

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT
LABORATOIRE DE
PHYTOPROTECTION ET DE
VALORISATION DES RESSOURCES
VÉGÉTALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

POST GRADUATE SCHOOL FOR
LIFE SCIENCES, HEALTH AND
ENVIRONMENT
LABORATORY OF
PHYTOPROTECTION AND
PLANT RESOURCES
VALORIZATION

**Contribution des actinobactéries (actinomycètes)
dans la lutte biologique contre *Pythium myriotylum*,
agent responsable de la pourriture des racines de
macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott)**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat/Ph.D en Biochimie

Par : **DJUIDJE KOUOMOU Peguy Flora**
Maître-ès Sciences

Sous la direction de
OMOKOLO NDOUMOU Denis
Professeur, Université de Yaoundé I
BEAULIEU Carole
Professeur, Université de Sherbrooke, Canada

Année Académique : 2020





DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE DE
DOCTORAT/Ph.D

Nous soussignés: Professeur **FEKAM BOYOM Fabrice**, Professeur **AMBANG Zachée**, Professeur **EFFA ONOMO Pierre**, et Docteur **NYASSE Salomon**, respectivement Président du jury et Examineurs de la Thèse de Doctorat Ph.D en Biochimie de Madame **DJUIDJE KOUOMOU Peguy Flora**, matricule **05R184**, préparée sous la co-direction des Professeurs **BEAULIEU Carole** et **BOUDJEKO Thaddée**, et de la supervision du Professeur **OMOKOLO NDOUMOU Denis**, intitulé: «**Contribution des actinobactéries (actinomycètes) dans la lutte biologique contre *Pythium myriotylum*, agent responsable de la pourriture des racines de macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott)**», soutenue le lundi 22 juin 2020 dans la salle S01/S02 du block pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, en vue de l'obtention du diplôme de **Docteur/Ph.D en Biochimie, Option Biotechnologie et Développement**, attestons que toutes les corrections demandées par le Jury de soutenance ont été effectuées.

Fait à Yaoundé, le... **06 JULI 2020**...

Examineurs

Le Président du Jury

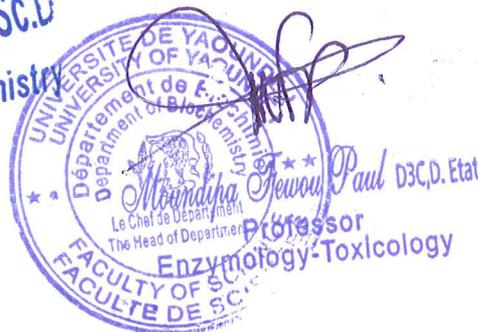
Le Chef de Département

Dr. Effa Onomo Pierre
Maitre de Conférences
Biochimie/Phytopathologie

AMBANG Zachée
Professeur

Salomon Nyasse

Fabrice F. Boyom, Sc.D
Professor of Biochemistry



UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020

ADMINISTRATION

DOYEN: TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA: ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE: AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC: ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière: NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR:

MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste

16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	VICE-DOYEN / DSSE
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./ MINSANTE
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste

15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFIEI DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste
44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste
3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)			
1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste

11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UD_s</i>
11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen
2	GHOOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFAK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste

33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste
6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHÉ DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)			
1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste

15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel</i>

15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	34 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	99 (28)	130 (33)	45 (10)	343 (75)

Soit un total de **344 (75)** dont:

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**



Dédicace

À la mémoire de ma chère grand-mère MOKAM Pauline; à toute ma famille en particulier mes parents SIKA WAFFO Jeannette et KOUOMOU Joseph; mon oncle DJOUMEN Augustin René et ma tante MATUEBOU WAFFO Anne.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à l'Eternel DIEU, pour la force, la patience et le courage qu'il m'a donné lors de la réalisation de ce travail.

J'exprime de tout cœur ma profonde gratitude au Pr. BOUDJEKO Thaddée, Maître de Conférences à l'Université de Yaoundé I pour avoir dirigé et encadré ce travail, pour ses fructueux conseils et sa disponibilité.

J'exprime également ma reconnaissance au Pr. Carole BEAULIEU, Professeur titulaire et Doyenne de la Faculté des Sciences de l'Université de Sherbrooke (Canada), pour avoir co-dirigé ce travail, m'avoir permis de travailler dans l'agréable cadre de son laboratoire.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser ma très vive reconnaissance au Pr. OMOKOLO NDOUMOU Denis, Professeur titulaire à l'Université de Yaoundé I, pour avoir supervisé ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude:

- Au Centre SÈVE de l'Université de Sherbrooke de m'avoir octroyé la bourse d'étude FQRNT (Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies) et pour le plateau technique de pointe qui m'a permis de réaliser la majeure partie de mes travaux de recherche;
- À OWSD (*Organization for Women in Science for the Developing World*) pour m'avoir octroyé une bourse d'étude, qui a été effectuée la caractérisation des métabolites des souches antagonistes à l'UPM (Universiti Putra Malaysia) en malaisie; pour tous les avantages et privilèges dont j'ai bénéficié en tant que boursière et membre de ladite organisation;
- À l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) du Cameroun, en particulier le laboratoire régional de biotechnologie d'Ekona et celui de lutte biologique et de microbiologie appliquée de Nkolbisson pour avoir mis à notre disposition les souches phytopathogènes fongiques utilisées dans cette étude;
- À l'Honorable KOUINCHE Albert, député du Koung-khi pour le soutien financier apporté à travers le Programme d'Assistance aux Doctorants (PAD);
- Au Pr. Dr. WONG YUI MUI, Maître de Conférences à l'Université Putra Malaysia (Malaisie), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire dans le cadre de la bourse OWSD, pour ses conseils multiformes et la confiance qu'elle m'a accordé;
- Au Pr. MBANYA Jean-Claude, Directeur du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, pour la collaboration administrative;
- À tous les enseignants du Département de Biochimie pour les enseignements reçus tout au long de mon cursus universitaire lesquels m'ont été d'une grande utilité lors de la réalisation de ce travail;

- Au Pr. Ryzard BREZINSKI, Professeur titulaire à l'Université de Sherbrooke pour la collaboration scientifique et ses précieux conseils; ainsi que M. Daniel GARNEAU et M. Charles BERTRAND de l'Université de Sherbrooke pour leurs assistances lors des séances enrichissantes et cordiales de microscopie optique et électronique;
- Au Pr. NGONKEU M. Eddy L, Maître de Conférences à l'Université de Yaoundé I, pour ses encouragements et ses précieux conseils;
- Au Dr. EWANE Cécile Annie, Chargée de cours à l'Université de Yaoundé I, pour sa collaboration scientifique et ses encouragements;
- Au Dr. TAGATSING Maurice du Laboratoire des Substances Naturelles N°3 du Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, pour la bonne collaboration scientifique lors de la réalisation d'une partie de l'aspect chimique de mon travail au sein de ce laboratoire et pour les encouragements;
- Au Pr. DJIOGUE Séfirin, Maître de Conférences à l'Université de Yaoundé I, pour ses encouragements et les remarques académiques constructives;
- À M. Wael SULTAN, de l'Université Putra Malaysia pour son aide durant les analyses bioinformatiques;
- Au Dr. ADAMOU du Laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, pour ses conseils et encouragements durant ces années;
- À toute la dynamique équipe du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, en particulier KANEMOTO Emery, Dr. MEDIESSE KENGNE Francine, TENE TAYO Martial, FANGUE Georges et SIPPING Maruis pour l'atmosphère chaleureuse durant ces années;
- À Mme Emiliènne et M. Warner MAMPUYA à Sherbrooke pour leurs conseils encouragements et leur affection;
- Au Pasteur CHIWI Iric, les couples MBOZO'O et KAMWA, M. TCHOUMBA Belmond, M. Dominique BIS, M. George NJOKU, M. BILONG Louis, M. WABO Emmanuel et Mme TANGILE NGASSI Stella épouse DONGO pour leur soutien multiforme;
- À mes frères et sœurs: NJIWA Maruis, DJOMBOU Blandine épouse NANKEU et MAMBOU Chloe; mes cousins et cousines DENFO Dany, KENGNE Franck, MAFFO Majolie et MOKAM Mauriat pour leur soutien moral, spirituel, leur affection, compréhension et leur patience; ainsi qu'à toute ma famille;

Je remercie enfin toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DÉDICACE	xi
REMERCIEMENTS	xii
TABLE DES MATIERES	xiv
RESUME	xxi
ABSTRACT	xxiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxv
LISTE DES TABLEAUX	xxvii
LISTE DES FIGURES	xxix
INTRODUCTION GENERALE	1
I. REVUE DE LA LITTERATURE	4
I.1. Généralités sur le macabo	4
I.1.1. Origine et distribution géographique	4
I.1.2. Présentation botanique	5
I.1.3. Reproduction.....	6
I.1.4. Ecologie	6
I.1.5. Diversité génétique et variétés de macabo.....	7
I.1.6. Taxonomie	8
I.1.7. Importance du macabo.....	8
I.1.7.1. Importance nutritionnelle	8
I.1.7.2. Importance économique	9
I.1.7.3. Importance médicale	10
I.2. Pourriture racinaire	10
I.2.1. Biologie de <i>P. myriotylum</i>	11
I.2.2. Distribution et Taxonomie de <i>P. myriotylum</i>	12
I.2.3. Ecologie de <i>P. myriotylum</i>	13
I.2.4. Interaction <i>Xanthosoma sagittifolium</i> - <i>Pythium myriotylum</i>	13
I.2.5. Moyens de lutte contre la pourriture racinaire.....	14
I.2.5.1. Lutte culturale	14
I.2.5.2. Lutte génétique.....	14
I.2.5.3. Lutte chimique	15
I.2.5.4. Lutte biologique	15
I.3. Généralités sur les actinobactéries (actinomycètes).....	16
I.3.1. Définition et principales caractéristiques.....	16

I.3.2. Morphologie des actinobactéries	17
I.3.3. Physiologie de développement	19
I.3.3.1. Oxygène	19
I.3.3.2. pH.....	19
I.3.3.3. Température	19
I.3.3.4. Tolérance au NaCl.....	20
I.3.4. Cycle de développement des actinobactéries.....	20
I.3.5. Taxonomie des actinobactéries	21
I.3.5.1. Première période	21
I.3.5.2. Seconde période	22
I.3.5.3. Troisième période.....	22
I.3.5.4. Quatrième période.....	23
I.3.6. Distribution des actinobactéries.....	23
I.3.7. Fonction écologique des actinobactéries	23
I.3.8. Importance biotechnologique des actinobactéries	24
I.3.8.1. Production des antibiotiques	24
I.3.8.2. Production des enzymes.....	24
I.3.8.3. Amélioration de la qualité de sol agricole	25
I.3.9. Actinobactéries comme agents de lutte biologique	25
I.3.9.1. Actinobactéries comme agents de biocontrôle des maladies des plantes	25
I.3.9.1.1. Production des antibiotiques	25
I.3.9.1.2. Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires.....	27
I.3.9.1.3. Production des sidérophores.....	27
I.3.9.1.4. Production des composés volatils.....	28
I.3.9.2. Actinobactéries comme des agents promoteurs de la croissance de la plante (PGP)	28
I.3.9.2.1. Mécanismes directs des microorganismes PGP	29
I.3.9.2.2. Mécanismes indirects des microorganismes PGP.....	32
II. MATERIEL ET METHODES.....	35
II.1. MATERIEL	35
II.1.1. Matériel végétal	35
II.1.2. Matériel édaphique	35
II.1.3. Matériel biologique	36
II.2. METHODES.....	37

II.2.1. Criblage des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de <i>P. myriotylum</i> et d'autres agents phytopathogènes.....	37
II.2.1.1. Echantillonnage, prétraitement et analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	37
II.2.1.1.1. Echantillonnage.....	37
II.2.1.1.2. Prétraitement des échantillons de sol	38
II.2.1.1.3. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	38
II.2.1.2. Isolement, énumération, purification et conservation des actinobactéries	39
II.2.1.2.1. Isolement des actinobactéries à partir des andosols rhizosphériques.....	39
II.2.1.2.2. Enumération des actinobactéries des andosols rhizosphériques	39
II.2.1.2.3. Isolement des actinobactéries à partir des racines de macabo	40
II.2.1.2.4. Purification et conservation des actinobactéries	40
II.2.1.3. Préparation du stock de spores d'actinobactéries	40
II.2.1.4. Activités antifongiques des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de <i>Pythium myriotylum</i> et d'autres champignons phytopathogènes.....	41
II.2.1.5. Activités antibactériennes des isolats d'actinobactéries	42
II.2.2. Caractérisation polyphasique des isolats antagonistes	42
II.2.2.1. Caractérisation morphologique.....	42
II.2.2.1.1. Morphologie des colonies	42
II.2.2.1.2. Microscopie optique (technique des lamelles).....	42
II.2.2.1.3. Microscopie électronique	43
II.2.2.2. Caractérisation culturelle	43
II.2.2.3. Caractérisation physiologique	43
II.2.2.3.1. Production des pigments mélanoides et des pigments diffusibles	44
II.2.2.3.2. Effet de la température, pH et la salinité sur la croissance des isolats d'actinobactéries	44
II.2.2.3.3. Résistance aux antibiotiques	44
II.2.2.3.4. Utilisation de différentes des sources de carbone	44
II.2.2.3.5. Utilisation de différentes sources d'azote	45
II.2.2.4. Caractérisation biochimique	45
II.2.2.4.1. Test de la catalase	45
II.2.2.4.2. Test de l'oxydase	46
II.2.2.4.3. Production de la nitrate réductase	46
II.2.2.4.4. Production de l'uréase.....	47
II.2.2.4.5. Dégradation de la gélatine.....	47

II.2.2.4.6. Hydrolyse de l'amidon.....	48
II.2.2.4.7. Hydrolyse de la caséine.....	49
II.2.2.4.8. Hydrolyse de l'arbutine et de l'esculine.....	49
II.2.2.5. Identification moléculaire	50
II.2.2.5.1. Extraction de l'ADN	50
II.2.2.5.2. Amplification PCR de la séquence d'ADNr 16S.....	51
II.2.2.5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	52
II.2.2.5.4. Séquençage de l'ARNr 16S	52
II.2.2.5.5. Analyse phylogénétique	53
II.2.3. Evaluation des traits de biocontrôle et des propriétés promotrices de la croissance de la plante des souches d'actinobactéries antagonistes ainsi que leurs effets sur les vitroplants de macabo.....	53
II.2.3.1. Détermination des traits de biocontrôle chez les souches antagonistes.....	53
II.2.3.1.1. Recherche de la production des métabolites volatils	53
II.2.3.1.2. Production des enzymes d'intérêt agronomique	54
II.2.3.2. Détermination des propriétés promotrices de la croissance de la plante (PGP) des souches antagonistes	56
II.2.3.2.1. Fixation de l'azote.....	56
II.2.3.2.2. Solubilisation du phosphate	56
II.2.3.2.3. Production des sidérophores	57
II.2.3.2.4. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA).....	57
II.2.3.2.5. Production de l'enzyme 1-aminocyclopropane carboxylique (ACC) désaminase.....	57
II.2.3.2.6. Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	57
II.2.3.2.7. Production de l'ammoniac (NH ₃).....	58
II.2.3.3. Effet des souches antagonistes sur la croissance racinaire des vitroplants de macabo.....	58
II.2.3.3.1. Production des vitroplants de macabo	58
II.2.3.3.2. Co-culture vitroplants de macabo / actinobactéries	60
II.2.3.3.3. Extraction et dosage des protéines totales à partir des racines des vitroplants de macabo	61
II.2.3.3.4. Activité des peroxydases.....	62
II.2.3.4. Identification moléculaire des marqueurs de stimulation de la croissance des plantes et de biocontrôle chez les souches antagonistes.....	63
II.2.3.4.1. Détection du gène <i>iaaM</i> de l'Acide Indole Acétique.....	63

II.2.3.4.2. Détection du gène <i>chiC</i> des chitinases	64
II.2.4. Caractérisation des métabolites bioactifs produits par les potentiels <i>Streptomyces</i> antagonistes	65
II.2.4.1. Préparation des extraits bruts	65
II.2.4.2. Activités antifongiques des extraits bruts vis-à-vis de <i>P. myriotylum</i>	65
II.2.4.3. Détermination de la concentration inhibitrice (CI) des extraits bruts	66
II.2.4.4. Analyse des composés volatils contenus dans les extraits bruts des souches antagonistes par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	66
II.2.4.5. Analyse des composés non volatils contenus dans les extraits bruts des souches antagonistes par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	67
II.2.5. Analyses statistiques	68
III. RESULTATS ET DISCUSSION	69
III.1. Criblage des isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques vis-à-vis de <i>P. myriotylum</i> et leur identification	69
III.1.1. Propriétés physico-chimiques des sols	69
III.1.2. Isolement et dénombrement des isolats d'actinobactéries	69
III.1.3. Tests d'antagonisme	72
III.1.3.1. Activités antifongiques	72
III.1.3.2. Activités antibactériennes	74
III.1.4. Caractérisation phénotypique	75
III.1.4.1. Observation macroscopique et caractères cultureux des isolats antagonistes	75
III.1.4.2. Aspects microscopiques des isolats antagonistes	78
III.1.4.2.1. Microscopie optique	78
III.1.4.2.2. Microscopie électronique	79
III.1.4.3. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats antagonistes	80
III.1.4.5. Identification moléculaire des isolats antagonistes	82
Discussion partielle 1	85
Conclusion partielle 1	88
III.2. Evaluation des <i>Streptomyces</i> antagonistes pour les traits de biocontrôle, les propriétés promotrices de la croissance de la plante	89
III.2.1. Evaluation des propriétés de biocontrôle des <i>Streptomyces</i> antagonistes	89
III.2.1.1. Production des métabolites volatils	89

