

UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

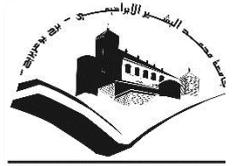
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريزيج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahim - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences biologiques



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé

**Activité antifongique d'une souche d'actinobactéries
(*Streptomyces* sp. BS05) vis-à-vis d'agents phytopathogènes
isolés à partir de graines de blé dur de quelques régions de la
wilaya de Bordj Bou Arreridj**

Présenté par : OUIDIR Kenza
CHIHAB Rima

Soutenu le : 12 / 07 / 2021

Devant le jury :

Président :	M ^{me} ABED Hanane	MCB	Univ. Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	M ^{me} SOUAGUI Yasmina	MCB	Univ. Bordj Bou Arreridj
Examineur :	M ^r SADRATI Nouari	MCB	Univ. Bordj Bou Arreridj

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Avant toute chose,

Nous remercions « ALLAH » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Le thème a été proposé par Dr. SOUAGUI Y. Maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie Université de Bordj Bou Arreridj. Sous sa direction le travail a été réalisé dans le laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences technologiques, Université de Bordj Bou Arreridj.

Nous tenons à lui exprimer nos profondes gratitude pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité sans limite, qui ont contribué à notre formation et qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Merci aux membres du jury :

- Madame ABED pour avoir accepté de présider ce jury
- Monsieur SADRATI pour avoir accepté d'examiner le document

Nos sincères remerciements vont aux dames :

- GAHFIF Wahiba
- DEHAMNA Wassima
- SAIDANI Amel

Pour leurs aides dans la réalisation pratique de ce travail.

Nous n'oublions pas de remercier tous ceux qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce travail.

MERCI à tous.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

À mon très cher père « **Noureddine** »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et du respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À ma très chère mère « **Djamila** »

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

À mes chers frères « **Ishak, Ouness, Redouane** »

Mes anges, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À mes vrais amies « **Samia, Nadjjet, Laila** »

À tout la famille **OUIDIR** et **TAMIMOUNT**

KENZA

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail a

À mes chers parents : « **Djamel et Djamil**a » en particulière

Je dédie ce mémoire à ma mère. Qui m'encouragé à aller de l'avant et qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études. et à mon père pour son confiance, soutien, sacrifices, et toutes les valeurs qu'il a sues m'inculquer.

À mes chers frères « **Fayez et Khalil** »

Pour leur soutien moralement, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À mes chères sœurs « **Khawla et Fayrouz** »

Pour leurs tendresse, complicités et leur présence.

À tout la famille « **CHIHAB et BOUGUERRA** »

A tous mes ami(e)s

RIMA

Sommaire

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les graines de blé3

2. Les champignons phytopathogènes et la lutte biologique3

3. Les actinobactéries et la lutte biologique6

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Durée et lieu du travail7

2. Matériel biologique7

2.1. La souche d'actinobactéries7

2.2 Les graines de blé dure7

2.3 Isolement des champignons phytopathogènes à partir des graines du blé9

2.4 Repiquage et purification des isolats fongiques10

2.5 Identification des souches fongiques10

2.5.1 Identification macroscopique10

2.5.2 Identification microscopique10

3. Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche d'actinobactérie vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolés11

4. Production et extraction des molécules bioactives11

4.1. Production des antifongiques sur milieu liquide11

4.2. Extraction des molécules antifongiques12

4.3. Mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut13

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Isolement des souches fongiques14

2. Identification morphologique des isolats fongiques14

2.1. Les isolats de la variété GTA₂14

2.2. Les isolats de la variété P1BB₁₇15

2.3. Les isolats de la variété BN₃16

2.4. Les isolats de la variété BW ₁₃	16
2.5. Les isolats de la variété BT ₆	17
2.6. Les isolats de la variété BT ₇	17
2.7. Les isolats de la variété BT ₈	18
2.8. Les isolats de la variété BT ₉	18
2.9. Les isolats de la variété BT ₁₀	19
3. Activité antifongique de la souche BS05	20
3.1. Technique des cylindres d'agar.....	20
3.2. Technique des puits	22
Conclusion générale.....	24
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures

Figure 01 : Histologie des graines de blé (Surget et Barron., 2005).

Figure 02 : Protocole d'isolement des champignons phytopathogènes des graines de blé

Figure 03 : purification des isolats (photographie originale)

Figure 04 : Observation macro et microscopique des isolats de champignons (Photographie originale)

Figure 05 : Précultures et cultures de la souche SB05 sur milieu liquide (Photographie originale)

Figure 06 : Séparation des deux phases et récupération de la phase organique (photographie originale)

Figure 07 : Concentration de la phase organique par Rotavapor (photographie originale)

Figure 09 : Aspect macro et microscopique ($G \times 10$) de l'isolat GTA_2 isolée à partir des grains de blé de la variété GTA.

Figure 10 : Aspect macro et microscopique ($G \times 40$) de l'isolat $P1BB_{17}$ isolée à partir des grains de blé de la variété P1BB.

Figure 11 : Aspect macro et microscopique ($G \times 40$) de l'isolat BN_3 isolée à partir des grains de blé de la variété BN.

Figure 12 : Aspect macro et microscopique ($G \times 10$) de l'isolat BW_{13} isolée à partir des grains de blé de la variété BW.

Figure 13 : Aspect macro et microscopique ($G \times 40$) de l'isolat BT_6 isolée à partir des grains de blé de la variété BT.

Figure 14 : Aspect macro et microscopique ($G \times 40$) de l'isolat BT_7 isolée à partir des grains de blé de la variété BT.

Figure 15 : Aspect macro et microscopique ($G \times 10$) de l'isolat BT_8 isolée à partir des grains de blé de la variété BT.

Figure 16 : Aspect macro et microscopique ($G \times 40$) de l'isolat BT_9 isolée à partir des grains de blé de la variété BT.

Figure 17 : Aspect macro et microscopique ($G \times 10$) de l'isolat BT_{10} isolée à partir des grains de blé de la variété BT.

Figure 18 : Résultats de mise en évidence de l'activité antifongique vis-à-vis de l'isolat GTA_2

Figure 19 : Résultats de mise en évidence de l'activité antifongique vis-à-vis de l'isolat BT_7 et BN_3

Figure 20 : Résultats de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des puits

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les principales maladies cryptogamiques de blé (**Page 04**).

Tableau 02 : Les différentes variétés de graines de blé dur (**Page 07**).

Tableau 03 : les souches fongiques isolées à partir des graines de blé dur (**Page 14**).

Tableau 04 : Résultats de l'activité antifongique d'actinobactéries (méthode des cylindres d'agar)
(**Page 21**).

Tableau 05 : Résultats du test d'activité antifongique par méthode de diffusion dans des puits d'agar
(**Page 22**)

Liste des abréviations

FAO: Food and Agriculture Organisation.

SAB : Milieu de culture sabouraud (solide).

M2 : Milieu de culture williams modifié (liquide).

Rpm : Rotation par minute.

RESUME

Résumé

La présente étude porte sur la recherche de molécules bioactives vis-à-vis de champignons phytopathogènes isolés à partir de graines de blé dur de quelques régions de la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

Après l'identification macro et micro-morphologique de neuf isolats de champignons, une mise en évidence de l'activité antifongique d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces* (BS05) a été effectuée par la technique des cylindres d'agar. L'extraction liquide/liquide, en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, des molécules bioactives a été réalisée après culture de la souche BS05 sur milieu liquide et la mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut vis-à-vis des germes fongiques les plus sensibles a été réalisée par la technique des puits.

Par le test des cylindres d'agar, la souche BS05 a montré une activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp, avec des zones d'inhibition de 46 mm, 20mm, 30mm, 20mm, 34mm, 6mm, 16mm, respectivement. Quant à la mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut, ce dernier a montré une zone d'inhibition de 14 mm vis-à-vis de *Cladosporium* sp.

A l'issue de cette étude, la souche d'actinobactéries *Streptomyces* BS05 montre une activité antifongique intéressante vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolés à partir des graines de blé. Une activité moins intéressante de l'extrait brut, ce qui suggère de tester d'autres solvants d'extraction pour la récupération des molécules bioactives.

Mots clé : activité antifongique ; champignons phytopathogènes ; molécules bioactives ; actinobactéries ; *Streptomyces*

Abstract

The present study concerns the search for bioactive molecules against phytopathogenic fungi isolated from durum wheat seeds from some regions of Bordj Bou Arreridj.

After the macro and micro-morphological identification of nine strains of fungi isolated from wheat seeds, the antifungal activity from a strain of actinobacteria *Streptomyces* (SB05) against these fungi strains was carried out by the agar cylinders test. The liquid/liquid extraction of bioactive molecules using ethyl acetate solvent was released for the liquid culture from the BS05 actinobacteria strain, and the antifungal activity was demonstrated by diffusion well technic.

The results of antifungal activity using the agar cylinders test showed inhibition zones against *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp., with 46 mm, 20mm, 30mm, 20mm, 34mm, 6mm, 16mm, diameters respectively. And the crude extract showed antifungal activity against *Cladosporium* sp. with 14 mm of diameter.

The actinobacteria BS05 strain, showed interesting antifungal activities against the phytopathogenic fungi strains isolated from durum wheat seeds. However, it will be interesting to test other extraction solvent for better extraction of antifungal bioactive molecules.

Keywords: Antifungal activity; phytopathogenic fungi, bioactive molecules, actinobacteria *Streptomyces*

ملخص

تتعلق الدراسة الحالية بالبحث عن الجزيئات النشطة بيولوجيا ضد الفطريات الممرضة للنبات المعزولة من بذور القمح الصلب من بعض مناطق برج بو عريريج.

