches :

1. Elaboration de méthodes de formulation assurant une meilleure viabilité des cellules ;
2. Production de biopesticide avec un plus grand spectre d'action ;
3. Recherches et formulation de biopesticides capables de résister aux changements climatiques et environnementaux ;
4. Les agriculteurs doivent accepter que la mise en place et l'efficacité d'un contrôle biologique doivent être évaluées sur la durée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Ajar Nath, Y., Ali Asghar, R., Neelam, Y., and Divyot, K. (2020). Advances in plant Microbiome and sustainable Agriculture : Diversity and Biotechnological Application, India : Naveen kumar Arora, Environmental Microbiology, School for environmental Science, Babasahed Bhimrao Ambedkar University, Lacknow, Uttar Pradesh, 310p, Springer.

Asma Absar, B., Shamsul, H., and Rouf Ahmad, B. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. Microbial pathogenesis, 111(2017) 458-467.

Benton jones jr, J (1999). Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden. United States of America : CRC Press LLC. 183p –(ISBN 0-8493-2025-9) [en ligne] (page consultée le 01/02/2023) https://agrifs.ir/sites/default/files/Tomato%20Plant%20Culture%20In%20the%20Field%20C%20Greenhouse%20and%20Home%20Garden%20%7BJ.%20Benton%20Jones%20%20Jr.%7D%20%5B9780849320255%5D%20%28CRC%20Press%20-%201998%29_2.pdf

Bergey's Manual of Détermination bacteriology, ninth édition,(2004).

Catherine, R-R., Bernard JR, R., and Charles, V. (2002). Biopesticide d'origine végétale. Paris : Lavoisier. 319p. TEC et DOC.

Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail. Pesticides (2023) [en ligne] (page consultée le 22/06/2023) <https://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/pesticides/general.html>

David Miller, J., and Christopher Young, J. (1985). Deoxynivalenol in an experimental fusarium graminearum infection of wheat. Canadian Journal of Plant Pathology. <https://doi.org/10.1080/07060668509501488>

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.

Essaid Ait, B., Parul, V., Lisa, S., Nahali, G-V., Cedric, J., Hans-peter, K., Christophe, C., Yder, O., and Gilles P.van, W., (2015). Taxonomy, Physiology and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 80: 1-43. Doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.0019-15>

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT (2023)[en ligne] page consultée le 01/02/2023 <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

Garner, W.W, Allard, H.A (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of agricultural research* [en ligne], 18(11), (page consultée le 01/02/2023) <https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43966282/pdf>

Hamini-Kadar, N., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and Steinberg, C. (2010). First report of *Fusarium commune* and *Fusarium redolens* causing crown and root rot on tomato in Algeria. *New Disease Reports*, 22(3), 3. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.003>

Hossain, F, Follet, P., Dang Vu, K., Haruch, M., Salmieri, S., and Lacroix, M. (2016). Evidence for Synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food: *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.006>

https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/34463/JSUNEPPF_Fr.pdf

[https://www.researchgate.net/profile/Martin-](https://www.researchgate.net/profile/Martin-Hilmi/publication/346427083_La_culture_de_la_tomate_production_transformation_et_commercialisation/links/5fc134dba6fdcc6cc6764c59/La-culture-de-la-tomate-production-transformation-et-commercialisation.pdf)

[Hilmi/publication/346427083_La_culture_de_la_tomate_production_transformation_et_commercialisation/links/5fc134dba6fdcc6cc6764c59/La-culture-de-la-tomate-production-transformation-et-commercialisation.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Martin-Hilmi/publication/346427083_La_culture_de_la_tomate_production_transformation_et_commercialisation/links/5fc134dba6fdcc6cc6764c59/La-culture-de-la-tomate-production-transformation-et-commercialisation.pdf)

Leslie, J.F., and Summerell, B.A. (2006). The fusarium Laboratory Manual. In the *Fusarium Laboratory Manual*. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>

Marasas, W.F.O., Ploetz, R.C., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., and Steekamp, E.T. (2006). Mango malformation disease and the associated and the associated fusarium species. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0667>

Naika, S., van Lidt de Jeude, J., de Goffau, M., Hilmi, M., van Dam, B (2005). La culture de la tomate production, transformation et commercialisation. *Agromisa et CTA*, Wageningen [en ligne], 106(5) (page consultée le 01/02/2023)

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.

Pérez Vicente, L.F., Dita, M., and Martinez De la Parte, E. (2014). Technical Manual Prevention and Diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). In food and Agriculture Organization (Vol.4, Issue May).

Qinyuan, L., Xiu, C., Yi, J., and Chenglin, J., (2016). Cultural, Physiological and Biochemical Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Application*. Intech. DOI: <https://doi.org/10.5772/61462>

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.