III.2.1.2. Production des enzymes hydrolytiques	89
III.2.2. Quelques propriétés promotrices de la croissance de la plante (PGP).....	92
III.2.2.1. Fixation de l'azote et solubilisation du phosphate	92
III.2.2.2. Production de l'acide cyanhydrique (HCN), des sidérophores et de l'ACC désaminase.....	92
III.2.2.4. Production de l'ammoniac (NH ₃) et de l'Acide Indole Acétique (AIA).....	93
III.2.3. Effet des <i>Streptomyces</i> sur la croissance racinaire de macabo <i>in vitro</i>	94
III.2.3.1. Production des vitroplants de macabo	94
III.2.3.2. Co-culture des vitroplants de macabo avec les <i>Streptomyces</i> antagonistes	94
III.2.3.3. Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur la longueur racinaire des vitroplants de macabo.....	95
III.2.3.4. Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur le nombre de racines primaires et secondaires des vitroplants de macabo	96
III.2.3.5. Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur le poids frais racinaire des vitroplants de macabo	97
III.2.4. Effet des <i>Streptomyces</i> sur les marqueurs biochimiques	97
III.2.4.1. Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur la teneur en protéine totale	97
III.2.4.1. Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur l'activité des peroxydases	98
III.2.5. Détection du gène (<i>chiC</i>) des chitinases et du gène (<i>iaaM</i>) de l'Acide Indole Acétique chez les <i>Streptomyces</i> antagonistes	99
Discussion partielle 2	100
Conclusion partielle 2.....	104
III.3. Caractérisation partielle des métabolites bioactifs produits par les <i>Streptomyces</i> antagonistes.....	105
III.3.1. Production des extraits bruts	105
III.3.2. Activité antifongique des extraits bruts.....	105
III.3.3. Détermination des concentrations minimales effectives (CME) des différents extraits bruts.....	105
III.3.4. Analyse des molécules volatiles contenues dans les extraits bruts en utilisant la Chromatographie en Phase Gaseuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)	106
III.3.4.1. Analyse GC-MS de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4	106
III.3.4.2. Analyse GC-MS de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1	108
III.3.4.3. Analyse GC-MS de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2.....	109
III.3.4.4. Analyse GC-MS de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4.....	110
III.3.5. Analyse des molécules non volatiles.....	111

III.3.5.1. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4.	111
III.3.5.2. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1	116
III.3.5.3. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2	121
III.3.5.4. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4	123
Discussion partielle 3	127
Conclusion partielle 3	130
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	131
1. Conclusion générale	131
2. Perspectives	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
ANNEXES	xxxiii
PUBLICATIONS	xxxiv

RESUME

Le macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) est une plante à tubercule d'intérêt agro-alimentaire et économique. La pourriture racinaire causée par l'Oomycète *Pythium myriotylum* est la principale maladie qui limite la croissance et la productivité de cette culture. Pour réduire l'utilisation des pesticides chimiques utilisés pour lutter contre cet oomycète tellurique, une alternative plus prometteuse, écologique et basée sur l'utilisation des microorganismes antagonistes est nécessaire. Les actinobactéries sont reconnues comme ayant l'habilité à produire les métabolites antimicrobiens, de potentiels agents de biocontrôle et promoteurs de la croissance de la plante. Le présent travail a pour but d'isoler, d'évaluer et de caractériser les actinobactéries des racines et de la rhizosphère des plants sains de *X. sagittifolium* des localités autour du Mont Cameroun pour leurs potentielles activités antagonistes contre *P. myriotylum* et/ou leur habilité à promouvoir la croissance de la plante. Les actinobactéries ont été isolées sur les milieux de cultures supplémentés d'antibiotiques nystatine et acide nalixidique. La culture en duel a été utilisée pour cribler les isolats contre les agents phytopathogènes fongiques incluant *P. myriotylum* et la méthode de diffusion a été utilisée pour évaluer les activités antibactériennes. Les isolats antagonistes ont été caractérisés sur le plan phénotypique (morphologique, cultural, physiologique, biochimique) et génétique. D'autre part, les souches antagonistes ont été caractérisées *in vitro* pour l'habilité à produire les enzymes hydrolytiques extracellulaires, les traits promoteurs de la croissance de la plante et leurs effets ont été évalués sur les vitroplants de macabo. Par ailleurs, quelques marqueurs de biocontrôle (gène *chiC*) des chitinases et de promotion de la croissance de la plante (gène *iaaM*) de l'Acide Indole Acétique ont été recherchés chez les souches antagonistes en utilisant la technique PCR. Enfin, les métabolites secondaires bioactifs de nature volatile et non volatile produits par les souches antagonistes ayant présentées des pourcentages d'inhibition ≥ 80 % contre *P. myriotylum* après confrontation directe, ont été partiellement caractérisés en utilisant les techniques d'analyses GC-MS et LC-MS/MS en tandem respectivement. Un total de 19 isolats distincts d'actinobactéries (07 endophytes et 12 rhizosphériques) a été obtenu sur la base des caractéristiques morphologiques. Après criblage de ces isolats contre *P. myriotylum* et les autres champignons phytopathogènes, 07 isolats (PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 et PFEL2) ont présenté de fortes activités antagonistes contre *P. myriotylum*, les autres champignons et les bactéries phytopathogènes testés. Les caractères phénotypiques combinés à l'analyse moléculaire des isolats antagonistes ont révélé leur appartenance au genre *Streptomyces* spp. Cependant, PERM2 et PERM4 ayant des pourcentages d'homologies de 98 % et 97 % respectivement avec les souches proches repertoriées dans la base de données Genbank seraient de nouvelles espèces. En outre, les souches antagonistes ont montré l'habilité

à produire les enzymes de lyse de la paroi des phytopathogènes fongiques et bactériens tels que les chitinases, β -1,3-glucanases, protéases, lipases, cellulases et pectinases. Additionnellement, elles ont été capables de produire les molécules promotrices de la croissance de la plante telles que l'Acide Indole Acétique (AIA), les sidérophores, l'Acide Cyanhydrique (HCN), l'ACC désaminase, l'ammoniac (NH_3), de solubiliser le phosphore et fixer l'azote atmosphérique (N_2). Cependant, PERM2 et PERM4 ont présenté des effets remarquables sur la croissance racinaire des vitroplants de macabo (longueur principale, poids frais et nombre de racines secondaires) et le gène (*chiC*) des chitinases a été détecté ces deux souches. L'analyse GC-MS des extraits bruts de *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4, a révélé la présence d'un nombre important de composés volatils dotés d'activités antimicrobiennes et de propriétés promotrices de la croissance de la plante dont les majoritaires représentés par les hauts pics sont : acide linoléique, acide oléique, acide 2,6-dihexadécanoate-1(+)-ascorbique, acide trifluoroacétique, tétraméthylphénazyne et butane-2,3-diol. Sur la base de l'analyse LC-MS/MS en tandem, les composés bioactifs non volatils appartenant au groupe des antibiotiques (amicoumarine, fongichromine, rapamycine), des acides phénoliques (acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, acide *P*-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide férulique, acide hydroxycinnamique, acide 7-oxooctadécanoïque et acide vanilique) et des acides aminés (N-actétyl-D-phénylanine) ayant les propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes et promotrices de la croissance de la plante ont été identifiés dans les différents extraits bruts. Ces résultats suggèrent que les souches *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4 et PFK4 seraient de potentiels candidats pour la formulation des biofongicides et biofertilisants utilisables pour une agriculture durable, compétitive et respectueuse de l'environnement.

Mots-clés: *X. sagittifolium*, *P. myriotylum*, *Streptomyces*, Biocontrôle, Potentiel stimulateur de croissance, GC-MS, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) is an important nutritional and economic tuber crop. Cocoyam root rot disease (CRRD) caused by *Pythium myriotylum* is the major disease that limits growth and productivity of this crop. To reduce the usage of chemicals, an alternative for a sustainable control method is necessary. Actinobacteria are known to produce antimicrobial compounds, are potential biocontrol agents and plant growth promoters. This study was carried out to isolate, evaluate and characterize actinobacteria from roots and rhizosphere of healthy cocoyam from localities around Mount Cameroon for their antagonistic activities against *P. myriotylum* and / or their ability to promote plant growth. Actinobacteria were isolated on culture media supplemented with antibiotics such as nystatin and nalixidic acid. Dual culture assay was used to screen the isolates against fungal phytopathogens including *P. myriotylum* and diffusion method was used for antibacterial activities. The antagonistic isolates were characterized morphologically, physiologically, biochemically and genetically. Furthermore, these isolates were characterized for production of extracellular hydrolytic enzymes, Plant Growth Promoting (PGP) traits and their effects were evaluated on tissue culture-derived cocoyam plantlets. Moreover, biocontrol marker (gene *chiC*) and plant growth promotion marker (gene *iaaM*) were searched in the antagonistic strains using PCR technique. Finally, volatile and non volatile secondary bioactive metabolites produced by the antagonistic strains that showed ≥ 80 % percentage inhibition against *P. myriotylum* after dual assay, were partially characterized using GC-MS and LC-MS/MS analyses respectively. A total of 19 different actinobacterial isolates (07 endophytic and 12 rhizospheric) was obtained from roots and rhizosphere of healthy cocoyam plants based on morphological characteristics. After screening these isolates against *P. myriotylum* and other fungi, 07 isolates namely PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 and PFEL2 showed high antagonistic activities against *P. myriotylum*, other fungal and bacteria phytopathogens. Phenotypic characters combined to molecular identification of antagonistic isolates indicated that all belonged to *Streptomyces* spp. genus. However, isolates PERM2 and PERM4 with 98 % and 97 % of similarities respectively with the closed strains retrieved from Genbank databases might represent novel species. The antagonistic *Streptomyces* strains showed abilities to produce cell wall degrading enzymes such as chitinase, β -1,3-glucanase, protease, lipase, cellulase and pectinase. They were also able to produce PGP traits like siderophores, Indole Acetic Acid (IAA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, ammoniac (NH₃), phosphate solubilization and nitrogen fixation (N₂). However, PERM2 and PERM4 showed remarkable effects on cocoyam plantlets growth parameters (root length, fresh weight and secondary roots) and the gene (*chiC*) of chitinases was detected into these two strains. GC-MS analysis of

Streptomyces sp. PFK4, PERM1, PERM2 and PERM4 ethyl acetate crude extracts, revealed the presence of several volatile bioactive metabolites which possess antimicrobial activities, PGP properties and the most representatives characterized by high peaks were linoleic acid (Z, Z), oleic acid, 1-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate, trifluoroacetic acid, tetramethylphenazyn and 2,3-butanediol. Based on LC-MS/MS analysis, non-volatile bioactive metabolites belongs to antibiotics (amicoumarin, fungichromin, rapamycin), phenolic acids (3, 30-di-O-methylallegic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, cafeic acid, ferulic acid, hydroxycinnamic acid, 7-oxooctadecanoic acid and vanilic acid) and amino acids (N-acetyl-D-phenylalaine) with antifungal, antibacterial, antioxidant, PGP properties were identified in the crude extracts. Therefore, *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4 and PFK4 could be developed as potential candidates in formulation of biofungicides and biofertilizers for a sustainable and environmentally friendly agriculture.

Key words: *X. sagittifolium*, *P. myriotylum*, *Streptomyces*, Biocontrol, Plant Growth Promoting, GC-MS, LC-MS/MS.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abs	Absorbance
ACC	Aminocyclopropane-1-carboxylate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AIA	Acide Indole Acétique
AL	Agent de lutte
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ANOVA	Analyse de la variance
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
dNTP	Désoxyribonucléotide
ddNTPs	Didésoxyribonucléotides
DAP	Acide diaminopimélique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D.O	Densité optique
CaCO ₃	Carbonate de calcium
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
G + C	Coefficient de Chargaff
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
GLM	Glucose-Extrait de levure-Malt
HCl	Chlorure d'hydrogène
HCN	Acide cyanhydrique
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
IRAD	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography complemented with mass spectrometry</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₃	Ammoniac
pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potatoe Dextrose Agar</i>

PEKO	Peguy Ekona
PEL1	Peguy Ekona Lelu 1
PEL2	Peguy Ekona Lelu 2
PERM	Peguy Endophyte des Racines de Macabo
PFBOT	Peguy Forêt de Botéva
PFEL2	Peguy Forêt Ekona Lelu2
PFK	Peguy Forêt Kumba
PGP	<i>Plant Growth Promotion</i>
PR	Protéine de résistance
P/V	Poids par volume
rpm	Rotation par minute
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
T.A	Température ambiante
TAE	Tris-acétate-EDTA
Tris	Hydroxyméthylaminométhane
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UFC	Unité formant colonies
YME	<i>Yeast malt extract</i>
YMEA	<i>Yeast malt extract agar</i>
UE	Unité Enzymatique
UFC	Unité formant colonie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Types de parois en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires chez les actinobactéries.....	22
Tableau II: Antibiotiques produits par les actinobactéries utilisées en biocontrôle.....	26
Tableau III: Origine des échantillons de sols, racines et boutures de macabo.....	36
Tableau IV: Composition du milieu réactionnel de la PCR.....	52
Tableau V: Cycles d'amplification du gène d'ADN 16S.....	52
Tableau VI: Différents traitements réalisés.....	60
Tableau VII: Composition du milieu réactionnel de la PCR du gène de l' <i>iaaM</i>	63
Tableau VIII: Cycles d'amplification du gène <i>iaaM</i>	64
Tableau IX: Composition du milieu réactionnel de la PCR du gène <i>chiC</i>	64
Tableau X: Cycles d'amplification du gène <i>chiC</i>	65
Tableau XI: Propriétés physico-chimiques des échantillons de sol collectés dans les différents sites d'échantillonnage.....	69
Tableau XII: Codes et fréquences d'apparition des isolats d'actinobactéries endophytes des racines de macabo dans différentes localités.....	70
Tableau XIII: Nombre d'unité formant colonies (UFC) par gramme de sol sec sur les milieux Bennett et GLM.....	71
Tableau XIV: Codes et fréquences des isolats d'actinobactéries obtenus à partir des échantillons de sols.....	72
Tableau XV: Antagonismes des 19 isolats d'actinobactéries contre <i>P. myriotylum</i> et 3 autres champignons pathogènes.....	73
Tableau XVI: Aspect morphologique des colonies des isolats d'actinobactéries antagonistes sur le milieu ISP2.....	76
Tableau XVII: Caractéristiques culturales des isolats d'actinobactéries antagonistes sur les différents milieux ISP.....	77
Tableau XVIII: Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats antagonistes.....	81
Tableau XIX: Identification moléculaire selon NCBI des souches d'actinobactéries antagonistes.....	83
Tableau XX: Pourcentages d'inhibition de la croissance de <i>P. myriotylum</i> par les métabolites volatils produits par les <i>Streptomyces</i> antagonistes après 7 jours d'incubation sur le milieu PDA.....	89
Tableau XXI: Traits promoteurs de la croissance de plante des <i>Streptomyces</i> antagonistes	92

Tableau XXII: Masses des extraits bruts (g) obtenus après fermentation solide.	105
Tableau XXIII: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur à égale à 1 % contenus dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 obtenus après chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).	107
Tableau XXIV: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % contenus dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).	108
Tableau XXV: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égale 1 % contenus dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC- MS).	109
Tableau XXVI: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égale 1 % contenus dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC- MS).	110
Tableau XXVII: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4.....	115
Tableau XXVIII: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1.	120
Tableau XXIX: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2	122
Tableau XXX: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4.	126

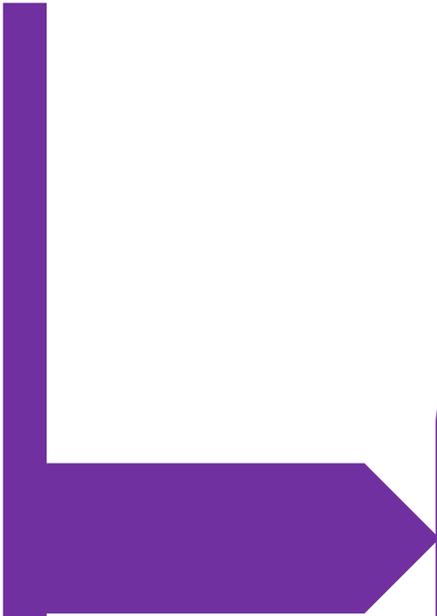
LISTE DES FIGURES

Figure 1: Production globale de <i>X. sagittifolium</i> dans le Monde	4
Figure 2: Morphologie de la partie aérienne d'un plant de <i>X. sagittifolium</i>	5
Figure 3: Cycle de développement de <i>X. sagittifolium</i>	6
Figure 4: Coupe transversale du rhizome des différents cultivars de <i>X. sagittifolium</i> ..	7
Figure 5: Symptômes de la pourriture racinaire sur la partie souterraine d'un plant de macabo.	11
Figure 6: Cycle infectieux des <i>Pythium</i> spp.	12
Figure 7: Parcelle de plants sains de macabo et parcelle de plants infectés de macabo.....	14
Figure 8: Chaînes de spores produites par les différentes espèces d'actinobactéries.....	18
Figure 9: Morphologie des hyphes d'actinobactéries en croissance dans le milieu liquide.....	19
Figure 10: Cycle de vie des actinobactéries sporulantes.	20
Figure 11: Morphologie de la surface des spores des actinobactéries.....	21
Figure 12: Promotion de la croissance des plantes par les microorganismes PGP.	29
Figure 13: Rôle de l'Acide Indole Acétique dans l'amélioration de la croissance de la plante	31
Figure 14: Racines et boutures prélevées à partir des plants d'apparence saine de macabo....	35
Figure 15: Souches de champignons phytopathogènes.	36
Figure 16: Souches de bactéries pathogènes <i>A. tumefaciens</i> et <i>S. Scabiei</i> EF-35.....	37
Figure 17: Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons	37
Figure 18: Protocole de préparation de la chitine colloïdale	54
Figure 19: Explants de macabo à stériliser.....	59
Figure 20: Confrontation directe des isolats d'actinobactéries contre <i>P. myriotylum</i>	74
Figure 21: Activités antibactériennes des isolats d'actinobactéries vis-à-vis d' <i>A.tumefaciens</i> et <i>S. scabiei</i> EF-35.....	75
Figure 22: Aspect macroscopique des isolats d'actinobactéries antagonistes sur le milieu ISP2.	76
Figure 23: Apparence microscopique de la morphologie des chaînes de spores des isolats d'actinobactéries antagonistes après 14 jours de culture à 30 °C sur le milieu ISP2 (G. 1000x).....	78
Figure 24: Morphologie des surfaces d'ornementations des spores des isolats d'actinobactéries antagonistes (x7000, 15KV).....	79
Figure 25: Activités amylasiques des isolats d'actinobactéries antagonistes après 48 h d'incubation à 30 °C.....	82
Figure 26: Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des isolats antagonistes.. ..	82