بعد التحديد المورفولوجي الكلي والجزئي لتسع سلالات من الفطريات المعزولة من بذور القمح، تم إجراء عدة تجارب توضيحية للنشاط المضاد للفطريات من سلالة البكتيريا الشعاعية *Streptomyces* (SB05) بواسطة تقنية اسطوانات أجار. ثم إجراء الاستخلاص سائل / سائل، باستخدام أسيتات الإيثيل كمذيب استخلاص للجزيئات النشطة بيولوجيًا، بعد زراعة السلالة SB05 في وسط سائل وتبيين النشاط المضاد للفطريات في المستخلص. ثم استخدام تقنية الحفر الأسطوانية على الجراثيم.

من خلال اختبار أسطوانة أجار، أظهرت سلالة BS05 نشاطًا مضادًا للفطريات *Penicillium sp* ، *Fusarium sp*

مع مناطق تثبيط 46 ملم، 20 ملم، 30 ملم، 20 ملم، 34 ملم، 6 ملم، 16 ملم، على التوالي. بالنسبة لإثبات النشاط المضاد للفطريات من

المستخلص الخام، أظهر الأخير منطقة 14 ملم مقابل *Cladosporium sp*.

في نهاية هذه الدراسة، أظهرت سلالة البكتيريا الشعاعية BS05 نشاطًا فعالاً ضد الفطريات الممرضة للنبات المعزولة من بذور القمح. ونشاط أقل فعالية للمستخلص الخام، والذي يقترح اختبار مذيبيات الاستخلاص الأخرى لاستعادة الجزيئات النشطة بيولوجيًا.

الكلمات المفتاحية: الجزيئات النشطة بيولوجيا، الفطريات الممرضة للنبات، البكتيريا الشعاعية، *Streptomyces*

INTRODUCTION

Introduction

Tout au long de leur cycle de vie, les plantes et les agents pathogènes interagissent avec une grande variété d'organismes, ces interactions peuvent affecter la santé des plantes d'une manière positive ou négative (Corbaz ,1990 ; Nakkeeran et *al.*,2005). Les maladies des plantes sont causées par l'action d'agents pathogènes (champignons, bactéries, virus, phytoplasmes, protozoaires etc.....). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine (Lepoivre ,2003).

Les champignons phytopathogènes provoquent des maladies cryptogamiques et sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (Lepoivre ;2003). D'après la F.A.O, ils réduisent de 12 à 14 % la production agricole mondiale, 70 % des dommages étant d'origine fongique (Aouar, 2012).

La lutte contre les maladies phytopathogènes et l'application illimitée des pesticides dans les sols peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines et l'apparition de souches pathogènes résistantes ; en outre ; les fongicides chimiques sont responsables de divers problèmes sur la santé des humains et des animaux (Ger hardson ,2002).

En générale, plusieurs définitions de la lutte biologique ont été proposées mais aucune n'est adoptée par tous les acteurs concernés. La lutte biologique est définie comme « l'utilisation d'organismes vivants, ou de produits de leurs gènes, pour limiter ou supprimer les activités et les populations de pathogènes » (Fravel, 2005 ; Paulitz et Bélanger, 2001).

En fait, elle peut se faire par utilisation de microorganismes entomopathogènes ou pathogènes de mauvaises herbes ou encore antagonistes d'autres organismes phytopathogènes. Ces microorganismes jouent un rôle important dans la protection de la plante (Benizri et al., 2001).

Les actinobactéries sont bien connus pour leurs capacités métaboliques, ils semblent être de bons candidats comme agents de lutte biologique (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b). Les actinobactéries sont des bactéries de Gram positif, la plupart sont saprophytes (Khamna et al.,2009), ils constituent une proportion importante de la microflore tellurique (10^4 - 10^6 UFC/ml) (Shrivastava et al., 2008) et (10^7 - 10^8 UFC/ml) (Hoorman et Islam, 2010). Ils synthétisent de nombreuses substances antifongiques, celles-ci montrent un rôle antagoniste élevé. Le genre *Streptomyces* est à l'origine de 75% des antifongiques produits, il est considéré en réalité l'une des sources majeures des produits naturels bioactifs (Pridham et al., 1956 ; Stevenson, 1956 ; Subrabani et Albersbreg, 2012).

INTRODUCTION

L'application des agents de lutte biologique sur les cultures présente plusieurs avantages, les plus importants sont l'absence d'effets secondaires nocifs (absence de résidus chimiques, de pollution chimique) et de danger pour l'environnement ou sur les cultures, car les biopesticides sont spécifiques à l'espèce-cible (Meyer, 2002).

Afin d'atteindre notre objectif, la démarche expérimentale consiste à :

-Isoler des moisissures phytopathogènes à partir de différentes variétés de blé dur de cinq régions de la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

-Purification et identification des souches isolées.

-Mise en évidence du pouvoir antifongique d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces* sp. BS05 vis-à-vis de ces isolats phytopathogènes.

-Extraction des molécules antifongiques et essai de semi-purification.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les graines de blé

Les graines de blé sont des fruits ; appelés caryopse ; ces dernières sont de forme ovoïde ; possédant sur l'un de leur face une cavité longitudinale « le sillon » et à l'extrémité opposée de l'embryon des touffes de poils « la brosse » (Beaugrand, 2004 ; Godon et William, 1991). Elles possèdent toutes des grains qui sont constitués successivement de l'extérieure vers l'intérieur (Canadas, 2006 ; Mc BEAN et MCLEOD, 2007) des enveloppes de la graine et du fruit donnant le son en semoulerie, elles sont d'épaisseurs variables et sont formées de six tissus différents : épiderme du nucelle, tégument séminale ou testa (enveloppe la graine) cellules tubulaires, cellules croisées, mésocarpe (Godon et willm, 1991 ; Feillet, 2000). L'albumen du grain principalement amylicé et vitreux, possède à sa périphérie une couche a aleurone (Kent,1975 ; Feillet, 2000). Le germe composé d'un embryon, lui-même formé des coléoptiles, de la gemmule, de la radicule, du coleorhise, se la coiffe et du scutellum (Feillet, 2000 ; Jeantet *et al.*, 2007).

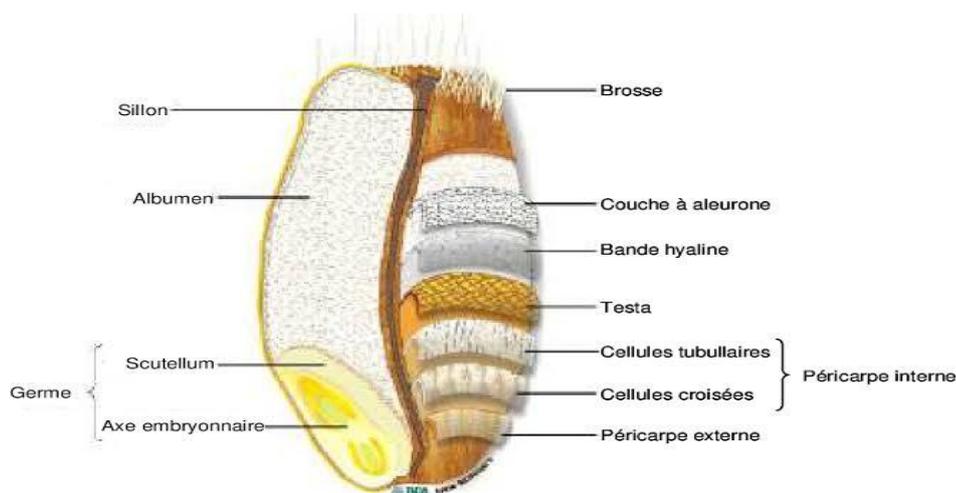


Figure 01 : Histologie des graines de blé (Surget et Barron, 2005).

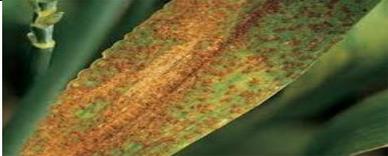
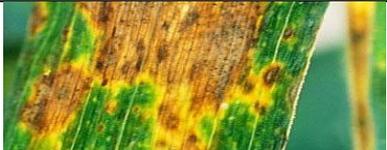
2. Les champignons phytopathogènes et la lutte biologique

Les champignons du sol peuvent être des champignons microscopiques et macroscopiques, souvent regroupés sous le nom de moisissures (*Penicillium* ; *Aspergillus*, *Fusarium* ; *Trichoderma* ; *Mucor* ; etc.). Ils sont hétérotrophes et leur nombre varie de 10^5 à 10^6 cellules /g de sol (Maier *et al.*, 2000).

Les cultures de blé sont soumises chaque année à une pression parasitaire importante et complexe, résultant d'un cortège parasitaire complexe (bactéries, champignons, virus) et des ravageurs (limaces, pucerons, insectes) capables d'attaquer toutes les parties de la plante à

tous les stades de son développement. Les plus dommageables, sont les maladies d'origine fongique, dont les principales sont classé dans le tableau 01.

Tableau 01 : Les principales maladies cryptogamiques de blé.