Saloni, J., Ishita, G., Priyanshu, W., and Shalini, S. (2022). Application of Actinobacteria in Agriculture, Nanotechnology and Bioremediation Actinobacteria – Diversity, Application and Medical Aspects. *IntechOpen*. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.104385>

Shivlata, L., and Satyanarayana, T. (2017). Actinobacteria in Agricultural and Environmental Sustainability. IN: Singh, J., Senevartne, G. (eds) *Agro environmental Sustainability*. Springer. Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49729-2-9>

TAKA VEGETABLE. *Tomato Plant Journal* (2021) [en ligne] (page consultée le 01/02/2023) <https://takavegetable.blogspot.com/2021/06/tomato-plant-journal.html>

Tian-Qiong, S., Hui, P., Si-Yu, Z., Rong-Yu, J., Kun, S., He, H., and Xian-Jun, J. (2016) Production of plant hormones: Oppornities and Challenges. *Bioengineered*, 8(2), 124-128. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1212138>

United Nations Environnement Programme, Effets des pesticides et des engrais sur l'environnement et la santé et solutions envisageables pour les réduire au minimum (2023) [en ligne] (page consultée le 20/06/2023)

Vidyasekaran, P., and Muthamilan, M. (1995). Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease*, 79(8) https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n08_782.PDF

Viswanathan, R., Poongothai, M., and Malathi, P. (2011). Pathogenic and Molecular Confirmation of *fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. *Sugar Tech.* <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0066-4>

Wang, W., Qiu, Z., Tan, H. (2014) Siderophore Production by Actinobacteria. *Biometals*, 27, 623-631. <https://doi.org/10.1007/s10534-10534-014-9739-2>

Willey, JM., Sherwood, LM. Woolverton, CD. (2017). Prescott's Microbiology 10th EDITION. Paris: De Beck. 980p.

Zebbouj, N (2021) Contribution à la lutte biologique vis à vis du *fusarium oxysporum f.sp. radicus-lycopersici* agent de la pourriture racinaire de la tomate Thèse de doctorat : Microbiologie. Oran : Université Oran 1, 104p.

Zhang, H., Mallik, A., and Zeng, R. Sen. (2013). Control of Panama Disease of banana by Rotating and Intercropping With Chinese chive (*Allium Tuberosum* Rottler): Role of Plant Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 243-252. <https://doi.org/10.1007/s10886-0/3-0243-x>

ANNEXES

Annexes

ISP2 (International *Streptomyces* Project 2)

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

PDA(Potato-Dextrose-Agar)

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

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

Gélose SABOURAUD

Peptone	10.00g
Agar	20.00g
Glucose	20.00g
Eau distillé	1000ml
PH	7

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Titre

Formulation d'un biofongicide à partir d'actinobactéries contre *Fusarium sp.* de la tomate « *Lycopersicon esculentum* »

Résumé

Notre travail porté sur la production d'un pesticide bio, qui peut être un produit de biocontrôle et phytostimulation pour les cultures. Le travail consiste à tirer avantage du caractère antagoniste des actinomycètes envers le phytopathogène *Fusarium* ravageur de plusieurs cultures. Le test a été effectué sur une totalité de 8 souches d'actinobactéries, parmi celles-ci 2 souches ont montré un antagonisme élevé et prometteur vis-à-vis du *Fusarium* et les 6 restants ont été assez inefficace. La biomasse, issue de chacune des 2 souches performantes (**A12** et **G3**), est récupérée par filtration puis lyophilisée pour avoir un aspect poudreux. Après lyophilisation, des tests de viabilité des cellules ont montré de très bons résultats. L'additif utilisé pour notre biopesticide est composé de la paille de blé broyée sous forme de poudre à laquelle 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (**CaCO₃**) sont ajoutés. Le produit final sera le mélange de la biomasse lyophilisée, paille de blé en poudre, 10g d'amidon et 1,5g de carbonate de calcium (**CaCO₃**), ce qui permet une bonne conservation de notre produit pour une longue durée de temps. L'étude macroscopique et microscopique de la souche **A12** a permis de la rapprocher au genre *Micromonospora*.

Mot clés : pesticide bio, biocontrôle, *fusarium*, actinobactérie, *Micromonospora*.

Membre du jury :

Encadreur : Zermane Ferial (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président : Boudemagh Alaoueddine (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Harrat Wahiba (MRB - INRAA).