Figure 27: Relation phylogénétique entre les isolats antagonistes et les espèces représentatives basée sur les séquences 16S d'ARNr construite en utilisant la méthode de neighbor-joining et le logiciel MEGA 7.....	84
Figure 28: Activités enzymatiques des <i>Streptomyces</i> antagonistes.....	91
Figure 29: Production des sidérophores sur le milieu chrome azurol (CAS) agar par les <i>Streptomyces</i> antagonistes après 7 jours d'incubation à 30 °C.	93
Figure 30: Production de l'ammoniac et de l'Acide Indole Acétique par les différents <i>Streptomyces</i> antagonistes.....	93
Figure 31: Micropropagation de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (cultivar blanc).....	94
Figure 32: Effet <i>in vitro</i> des souches d'actinobactéries antagonistes sélectionnées sur la croissance racinaire des vitroplants de macabo après 35 jours de co-culture sur milieu DKW.	95
Figure 33: Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur la longueur des racines principales des vitroplants de macabo.....	96
Figure 34: Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur le nombre de racines primaires et de racines secondaires des vitroplants de macabo.....	96
Figure 35: Effet des <i>Streptomyces</i> antagonistes sur le poids frais racinaire des vitroplants de macabo.	97
Figure 36: Teneur en protéines totales en équivalence de BSA/g de matière fraîche dans les racines de vitroplants de macabo en fonction des traitements.	98
Figure 37: Variation de l'activité péroxidasique en UE/min/g de matière fraîche dans les racines de vitroplants de macabo en fonction des traitements.	98
Figure 38: Profiles électrophorétiques issus du produit de l'amplification PCR du gène <i>chiC</i> des chitinases et du gène <i>iaaM</i> de l'Acide Indole Acétique chez les <i>Streptomyces</i> antagonistes.	99
Figure 39: Effet des extraits bruts sur la croissance de <i>P. myriotylum</i> après 7 jours d'incubation à 28 ± 2 °C.....	105
Figure 40: Effet des différentes concentrations des extraits bruts de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 sur la croissance de <i>P. myriotylum</i> après 7 jours d'incubation à 28 °C.....	106
Figure 41: Détection de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	111
Figure 42: Détection de l'amicoumacine A dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	112

Figure 43: Détection de la fongichromine dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	112
Figure 44: Détection de la N-Acétyl-D, L-Phénylalanine dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	113
Figure 45: Détection de la rapamycine dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	113
Figure 46: Structures des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de la souche <i>Streptomyces</i> sp. PFK4, l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, l'amicoumacine A, la fongichromine, N-Acétyl-D, L-phénylanine et la rapamicine A.....	114
Figure 47: Détection de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	116
Figure 48: Détection du dérivé de l'acide caféïque dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	117
Figure 49: Détection du dérivé de l'acide férulique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'anlayse LC-MS/MS en tandem.	117
Figure 50: Détection de N-Acétyl-D, L-phényalanine dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	118
Figure 51: Détection de l'isomère de l'acide <i>p.</i> hydroxybenzoïque dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	118
Figure 52: Détection de l'acide Vanilique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	119
Figure 53: Structures des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM1: l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique, N-Acéthyl-D, L-phénylanine, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide <i>p.</i> hydroxybenzoïque et l'acide vanilique.....	119
Figure 54: Détection de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.....	121
Figure 55: Structure de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique identifié dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM2 par analyse LC-MS/MS en tandem.	121
Figure 56: Détection de l'isomère de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	123
Figure 57: Détection de l'isomère de l'acide hydroxycinamique ou acide coumarique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	124

Figure 58: Détection de l'acide 7-oxooctadécanoïque dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	124
Figure 59: Détection de l'acide vanilique dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.	125
Figure 60: Structure des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de <i>Streptomyces</i> sp. PERM4: le dérivé de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique, l'acide vanilique et l'acide 7-oxooctadécanoïque.	125



*INTRODUCTION
GENERALE*



INTRODUCTION GENERALE

Le macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) est l'une des six plus importantes plantes à racines et à tubercules (FAOSTAT, 2012). Il est consommé par plus de 400 millions de personnes à travers le monde (Vanecker et Slaats, 2013). La production mondiale annuelle du macabo est d'environ 10 millions de tonnes (FAOSTAT, 2014). L'Afrique est le principal producteur contribuant à près de 74 % du total de la production mondiale (FAOSTAT, 2018). Au Cameroun, le macabo est la seconde plante à tubercule après le manioc consommé par plus de 13 millions de personnes avec une production annuelle d'environ 1.550.973 tonnes (FAOSTAT, 2013). Le macabo est cultivé dans presque toutes les zones agro-écologiques du Cameroun et fait partie intégrante de l'art culinaire de sept des dix régions du pays. Son importance est surtout due à la richesse de ses tubercules et ses feuilles en protéines, vitamines, acides aminés, antioxydants et en sels minéraux (Sefa-Dedeh et Agyir-Sackey, 2004).

Le macabo est donc d'une importance indéniable. Cependant, la pourriture racinaire causée par l'oomycète *P. myriotylum* est la principale maladie qui limite la croissance et la productivité de cette plante au Cameroun (Tambong et Hölfte, 2001; Omokolo *et al.*, 2003). Cet Oomycète téllurique attaque la plante à tous les stades de développement et cause des dégâts énormes allant jusqu'à 90 % de perte du rendement de la production du macabo et impacte significativement l'économie (Zang et Yang, 2000). Bien que les symptômes de la pourriture racinaire et l'agent pathogène responsable de cette maladie ont été bien caractérisés (Boudjeko *et al.*, 2005; Nyochembeg *et al.*, 2007), les connaissances liées aux mesures de contrôle de la pourriture racinaire sont encore insuffisantes. En plus, aucune variété résistante de macabo n'a été jusqu'à présent développée. Pour réduire les dégâts occasionnés par *P. myriotylum* sur la production du macabo, la méthode de lutte chimique basée sur l'utilisation excessive des fongicides et fertilisants chimiques est la plus pratiquée. Mais, cette méthode présente de nombreuses limites telles que le coût onéreux des intrants chimiques, l'émergence des souches pathogènes résistantes, l'efficacité peu durable des produits chimiques, ainsi que la haute toxicité des composés chimiques qui présentent les effets néfastes sur la santé des agriculteurs, des consommateurs et sur l'environnement. Aujourd'hui, avec les avancées biotechnologiques et agronomiques, la méthode écologique plus efficace, respectueuse de la santé humaine et de l'environnement est une alternative viable. Cette lutte écologique consiste à exploiter des microorganismes bénéfiques qui inhibent les microorganismes pathogènes et améliorent la santé de la plante (Kumar *et al.*, 2016).

Un ensemble d'études réalisées met en exergue la capacité de plusieurs genres microbiens dans le contrôle de la pourriture racinaire du macabo. Ainsi, le traitement *in vivo* des plants de macabo avec les souches de *Trichoderma asperellum* (*Trichoderma* PR10 et PR11) isolées et caractérisées par l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) du

Cameroun pouvait réduire de 50 %, les dégâts causés par *P. myriotylum* (Mbarga *et al.*, 2012). En outre, les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* (*Pseudomonas* CMR5c et CMR12a) isolées à partir de la rhizosphère des plants sains de macabo ont montré des activités contre *P. myriotylum* et de ce fait ont été considérées comme de potentiels agents de lutte contre la pourriture racinaire du macabo (Perneel *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les observations en champs, ont montré que les andosols des localités situées autour du Mont Cameroun sont supprimés vis-à-vis de *P. myriotylum*. Adiobo *et al.* (2007), ont montré que la composition élevée en minéraux des andosols pourrait justifier la suppressivité de ces sols. En outre, cette suppressivité était réduite significativement après pasteurisation et traitement avec les fongicides et les bactéricides (Adiobo *et al.*, 2007). Sur la base de ces connaissances, la recherche a été initiée pour évaluer l'utilisation des différents groupes de microorganismes dans le contrôle de la pourriture racinaire. De ce fait, les actinobactéries, un des groupes majoritairement présents dans les andosols supprimés des localités autour du Mont Cameroun, sont reconnues comme des microorganismes colonisant les rhizosphères et les tissus des plantes (Dombou *et al.*, 2001 ; Goudjal *et al.*, 2013).

Les actinobactéries sont des bactéries Gram positif caractérisées par un génome avec une teneur élevée en base G+C (guanine + cytosine) comprise entre 69 % < G + C < 78 % (Gowdar *et al.*, 2018). Elles sont distribuées dans l'ensemble des écosystèmes aquatiques et terrestres (Barka *et al.*, 2016). Leur présence dans les tissus des végétaux (racines, feuilles, tiges et écorces) sans causer de dommages ni de blessures à la plante hôte, est caractéristique de leur endophycité (Matsumoto et Takahashi, 2017). Plusieurs espèces d'actinobactéries rhizosphériques et endophytes en particulier celles appartenant au genre *Streptomyces* sont reconnues pour favoriser la croissance des plantes et sont dites PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (Boudjeko *et al.*, 2017; Gowdar *et al.*, 2018). Les actinobactéries peuvent promouvoir la croissance de la plante sous des conditions de stress biotique ou abiotique par des mécanismes directs en produisant des phytohormones et en synthétisant d'autres composés comme les sidérophores, l'acide cyanhydrique, l'ACC desaminase et en augmentant la disponibilité des nutriments dans le sol (Pemila, 2018; Yadav *et al.*, 2019). Les actinobactéries agissent indirectement par le biocontrôle en produisant les composés bioactifs tels que les composés volatils et les enzymes hydrolytiques extracellulaires qui inhibent la croissance des agents phytopathogènes (Kaur *et al.*, 2017; Karthikeyan *et al.*, 2018). Les actinobactéries ont gagné l'attention de la communauté scientifique dû à leur habilité à produire une large gamme de métabolites bioactifs avec des structures intéressantes (Barka *et al.*, 2016). Un total de 23 000 métabolites bioactifs sont produits par les microorganismes et parmi cela, 10 000 (45 % du total des métabolites) sont produits par les actinobactéries. Parmi ce groupe de bactérie, 7 600 métabolites (76 %) sont produits uniquement par le genre *Streptomyces* spp. (Berdy, 2012).

Questions de recherche

- [1]. Les racines et les andosols de la rhizosphère des plants de macabo asymptomatiques collectés dans les localités situées autour du Mont Cameroun contiennent-ils les actinobactéries capables d'inhiber la croissance de *P. myriotylum*?
- [2]. Les souches d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques antagonistes sélectionnées sont-elles capables de produire les molécules impliquées dans le biocontrôle et/ou dans la promotion de la croissance de la plante en particulier les vitroplants de *X. sagittifolium*?
- [3]. Quelles sont les molécules bioactives responsables des potentielles activités observées chez les souches d'actinobactéries antagonistes?

Hypothèses de recherche

- [1]. Les racines et les andosols des plants de macabo asymptomatiques collectés dans les localités situées autour du Mont Cameroun contiennent les actinobactéries capables d'inhiber *P. myriotylum*.
- [2]. Les souches d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques antagonistes sélectionnées produisent les molécules bioactives impliquées dans le biocontrôle et la promotion de la croissance de la plante et ont des effets sur les vitroplants de *X. sagittifolium*.
- [3]. Les souches d'actinobactéries antagonistes sélectionnées produisent divers métabolites secondaires bioactifs dotés d'activités biologiques.

Objectif général

L'objectif général de cette étude est d'apporter une contribution à la lutte biologique contre *P. myriotylum*, agent responsable de la pourriture des racines du macabo en utilisant comme outils biologiques tels que les actinobactéries endophytes et rhizosphériques isolées des localités situées autour du Mont Cameroun.

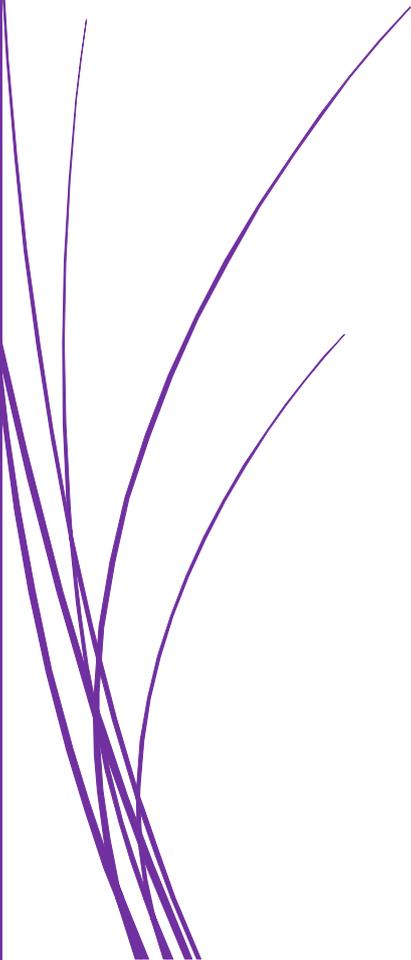
Objectifs spécifiques

Plus spécifiquement il sera question de :

- [1]. Cribler les actinobactéries isolées des racines et des sols de la rhizosphère des plants de *X. sagittifolium* asymptomatiques contre *P. myriotylum*, d'autres agents phytopathogènes tout en identifiant les isolats antagonistes sur la base des caractères polyphasiques;
- [2]. Evaluer les souches d'actinobactéries antagonistes pour l'habilité à produire les traits de biocontrôle, les propriétés promotrices de la croissance de la plante et leurs effets sur les vitroplants de *X. sagittifolium*;
- [3]. Caractériser partiellement les métabolites bioactifs produits par les souches d'actinobactéries antagonistes sélectionnées.

A thick purple vertical bar runs down the left side of the page. A purple arrow points from the bar towards the text box.

*CHAPITRE I:
REVUE DE LA
LITTÉRATURE*



I. REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur le macabo

I.1.1. Origine et distribution géographique

Le macabo est une plante à tubercule originaire de l'Amérique latine, largement cultivée dans les régions tropicales et subtropicales du Monde (Ejikeme *et al.*, 2016). L'Afrique est le principal producteur contribuant à près de 73,6 % de la production mondiale, suivi de l'Asie avec 21,4 %, ensuite l'Océanie avec 4,1 % et enfin l'Amérique avec 0,8% (FAOSTAT, 2018) (Figure 1). Sur le continent Africain, le genre *Xanthosoma* est cultivé en Afrique Centrale et Occidentale avec comme principaux pays producteurs, le Ghana, le Nigeria, le Gabon, la Guinée équatoriale, le Togo et le Cameroun (Perez, 2010).

Au Cameroun, le macabo est cultivé depuis les hauts plateaux de l'Ouest jusqu'aux basses terres forestières du Sud, du 2^{ème} au 9^{ème} degré de latitude Nord; dans 7 des 10 régions (Centre, Sud, Ouest, Nord-Ouest, Sud-Ouest, Est et Littoral) que compte le pays; en forêt et en lisière de savane où il fait l'objet d'une culture traditionnelle (Nzietchueng, 1983; Schafer, 1999). *Xanthosoma sagittifolium* est connu sous plusieurs noms communs tels que «tannia», «tania», «yautia», «cocoyam», «tanier» en anglais; «yautía» en espagnol; «inhame / tajoba» (Bresil); «chou caraïbe» (Martinique); «malanga» (Entilles); «macal» (Mexique); «Tiquisque» (Costa Rica); «otó» (Panama); «oreilles d'éléphant» (Sud de la floride); «matabala» (Sao Tomé-et-Principe); «malangay» (Colombie); «okomo» (Vénézuéla); «mangarito», «mangaras», «mangereto» (Brésil); «arri, kachu» (Inde) et «macabo» (Cameroun) (Lopez *et al.*, 1995; Reyes Castro *et al.*, 2005; Zarate *et al.*, 2013).

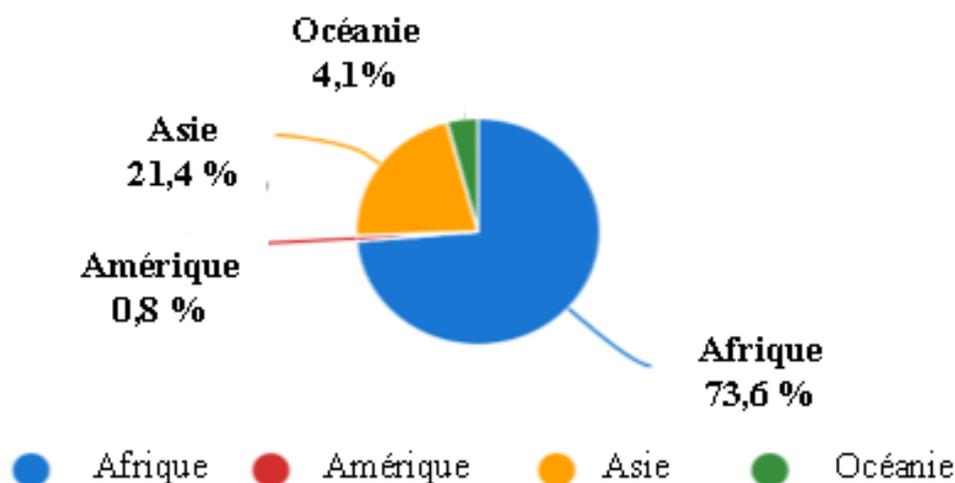


Figure 1: Production globale de *X. sagittifolium* dans le Monde (FAOSTAT, 2018).

I.1.2. Présentation botanique

Le macabo est une herbacée monocotylédone de la famille des *Aracées* pouvant dépasser 2 m de haut (Figure 2a). Son appareil végétatif présente une partie aérienne et une partie souterraine.

La partie aérienne comprend une tige longue d'un mètre et plus qui porte un bouquet de 4 à 6 larges feuilles alternées constituées d'un long pétiole et d'un limbe épais, de couleur verte luisant ayant la forme sagittée ovale ou hastée, caractéristique qui le distingue du taro (*Colocasia esculenta*). Le sommet de la feuille est aigu et les lobes basaux de 6 à 20 cm sont triangulaires. Dans les conditions naturelles, la floraison du macabo est rare; mais lorsque cela se produit, une série de 7 à 8 inflorescences dont le niveau de maturité est graduel se développe à l'aisselle des feuilles (Purseglove, 1985). Chaque inflorescence est composée d'un gros pédoncule, d'une large bractée jaunâtre appelée spathe et d'un spadice qui comprend un axe central avec de nombreuses petites fleurs qui lui sont rattachées (Figure 2b). Toutefois, la floraison de *X. sagittifolium* peut être induite par application de l'acide gibbérellique (GA3) (Ngouo, 1988). De plus, l'apparition des inflorescences varie en fonction du cultivar, de la nature du sol et des conditions climatiques.