Nom de la maladie / Agent causale	Organe touché	Description de la maladie	Image
Charbonneuss caries (<i>Tilletia caries</i>)	Grain	Grain vert olive , rempli de spores noires à odeur de poisson pourri	 (Zillinsky., 1983)
Charbon foliaire (<i>Urocystis agropyri</i>)	Feuilles	Stries longitudinales le long des feuilles qui se tordent et s'enroulent. Des masses sporifères noirâtres apparaissent au niveau des stries entre les veines de la feuille.	 (Bouakaz et Oussaid., 2013)
Charbon nu (<i>Ustilago tritici</i>)	L'épi	Les fleurs sont remplacées par une masse de spores noires. Le mycélium pénètre a la floraison et se conserve a l'intérieure des téguments du grain	 (Zillinsky., 1983)
Les fusarioses (<i>Fusarium roseum</i>)	Epis	Dessèchement précoce Echaudage Les grains contaminés sont toxiques	 (Lauzon et al., 2007)
Les rouilles (<i>Puccinia tricina</i>)	Feuilles (face supérieure)	Pustules brunes, dispersées	 (Zillinsky., 1983)
Les septarioses (<i>Septoria tritici</i>)	Feuilles Rarement les épis	Taches provoquant un dessèchement des feuilles	 (Zillinsky., 1983)

Helminthosporiose (<i>Helminthosporium</i>)	Feuilles	Taches chlorotiques et nécrotiques sur les limbes des feuilles jeunes ou adultes, losangiques ;bordées par des zones chlorotiques	 <p>(Zillinsky., 1983)</p>
Oïdium (<i>Erysiphe graminis</i>)	Graines Feuilles Glumes	Feutrage blanc sale	 <p>(INRA., 2014)</p>
Jaunisse nanisant (<i>Rhopalosiphum pad</i>)	Feuilles Tiges	Jaunissement et rougissement Au début de la montaison ; on observe un mânisme plus ou moins important. Développement racinaires très ralenti. Dégât grave	 <p>(Dehimat et al., 2001)</p>
Les pourritures racinaires (<i>Fusarium culmorum</i>)	Racines Collet	Dessèchement des jeunes plantes Taches nécrotiques ou noirâtre sur le collet, et les racines	 <p>(Zillinsky., 1983)</p>

La lutte biologique est une méthode qui consiste à utiliser les capacités biologique d'un organisme vivant en vue de limiter, arrêter ou bien inhiber le développement d'un autre organisme vivant sans avoir recours aux pesticides. Plusieurs être vivant, bactéries et champignons, ont fait l'objet d'étude ou ont été utilisées dans des applications de lutte biologiques. En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999) que l'utilisation des fongicides chimiques. La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme (Cook, 1993 ; Benbrook et *al.*, 1996). La lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990 ; Toussaint, 1996).

3. Les actinobactéries et la lutte biologique

Les actinobactéries sont des bactéries saprophytes capables de dégrader la matière organique dans le sol et d'utiliser des molécules plus complexes pour leur croissance (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Ceci leur permet de s'adapter et de coloniser différents milieux rhizosphériques. Cette caractéristique est essentielle dans la lutte biologique. Ainsi, les actinobactéries peuvent agir par différents mécanismes d'action comme l'antibiose, la compétition nutritionnelle ou spatiale ou encore le parasitisme (Errakhi, 2008). Enfin, les actinobactéries possèdent un nombre élevé d'enzymes hydrolytique. Une telle pléthore d'enzymes ; d'antibiotiques et de métabolites secondaires en font de redoutables concurrents dans les milieux naturels ainsi que des organismes très attractifs à des fins biotechnologiques (Bubici, 2018). Les actinobactéries ont révélé leur large activité antifongique, ils sont utilisés pour protéger plusieurs plantes contre divers pathogènes fongiques. Ils sont utilisés en tant qu'agent de lutte biologique produisent des urauchimycines qui font partie de la classe des antimycines, un ensemble d'antifongiques bien identifiés, qui agissent en inhibant le flux d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale d'un champignon phytopathogène (Gomes et al., 2018). La plupart des études ont utilisé des streptomycètes comme agents potentiels de lutte biologique contre les champignons pathogènes (Berg et al., 2000 ; Xiao et al., 2002).

Des biofongicides tels que MYCOSTOP® sont produits par des actinobactéries pour lutter contre les agents phytopathogènes (*Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora* et *Pythium*) qui provoquent la fonte des semis et des maladies des racines (Gomes et al., 2018).

Chapitre 2 : matériel et méthodes

1. Durée et lieu du travail

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers de l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi (BBA). Notre étude s'est étalée sur une période allant du 13/04/2021 au 17/06/2021.

2. Matériel biologique

2.1. La souche d'actinobactéries

La souche utilisée dans notre étude appartient au genre *Streptomyces* sous la dénomination **BS05**, elle a été isolée et identifiée par notre encadrante Dr. SOUAGUI Y. à partir d'un échantillon de sol d'une région aride du sud algérien, Boussaâda (35°10'N ; 49E).

2.2. Les graines de blé dur

Sur le tableau 02, sont indiquées les cinq variétés de graines de blé dur de la région de Bordj Bou Arreridj qui ont été utilisées dans la présente étude pour l'isolement des champignons phytopathogènes.

Tableau 02 : Les différentes variétés de graines de blé dur utilisées

Code de la graine	La région (provenance)	La variété	Image
BW	Bir kasdali BBA	Waha R3	

<p>P1BB</p>	<p>Tixter Ain tasser</p>	<p>Mohammes ben bachir</p>	
<p>BT (Traitées aux antifongiques)</p>	<p>Bordj bou arreridj</p>	<p>Bousselam</p>	
<p>GTA</p>	<p>Sidi Mbarek</p>	<p>GTA</p>	
<p>BN</p>	<p>Ras el oued</p>	<p>Bousselam</p>	

2.3. Isolement des champignons phytopathogènes à partir des graines de blé

Le but de l'étude mycologique des graines de blé est d'évaluer les types de champignons pathogènes présents dans les différentes variétés. Pour cela, l'isolement de la flore fongique et l'identification macroscopique et microscopique des isolats doivent être représentatifs, en respectant l'enchaînement des étapes et le conditionnement du matériel.

Ci-dessous, un schéma des étapes de l'isolement des souches fongiques à partir des graines de blé.

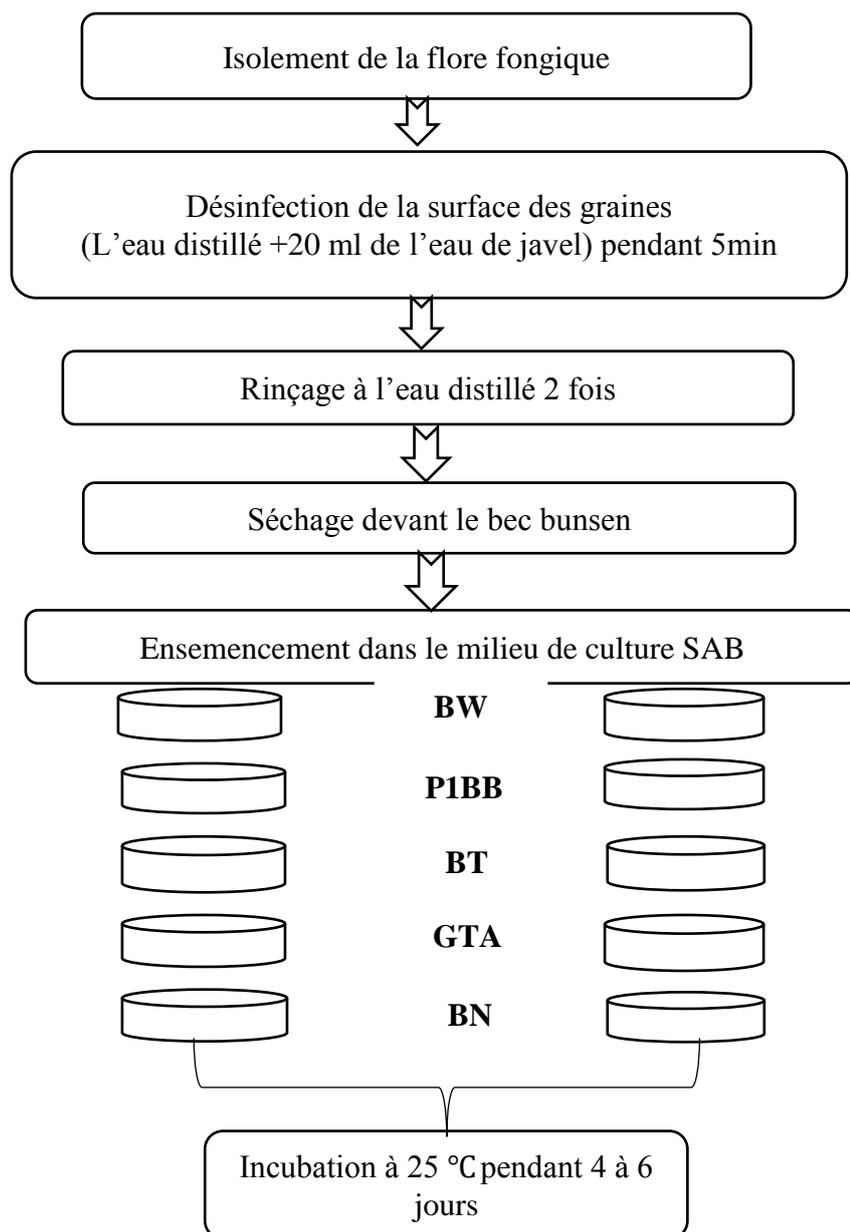


Figure 02 : Protocole d'isolement des champignons phytopathogènes des graines de blé.