Incubateur : Bellil Iness (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Cati : Bethina Soumeya (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Partenaire Socio-économique : Benlatreche Salim (Catalyse Lab)

Présentée par : TRAORE Lassina
TRAORE Adama

Année universitaire : 2022 -2023

Business Model Canevas

Partenaires clés	Activités Clés	Propositions de valeur	Relation Client	Clients
Incubateur Agences de Marketing	Production	Nous proposons : Biopesticide antifongique et phytostimulant Bioremédiation du sol	Téléphone et emails Réseaux sociaux Evènements (salon de l'industrie) Influenceurs	Agriculteurs Jardiniers Commerçants
	Ressources clés		Canaux de distribution	
	Employés (Ressources humaines) Machines et Appareils (Ressources matériels) Véhicules (Ressources matériels)		Agence ; Online (en ligne) ; Boutique (Point de Vente) ; Shop non permanent	
Coûts ou Structures des Coûts			Revenus	
Salaires et Cotisation salariales Achat et entretien de Matériels Achat et aménagement du local Dépenses administratives classiques (Budget de Fonctionnement)			Vente de Produits Publicités Formations	

Business Model Canevas

1^{er} axe : Présentation du Projet

1. L'idée du projet :

L'idée de ce projet a surgit après diverses recherches effectuées sur les pesticides chimiques, notamment sur leurs effets gravement néfastes sur notre santé et notre environnement. Ces pesticides synthétiques sont classés comme la 2eme cause de mortalité chez les enfants de plus d'1 an et qu'environ un enfant sur 500 est atteint de cancer avant l'âge de 15 ans.

C'est pour cela, qu'on a envisagé de produire un pesticide BIO à partir d'actinomycètes qui sera sans effets néfastes sur notre santé et. La production se fait éventuellement avec les dernières technologies du domaine.

2. Valeur proposées :

Il s'agit d'un biopesticide, à base d'actinobactéries sans effets néfaste sur l'environnement à prix moindre par rapport aux pesticides chimiques

3. Equipe de travail :

Notre équipe est constitué de :

Traoré Lassina : compétence dans la biotechnologie microbienne, du commerce et du contrôle qualité. Microbiologiste et a des connaissances dans le domaine de l'entrepreneariat ainsi que des softs Skills dans l'entreprise.

Traoré Adama : microbiologiste

Zermane Férial : Maitre assistante «A » UMC1, Magistère en biotechnologie microbienne.

4. Objectifs du projet :

Comme il est stipulé que l'entrepreneariat, c'est de faire de l'argent, donc notre but est de devenir le leader en production et commercialisation de biopesticide dans tout le continent et cela dans la plus brève période. Se procurer les 40% de la part du marché de pesticide en Afrique.

5. Calendrier de réalisation du projet :

			Mois						
			1	2	3	4	5	6	7
1		Études préalables : choix de l'implantation de l'unité de production, préparation des documents nécessaires	✓						
2		Commande des équipements	✓	✓					
3		Construction d'un siège de production (usine)		✓	✓	✓			
...		Installation des équipements			✓	✓	✓		
n		Achat de matières premières						✓	
...		Réalisation du prototype							✓

Une année nous suffira pour la réalisation du projet

2eme axe : Aspect innovants

1. Nature des innovations :

- ✓ Innovation dans le marché
- ✓ Innovation technologique

2. Domaine d'innovation :

- Produit à double activité, Pesticide et dépollueur
- Cibler les consommateurs passionnés des produits non traités avec les pesticides synthétiques.

3eme axe : Analyse stratégique du marché

1. Segment de marché :

Marché potentiel : ce sont les agriculteurs, jardiniers, les commerçants, établissements agroalimentaires. Ils seront motivés à l'acheter car c'est un produit Bio.

Marché Cible : on cible les individus consommateurs du naturel sans effets néfastes afin de préserver leur santé. Par exemple les sportifs, les nutritionnistes, les individus allergiques aux pesticides chimiques.

Ce segment a été ciblé à cause de leur désir et intérêt de s'intéresser à tout ce qui est traité par du BIO.

2. Mesure de l'intensité de la concurrence :

Les concurrents sont les entreprises de production pesticides synthétiques telles que Simonis B.V

Atouts : Ils sévissent depuis longtemps sur le marché

Faiblesse : leurs produits ne sont pas naturels et le prix est plus cher par rapport à la nôtre.

3. Stratégie du Marketing :

Afin de mettre sur le marché notre produit, nous proposons des coûts vraiment abordables aux consommateurs en utilisant une matière première naturelle et surtout ubiquitaire. Ainsi qu'avec l'utilisation de technologies sophistiquées. Favoriser également les ventes en lignes et les foires et salons de publicité. Enfin être toujours aux abords de nos clients pour les moindres réclamations et suggestions.

4eme axe : Plan de production et d'organisation

1. Etapes de Production :

- a) ISOLEMENT
- b) MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE BIOPESTICIDE
- c) PRODUCTION DE LA BIOMASSE
- d) LYOPHYLISATION
- e) EMBALLAGE

2. Approvisionnement :

Nous nous approvisionnons chez les propriétaires de champs, cela permet de aussi d'accéder à un avantage dans la course au 1^{er} rang du marché.

3. Main d'œuvre :

Ce projet qui est le nôtre engendre 30 emplois directs et 70 indirects. Le projet ne nécessite pas de spécialisation spécifique, sauf pour les ingénieurs et techniciens. (3 ingénieurs et 7 techniciens).

4. Partenaires :

Nos partenaires sont essentiellement les agences de marketing, les fournisseurs ainsi les incubateurs des universités.