La partie souterraine est constituée d'un tubercule mère (rhizome), d'un tubercule principal (corme) et de tubercules secondaires (fils ou cormels). Le tubercule mère est de forme variable, cylindrique ou aplati, ramifié ou non, d'où partent plusieurs racines ainsi que plusieurs tubercules secondaires produits par quantité de 10 ou plus. Le tubercule principal est celui sur lequel se fixent de nombreuses racines et tubercules secondaires. Les tubercules secondaires ou tubercules fils qui sont issus des zones méristématiques des entre-nœuds (Figure 2c). Ils peuvent évoluer en rejets ou repousses (Ngouo, 1988). Le tubercule de macabo a une longueur d'environ 15 à 25 cm et est plus large vers l'apex (côté tourné vers le sol) (Onwueme, 1978; Purseglove, 1985).

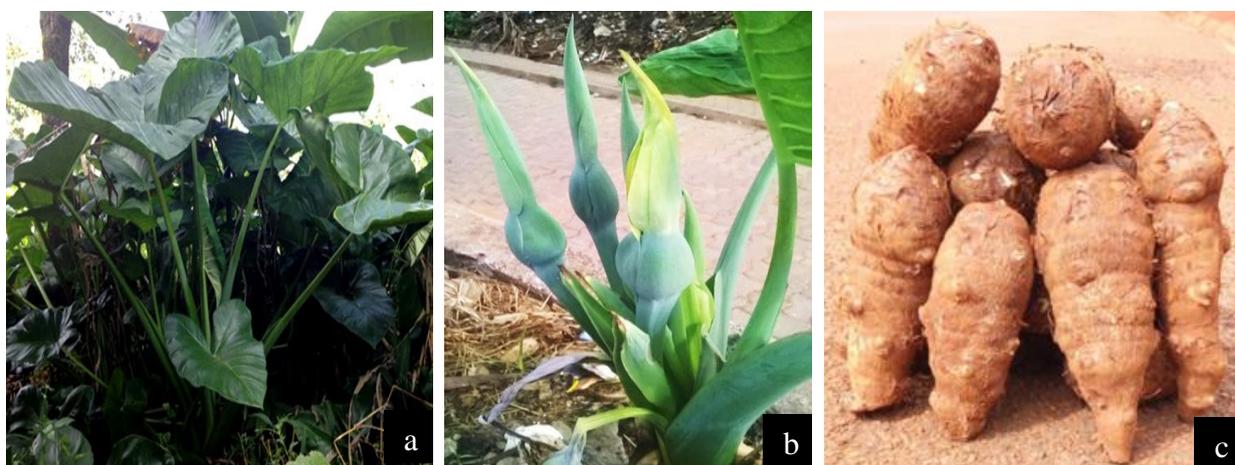


Figure 2: Morphologie de la partie aérienne d'un plant de *X. sagittifolium* (a), des inflorescences de *X. sagittifolium* (b) et des tubercules de *X. sagittifolium* (c) (Photo Djuidje, 2016).

I.1.3. Reproduction

Le cycle de développement du macabo s'étend entre 9-12 mois (Agueguia *et al.*, 2000; Onwueme *et al.*, 1994). La croissance et le cycle de développement du macabo peuvent être répartis en trois principales périodes (Figure 3).

La première période: pendant les deux premiers mois, la croissance est lente; cette période commence avec la germination des pousses et s'achève quand les cormels émergent.

La seconde période: elle est caractérisée par une augmentation rapide de la croissance des pousses jusqu'à 6-7 mois après plantation et c'est durant cette période que les plantes font le maximum de feuilles.

La troisième période: durant cette période, les tubercules ou bulbes secondaires achèvent leur renflement, les feuilles commencent à se flétrir et la masse totale sèche des plantes au-dessus du sol diminue jusqu'à la récolte. Cette sénescence de la plante est utilisée par les agriculteurs comme un indice de maturité.

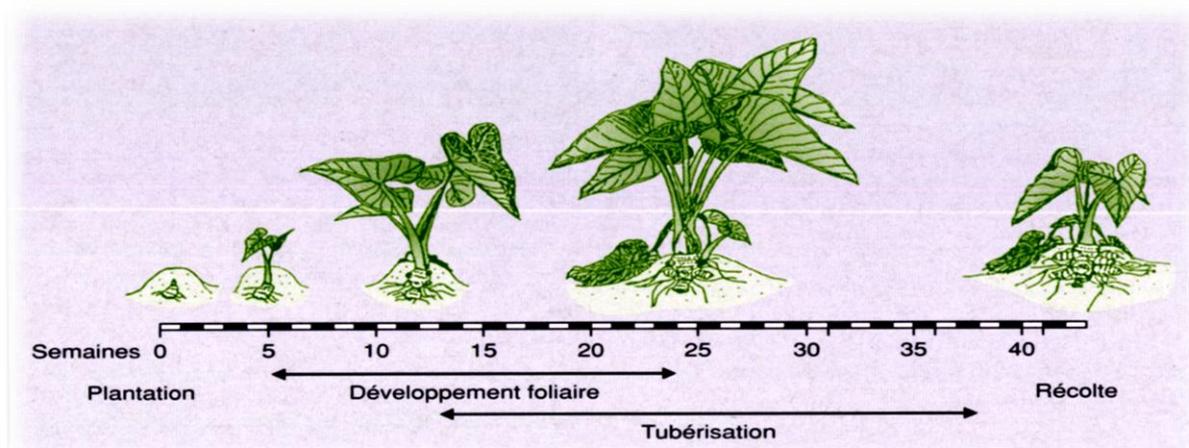


Figure 3: Cycle de développement de *X. sagittifolium* (Schafer, 1999).

I.1.4. Ecologie

Les espèces du genre *Xanthosoma* sont cultivées dans les zones tropicales et subtropicales entre les latitudes 30 degrés Nord et 15 degrés Sud de l'équateur. La culture du macabo requiert des températures moyennes comprises entre 20 et 35 °C et des températures minima ne descendant pas en dessous de 10 °C. La photosynthèse est optimale entre 25 et 29 °C. Une pluviométrie annuelle d'environ 1500 à 2000 mm est adéquate pour une bonne croissance (Lopez *et al.*, 1995). La culture du macabo a besoin d'un sol léger, sablo-argileux, profond, bien ameubli et aéré avec une nappe phréatique peu profonde, mais cette plante peut tolérer les sols de texture lourde avec des valeurs de pH comprise entre 5,5 et 6,5 (Onwueme, 1978).

X. sagittifolium est en règle générale plus rustique que les autres Aracées, certaines variétés pouvant même se cultiver en altitude (jusqu'à 2000 m en Afrique centrale et au-delà des 2000 m sur la côte atlantique, par exemple sur le Mont Cameroun) et même sur les sols

moins fertiles et moins arrosés. Le genre *Xanthosoma* pousse difficilement lorsque les conditions sont défavorables, tolère de quantité d'ombre, les sols plus lourds et plus secs que le taro (Bown, 2000; Mathews, 2002). Le macabo pousse bien à l'ombre, ce qui facilite son incorporation dans les plantations permanentes de bananes, de noix de coco, de palmiers à huile ou de cacao. Il est également incorporé aux cultures annuelles et pérennes, constituant ainsi une culture de choix dans les systèmes d'exploitation tels que les forêts, savanes et les zones de transitions forêts/savanes (Opoku-Agyeman *et al.*, 2004).

I.1.5. Diversité génétique et variétés de macabo

Le macabo appartient au genre *Xanthosoma* qui compte environ 50 à 60 espèces (Stevens, 2012) et toutes les variétés cultivées sont regroupées en 04 espèces: *X. sagittifolium*, *X. caracu*, *X. atrovirens* et *X. nigrum* (FAOSTAT, 2013). Au Cameroun, l'espèce cultivée est *X. sagittifolium*. Selon la caryogamie, la productivité, le degré de résistance à *P. myriotylum*, la couleur de la chair du tubercule, la forme des feuilles et des pétioles, il existe trois variétés de macabo (Figure 4) à savoir:

- **Le cultivar blanc**, diploïde ($2n=26$); très productif et très sensible à *P. myriotylum*, il possède des tubercules blancs et tendres (Boudjeko *et al.*, 2005; Perneel *et al.*, 2008);
- **Le cultivar rouge**, diploïde ($2n=26$); moins productif et très tolérant à *P. myriotylum*, il possède des tubercules rouges et fermes (Mbouobda *et al.*, 2007; Perneel *et al.*, 2008);
- **Le cultivar jaune**, tétraploïde, ($4n=52$); peu productif et très résistant à *P. myriotylum*, il possède des tubercules jaunes (Hölfe et Altier, 2010).

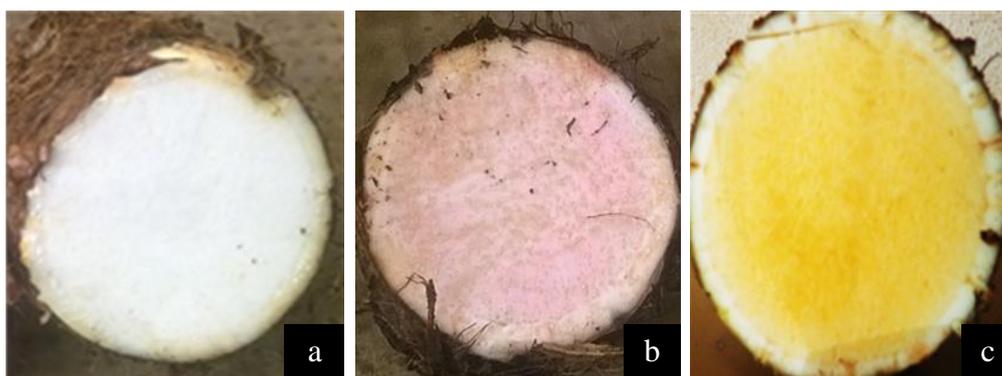


Figure 4: Coupe transversale du rhizome des différents cultivars de *X. sagittifolium*. (a) cultivar blanc, (b) cultivar rouge et (c) cultivar jaune (Photo Djuidje, 2016).

I.1.6. Taxonomie

Selon la classification de Bown (2000), le macabo présente la classification suivante :

Embranchement: Magnoliophyta

Sous embranchement: Anthohtya

Classe: Liliopsidae

Sous-classe: Aracidae

Super-ordre: Spadiciflorae

Ordre: Arales

Famille: Araceae

Sous-famille: Aroideae

Tribu: Caladiae

Genre: *Xanthosoma* Schott

Espèce: *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott

I.1.7. Importance du macabo

I.1.7.1. Importance nutritionnelle

Le macabo est un aliment de base pour les populations des régions tropicales et subtropicales du fait de sa capacité à supporter les conditions difficiles; de sa richesse en éléments nutritifs permettant de couvrir la quasi totalité des besoins énergétiques et jusqu'à 60% des besoins protéiques d'un adulte (Boudjeko *et al.*, 2005). Au Cameroun, le macabo est cultivé pour ses tubercules et ses jeunes feuilles (Schafer, 1999). Les jeunes feuilles de macabo contiennent en moyenne 20 % de protéines et constituent une excellente source de vitamine B1, B9, B2 et A. En outre, les feuilles de macabo contiennent une importante source d'antioxydants et de fibres alimentaires (Ekwe *et al.*, 2009). Les tubercules de macabo contiennent sensiblement 1-4 % de protéines, 0,2-0,4 % de lipides, 17-39 % de glucides, 60-77 % d'eau, les sels minéraux et les vitamines A1, B1, B2, PP et C (Agueguia *et al.*, 2000).

Le macabo est consommé sous différentes formes selon les localités et les cultures culinaires. Il peut servir d'aliment pour les animaux domestiques comme le porc et pour la consommation humaine grâce à ses feuilles et à son tubercule principal qui sont très fibreux (Rodriguez *et al.*, 2006). Les tubercules et jeunes feuilles de macabo sont consommés à l'état frais et doivent être bouillis pendant longtemps afin d'éliminer l'Oxalate de Calcium responsable de l'effet délusoire affectant les papilles gustatives (Yahaya *et al.*, 2013). En Afrique de l'Ouest, en particulier au Nigéria, le macabo est consommé comme "FuFu", un plat préparé en pilant les tubercules bouillis (Opoku-Agyeman *et al.*, 2004); ces tubercules sont également frits dans de l'huile ou pilés et accompagnés de sauces (Ejoh *et al.*, 2013).

Au Cameroun, dans les régions de l'Ouest et du Centre, les tubercules de macabo sont consommés sous forme "Râpé", un plat qui est préparé en mélangeant les tubercules râpés avec de l'eau et un peu d'huile de palme pour former une pâte qui s'accompagne de sauce d'arachide. Ses feuilles sont consommées dans la région de l'Ouest comme "Tenue militaire". Ses tubercules sont également consommés sous forme de rôtis, de bouillon, de "pilé" avec du haricôt et comme compléments à de nombreux légumes et sauces. Les feuilles et les tubercules de macabo sont consommés comme "Ekwan" un plat de la région du Nord-Ouest et du Sud-Ouest. Toujours dans la région du Sud-Ouest, les femmes utilisent un plat à base de macabo « timbanamboussa » pour séduire les hommes. En outre, les travaux d'Abdulrashid et Agwunobi (2012), ont montré l'utilisation du macabo comme une source d'énergie alternative dans la production de volaille.

I.1.7.2. Importance économique

Le macabo est la sixième plante à tubercule la plus consommée dans le monde après le manioc, la pomme de terre, la patate douce, l'igname et le taro (Perez, 2010). Sa production mondiale annuelle est d'environ 10 millions de tonnes (FAOSTAT, 2014). L'Afrique est le premier producteur et fournit 73,6 % de la production mondiale, suivit de l'Asie avec 21,4%, puis l'Océanie avec 4,1% et l'Amérique avec juste 0,8% (FAOSTAT, 2018).

Le genre *X. sagittifolium* est une plante économiquement importante dans plusieurs régions du Monde, principalement pour les agriculteurs du Cameroun (Mbarga *et al.*, 2012), du Bangladesh (Paul et Bari, 2013), du Ghana (Arhin *et al.*, 2014) et du Nigeria (Ejoh *et al.*, 2013). Au Cameroun, le macabo est la seconde plante à tubercule la plus consommée après le manioc par plus de 13 millions de personnes avec une production annuelle de 1 550 973 tonnes (FAOSTAT, 2013). Une quantité considérable est produite pour la commercialisation et joue ainsi un rôle dans la réduction de la pauvreté chez les petits cultivateurs qui en sont les principaux producteurs.

Les tubercules de macabo sont largement utilisés dans les industries agroalimentaires, c'est le cas en Amérique Latine où les tubercules de macabo constituent les matières premières pour la formulation des farines et aliments pour enfants (Perez *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que l'amidon du macabo est constitué de fins granules ce qui augmente sa digestion comparativement aux autres cultures amidonnées et lui confèrent également une propriété très sollicitée et utilisée par les industries (Yahaya *et al.*, 2013; Owusu-Darko *et al.*, 2014; Boakye *et al.*, 2018). Ainsi, le macabo fait partie des nouveaux produits d'exportation dans les pays producteurs (Onyenweaku et Okye, 2007). L'ouverture de nouveaux marchés en Amérique du Nord constitue des débouchés pour l'exportation de cette denrée alimentaire (Onyenweaku et Okoye, 2007).

I.1.7.3. Importance médicale

Le macabo possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. Le décocté de ses feuilles est utilisé dans la lutte contre les maladies gastro-intestinales et certaines allergies pour stimuler la sécrétion du lait maternel (Agueguia *et al.*, 2000). Le broyat des jeunes feuilles de *X. sagittifolium* est utilisé comme antipoison pour lutter contre les morsures de serpents et de scorpions (Boakye *et al.*, 2018). Le macabo est un aliment très recommandé chez les patients diabétiques car il contribue à la régulation du taux de glycémie (Folasire *et al.*, 2016) et améliore considérablement la mobilité et les caractéristiques des spermatozoïdes chez ces derniers (Mbeta et Saikia, 2006). Il a été également démontré que le macabo réduit et protège contre le stress, augmente l'efficacité de l'organisme à utiliser l'oxygène, booste le système immunitaire, réduit l'inflammation, protège le cœur, les poumons et le foie (Alabi *et al.*, 2005). Le macabo est aussi une riche source d'antioxydants. En pharmacopée Camerounaise, les tubercules écrasés de macabo sont utilisés dans le traitement de l'ulcère gastrique dans la localité du Moungo. En outre, le décocté des jeunes feuilles de macabo est utilisé dans la région de l'Est pour stimuler la montée laiteuse chez les femmes. Le broyat des jeunes feuilles de macabo est utilisé dans la médecine traditionnelle Bamoum pour lutter contre les morsures de serpents. Additionné à l'alcool et au menthol, la farine de macabo est très efficace dans le traitement des oreillons.

I.2. Pourriture racinaire

La pourriture racinaire du macabo causée par *P. myriotylum*, est la principale contrainte et le plus grand handicap de la production de cette culture dans le Monde (Nzietchueng, 1985; Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong et Hölte, 2001). Cette maladie cause des pertes allant jusqu'à 90 % de réduction du rendement de la production du macabo lorsqu'aucune mesure n'est prise (Zang et Yang, 2000; Omenyo *et al.*, 2013). Les racines infectées par *P. myriotylum*, perdent leur habilité à absorber les nutriments du sol et cette incapacité se manifeste par le jaunissement foliaire et l'atrophie des racines (Pacumbaba *et al.*, 1992; Boudjeko *et al.*, 2006) (Figure 5). La baisse de la production du macabo est liée aux méthodes culturales traditionnelles, à l'étroitesse de la diversité génétique (Onokpise *et al.*, 1999), à la faible disponibilité du matériel végétal performant et aux infections fongiques et virales (Xu *et al.*, 1995). Outre *P. myriotylum*, agent responsable de la pourriture racinaire, le macabo est également sujette aux attaques virales occasionnées par le virus de la mosaïque de Dashen (Anon, 1991), bactériennes causées par certaines bactéries telles que les *Pseudomonas* (Giacometti et Léon, 1994) et fongiques attribuées à *Sclerotium rofsii* (Lyonga *et al.*, 1979).



Figure 5: Symptômes de la pourriture racinaire sur la partie souterraine d'un plant de macabo (Photo Djuidje, 2015).