2.4 Repiquage et purification des isolats fongiques

Les champignons isolés ont été repiqués successivement jusqu'à l'obtention de souches pures. Le repiquage a été fait par prélèvement d'un cylindre du mycélium à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur le milieu Sabouraud. Le cylindre a été déposé à l'aide d'une pince au centre d'une nouvelle boîte de pétri soigneusement étiquetée (Botton *et al.*, 1990).

Les boîtes ont été, par la suite, incubées à 28°C pendant 4 à 6 jours, cette méthode est répétée jusqu'à l'obtention de colonies pures.

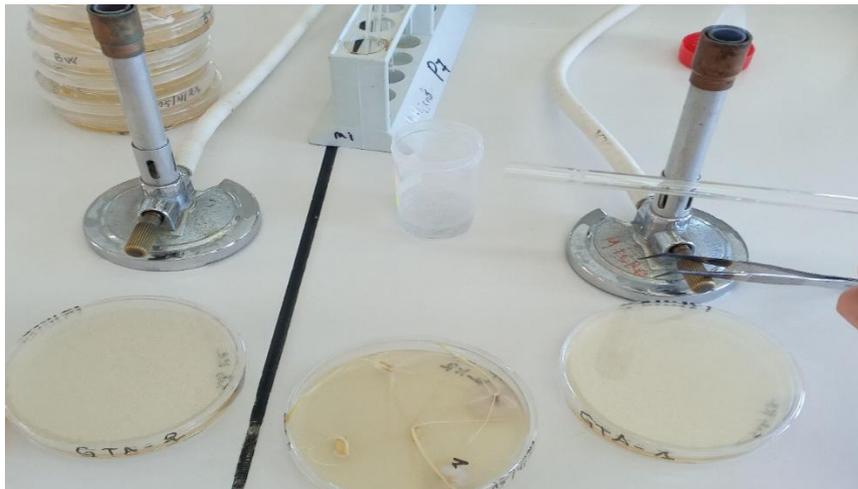


Figure 03 : purification des isolats (photographie originale)

2.5 Identification des souches fongiques

L'identification des champignons contaminants les graines de blé repose sur une :

2.5.1 Identification macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose après purification, les caractères étudiés sont :

- Au niveau du mycélium : la forme des colonies, la couleur et la texture du thalle, la couleur du réverse de la colonie.
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle ; l'aspect des spores (granuleux ; poudreux) ; l'uniformité de la couleur des spores (Djossou *et al.*, 2011).

2.5.2 Identification microscopique

Observation à l'état frais : technique dite du scotch :

- Sur une lame de verre, déposer une goutte de bleu de méthylène.
- Prélever, à l'aide d'un morceau de scotch transparent, le champignon directement dans la boîte de pétri.

- Coller ce morceau de scotch directement sur la lame.
- Observer au microscope a l'objectif $\times 40$ (Guiraud, 1998). (Pour confirmer les résultats des observations, utiliser le grossissement $\times 100$).

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons couleur ; texture des parois ; mode de ramification ; différenciation des thallospores ...) et des spores (forme ; couleur ; texture des parois ; groupement en chaines ; etc...) (Botton et *al.*, 1990).



Figure 04 : Observation macro et microscopique des isolats de champignons
(Photographie originale)

3. Mise en évidence de l'activité antifongique de la souche d'actinobactéries vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolés

La technique utilisée pour révéler l'activité antifongique est la technique des cylindres d'agar. Dans de l'eau physiologie stérile répartie dans des tubes à essai (9ml), mettre une quantité suffisante du champignon, puis bien agiter. Ensemencer des boîtes Pétri contenant le milieu Sabouraud gélosé par inondation, puis étaler la quantité déposée sur toute la surface de la boîte à l'aide d'un râteau.

A partir d'une culture de 7 jours, un cylindre d'une culture de la souche **SB05** est déposé au centre de chaque boîte de pétri préalablement ensemencée avec le champignon phytopathogène. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées à 28°C. Les zones d'inhibition sont mesurées à partir de 48h d'incubation (Bastide et *al.*, 1986).

4. Production et extraction des molécules bioactives

4.1. Production des antifongiques sur milieu liquide

Une pré-culture de 3 à 4 jours est préparée dans des tubes contenant 5 ml de milieu M2 (williams modifié) (annexe 01).

Cette pré-culture sert à ensemer 50 ml à 100 ml du même milieu liquide contenue dans des erlenmeyers (à raison de 10% v/v). L'incubation a lieu à 30°C dans des conditions d'agitation permanente (200rpm).

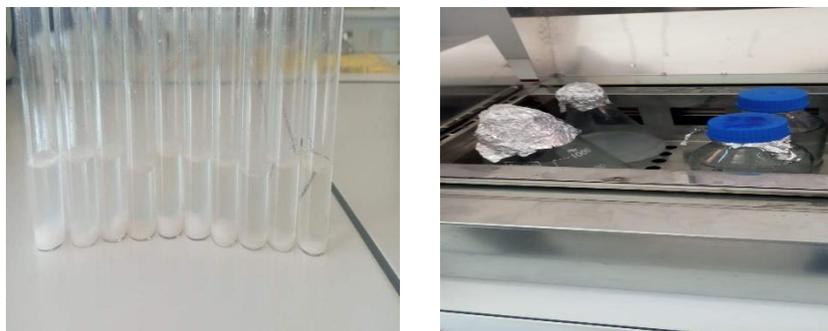


Figure 05 : Pré-cultures et cultures de la souche SB05 sur milieu liquide (Photographie originale)

4.2. Extraction des molécules antifongiques

Au total 1 litre de culture a été préparé. Une extraction a été effectuée pour le filtrat de culture récupéré après filtration.

L'extraction a été effectuée dans une ampoule à décanter avec un volume égale d'acétate d'éthyle, il faut bien mélanger le solvant avec le filtrat de culture par une agitation vigoureuse pendant au moins 20 minutes (Thakur et *al.*, 2009). Laisser le mélange se séparer en deux phases, une aqueuse et l'autre organique qui contient les molécules recherchées (figure 06).



Figure 06 : Séparation des deux phases et récupération de la phase organique (photographie originale)

La phase organique récupérée est par la suite concentrée par évaporation au Rotavapor (40°C) (figure 07). L'extrait brut obtenu après évaporation du solvant est récupéré dans une quantité de méthanol et conservé au réfrigérateur.



Figure 07 : Concentration de la phase organique par Rotavapor (photographie originale)

4.3. Mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut

L'extrait brut obtenu après concentration, est testé par la suite pour son activité antifongique par la méthode de diffusion dans des puits d'agar. Dans cette méthode des boîtes pétri contenant le milieu de culture sabouraud, préalablementensemencées avec les champignons phytopathogènes isolés (les plus sensibles). Ensuite, un puit creusé de manière aseptique à l'aide d'un embout stérile, sera rempli avec la solution d'extrait brut. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées à 28°C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 48 à 72h d'incubation.

Trois boîtes pétri contenant le milieu de culture sabouraud, préalablement ensemencées avec les champignons phytopathogènes isolés, mettre dans leurs puits une quantité suffisante de méthanol pour confirmer qu'il n'influence pas l'activité des champignons (témoin).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Isolement des souches fongiques

A partir des 5 variétés de graines de blé, on a isolé 19 isolats de champignons, réparties sur 09 isolats morphologiquement différents. Les résultats de l'isolement sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 03 : les souches fongiques isolées à partir des graines de blé dur

Variété des graines de blé	Nombre d'isolats	Code Isolats (champignons)	Noms Isolats (après identification)
R1, Région de Sidi Mbarek	02	GTA	GTA ₂ : <i>Fusarium</i> sp.
R2, Région de Tixter	04	P ₁ BB	P1BB ₁₇ : <i>Penicillium</i> sp.
R3, Région de Ras El Oued	01	BN	BN ₃ : <i>Cladosporium</i> sp.
R3, Région de Bir Kas Dalí	03	BW	BW ₁₃ : <i>Fusarium</i> sp
Semence traitée ATF de Bordj Bou Arreridj	09	BT	BT ₆ : <i>Aspergillus</i> sp BT ₇ : <i>Alternaria alternata</i> BT ₈ : <i>Aspergillus</i> sp BT ₉ : <i>Aspergillus</i> sp. BT ₁₀ : <i>Rhizopus</i> sp

2. Identification morphologique des isolats fongiques

Les caractères macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques sont étudiés sur milieu Sabouraud, le plus communément utilisé à cet effet (Botton,1990). Quant à l'étude microscopique, elle porte sur l'observation des structures caractéristiques des isolats (conidiospores, conidies, mycélium, etc. ...). Ces examens ont permis d'identifier l'isolat sélectionné selon les caractères morphologiques établis par Nelson et *al.*, (1983). La description des champignons obtenus est très essentielle pour l'identification basée sur les clés d'identification de Rémi et *al.*, (1997), Botton et *al.*, (1990) et Pitt (1985).

Les résultats de l'identification des souches fongiques isolées sont comme suit :

2.1. Les isolats de la variété GTA :

- Isolat GTA₂ :

Selon l'aspect macroscopique, la souche forme des colonies cotonneuses de couleur blanche en début de croissance. Le revers de la boîte est crème.

Quant à l'aspect microscopique, on observe un thalle très ramifié, portant des spores (Figure 1). Ces observations nous ont permis d'assigner cette souche au genre *Fusarium*

Les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas). Le revers peut être crème, jaune, rose, blanc. Les pigments diffusent souvent dans la gélose. (Chermette et Bussieras.,1993). Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets et portent des masses de spores. La présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. (Roquebert., 1998).