I.2.1. Biologie de *P. myriotylum*

L'oomycète *P. myriotylum* est un membre de la lignée des Stramenophiles. Les espèces de *Pythium* se rencontrent à travers le monde et sont communément en association avec les racines des plantes et d'autres parties de la plante en contact avec ou à proximité du sol. Lorsque les conditions environnementales sont favorables pour ces organismes et défavorables pour la plante, l'infection de la plante peut se produire. Ces infections se produisent au niveau des racines, des tiges basses, des fruits proches ou en contact avec le sol et les tissus mous des plantes qui existent généralement dans les semences des plantes (Kuchareck et Mitchell, 2000).

Les espèces de *Pythium* sont généralement composées de fins filaments microscopiques appelés hyphes. L'ensemble de ces hyphes est appelé mycélium et est de couleur blanche. Parfois, une large colonie mycellaire peut croître sur des tissus infectés. Une colonie de mycélium peut croître de plus d'un centimètre par jour lorsque les conditions humides et chaudes prévalent (Kucharech et Mitchell, 2000). La multiplication des espèces de *Pythium* se fait par croissance des hyphes et production des spores microscopiques. Quatre types de spores sont produits: les sporocystes, les zoospores, les oospores et les chlamydozoospores. Les chlamydozoospores sont formées des segments d'hyphes très épais. Les sporocystes peuvent germer pour former de nouveaux hyphes, mais généralement le rôle des sporocystes dans le cycle de la maladie est de produire les vésicules dans lesquelles les zoospores sont formées. Les zoospores sont fragiles, ils produisent de manière asexuée les spores dépourvues de paroi cellulaire et possèdent deux flagelles qui propulsent l'organisme dans l'eau. L'eau est nécessaire pour la production des sporocystes, des vésicules et des zoospores. L'oospore se forme après le croisement des portions mâle et femelle du thalle (Figure 6). La plupart des espèces de *Pythium* sont hermaphrodites. Bien que les oospores soient le résultat d'un croisement sexué, l'organisme a un mécanisme de recombinaison des gènes pour augmenter les variations à l'intérieur des

espèces. Egalement, les oospores constituent une forme efficace de survie des espèces *Pythium* parce qu'ils ont généralement une paroi très épaisse. Les oospores survivent dans les débris de récoltes tels que les racines et les tiges décomposées qui ont été infectées précocement. Les oospores ont une durée de vie extrêmement longue et peuvent survivre pendant plus de 10 ans (Kuchareck et Mitchell, 2000).

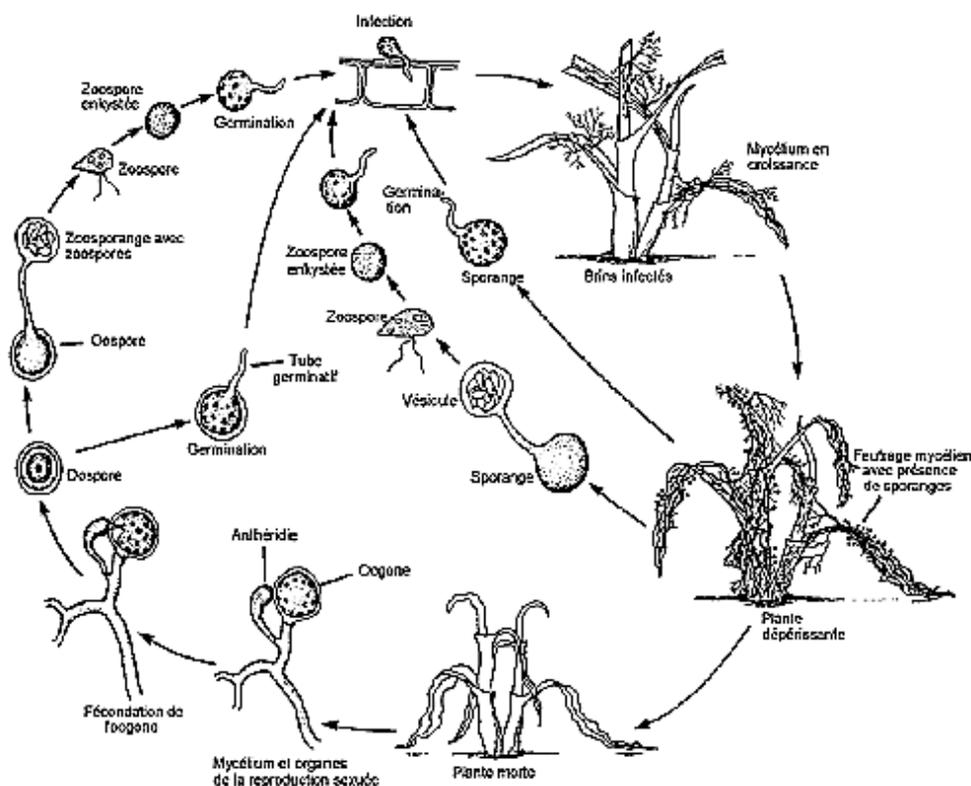


Figure 6: Cycle infectieux des *Pythium* spp. (Van West *et al.*, 2003)

I.2.2. Distribution et Taxonomie de *P. myriotylum*

L'oomycète *P. myriotylum* est distribué dans toutes les régions chaudes du Monde avec une très large gamme d'hôtes. Selon Farr *et al.* (2007), cet agent pathogène a été reporté dans 79 plantes hôtes appartenant au genre *Antirrhinum*, *Aponogeton*, *Arachis*, *Caladium*, *Citrullus*, *Coronilla*, *Cucumis*, *Glycine*, *Ligustrum*, *Lolium*, *Peperomia*, *Phaseolus*, *Robinia*, *Solanum* et *Triticum*. Cet agent pathogène est responsable de la perte du rendement de la production de plusieurs cultures d'intérêts économiques tels que la tomate, l'arachide, le tabac et le macabo (*Xanthosoma sagittifolium*).

Systématiquement, Kirk *et al.* (2008) décrit la taxonomie de *P. myriotylum* comme suit :

Règne : Chromista

Lignée : Stramenophile

Classe : Oomycètes

Ordre : Pythiales

Famille : Pythiacées

Genre : *Pythium*

Espèce : *P. myriotylum*

Au Cameroun, il est assez difficile de situer la période exacte de l'apparition de la maladie. Selon, Nzietchueng (1983), les débuts de la maladie remontent vers les années 70. Dans les zones de grande culture, la maladie à laquelle les paysans avaient donné le nom d'«Appollo» semble présente depuis 1969. La pourriture racinaire du macabo prédomine dans les zones forestières (départements du Nyong et Kellé, Sanaga Maritime, Nkam, Mungo, Fako et Memé) (Nzietchueng, 1983).

I.2.3. Ecologie de *P. myriotylum*

Dans les zones forestières du Cameroun où sévit la pourriture racinaire du macabo, les températures enregistrées de juillet à octobre sont comprises entre 18 et 34 °C. Dans les hauts plateaux de l'Ouest où la maladie est de faible importance, les températures enregistrées de juillet à octobre sont comprises entre 13 et 24 °C. Les pHs moyens des sols dans les grandes zones de culture du macabo au Cameroun sont supérieurs à 5,0. Le pH optimum pour la croissance mycélienne de *P. myriotylum* est situé aux environs de 6,0 ; cette croissance est moyenne à pH 5,0 et faible pour les pH inférieurs à 5,0 (Nzietchueng, 1983).

I.2.4. Interaction *Xanthosoma sagittifolium*-*Pythium myriotylum*

Les études ont montré que les isolats de *P. myriotylum* qui affectent le macabo ont développé un certain degré de spécificité avec la plante hôte (Perneel *et al.*, 2006). Les Oomycètes peuvent attaquer le genre *Xanthosoma* à différents stades de croissance (Figure 7). L'infection précoce de *X. sagittifolium* au stade d'émergence des racines par *P. myriotylum* induit un retard de croissance, de même que l'infection tardive entre 5 à 6 mois après plantation réduit le nombre de racines nourricières, ce qui provoque une chlorose et des rendements médiocres (Adiobo *et al.*, 2007).

P. myriotylum est difficile à contrôler en utilisant les méthodes de lutte classique telles que l'usage des fongicides chimiques (Nzietchueng, 1983). En outre, aucune variété de macabo résistante n'a été développée avec succès contre cette maladie. Une stratégie fiable de lutte contre cette maladie qui permettra de réduire les pertes de rendement du macabo induite par

Pythium à un niveau économiquement acceptable et, permettant d'assurer une production durable de cette culture vitale, est d'un besoin urgent.



Figure 7: Parcelle de plants sains de macabo (A) et parcelle de plants infectés de macabo (B) (Photo Djuidje, 2015).

I.2.5. Moyens de lutte contre la pourriture racinaire

I.2.5.1. Lutte culturale

La lutte culturale consiste à créer des conditions défavorables au développement de l'agent pathogène ou à diminuer la pression de l'inoculum. La rotation des cultures réduit lentement la densité de l'inoculum, il n'est pas profitable pour les récoltes intenses. Le caractère monocyclique de l'épidémie réclame une stratégie de contrôle de la maladie basée principalement sur la réduction de l'inoculum initial dans le sol à cet égard des stratégies courantes de contrôle intégré soutenable se focalisent sur des mesures alternatives de contrôle qui remplacent ou réduisent le contrôle chimique. Les pratiques culturales telles que l'amendement de sol avec les débris organiques d'animaux ou végétaux sont utilisées pour réduire diverses phytopathologies (Blok *et al.*, 2000).

I.2.5.2. Lutte génétique

Cette méthode consiste à la sélection et la multiplication de variétés de plantes résistantes à la maladie. La principale limite de cette méthode chez le genre *Xanthosoma*, est la difficulté à développer les variétés complètement résistantes due à la différence caryogamique des différents cultivars (blanc, rouge et jaune) et la très faible floraison de cette plante (Boudjeko *et al.*, 2005 ; 2006 ; Perneel *et al.*, 2006).

I.2.5.3. Lutte chimique

L'application des fongicides chimiques est en général le moyen de lutte le plus utilisé pour lutter contre la pourriture racinaire du macabo. En terme de lutte chimique de la pourriture racinaire du macabo, les fongicides de type phénylamide (Metalaxyl) sont les plus utilisés. Ce type de molécule interfère avec la biosynthèse des ARN, en ciblant les ARN polymérases, enzymes présentes dans tous les organismes vivants (Jespers *et al.*, 1994). Ces molécules à large spectre d'action sont hautement toxiques et sont responsables de la pollution environnementale.

I.2.5.4. Lutte biologique

La lutte biologique est l'emploi d'organismes vivants afin de diminuer l'ampleur de plusieurs ennemis des cultures agricoles (microorganismes pathogènes, rongeurs, insectes, nématodes et mauvaises herbes) (Dib, 2010). Dans le sens écologique stricte, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agroécosystèmes par addition des agents naturels sélectionnés (Nautiyal *et al.*, 2000). La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique et au fait qu'elle soit efficace et moins toxique aussi bien pour l'homme que pour l'environnement. Elle utilise la matière organique, les extraits de plantes, les microorganismes tels que les champignons et les bactéries (Taiwo *et al.*, 2016).

Tout comme pour les produits de lutte chimique, on peut distinguer chez les microorganismes des effets directs sur l'agent pathogène, des effets sur la pathogenèse et des effets indirects par l'intermédiaire de la plante (Nicot, 2002). Les agents de biocontrôle fonctionnent par la production d'antibiotiques à l'encontre du parasite et des substances appelées sidérophores qui ont une grande capacité à chélater le fer ferrique (Pathma *et al.*, 2011; Morath *et al.*, 2012) ou par compétition trophique au dépend des parasites (Lugtenberg *et al.*, 2003). Ils peuvent agir également par compétition de l'espace et par induction de la résistance systémique acquise de la plante (Stutz *et al.*, 2000; Tjamos *et al.*, 2005).

Les agents de biocontrôle sont également connus pour leur capacité à occuper la rhizosphère, à se développer endophytiquement chez quelques plantes et à réduire ainsi les symptômes de la maladie. Parmi tous les modes d'action possibles des agents de protection biologique, le phénomène d'hyperparasitisme est le seul qui soit propre aux agents microbiens. Il est associé le plus souvent à la production d'enzymes capables de dégrader les parois cellulaires des agents pathogènes (chitinases, β -1,3-glucanases etc...) (Elad, 2000).

À ce jour, très peu de microorganismes sélectionnés ont été identifiés comme de potentiels agents de lutte contre la pourriture racinaire du macabo causée par *P. myriotylum*. De ce fait, les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* (*Pseudomonas* CMR5c et CMR 12a) isolées de la rhizosphère des plants sains de macabo (Perneel *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2016) et les souches

de *Trichoderma asperellum* (*Trichoderma* PR10 et PR11) isolées et caractérisées par l'IRAD du Cameroun (Mbarga *et al.*, 2012) ont été démontrées comme étant de potentiels agents de contrôle biologique de *P. myriotylum*. Par ailleurs, des études ont également montré l'utilisation des molécules organiques telles que le chitosane et le Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester (BTH) dans un schéma de lutte biologique contre *P. myriotylum* agent responsable de la pourriture racinaire de *X. sagittifolium* (Mbouopda *et al.*, 2010).

Les bactéries en pleine extension dans les schémas de lutte biologique sont les actinobactéries. Les travaux d'Abiobo *et al.* (2007) ont suggéré que la suppression de la pourriture racinaire de *X. sagittifolium* causée par *P. myriotylum*, observée dans les andosols des localités situées autour du Mont Cameroun dans la région du Sud-Ouest, pourrait être attribuée à certains groupes de microorganismes parmi lesquels les actinomycètes.

I.3. Généralités sur les actinobactéries (actinomycètes)

I.3.1. Définition et principales caractéristiques

Les actinobactéries sont des bactéries Gram positif caractérisées par un génome avec un coefficient de chargraff (G+C) élevé et qui sont ubiquitairement distribuées dans l'ensemble des écosystèmes aquatiques et terrestres (Barka *et al.*, 2016). Elles sont majoritairement aérobiques, mais certaines d'entre elles peuvent croître anaérobiquement (Olanrewaju et Babalola, 2019). Plusieurs actinobactéries forment des filaments et possèdent des mycéliums de croissance bien que quelques espèces produisent des spores externes. De tous les microbes de la rhizosphère, les actinobactéries sont connues pour être spéciales dans la promotion de la croissance de la plante car elles exhibent plusieurs traits bénéfiques (El-Tarabily et Alkhajeh, 2016; Monteiro *et al.*, 2017). Leurs filaments et leur habilité à sporuler les aident à s'encrenner solidement dans les particules des sols rhizosphériques en formant des fortes liaisons avec les plantes.

Les actinobactéries ont longtemps été rejetées de l'ensemble des bactéries et confondues avec les champignons (eucaryotes), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'elles provoquent, de leurs morphologies fongoïdes et de leur organe de sporulation (Reponen *et al.*, 1998). Les bactériologistes considéraient les actinobactéries comme les bactéries tandis que les mycologues les considéraient comme des champignons. Mais actuellement, elles sont classées définitivement parmi les bactéries (procaryotes) du fait de leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques et leurs matériels génétiques dépourvus de noyau contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Les principales différences entre les champignons et les actinobactéries peuvent être résumées dans les points suivants:

- Leur paroi qui ne renferme ni chitine, ni cellulose qui se retrouvent respectivement chez les champignons et les plantes, mais une glycoprotéine

contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (Shukla, 2010);

- Le diamètre de leurs mycéliums est approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0,7 à 0,8 μm) (Prescott *et al.*, 2010);
- Leur sensibilité aux attaques des bactériophages et lysozymes (Hawker et Linton, 1971);
- Leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens (Winn et Koneman, 2006).

I.3.2. Morphologie des actinobactéries

Sur la base morphologique, les actinobactéries sont classifiées en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifiés. Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier et Lechevalier, 1985). Les colonies formées par les actinobactéries sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupées en trois types :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu;
- Des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides;
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinobactéries peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinobactéries sporulent en produisant des sporocystes, c'est le cas du genre *Streptosporangium* (Kalakoutskii et Agre, 1976). Les spores peuvent, selon les genres, être produites de manière isolée (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non droites, flexibles ou en spirales (Figure 8).

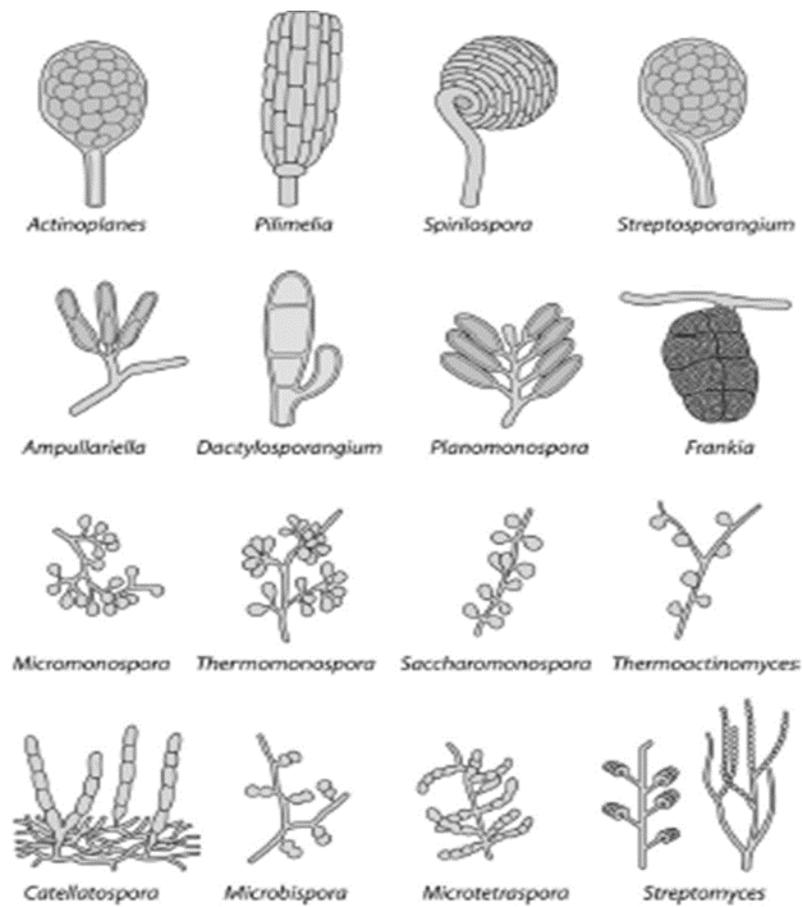


Figure 8: Chaînes de spores produites par les différentes espèces d'actinobactéries (Barka *et al.*, 2016).

L'analyse par imagerie révèle la présence de deux catégories de filaments chez les actinobactéries: les hyphes dispersés et les pellets (Almaris, 2007). Dans les hyphes dispersés, les mycéliums libres et les enchevêtrements sont rencontrés (Figure 9). Pour la première forme ce sont des hyphes indépendants dispersés, pour la seconde ce sont les pellets. Les colonies que forment les actinobactéries sur milieux solides résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies varie entre 1 et 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisses ou échancrés. Elles sont très souvent pigmentées en: blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc (Thenmozhi et Kannabiran, 2010).

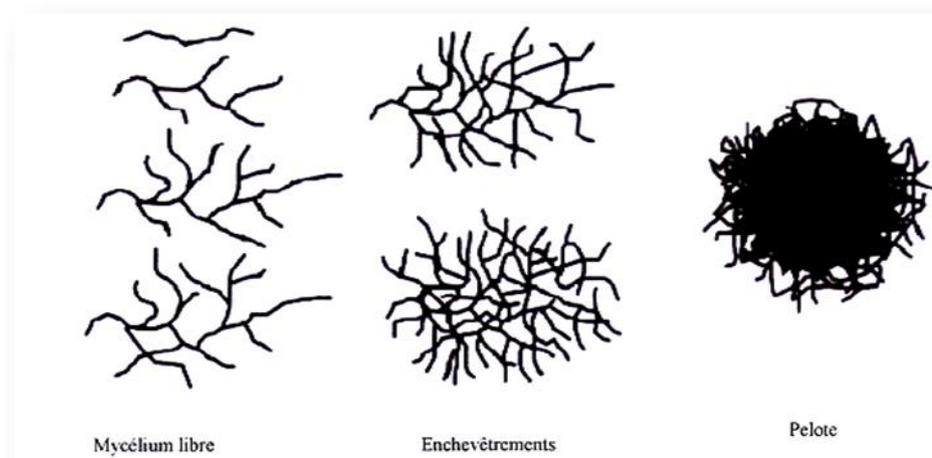


Figure 9: Morphologie des hyphes d'actinobactéries en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

I.3.3. Physiologie de développement

La croissance des actinobactéries est influencée par plusieurs paramètres physiologiques tels que l'oxygène, le pH, la température, la tolérance au NaCl etc.

I.3.3.1. Oxygène

On peut diviser les actinobactéries selon leurs types respiratoires en deux groupes.

- Les formes fermentatives anaérobies, représentées par le genre type *Actinomyces*, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, ils font partie de la flore de veillons (Avril *et al.*, 1992).
- Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier dans le sol (Avril *et al.*, 1992).

I.3.3.2. pH

Pour le pH, la plupart des actinobactéries croissent entre pH 5 et 9 avec une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7-8. Les actinobactéries sont particulièrement abondantes dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques. Cependant, la croissance des actinobactéries peut également être observée à des valeurs de pH inférieures à 4 (Mckinney, 2004), tel est le cas pour les souches acidophiles appartenant au genre *Streptacidiphilus* (Wang *et al.*, 2006).

I.3.3.3. Température

La température optimale de croissance des actinobactéries est comprise entre 25 °C et 30 °C, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures comprises entre 55 °C et 65 °C (Rangaswami *et al.*, 2004).

I.3.3.4. Tolérance au NaCl

Selon leurs exigences en NaCl, les actinobactéries sont divisées en deux groupes:

- Les halophiles qui ont besoin du sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1 % - 6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusqu' à 15 % - 30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.
- Les halotolérants qui acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolèrent de 6 % à 8 % de NaCl (P/V); les modérément tolérants (tolèrent de 18 % à 20 % de NaCl); et les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu' à saturation en NaCl) (Nanjani, 2011).

I.3.4. Cycle de développement des actinobactéries

Le cycle de développement de nombreuses actinobactéries commence par la germination des spores (Figure 10); processus qui nécessite la présence des ions calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (O'Gara *et al.*, 2008). Un mycélium aérien vient se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet, ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment-là que les composés médicalement utilisés sont synthétisés, et sont appelés métabolites secondaires (Smaoui, 2010). A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à parois fines appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par septation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriments). Si les spores sont localisées dans les sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative (Prescott *et al.*, 2010).

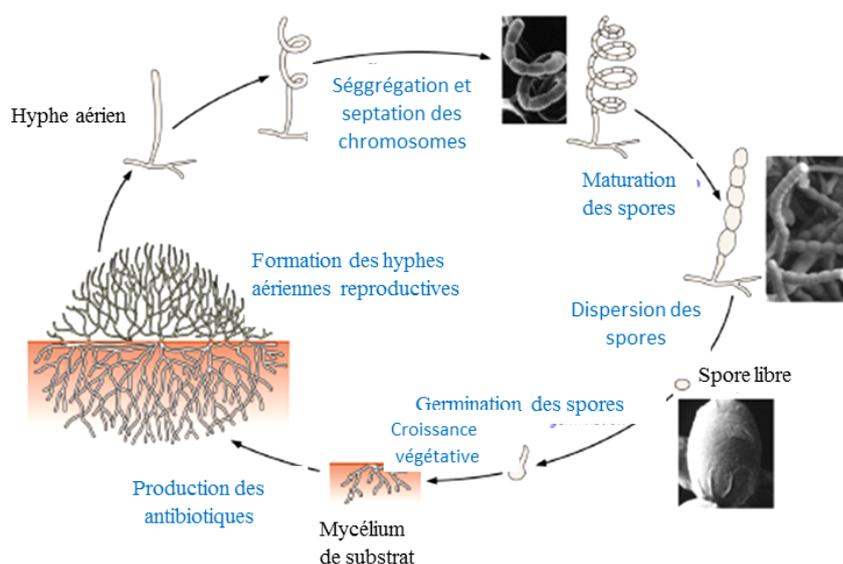


Figure 10: Cycle de vie des actinobactéries sporulantes (Barka *et al.*, 2016).

I.3.5. Taxonomie des actinobactéries

En se basant sur le système de classification de Murray (Murray *et al.*, 1989), les actinobactéries ont été classées dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), classe des Thallobacteria (bactéries Gram-positives ramifiées), dans laquelle on trouve l'ordre des Actinomycétales (Ouhdouch *et al.*, 2001). La taxonomie des actinobactéries a évolué en fonction du développement des connaissances. Durant ces 30 dernières années, elle a été marquée par quatre périodes dont chacune a porté de nouveaux critères de classification:

I.3.5.1. Première période

C'est la période classique, où seuls les critères macro et micromorphologiques, permettent de différencier les genres entre eux. Les caractères morphologiques décrits dans la clé d'identification par Nonomura (1988) sont très utiles dans l'identification des streptomycètes (Thenmozhi et Kannabiran, 2010). Ils sont comme suit :

- La couleur de mycélium aérien: les *streptomyces* sont divisés en sept groupes selon la couleur du mycélium aérien « blanc, gris, rouge, jaune, bleu, vert, ou violet ».
- La production des pigments mélanoides « brun-noir ou Brun-verdâtre ».
- Fragmentation du mycélium de substrat
- La couleur du mycélium de substrat
- La production des pigments solubles « rouge, orange, vert, jaune, bleu ou violet »
- L'assimilation des glucides « arabinose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose, saccharose et raffinose »
- La morphologie des chaînes de spores : les chaînes de spores peuvent être simples ; droit à flexueuses (type « rectus-flexibilis » = RF), en crochets ou en boucles (type « rectinaculum-opertum » = RA), ou en spirales (type « spira » = S), comme elles peuvent être verticillées, Biverticillus (BIV), Biverticillus-Spira (BIV-S), Monoverticillus (MV), Monoverticillus - Spira (MV-S).
- L'ornementation de la surface des spores : les spores peuvent avoir une surface lisse « *smooth* », rugueuse « *warty* », épineuse « *spiny* » ou chevelue « *hairy* » (Figure 11).

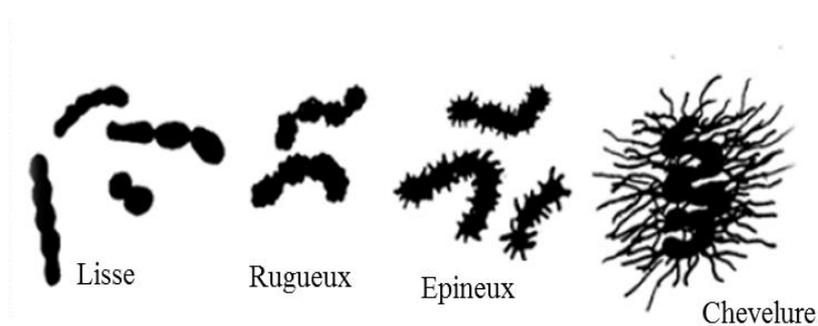


Figure 11: Morphologie de la surface des spores des actinobactéries (Shirling et Gottlieb, 1966).

I.3.5.2. Seconde période

C'est la période qui est basée sur l'utilisation de la chimio-taxonomie. Selon Goodfellow et Minnikin (1981), la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques (marqueurs) dans la classification des organismes. Les caractères chimiques utilisés dans la classification des actinobactéries sont surtout limités à certains composés des parois cellulaires (O'Donnel *et al.*, 1982) et ont permis de définir plusieurs types cellulaires rencontrés chez les actinobactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1970) (Tableau I).

Tableau I: Types de parois en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires chez les actinobactéries.

Type de paroi	Constituants distinctifs majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP, glycine	<i>Streptomyces</i>
II	Méso-DAP, glycine	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP: acide 2,6-diaminopimélique ; BAP: acide 2,4-diaminobutyrique.

I.3.5.3. Troisième période

Durant la troisième période naît la taxonomie numérique, qui débute dans les années 70, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles (Smaoui, 2010). La taxonomie numérique a été définie comme le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères (Prescott *et al.*, 2003). Le procédé consiste à déterminer la présence ou l'absence des caractères sélectionnés dans le groupe d'organisme étudié. Pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins 50. Et il est également préférable d'inclure de nombreux types de données: morphologiques, biochimiques et physiologiques. Chacun des caractères est codé **1** pour présence du caractère, ou **0** pour absence du caractère. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables (Prescott *et al.*, 2003; Kitouni, 2007).

I.3.5.4. Quatrième période

Elle a débuté durant les années 80 et s'étend jusqu'à nos jours. Elle consiste en l'application de données basées sur les acides nucléiques, aux problèmes de systématique. Le terme taxonomie moléculaire signifie l'utilisation de l'ADN et de l'ARN pour l'étude des relations entre les organismes (Judd *et al.*, 2001). La structure générale des gènes codants pour l'ARNr 16s est hautement conservée chez tous les êtres vivants procaryotes, et sa séquence présente des zones qui sont presque invariables appelées séquences signatures oligonucléotidiques. Ces derniers serviront comme outil pour identifier spécifiquement les actinobactéries.

I.3.6. Distribution des actinobactéries

Les actinobactéries existent dans différents habitats naturels et représentent le groupe de microbes ubiquitaires mondialement distribué dans les écosystèmes (George *et al.*, 2012). Les actinobactéries ont été isolées à partir de différentes niches écologiques tels que la rhizosphère (Boudjeko *et al.*, 2017; Shariffah-Muzaimah *et al.*, 2018), les eaux douces ou salées (Kitouni *et al.*, 2005), les composts (Sreevidya *et al.*, 2016), les mangroves (Shrivastava *et al.*, 2015), la glace sous-glaciaire de l'antarctique (Mocheva *et al.*, 2002), les niches extrêmes (Mohamed *et al.*, 2017; Nafis *et al.*, 2019), les tissus des plantes (Goudjal *et al.*, 2016; Gos *et al.*, 2017; Shaheen *et al.*, 2017) et dans les substrats les plus divers (Zaitlin *et al.*, 2006) où elles jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa saveur. Toutefois, elles sont particulièrement abondantes dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où elles constituent une part importante de la population microbienne (Loqman, 2009). Certains genres d'actinobactéries préfèrent des habitats spécifiques, comme les *Micromonospora* qui sont abondants dans les lacs, les *Actinomyces* et les *Nocardia* préfèrent les cavités des hommes et des animaux, les *Thermoactinomyces* qui se retrouvent généralement dans les sources hydrothermales où la température est élevée, les *Streptomyces* sont très abondants dans le sol et jouent un rôle crucial dans le recyclage des nutriments (Kinkel *et al.*, 2012) et sont très étudiés à cause de leur habilité à produire les antibiotiques et bien d'autres métabolites secondaires bioactifs (Davelos *et al.*, 2004).

I.3.7. Fonction écologique des actinobactéries

La fonction écologique principale des actinobactéries au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (Prescott *et al.*, 2010), grâce à leurs capacités à produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques, telles que les protéases, les nucléases, les lipases (Prakash *et al.*, 2012), et des enzymes capables d'hydrolyser des sucres complexes comme la cellulose, hémicellulose et certaines d'entre elles attaquent même la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (Maier *et al.*, 2009). Au niveau de la rhizosphère, les

actinobactéries forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes, en contribuant à la promotion de leur croissance par des effets directs et indirects (Barreto *et al.*, 2008). Les effets directs comprennent la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote, la production de phytohormones (El-Mehalawy *et al.*, 2004), et les effets indirects sont le contrôle des agents pathogènes par la production des antibiotiques (Barreto *et al.*, 2008), ou par la compétition nutritionnelle et spatiale avec les agents pathogènes (Getha *et al.*, 2005).

I.3.8. Importance biotechnologique des actinobactéries

I.3.8.1. Production des antibiotiques

Les actinobactéries ont une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques malgré les progrès de synthèse chimique car elles sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques (Kumari *et al.*, 2012). Environ 80% des antibiotiques mondialement produits sont connus comme provenant des actinobactéries en particulier des genres *Streptomyces* et *Micromonospora* (Hassan *et al.*, 2011). Les antibiotiques produits par les actinobactéries sont regroupés en plusieurs classes structurales tels que: les glycosamides: streptomycine et kanamycine (Nanjawade *et al.*, 2010); les ansamycines: rifamycine (Floss et Yu, 1999); les anthracyclines: Doxorubicine (Kremer et Van Dalen, 2001); β -lactam: cephalosporines (Kollef, 2009); les macrolites: érythromycine et tétracycline (Harvery et Champe, 2009).

Les actinobactéries produisent également d'autres molécules qui ont des applications biotechnologiques variées, telles que :

- Les antitumoraux : actinomycine, adriamycine, rebeccamycine (Uyeda, 2004);
- Antiviraux, antiparasistes : pentalactones, Benzastatin C (Lee *et al.*, 2007).
- Biopesticides (Wang *et al.*, 2015).

I.3.8.2. Production des enzymes

Les actinobactéries sont également d'importantes sources d'enzymes extracellulaires d'intérêt agricole et industriel (Saugar *et al.*, 2002 ; Basilio *et al.*, 2003). Plusieurs enzymes telles que les chitinases (*Streptomyces viridificans*, *Streptomyces Hygroscopicus* VMCH2, *Streptomyces* sp. 9p), les cellulases (*S. albidoflavus*), les protéases (*Nocardia* spp, *Streptomyces* spp), les xylanases (*Microbispora* spp), les ligninases (*Nocardia autrophica*), les amylases (*Thermomonospora curvata*), les isomérases (*Actinoplanes missouriensis*), les peptidases, les pectinases, hemicellulases et Kératinases sont produites par les actinobactéries (Priya *et al.*, 2011; Mohandas *et al.*, 2013; Payal *et al.*, 2014; Limaye *et al.*, 2017).

I.3.8.3. Amélioration de la qualité de sol agricole

Les actinobactéries jouent un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole (Demain *et al.*, 2009). Elles sont connues comme étant des sources de composés agroactifs qui sont importants dans la décomposition de la cellulose et de la chitine (Adegboye et Babalola, 2012; Tyc *et al.*, 2017). Les actinobactéries sont de plus en plus utilisées en biotechnologie pour la production des biofertilisants qui augmentent l'apport ou la disponibilité des nutriments primaires à la plante hôte et stimulent la croissance de la plante à travers la production des substances promotrices de la croissance (Doolotkeldieva *et al.*, 2015). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines avec plus de 200 espèces d'angiospermes, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (Thirupl *et al.*, 2001). Les actinobactéries contribuent également au maintien des particules du sol grâce à leur structure filamenteuse et leur habilité à produire les polysaccharides (Kennedy, 1999). Les actinobactéries améliorent aussi l'infiltration de l'eau dans le sol et permettent ainsi une bonne aération du sol (Mckenna *et al.*, 2002). Outre la structure et la fertilité du sol, les actinobactéries augmentent le pouvoir suppressif du sol. Errakhi. (2008) a montré qu'un sol riche en actinobactéries est plus suppressif aux maladies phytopathogènes qu'un sol pauvre en ces microorganismes.

I.3.9. Actinobactéries comme agents de lutte biologique

I.3.9.1. Actinobactéries comme agents de biocontrôle des maladies des plantes

Les actinobactéries en particulier les *Streptomyces* agissent comme les agents de biocontrôle à travers la production des composés naturels pour combattre les attaques des agents phytopathogènes des plantes. Leur abilité à contrôler les agents pathogènes des plantes se fait par la production des traits suivants:

- La production des composés bioactifs: les antibiotiques et les enzymes hydrolytiques extracellulaires (Couillerot *et al.*, 2013)
- La production des sidérophores (Nanjappan *et al.*, 2018)
- La production des composés volatils (Jones et Elliot, 2017)
- La synthèse des régulateurs de croissance de la plante (Goudjal *et al.*, 2013)
- La compétition pour les nutriments.