Figure 09 : Aspect macro et microscopique (G x10) de l'isolat GTA_2 isolé à partir des graines de blé de la variété GTA.

2.2. Les isolats de la variété P₁BB

• Isolat P₁BB₁₇

D'après l'observation macroscopique des isolats purifiées, les colonies sont de couleur vert-bleu avec un aspect velouté, les revers de la colonie est de couleur jaune a gris selon Pitt (1985), cet isolat correspondant à l'espèce *Penicillium* sp. Ses caractères microscopiques sont : un thalle formé un filament mycélien septé. Des conidies ellipsoïdales a sub-globuleuses, lisses, simple ou ramifiés, qui sont groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 10).

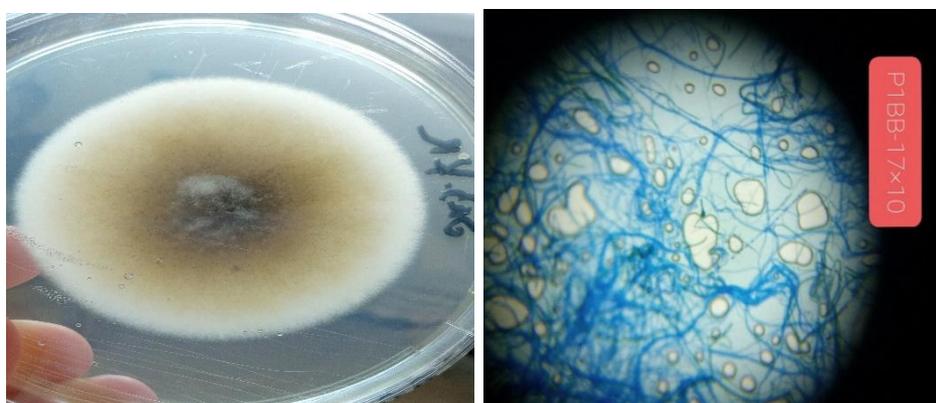


Figure 10 : Aspect macro et microscopique (G. x10) de l'isolat P₁BB₁₇ isolé à partir des graines de blé de la variété P₁BB

2.3. Les isolats de la variété BN

- Isolat BN₃

Selon la morphologie macroscopique, les colonies en début de croissance commencent sous forme de colonies duveteuses vertes à brunes puis blanches dans les extrémités. La surface est veloutée ou poudreuse et peut présenter des variations de couleur et de texture (Wiley,2017)

Sous microscope, des conidies rondes à ovales, à parois lisses ; les spores de mode blastique acropète (Botton et al., 1990) (Figure 11).

Ces résultats nous mènent à assigner l'isolat BN₃ au genre *Cladosporium*.

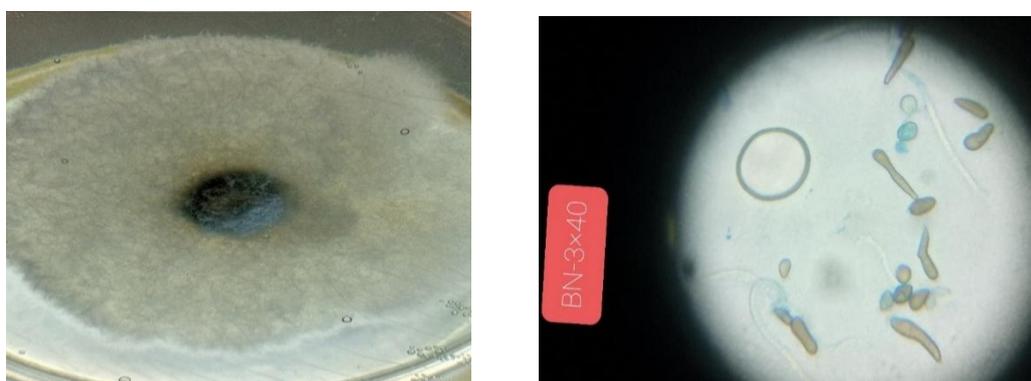


Figure 11 : Aspect macro et microscopique (G. x40) de l'isolat BN₃ isolé à partir des graines de blé de la variété BN

2.4. Les isolats de la variété BW

- Isolat BW₁₃

D'après l'observation macroscopique de l'isolat ; les colonies sont blanches à crème cotonneux ; selon les clés d'identification de Botton et *al.* (1990), cet isolat correspond à l'espèce *Fusarium solani*, ses caractères microscopiques sont : Macroconidies formé à partir de conidiospore : ramifiées, multiples, courtes. Microconidies cylindriques cloisonnés.

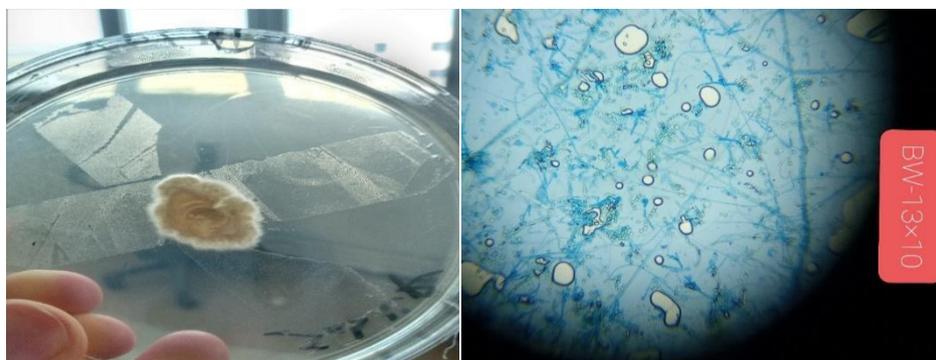


Figure 12 : Aspect macro et microscopique (Gx10) de l'isolat BW₁₃ isolé à partir des graines de blé de la variété BW

2.5. Les isolats de la variété BT

- Isolat BT₆

D'après l'observation macroscopique des souches purifiées, les colonies sont duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis vert-jaunâtre, et une croissance rapide et la forme ronde, le revers est incolore, selon les clés d'identifications de Rémi (1997) cet isolat correspond à l'espèce *Aspergillus flavus*,

Les caractères microscopiques sont : Thalle cloisonné. Des sporocystes qui porte des spores.

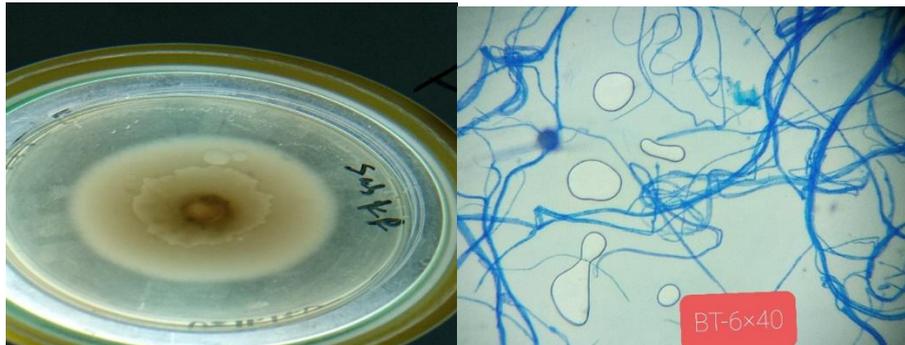


Figure 13 : Aspect macro et microscopique (Gx40) de l'isolat BT₆ isolé à partir des graines de blé de la variété BT

- Isolat BT₇

D'après l'observation macroscopique, les colonies sont d'une couleur noire, vert et duveteuses, elles présentent une texture épaisse selon les clés d'identification de Rémi et *al.* (1997) il s'agit de l'espèce *Alternaria alternata*. Sous microscope, on observe un mycélium cloisonné ; des conidies en chaînes simple ou ramifiées ; irrégulière ; rostre apical court mais bien différencié.

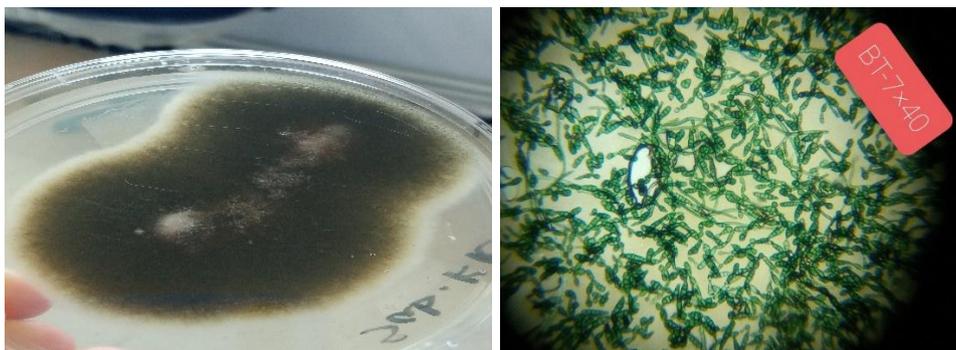


Figure 14 : Aspect macro et microscopique (Gx40) de l'isolat BT₇ isolé à partir des graines de blé de la variété BT

- **Isolat BT₈**

Du point de vue macroscopique, on observe des colonies d'abord blanches, puis bleu-vert et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers est jaune.

Possède un mycélium à croissance rapide (Morin, 1994). L'aspect macro et microscopique de l'isolat (Figure 07) nous permet d'assigner la souche à l'espèce *Aspergillus fumigatus*.