I.3.9.1.1. Production des antibiotiques

Les actinobactéries sont reconnues pour produire une variété de métabolites secondaires bioactifs dont les majoritaires sont les antibiotiques de nature volatile ou non volatile. Environ 23.000 antibiotiques ont été découverts à partir des microorganismes et approximativement 10.000 de ces antibiotiques ont été isolés à partir des actinobactéries (Manivasagan *et al.*, 2014). Les actinobactéries, en particulier le genre *Streptomyces* spp., ont l'habilité à produire une grande variété de métabolites secondaires bioactifs incluant les antibiotiques. Les travaux sur la

souche *Streptomyces lydius* A01, ont permis d'obtenir le principal composé antifongique antagoniste à *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Monilina laxa* ect. Les investigations futures ont révélé que ce composé est la natamycine, un potentiel antibiotique polyène grandement utilisé comme bioconservateur des aliments (Lu *et al.*, 2008). Parmi les actinobactéries, celles appartenant au genre *Streptomyces* spp. sont très explorées comme agents de biocontrôle pour lutter contre plusieurs pathogènes telluriques. Streptomycine et cycloheximide produits par *S. griseus* sont les premiers antibiotiques utilisés dans le contrôle des champignons et bactéries pathogènes des plantes. Par ailleurs, les antibiotiques produits par les actinobactéries sont appliqués dans le sol comme alternative à la large gamme de fongicides chimiques tels que le méthylbromide et le métalaxyl (Jinhua *et al.*, 2010). Plusieurs antibiotiques produits par les actinobactéries sont actuellement utilisés dans la lutte biologique (Errakhi, 2008) (Tableau II).

Tableau II: Antibiotiques produits par les actinobactéries utilisées en biocontrôle.

Antibiotiques	Actinobactéries	Maladies / agents sélectionnés	Mécanisme d'action
Streptomycine	<i>Streptomyces gresus</i>	<i>Xanthosomas Oryzae</i> <i>X.citri</i> <i>Pseudomonas tabaci steven</i> <i>P. lachrymans</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines se fixant sur la sous unité 30 s et cause une erreur de lecture du gène codant pour la synthèse des protéines
Polioxine	<i>Streptomyces cacaoi var asoensis</i>	<i>Alternaria sp.</i> <i>Botrytis cinera</i> <i>Rhizoctania solani</i>	Inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (chitine)
Mildiomyicine	<i>Streptoverticillium Rimofaciens</i> B-98891	Les mildious <i>Erysiphe sp.</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Podospaera sp</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines chez les champignons par l'inhibition de la peptidyle-transferase
Kasugamycine	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	<i>Falvia fulva</i> <i>Cercospora spp.</i> <i>Venturia spp.</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines interférant l'association d' amino-acyl tRN avec mRNA et la sous unité ribosomale nRNA 70S
Blasticidines	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	<i>Pyricularia Oryzae</i> <i>Cavara</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines liées au ribosome 50S protéiques.
Validamycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition de la trihalase causant un mauvais branchement du mycélium et arrêt de la croissance mycélienne

I.3.9.1.2. Production des enzymes hydrolytiques extracellulaires

Les agents de biocontrôle produisent les enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi cellulaire des champignons et des bactéries pathogènes, la membrane cellulaire, les protéines membranaires et les facteurs de virulence extracellulaires impliqués dans le contrôle des maladies des plantes (Pal et Garden, 2006). Les actinobactéries en particulier les *Streptomyces* spp. sont très étudiés pour la production des enzymes extracellulaires de lyse de la paroi des agents phytopathogènes, leur expression, leur reconnaissance du substrat et leur implication dans la croissance et le développement des plantes (Charter *et al.*, 2010). Parmi les enzymes de lyse de la paroi des agents phytopathogènes, les chitinases jouent un rôle vital dans la dégradation de la chitine qui est le principal composant structural de la paroi cellulaire. Les autres enzymes extracellulaires sont les β -1,3-glucanases, les cellulases, les protéases qui causent aussi la lyse des hyphes et inhibent la croissance des phytopathogènes (Xue *et al.*, 2013a). Passari *et al.* (2015), ont montré la production des chitinases par les actinobactéries endophytes comme les traits de biocontrôle. Par ailleurs, les métabolites antifongiques en particulier les chitinases et les β -1,3-glucanases produites par les actinobactéries inhibent la croissance des champignons phytopathogènes à travers la lyse de la paroi cellulaire chez *F. oxysporum* et *S. rolfsii* (Nanjappan *et al.*, 2018). En plus de leur rôle important dans l'inhibition de la croissance des agents phytopathogènes des plantes, les enzymes extracellulaires produites par les actinobactéries dans la nature sont impliquées dans la transformation des biopolymères complexes (lignine, cellulose, kératine, chitine, suberine...) en des formes minérales simples (Book *et al.*, 2014; Padilla-Reynaud *et al.*, 2015; Beaulieu *et al.*, 2016; Mukhtar *et al.*, 2017).

I.3.9.1.3. Production des sidérophores

Lorsque les cellules microbiennes perçoivent une carence en fer, l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des sidérophores est activée (Saha *et al.*, 2013). Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire de 200 à 2.000 kDa avec une forte affinité pour le fer (Fe^{3+}) et permettent la nutrition en fer des microorganismes (Saha *et al.*, 2013). Ces molécules contiennent généralement l'un ou plusieurs de ces quatre groupements assurant la chélation des ions Fe^{3+} : les catécholates, les phénolates, les hydroxamates et les α -hydroxycarboxylates (Miethke et Marahiel, 2007). La production des sidérophores en quantité suffisante par les agents de biocontrôle permet de limiter la disponibilité de l'ion ferrique Fe^{3+} aux agents pathogènes et vont de ce fait développer la résistance contre les agents pathogènes (Sureshbabu *et al.*, 2016). Plusieurs études ont montré la production des sidérophores par les actinobactéries et leur implication dans le biocontrôle de plusieurs agents phytopathogènes (Mohandas *et al.*, 2013; Passari *et al.*, 2015; Sreevidya *et al.*, 2016; Nafis *et al.*, 2019).

I.3.9.1.4. Production des composés volatils

Les agents de biocontrôle en particulier les actinobactéries sont capables de produire les composés volatils pour combattre les agents phytopathogènes. Ces composés volatils sont de nature inorganique ou organique. Parmi les composés volatils inorganiques produits par les bactéries nous avons entre autre le dioxyde de carbone (CO₂), l'ammoniac (NH₃) et l'acide cyanhydrique (HCN) (Effmert *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré l'inhibition de la croissance des agents phytopathogènes par les actinobactéries endophytes et rhizosphériques productrices des composés volatils inorganiques tels que l'ammoniac et l'acide cyanhydrique (Passari *et al.*, 2015; Damam *et al.*, 2016). Parmi les composés volatils organiques nous avons entre autres: méthane (CH₄), méthanol (CH₂OH), éthanol (C₂H₅OH), butanol (CH₃-CH₂-CH₂-CH₂OH), acétone (CH₃-CO-CH₃), acétoïne et butane-2,3-diol (Effmert *et al.*, 2012). Olanrewaju et Babalola. (2019) ont montré que les composés volatils organiques produits par les *Streptomyces* jouent un rôle important dans le biocontrôle des agents phytopathogènes.

I.3.9.2. Actinobactéries comme des agents promoteurs de la croissance de la plante (PGP)

Les agents PGP sont des microorganismes bénéfiques aux plantes, de plus en plus utilisés en agriculture dans le but de booster le rendement des cultures en augmentant la disponibilité des nutriments, en améliorant la croissance des plantes et en les protégeant contre les maladies et les ravageurs (Grobelač *et al.*, 2014). Les agents PGP peuvent favoriser et faciliter la croissance des plantes sous des conditions de stress biotique ou abiotique par des moyens directs ou indirects. Parmi les PGP, les PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) sont les plus étudiées en raison de leur capacité à coloniser les racines des plantes (Kang *et al.*, 2014). Selon leurs activités, les PGP sont classés comme: biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones), et agents de biocontrôle ou biopesticides (luttent contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques) (Figure 12).

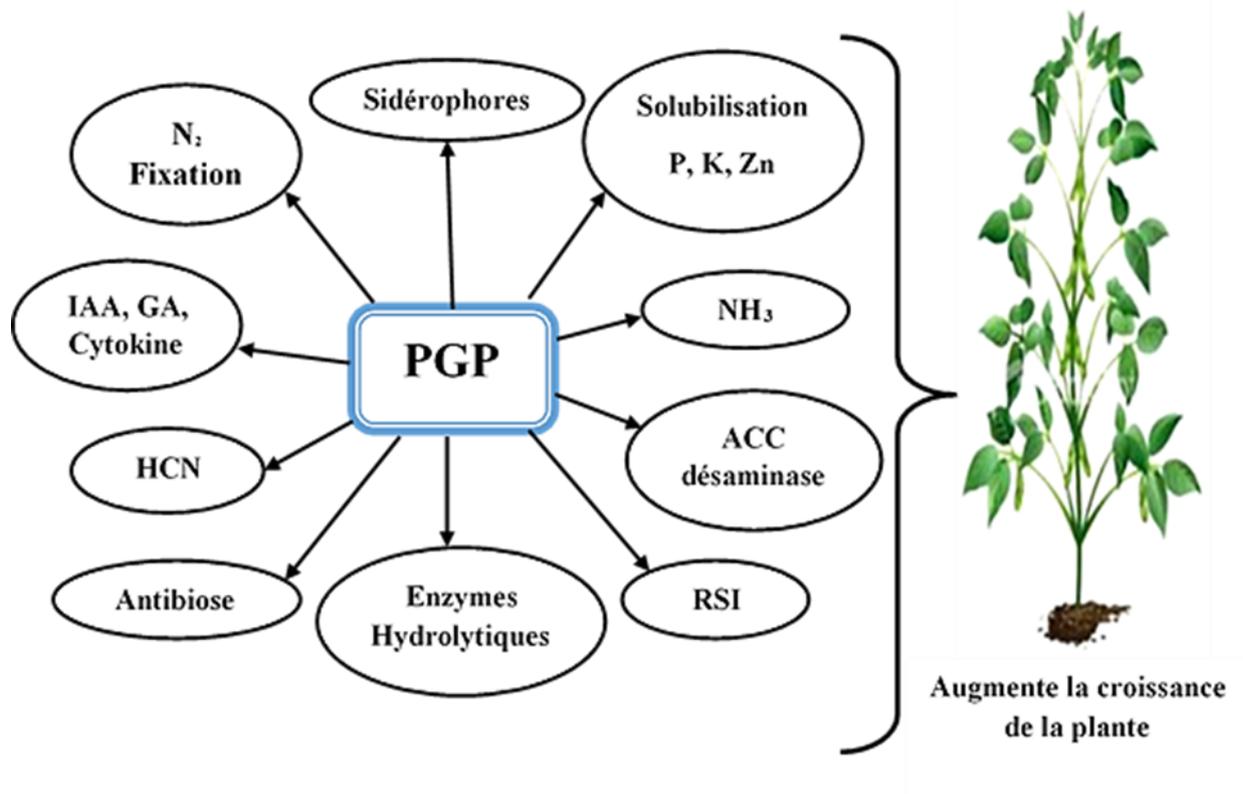


Figure 12: Promotion de la croissance des plantes par les microorganismes PGP (Photo Djuidje, 2017).

Les PGP agissent selon deux mécanismes: les mécanismes directs qui sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme et les mécanismes indirects qui se produisent généralement en dehors de la plante. Ces mécanismes peuvent être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de croissance des plantes.

I.3.9.2.1. Mécanismes directs des microorganismes PGP

– La fixation de l'azote

L'azote (N) est le plus important nutriment vital pour la croissance, le développement et la productivité de la plante. Bien que l'azote soit présent à environ 78 % dans l'atmosphère (N_2), ce nutriment vital n'est pas toujours disponible pour la croissance des plantes. Alors, l'azote atmosphérique (N_2), est convertit par les microorganismes fixateurs d'azote en des formes utilisables par les plantes à travers un procédé biologique qui change l'azote en ammoniac en utilisant un système complexe d'enzymes connus sous le nom de nitrogenases (Kim et Rees, 1994). La dépendance aux engrais chimiques azotés peut être minimisée par l'utilisation des engrais biologiques à base de bactéries impliquées dans la fixation de l'azote. Les organismes fixateurs d'azote sont de deux types: symbiotiques (Esitken *et al.*, 2006), et non symbiotiques (Bhattacharyya et Jha, 2012). Les bactéries fixatrices d'azote peuvent fournir seulement une petite quantité d'azote fixée par association aux plantes hôtes (Glick, 2012). Une addition significative de la fixation d'azote à partir de l'atmosphère et une balance positive de l'azote

étaient observées dans le système sol-plante dans les expériences en serre ou *Pisum sativum* pouvaient croître avec l'application de *Streptomyces lydicus* WYEC108 (Tokala *et al.*, 2002).

– **La solubilisation du phosphate**

Le phosphore (P) est le second plus important nutriment nécessaire pour la croissance des plantes après l'azote et est abondamment disponible dans les sols sous deux formes: organique et inorganique (Klan *et al.*, 2009). Le phosphate organique dans le sol est largement présent sous la forme d'inositol phosphate. Il est synthétisé par les microorganismes et les plantes et est la forme la plus stable de phosphate organique dans le sol, représentant jusqu'à 50 % de phosphate organique total. Les autres composés de P organique dans le sol sont sous la forme de phosphomonomères, phosphodiesters (incluant les phospholipides et les acides nucléiques) et les phosphotriesters (Glick, 2012). Plusieurs de ces composés P sont de hauts poids moléculaire qui peuvent être bioconvertir en d'autres ions phosphate solubles (P_i , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}), en phosphate organique de faibles poids moléculaire pour être assimilés par les cellules (Bhattacharyya et Jha, 2012). Le procédé biologique de conversion de la forme inorganique du phosphore en forme organique ($H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}) a été nommé comme la solubilisation du phosphore minéral (Hinsinger, 2001). Dans ce contexte, les microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) peuvent fournir la forme disponible de P à la plante et peuvent être des substituts d'engrais chimiques phosphatés (Klan *et al.*, 2009). Plusieurs études ont été effectuées sur l'effet des bactéries solubilisant le phosphate (BSP) dans plusieurs plantes. Par exemple, l'inoculation dans les graines de blé par deux BSP a révélé que les bactéries augmentaient significativement les paramètres de croissance des semis et l'absorption des nutriments (Sarker *et al.*, 2014).

– **Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)**

L'AIA est la phytohormone la plus importante du groupe des auxines qui stimule la croissance et le développement de la plante (Spaepen et Vanderleyden, 2011). L'AIA est produit à partir du tryptophane qui est le précurseur principal (Zaida *et al.*, 2009). Cette phytohormone peut promouvoir la croissance des plantes par la stimulation de l'élongation cellulaire, l'initiation des racines, la germination des graines, la stimulation de la division cellulaire, l'initiation des racines latérales et adventives, l'amélioration de l'absorption des minéraux et des éléments nutritifs du sol, le développement des racines et elle stimule la plante à résister aux conditions de stress (Klan *et al.*, 2009; Glick, 2012; Gupta *et al.*, 2015) (Figure 13). En particulier, la production de l'AIA semble être une propriété de la promotion de la croissance de la plante la plus répandue parmi les PGP. Plusieurs études ont montré la production de l'AIA par les actinobactéries (Parten et Glick, 2002; Abd-Allah *et al.*, 2013; Boudjeko *et al.*, 2017; Shariffah-Muzaimah *et al.*, 2018).

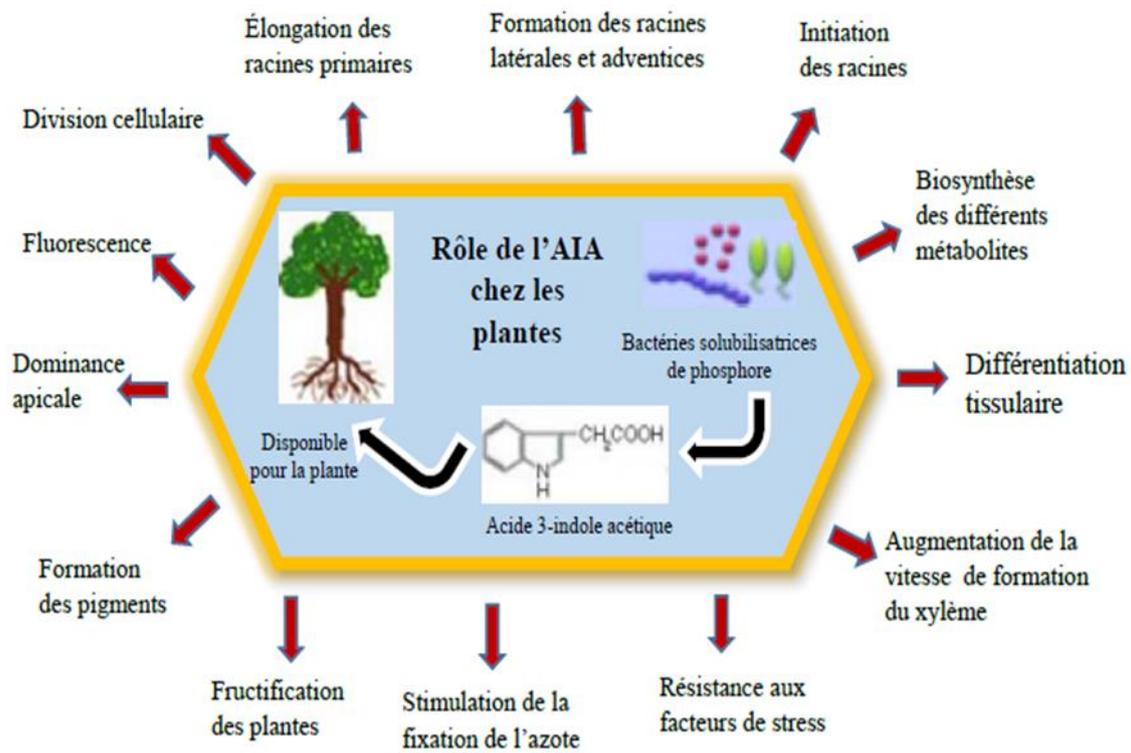


Figure 13: Rôle de l'Acide Indole Acétique dans l'amélioration de la croissance de la plante (Khan *et al.*, 2009).

– Production des cytokinines et les gibbérellines (GA)

Les cytokinines sont un groupe de composés naturels qui régulent un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Gupta *et al.*, 2015). Les gibbérellines (GA) sont des hormones végétales omniprésentes qui assurent plusieurs fonctions métaboliques pendant la croissance des plantes, comme la germination des graines, l'allongement des tiges, l'expression sexuelle, la floraison, la formation de fruits. Les (GA) permettent également d'améliorer la croissance des plantes (Kang *et al.*, 2012).