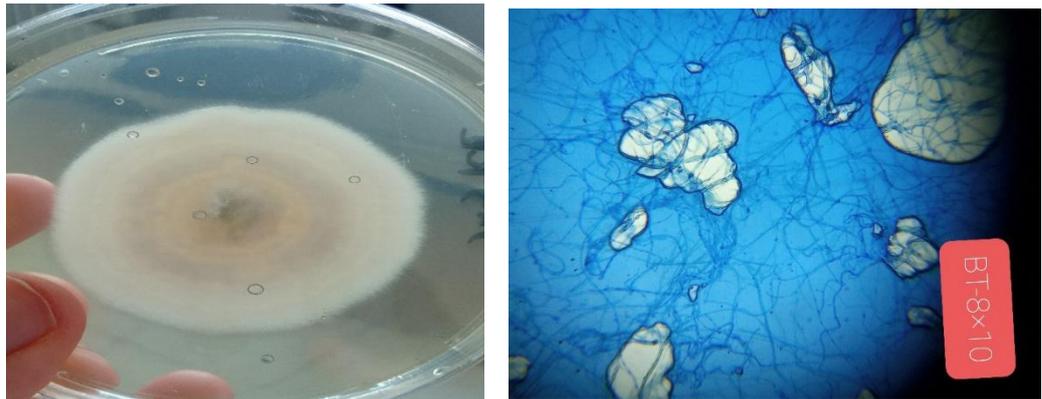


Figure 15 : Aspect macro et microscopique (Gx10) de l'isolat BT₈ isolé à partir des graines de blé de la variété BT

- **Isolat BT₉**

Après incubation les colonies prennent une forme plate, blanc, puis deviennent brunes.

Formation des colonies granuleuse.

Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras.,1993)

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable (Badillet et al., 1987 ; Raper et Fennell., 1965).

D'après ces caractéristiques notre isolat est proche du genre *Aspergillus*.



Figure 16 : Aspect macro et microscopique (Gx40) de l'isolat BT₉ isolé à partir des graines de blé de la variété BT

- **Isolat BT10**

L'aspect macroscopique de l'isolat BT10 montre des colonies présentant des stolons de *Rhizopus* pigmentés, avec une croissance cotonneuse dense qui devient après grise ou brune avec sporulation. D'après l'identification de Botton *et al.*, (1990) cet isolat correspond à *Rhizopus stolonifer*, ses caractères microscopiques sont : un thalle à croissance rapide sur des rhizoïdes ; la présence de sporocystes marron à noirs à la surface du mycélium.



Figure 17 : Aspect macro et microscopique (Gx10) de l'isolat BT10 isolé à partir des graines de blé de la variété BT

Pour l'identification des espèces fongiques isolées, nous nous sommes basés sur les critères morphologiques. Cette manière s'avère longue et fastidieuse et nécessite une expérience confirmée. De plus, les caractéristiques morphologiques sont influencées par les conditions de culture et peuvent amener à de mauvaises identifications (Diguta, 2010). L'observation des caractères morphologiques est faite par un examen microscopique soigneux aux divers stades du développement de la moisissure. Cet examen ne pourra, le plus souvent, être réalisé que si la moisissure a été isolée et cultivée sur un milieu de culture gélosé qui lui convient.

Le milieu Sabouraud utilisé au cours de cette étude avait été décrit par plusieurs auteurs pour l'isolement des moisissures contaminant les aliments (Gacem, 2011 ; Dedi et Doimonde, 2017).

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* présentent une fréquence d'apparition élevée sur les échantillons analysés. Ce sont des champignons très fréquents, dans le sol et l'air, très sporulant, dotés d'un grand pouvoir de dissémination cela pourrait expliquer la forte présence de ce genre ; Il faut souligner la grande dominance d'*Aspergillus flavus*. Il produit une toxine redoutable l'aflatoxine dans les graines avant et après la récolte (Dedi et Doimonde, 2017) dans presque toutes les semences de culture stockées et cette dernière est un cancérigène puissant fortement réglementé dans la plupart des pays (Klich, 2007).

L'espèce *Alternaria alternata* isolée à partir des graines de blé de la variété de la région de Bordj Bou Arreridj est naturellement présente sur les cultures au niveau des champs et dans le sol (Withlow et al., 2001). La présence de ce genre dans le blé semble être due à l'humidité élevée. Ces mêmes résultats ont été constatés par Weindenbomer (2000).

Le genre *Fusarium*, présent également dans les échantillons analysés, selon Tabuc (2007) c'est un contaminant des champs qui affecte les produits agricoles avant et pendant la récolte. Dans notre étude, le genre *Cladosporium* prédomine la semence non traitée, cette dernière présente un aspect détérioré et un faible taux de germination, les isolats de ce champignon peuvent causer des pertes de rendement et de qualité du grain.

Le genre *Rhizopus* est considéré comme une flore intermédiaire sans importance qui peut contaminer les graines de blé (Godon et Loisel, 1997).

Dans l'ensemble, les taux de contamination élevée, ainsi que la biodiversité fongique assez importante constatés dans les différentes variétés de blé peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage.

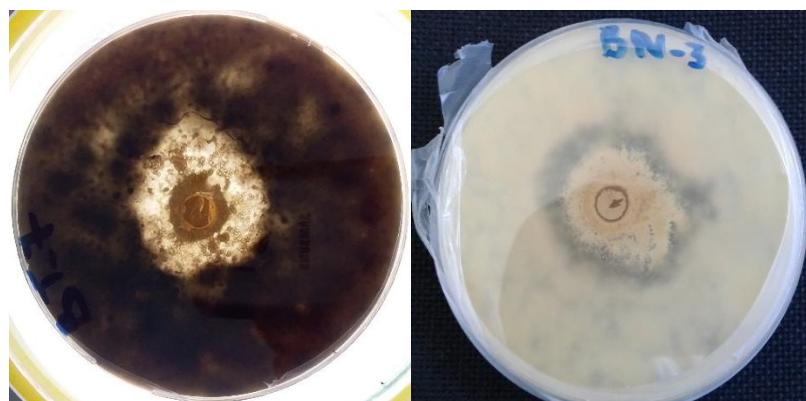
3. Activité antifongique de la souche BS05

3-1. Technique des cylindres d'agar

Les résultats de la mise en évidence de l'activité antifongique de la souche d'actinobactéries BS05 vis-à-vis des champignons isolés sont rapportés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 04 : Résultats de l'activité antifongique d'actinobactérie (méthode des cylindres d'agar)

<i>Streptomyces sp. BS05</i>	
Isolat (champignon phytopathogène)	Zone d'inhibition
GTA ₂ (<i>Fusarium sp</i>)	46 mm
PIBB ₁₇ (<i>Penicillium sp</i>)	20 mm
BN ₃ (<i>Cladosporium sp</i>)	30 mm
BW ₁₃ (<i>Fusarium sp</i>)	0 mm
BT ₆ (<i>Aspergillus sp</i>)	20 mm
BT ₇ (<i>Alternaria alternata</i>)	34 mm
BT ₈ (<i>Aspergillus sp</i>)	6 mm
BT ₉ (<i>Aspergillus sp</i>)	16 mm
BT ₁₀ (<i>Rhizopus sp</i>)	0 mm

**Figure 18 :** Résultats de mise en évidence de l'activité antifongique vis-à-vis de l'isolat GTA₂**Figure 19 :** Résultats de mise en évidence de l'activité antifongique vis-à-vis des isolats BT₇ et BN₃

Les résultats de la mise en évidence de l'activité antifongique montre que la souche d'actinobactéries BS05 est active vis-à-vis de la majorité des souches fongiques isolées. Elle montre une activité antifongique considérable vis-à-vis des isolats GTA₂, P₁BB17, BT₆ et BT₇, BN₃ avec des zones d'inhibition de 46 mm, 20mm, 20 mm, 34mm, 30mm respectivement. D'une autre part elle ne montre pas d'activité antifongique vis-à-vis des isolats BW₁₃ et BT₁₀.

3-2. Technique des puits

Après extraction des molécules bioactives, l'extrait brut est dissous dans une quantité de méthanol, puis le test d'activité réalisé par la méthode de diffusion dans des puits, vis-à-vis de trois isolats fongiques les plus sensibles à savoir BN₃, BT₆ et BT₇. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 05 : Résultats du test d'activité antifongique par méthode de diffusion dans des puits d'agar

Isolat	BN ₃ (<i>Cladosporium</i> sp.)	BT ₆ (<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>)	BT ₇ (<i>Alternaria</i> <i>alternata</i>)	Témoin BN ₃	Témoin BT ₆	Témoin BT ₇
Zone d'inhibition	14mm	-	-	-	-	-



Figure20 : Résultats de mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des puits

L'extrait brut de la souche BS05 a montré une activité de 14mm de diamètre vis-à-vis de l'isolat BN₃ uniquement. Absence d'activité vis-à-vis des deux autres isolats testés.

Cela peut être expliqué par le fait que l'extrait provient du filtrat de culture de la souche BS05, soit le solvant utilisé (acétate d'éthyle) n'est pas le mieux approprié, les molécules

antifongiques sont moins solubles dans ce solvant, donc pas extraites par ce solvant, ce serait intéressant alors, de tester d'autres solvants d'extraction pour une meilleure extraction.

Soit c'est dû à une concentration faible des molécules dans le filtrat, ou bien parce que certaines molécules ne sont pas excrétées à l'extérieur (endocellulaires), donc ce serait intéressant de tester la biomasse cellulaire.

Les actinobactéries sont connus pour leurs capacités métaboliques, en particulier les espèces du genre *Streptomyces* qui produisent des milliers d'antibiotiques. Ils semblent être de bons candidats comme agents de lutte biologique (Aouar et al., 2019).

La souche *Streptomyces* sp. BS05 a déjà fait l'objet d'une étude de test d'antagonisme vis-à-vis de champignons phytopathogènes à savoir : *Fusarium culmorum*; *Botrytis cinerea*; *Fusarium oxysporum*; *Penicillium expansum*; *Fusarium glabrum*; *Fusarium multifarum*; *Fusarium sporotrichoides*. Et la souche s'est révélée être doter d'une activité antifongique intéressante, elle a inhibé de façon plus ou moins importante la totalité des champignons phytopathogènes testés (Souagui, 2015).

Les souches appartenant au genre *Streptomyces* montrent plus d'activité comparativement aux autres genres d'actinobactéries (Souagui, 2015).

L'application de *Streptomyces* sp., comme agent de lutte biologique a été étudié contre certains champignons phytopathogènes transmis par le sol tels que *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. En 2020, Abbasi et ces collègues ont testé l'activité antifongique de 106 souches de *Streptomyces* sélectionnées parmi une collection de cultures microbiennes contre *Phytophthora capsici* l'agent causal de la brûlure du poivre. Parmi les souches étudiées, quatre souches ont montré une inhibition de croissance supérieure à 50% contre *Phytophthora capsici* sur milieu PDA.

Conclusion

Conclusion

Notre étude a été réalisée afin de mettre en évidence le pouvoir antifongique d'une souche d'actinobactéries, *Streptomyces* sp. BS05 vis-à-vis de champignons phytopathogènes isolés à partir de différentes variétés de blé dur de cinq (05) régions de la willaya de Bordj Bou Arreridj.

Pour répondre à cet objectif, un échantillon représentatif de chaque variété a été analysé. Pour ce faire, nous avons tout d'abord exploité les données bibliographiques qui nous ont aidés à différencier les principales maladies cryptogamiques de blé, et s'avoir la méthode de lutte biologique par les actinobactéries.

En tenant compte des analyses effectuées et le mode opératoire, en décrivant l'isolement, purification et identification des champignons phytopathogènes à partir des graines du blé, et en détaillant par la suite la mise en évidence de l'activité antifongique de l'actinobactérie vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolés et l'extraction des molécules bioactives, permettant de connaître l'effet antagoniste de cette souche (actinobactérie) vis-à-vis des champignons phytopathogènes résumés dans le dernier chapitre résultats et discussion.

Au terme de cette étude et à partir des résultats obtenus et leurs interprétations, nous espérons avoir atteint l'objectif de notre étude résumé ainsi :

- Isolement de 19 souches fongiques réparties comme suit : 02 isolats fongiques à partir des graines de la variété (GTA), 04 isolats dans la variété de (P1BB), 01 isolat à partir des graines de (BN), 03 isolats de la variété de (BW), le grand nombre d'isolats (09) été obtenu à partir des graines de blé de la variété de (BT).
- Identification de 9 souches différentes tels que : *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus*.
- L'étude du pouvoir antagoniste de la souche d'actinobactéries BS05 par la méthode des cylindres d'agar, ainsi que l'extraction des molécules bioactives et mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut par la méthode des puits.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser les étapes suivantes :

- Identification génétique des souches fongiques autochtones isolées.
- Extraction des molécules bioactives en utilisant d'autres solvants organiques.
- Caractérisation des molécules bioactives intéressantes.

ANNEXES

ANNEXE 01

1) Préparation des milieux de culture

➤ Préparation de milieu de culture (Sabouraud)

65g de poudre de sabouraud

1L de l'eau distillé

- ✓ Dans un erlenmayer qui contient un barreau magnétique, dissoudre soigneusement la poudre de sabouraud dans l'eau distillée.
- ✓ A l'aide d'un agitateur magnétique (agitation 1500/min à 340°C), mélanger pendant 35min.
- ✓ Répartir et stériliser 15min à 121°C à l'autoclave.

➤ Préparation de milieu William's (Liquide) :

- 10g amidon soluble

-0,3g caséine (remplacé par 1g de lait en poudre)

-2g (le nitrate de potassium) KNO_3

-2g (Hydrogénophosphate de potassium) K_2HPO_4

- 2g NaCl quantité suffisante pour 1L

-0,05g (Sulfate de magnésium) $MgSO_4$

-0,02 (Carbonate de calcium) $CaCO_3$

-0,01g (Sulfate ferreux) $FeSO_4$

➤ Préparation de l'eau physiologie ;

-8,5g Chlorure de sodium

-1L de l'eau distillée

- ✓ Répartir en tubes à essais (10 ml). Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

ANNEXE 02

Matériels utilisés



Lame et lamelle



Balance de précision



Plaque chauffante



Autoclave



Etuve



Microscope



Pipette pasteur



Evaporateur rotatif



Ampoule à décanter



Tubes à essais



Micropipette



Erlenmeyer

Bibliographie graphiques

Référence bibliographique

- Aouar L, Sylvain Lerat, Ammar Ouffroukh, Abderrahmane Boulahrouf and Carole Beaulieu (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. « Canddian Journal of plant pathology ». 165-176.
- Aouar, L. Boukelloul, I. Benadjila, A. Medjoudj, H. Zaabat, M. (2019). *Streptomyces griseus* LACI : biocontrol et propriétés promotrices de la croissance des plantes. Revue des Bioressources. (9).27-37.
- Badillet, G., Bievre, C., et Gueho, E. (1987). Champignons contaminants des cultures : Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Varia. P 132-216.
- Bastid A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. et Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. Mircen. J., 2 : 453-466.
- Beaugraud, J.2004. Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre. Thèse de doctorat. Univ de reins Champagne-Ardenne. Coll. INRA.
- Ben Aneur Mehdi, R., S. Sioud, L. Fourati Ben fgaira, S. Bejar, et L. Mellouli. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *streptomyces* sp.TN. 97. Strain. Process biochem.41:1506-1513.
- Benbrook C. M., Groth E., Halloran J. M., Hanser M. K. and Marquaratt S. (1996). Pest management at the crossroads, consumer's union, Yonkers. 272.
- Benizri E., Bandoïn E., Di Battista-Leboeuf C., et Guckert A., (2001). Des bactéries pour la santé des plantes. Biofutur 210 :52-56.
- Berdy J. (2005). Bioactive microbial métabolites. J Antibiot .58 :1-26.
- Berg, G. Kuize, S. Buchner, A. Wellington, E. M. Smalla, K. (2000). Successful strategies for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium wilt*. Canadian journal of microbiology. (46).1128-1137.
- Botton B., Bretton A. Fever M., Gautier S., Guy ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier y, veau p. (1990). Moisissures utiles et nuisible importance industrielle 2^{ème} édition. Masson collection biotechnologie. :34-428.
- Bouakaz K et Oussaid Y. (2013). Reconnaissance et identification des principales maladies cryptogamiques du blé et de l'orge. Institut national de la protection des végétaux.
- Bubici, G. (2018). *Streptomyces* spp. As biocontrol agents against *fusarium* species. CAB Reviews. (13). 1-15.

- Canadas, D. 2006. Evaluation du procédé oxygreen R pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à ochratoxine A sont-ils atténués ? Thèse de doctorat. INPT. Toulouse.
- Chermette R., Bussieras J., (1993), Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Cook R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31., P53-80.
- Corbaz R (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes. D'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Canada, pp 56.
- Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Press polytechniques et universitaires.
- Dedi, J K. E et Diomande, B. Y. (2017).Caracterisation de la mycoflore de grains de maïs (*Zea mays*) destinés à la préparation d'aliments composés pour la volaille. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol 11, no 6, p. 259462603.
- Dehimat L. (2011). Contribution à l'étude des maladies foliaires des céréales « approche à l'étude Epidémiologique et identification de la jaunisse nanisante de l'orge dans les céréales d'hiver dans les régions de l'est d'Algérie », INRAA.2 ; rue des freres ouaddek. El Harrach. Alger-Algérie. N° 33.
- Diguta, C. F., (2010). Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisins. 154p. Thèse de Doctorat. Univ. De Bourgogne, Institut universitaire de la vigne et du vin. France.
- Djossou O., Perraud-Gaime, Lakhel Mirleau F., Rodriguez –Serrana G., Niamke S., Ouzari I., Boudabous A and Roussos s. (2011). Robusta coffee beans post-harvest microflora a : *Lactobacillus plantarum* sp . As potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*:1-6.
- EL-Tarabily, K.A. Sivasithamparam, K. (2006). Non-Streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil biology and biochemistry.* (38).1505-1520.
- Emmert E. A. B et Hande Isman J., (1999). Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.* P. 171, 1-9.
- Errakhi R. (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Feillet. 2000. « Le grain de blé composition et utilisation ». INRA. Paris 308p.

- Fravel ,2005: Fravel D.R., (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. Annu.Rev. Fusariose des céréales en Algérie.INPV (Institut National de la protection des végétaux).
- Gacem M., 2011. Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxigène des extraits méthanolique et aqueux des graines de Citrullus.
- Gerhardson B. (2002). Biological substitutes for pesticides. Trends in biotechnology.20. (8):338-343.
- Godon, B, and Loisel, W. 1997. Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales. Technologies et documentation. Paris p819.
- Godon, B., Et William, C.I(1991). « Des industries de première transformation des céréales ». Page :79 à 85.
- Gomes, E. B. Dias, L. R. Miranda, R.C. (2018). Actinomycets bioactive compounds: biological control of fungi and phytopathogenic insect. African journal of biotechnology. (17). 552-559.
- Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.
- Hoorman. J. et R. Islam. 2010. Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and natural Resources. The Ohio state university, pp.1-5.
- INRA., (2014). Céréales à pailles. Note commune résistances aux fongicides., p.3-7. ISBN :978-9961-9523-1-3. P. 8.19.23.26.25.27.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Pschuck, P and Gerard Brule. 2007 : Science des aliments : Biochimie Microbiologie, proceeds produits p138-159.
- Kent, N. L.M. A, phd. 1975. Technology of cereals: with specialre reference to wheat.2^{eme} Ed. Pergamon press. 297 p. La fondation Historica du Canada.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Molecular plant pathology, vol.8, no. 6, p.713-722.
- Lauzon M. (2007). Fusariose de l'épi chez le blé et l'orge. Cérom. Canada N 02 .01. P5.
- Lepoivre P (2003). Phytopathologie .1 st édition, De Boeck, Bruxelles(Blgium), pp 111-159.
- Lechevalier, M. P. Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycets. International journal of systematic bacteriology (20), 435-443.
- Maier, R. M., I. I. Pepper et C.P. Gerba.2000. Environmental microbiology, p.79-82. Microorganisms in surface soils. In. Acadimic press. A Harcourt sciencead technology company. Canada.
- Mc BEAN, D. S; MCLEOD, J. G. 2007. Le seigle l'encyclopédie canadienne : en ligne.

- Meyer J. Y., (2002). La lutte biologique contre les espèces introduites envahissantes : Solution miracle ou méthode risquée ? Fiche technique-16.
- Morin O., (1994), *Aspergillus* et aspergilloses : biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- Nakkeeran S., et Fernando G.T.D. (2005). La croissance des plantes rhizobactéries formulation et champ d'application en matière de commercialisation de la gestion des ravageurs et des maladies In : Siddiqui Z.A(ed) PGPR : bio contrôle et bio fertilisation. Springer Dordrecht 257-296.
- Nelson, P.E., Toussoun, T. A., Marasas, W.F.O.1983.*Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Paulitz, 2001 : Paulitz T.C., et Bélanger R.R., (2001). Biological control in greenhouse systems. Annu.
- Pitt J.I. (1985). The genus *Penicillium*. Edition: Academic Press.634p.
- Pridham, T. G., L.A. Lindenfelser, O.L. Shotwell, F.H. Stodola, R.G. Benedict et R.W. Jackson. 1956. Antibiotics against plant disease. II. Effective agents produced by streptomyces cinnamoneus of Azacoluta F.nov. phytopath 46:757-581.
- Raper, K B., Fennell, I., Fennell, P K. Austwick, C. (1995). *The genus Aspergillus*. Edition réimprimée. University of Minnesota: Williams et Wilkins. p 686.
- Reidlinger, J., S.D. Schrey, M.T. Tarkka, R. Hampp, M. Kapur et H.P. Fiedler. 2006.Auxafurma, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium streptomyces strain Ach505. Appl. Environ. Microbiol.72(5):3550-3557.
- Rémi C. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.
- Roquebert M. F, (1998), Taxonomie des moisissures, Méthodes de culture et techniques d'observation, Identification, in « *Moisissures des aliments peu hydratés* », Ed. Tec et Doc,39-95.
- Shrivastava S., S.F. D'Souza et P.D. Desai. 2008. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora sp*) for soil applications. Current sci.94(25):1595-1604.
- Souagui, Y. (2015). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques. Purification et caractérisation des molécules synthétisées. Thèse de Doctorat, Université A/Mira de Bejaia.
- Stevenson, I.I.1956. Antibiotic Activity of actinomycets in soil and their controlling effects on root-rot of wheat.J.Gen. Microbiol. 14:440-448.
- Subrabani, R. et W. Albersberg. 2012. Marine actinomycetes: on ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiol. Res. 167(10):571-580.
- Surget, A., et Barron, C., 2005. Histologie du grain de blé, Industrie des céréales 145, 4-7.

- Tabuc. N., (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti. Hawksworth D. L., Kirk P.M.
- Thakur D, Bora T. C, Bordoloi G.N, Mazumdar S (2009), Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by streptomyces sp.201, journal de Mycology Medical (2009)19: p 161-167.
- Toussaint V. (1996). Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *phytophthora fragariaerar*. Rubicausant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de maîtrise ès science. Université et Sherbrooke, Québec, Canada.
- Weindenborner. (2000). Whole wheat and white weat flour, the microbiota and potentialmycotoxins. F. Microbiol. P:103-107.
- Withlow L.W. and Hagler, W. M. (2001). Mycotoxin contamination of feedstuffsan additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ, Québec.
- Xiao, K. Kinkel, L. L. Samac, D. A. (2002). Biological control of *phytophthora root* rots on al falfa and Soybean with streptomyces. Biological control. (23). 285-295.
- Zillinsky F, J., (1983) : Les maladies des céréales à paille. Guide d'identification. Eds. CIMMYT. Mexico.142p.

RESUME

Résumé

La présente étude porte sur la recherche de molécules bioactives vis-à-vis de champignons phytopathogènes isolés à partir de graines de blé dur de quelques régions de Bordj Bou Arreridj.

Après l'identification macro et micro-morphologique de neuf souches de champignons isolés à partir des graines de blé, une mise en évidence de l'activité antifongique à partir d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces* (SB05) a été effectuée par la technique des cylindres d'agar. L'extraction liquide/liquide, en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, des molécules bioactives a été réalisée après culture de la souche BS05 sur milieu liquide et la mise en évidence de l'activité antifongique de l'extrait brut vis-à-vis des germes fongiques les plus sensibles a été réalisée par la technique des puits.

Par le test des cylindres d'agar, la souche BS05 a montré une activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp, avec des zones d'inhibition de 46 mm, 20mm, 30mm, 20mm, 34mm, 6mm, 16mm, respectivement. Quant à la mise en évidence de l'activité antifongique à partir de l'extrait brut, ce dernier a montré une zone d'inhibition de 14 mm vis-à-vis de *Cladosporium* sp.

A l'issue de cette étude, la souche d'actinobactéries BS05 montre une activité antifongique intéressante vis-à-vis des champignons phytopathogènes isolés à partir des graines de blé. Une activité moins intéressante de l'extrait brut, ce qui suggère de tester d'autres solvants d'extraction pour la récupération des molécules bioactives.

Mots clé : activité antifongique ; champignons phytopathogènes ; molécules bioactives ; actinobactéries ;

Abstract

The present study concerns the search for bioactive molecules against phytopathogenic fungi isolated from durum wheat seeds from some regions of Bordj Bou Arreridj.

After the macro and micro-morphological identification of nine strains of fungi isolated from wheat seeds, the antifungal activity from a strain of actinobacteria *Streptomyces* (SB05) against these fungi strains was carried out by the agar cylinders test. The liquid/liquid extraction of bioactive molecules using ethyl acetate solvent was released for the liquid culture from the BS05 actinobacteria strain, and the antifungal activity was demonstrated by diffusion well technic.

The results of antifungal activity using the agar cylinders test showed inhibition zones against *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp., with 46 mm, 20mm, 30mm, 20mm, 34mm, 6mm, 16mm, diameters respectively. And the crude extract showed antifungal activity against *Cladosporium* sp. with 14 mm of diameter.

The actinobacteria BS05 strain, showed interesting antifungal activities against the phytopathogenic fungi strains isolated from durum wheat seeds. However, it will be interesting to test other extraction solvent for better extraction of antifungal bioactive molecules.

Keywords: Antifungal activity; phytopathogenic fungi, bioactive molecules, actinobacteria *Streptomyces*

ملخص

تتعلق الدراسة الحالية بالبحث عن الجزيئات النشطة بيولوجيا مقابل الفطريات الممرضة للنبات المعزولة من بذور القمح الصلب من بعض مناطق برج بوعرييريج.

بعد التحديد المورفولوجي الكلي والجزئي لتسع سلالات من الفطريات المعزولة من بذور القمح، تم إجراء عرض توضيحي للنشاط المضاد للفطريات من سلالة من البكتيريا الشعاعية *Streptomyces* (SB05) بواسطة تقنية اسطوانات أجار. تم إجراء الاستخلاص السائل / السائل، باستخدام أسيتات الإيثيل كمذيب استخلاص، للجزيئات النشطة بيولوجيا بعد زراعة السلالة BS05 على وسط سائل وإثبات النشاط المضاد للفطريات في المستخلص. تم استخدام تقنية البئر على الجراثيم.

من خلال اختبار اسطوانة أجار، أظهرت سلالة BS05 نشاطاً مضاداً للفطريات ضد *Penicillium* sp ، *Fusarium* sp

مناطق تثبيط 46 ملم، 20 ملم، 30 ملم، 20 ملم، 34 ملم، 6 ملم، 16 ملم، على التوالي. بالنسبة لإثبات النشاط المضاد للفطريات من المستخلص الخام، أظهر الأخير منطقة 14 ملم مقابل *Cladosporium* sp .

في نهاية هذه الدراسة، أظهرت سلالة البكتيريا الشعاعية BS05 نشاطاً مثيراً للاهتمام ضد الفطريات الممرضة للنبات المعزولة من بذور القمح. ونشاط أقل إثارة للاهتمام للمستخلص الخام، والذي يقترح اختبار مذيبات الاستخلاص الأخرى لاستعادة الجزيئات النشطة بيولوجيا.

الكلمات المفتاحية: الجزيئات النشطة بيولوجيا، الفطريات الممرضة للنبات، البكتيريا الشعاعية، *Streptomyces* (SB05)