– Production de l'éthylène

Généralement, l'éthylène est un métabolite essentiel pour la croissance normale et le développement des plantes (Khalid *et al.*, 2006). Ce régulateur de croissance est produit de manière endogène approximativement par toutes les plantes et est aussi produit par différents procédés biotiques et abiotiques dans les sols et est important dans l'induction des changements physiologiques multiformes chez les plantes. Bien qu'il soit un régulateur de croissance de la plante, l'éthylène a aussi été établi comme étant une hormone de stress (Saleem *et al.*, 2007). L'éthylène est un gaz impliqué dans beaucoup de processus physiologiques, comme la

germination de la graine, la différenciation de tissus, la formation et l'élongation de la racine, le développement latéral des bourgeons, le fleurissement, l'ouverture de la fleur, la sénescence d'organes, la maturation de fruits et l'abscission de la feuille et du fruit (Gupta *et al.*, 2015). A des concentrations modérées, l'éthylène agit comme stimulateur de la croissance des plantes mais au-delà de cette concentration, il devient inhibiteur de l'élongation racinaire (Glick *et al.*, 2007).

– **Production de l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

Un nouveau mode de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène a été proposé au cours de ces dernières années. Les PGP produisent l'ACC désaminase, une enzyme qui clive l'acide-1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), qui est le précurseur immédiat de la biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène et favoriserait un allongement des racines (Bhattacharyya et Jha, 2012).

Les bactéries PGP qui produisent l'enzyme ACC désaminase, soulagent la plante de plusieurs stress causés par les infections, l'absorption des métaux lourds, la salinité et même la sécheresse (Gupta *et al.*, 2015). Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGP est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGP s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose et Glick, 2001). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniac et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin et Glick, 2001) par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante. Plusieurs études ont montré la production de l'ACC désaminase par les actinobactéries et leur effet dans la stimulation de la croissance des plantes (Palaniyandi *et al.*, 2013; Abaid-Ullah *et al.*, 2015).

I.3.9.2.2. Mécanismes indirects des microorganismes PGP

-Production des enzymes de lyse de la paroi cellulaire

Les agents de biocontrôle produisent les enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi cellulaire des champignons et bactéries pathogènes, la membrane cellulaire et les facteurs de virulence extracellulaires impliqués dans le contrôle des maladies des plantes (Sathya *et al.*, 2017). Plusieurs enzymes hydrolytiques extracellulaires de classes variées sont impliquées dans le biocontrôle des agents pathogènes des plantes à savoir les nucléases, les lipases, les glucanases, les xylanases, les amylases, les protéinases, les peptidases, les peroxydases, les chitinases, les cellulases, les ligninases, les pectinases, les hémicellulases et les kératinases.

Toutes ces enzymes ensemble, constituent un potentiel biocontrôle contre la large gamme d'agents phytopathogènes, parce que les parois cellulaires de la majorité des champignons et des bactéries pathogènes sont constituées de polymères tels que les chitines, les glucanes, les celluloses, les protéines et les lipides (Fodil *et al.*, 2011). Plusieurs actinobactéries en particulier les *Streptomyces* spp. ont été identifiés comme produisant les enzymes hydrolytiques qui inhibent à la fois la croissance des champignons phytopathogènes et des insectes ravageurs (Yandigeri *et al.* 2015; Priya *et al.*, 2017).

– **Compétition pour l'espace et les nutriments**

Les PGP peuvent éliminer les agents phytopathogènes par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Dans le cas des PGPR, leur nombre sur les racines doit être suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'établir une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Gupta *et al.*, 2000). Le fer est l'élément vital de presque toutes les formes de vie. Dans l'optique de capturer le fer, les microorganismes ont développé des mécanismes spécifiques impliquant la production des sidérophores.

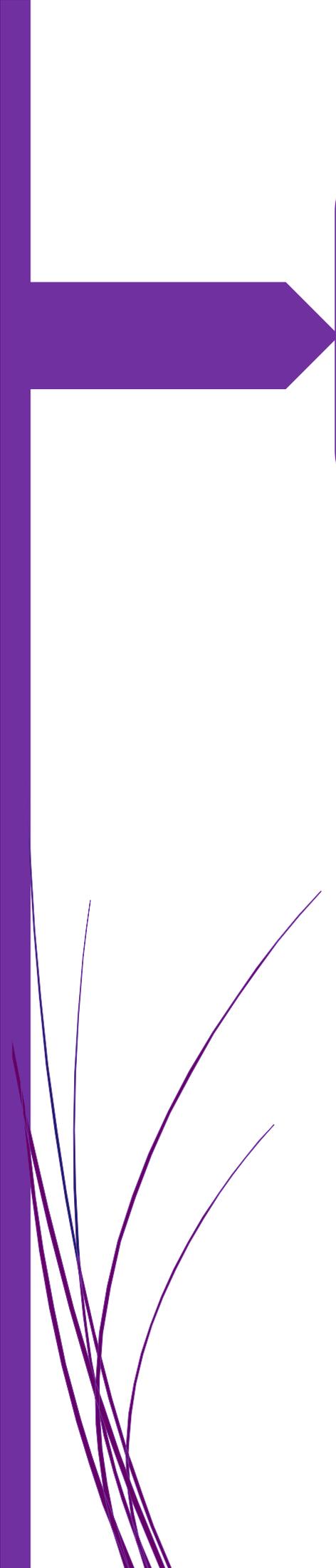
Les sidérophores sont des molécules de faibles poids moléculaire, synthétisées sous des conditions limitées en fer. Ils sont produits dans le milieu extracellulaire pour lier le fer et d'autres ions pour former les complexes métaux-sidérophores. Ces complexes sont ensuite liés par les cellules et transportés dans le milieu intracellulaire (Nakouti et Hobbs, 2012). Le fer est utilisé comme cofacteur de plusieurs transports d'électrons des protéines, de précurseurs de réduction de ribotide de l'ADN, pour la formation d'autres composés essentiels (Neilands, 1995). Dans les sols, le fer est présent sous forme d'ion Fe^{3+} que les microorganismes ne peuvent pas directement assimiler, ainsi les microorganismes produisent les molécules chélatrices de fer ou sidérophores. Ces molécules ont une grande affinité pour les ions Fe^{3+} et forment des complexes qui sont importés dans les cellules. Les sidérophores sécrétés par les microorganismes sont généralement classifiés comme les hydroxamates, catécholates et carboxylates selon le groupe principal à chelater. La plupart des sidérophores produits par les bactéries sont de type hydroxamate et catécholate et peu de bactéries (*Rhizobium melloti* and *Straphylococcus hyicus*) produisent les siderophores de type carboxylate. Les bactéries ayant un grand pouvoir de chélation du fer peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres microorganismes de la rhizosphère (Ongena *et al.*, 2002, Meziane *et al.*, 2005). Les sidérophores étant principalement spécifiques au fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds pour atténuer leur toxicité ou posséder d'autres fonctions biologiques (Klan *et al.*, 2009). Plusieurs études ont montré la production des sidérophores par les actinobactéries (Mohandas *et al.*, 2013; Passari *et al.*, 2015; Sreevidya *et al.*, 2016).

– **Production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

L'acide cyanhydrique est un antibiotique de nature volatile produit par les microorganismes PGP pour inhiber la croissance des agents pathogènes fongiques (Bhattacharyya et Jha, 2012; Anfal *et al.*, 2014). Les études récentes ont montré que les métabolites produits par les microorganismes tels le HCN interviennent dans la stimulation de la croissance de la plante (Geetha *et al.*, 2014; Bhosale et Kadam, 2015; Damam *et al.*, 2016). En outre, le HCN produit par les microorganismes joue également un rôle important dans la suppression des maladies des plantes (Hastuti *et al.*, 2012; Kaberi *et al.*, 2014; Passari *et al.*, 2015).

– **Production de l'ammoniac (NH₃)**

La disponibilité de l'azote est un facteur crucial pour le développement des plantes. Les bactéries PGP peuvent synthétiser l'ammoniac qui est utilisé par les plantes comme source d'azote pour leur croissance et leur développement (Marques *et al.*, 2010). L'ammoniac produit par les bactéries PGP joue également un rôle de signalisateur dans l'interaction plantes-PGP (Chitra *et al.*, 2002). En outre, la production de NH₃ sert comme facteur adéquat pour la virulence des agents pathogènes opportunistes. Des études récentes ont montré la production de l'ammoniac par les actinobactéries promotrices de la croissance de la plante et le rôle de ce métabolite dans la suppression des maladies des plantes (Passari *et al.*, 2015; Anwar *et al.*, 2016).



*CHAPITRE II:
MATÉRIEL ET
MÉTODES*

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Matériel végétal

Les échantillons de racines utilisés pour l'isolement des actinobactéries ont été collectés à partir des plants de macabo sains d'apparence dans les champs et forêts de six localités de la région du Sud-Ouest autour du Mont Cameroun durant le mois de Décembre en 2013 (Figure 14a).

Les boutures de macabo utilisées pour la production des vitroplants ont été prélevées à partir des plants de macabo asymptotiques (cultivar blanc) dans la région du Centre au Cameroun durant le mois de Décembre en 2016 (Figure 14b).



Figure 14: Racines (a) et boutures (b) prélevées à partir des plants d'apparence saine de macabo (Photo Djuidje 2013 et 2016).

II.1.2. Matériel édaphique

Les échantillons de sols utilisés pour l'isolement des actinobactéries ont été prélevés à partir de la rhizosphère des plants de macabo sains d'apparence dans les champs et forêts de six localités du Sud-Ouest, autour du Mont Cameroun durant le mois de Décembre en 2013. Les coordonnées géographiques des différentes localités de prélèvement des échantillons ont été regroupées dans le Tableau III.

Tableau III: Origine des échantillons de sols, racines et boutures de macabo.

Localités	Zone Agro-écologique	Altitude (m)	Systèmes d'exploitation	Nature de l'échantillon	Coordonnées géographiques	
Bonakanda	IV	742	champ	racines et sols	04°12'417"N	009°16'303"E
Boteva	IV	768	forêt	racines et sols	04°13'159"N	009°17'132"E
Ekona	IV	433	champ	racines et sols	04°12'837"N	009°19'828"E
Ekona Lelu 1	IV	940	champ	racines et sols	04°16'413"N	009°18'062"E
Ekona Lelu 2	IV	788	forêt	racines et sols	04°16'110"N	009°18'433"E
Kumba	IV	548	forêt	racines et sols	04°30'716"N	009°28'176"E
Nkolbisson	V	718	champ	boutures	03°52'12"N	11°27'31"E

Zone Agro-écologique IV: Forêt humide à pluviométrie monomodale; Zone Agro-écologique V: Forêt humide à pluviométrie bimodale.

II.1.3. Matériel biologique

La souche de *P. myriotylum* provenait de la banque de souches du laboratoire Régional de Biotechnologie de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), Ekona-Buea (Cameroun), où elle a été isolée et identifiée. Les souches de *Phytophthora megakarya*, *Fusarium oxysporum* et *Colletotrichum gloeosporioides* (Figure 15), provenaient de la banque de souches du laboratoire Régional de Lutte Biologique et de Microbiologie Appliquée de l'IRAD, Nkolbisson-Yaoundé (Cameroun); les bactéries pathogènes à savoir *Agrobacterium tumefaciens* et *Streptomyces Scabiei* EF-35 (Figure 16) provenaient de la banque de souches du laboratoire de Phytopathologie du département de Biologie, Université de Sherbrooke, Québec (Canada).

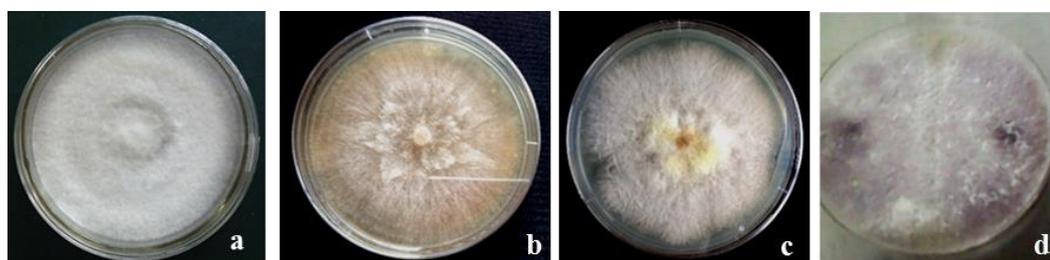


Figure 15: Souches de champignons phytopathogènes (a) *P. myriotylum* et (b) *P. megakarya* (c) *F. oxysporum* et (d) *C. gloeosporioides* sur le milieu PDA (Photo Djuidje, 2014).

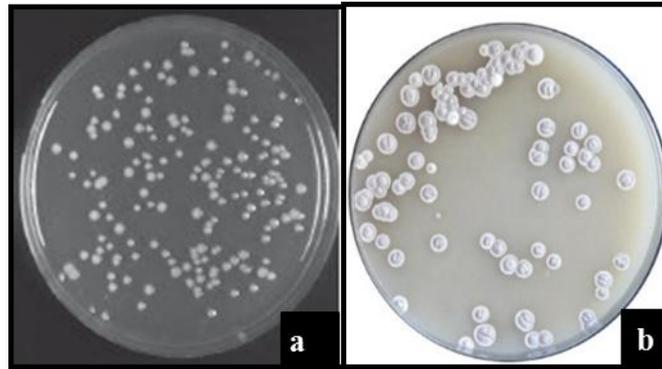


Figure 16: Souches de bactéries pathogènes (a) *A. tumefaciens* et (b) *S. Scabiei* EF-35 (Photo Djuidje, 2014).

II.2. METHODES

II.2.1. Criblage des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de *P. myriotylum* et d'autres agents phytopathogènes

II.2.1.1. Echantillonnage, prétraitement et analyses physico-chimiques des échantillons de sol

II.2.1.1.1. Echantillonnage

Six échantillons de racines et de sols de la rhizosphère de macabo ont été prélevés dans les champs et forêts des localités de Bonakanda, Botéva, Ekona, Ekona Lelu1, Ekona Lelu 2 et Kumba situées autour du Mont Cameroun (Figure 17).

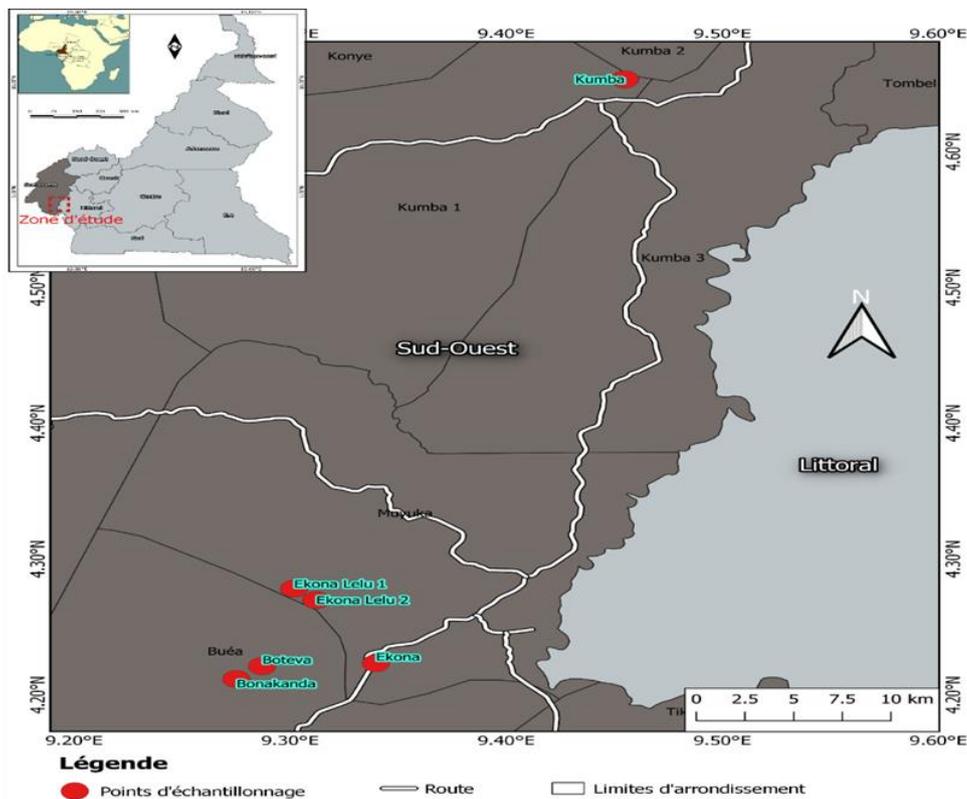


Figure 17: Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons

– Sol

Les échantillons de sols ont été prélevés selon le protocole décrit par Errakhi *et al.* (2009). À l'aide d'une grande spatule stérile, après avoir ôté les 5 à 10 premiers centimètres de la couche superficielle du sol située autour des racines des plants de macabo sains d'apparence, 100-150 g de sol ont été prélevés dans cinq points différents de chaque système d'exploitation de manière à former un carré et déposés sur du papier aluminium. Le mélange des cinq prélèvements dans chaque site constitue l'échantillon de sol de la localité. L'échantillon de sol composite obtenu a été débarassé de racines et cailloux, puis 500 g de chaque échantillon ont été placés dans des sachets stériles et transportés au laboratoire pour les analyses.

– Racines

Les racines des plants de macabo sains d'apparence ont été collectées selon la technique de Nimnoi *et al.* (2010). Cette technique consistait à prélever à l'aide de scalpels stériles les racines, de les débarassées de débris de terre et les ensachées dans des sacs stériles avant de les transporter au laboratoire où elles ont été conservées à 4 °C avant utilisation.

II.2.1.1.2. Prétraitement des échantillons de sol

– Séchage des échantillons de sol

Les échantillons du sol composites ont été transportés au laboratoire et séchés à l'air libre pendant 10 jours puis écrasés et tamisés à l'aide d'un tamis de 0,8 mm de mailles. Le séchage des échantillons du sol à l'air libre pendant dix jours, a pour but la réduction de la flore bactérienne contaminante. En effet les conidiospores des actinomycètes résistent bien à la dessiccation par rapport aux autres bactéries de coloration de Gram positif et négatif qui vont crever (Suwan *et al.*, 2012).

– Enrichissement des échantillons de sol au carbonate de calcium (CaCO₃)

Un gramme de chaque échantillon de sol séché à l'air libre et tamisé a été mélangé avec 0,1 g de carbonate de calcium (CaCO₃) et l'ensemble a été incubé à 28 °C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité. L'enrichissement des échantillons de sols au CaCO₃ a pour but de stimuler la sporulation des colonies d'actinobactéries, mais aussi de diminuer la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération court et qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinobactéries (Arhad *et al.*, 2012).

II.2.1.1.3. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

– Mesure du pH des échantillons de sol

Les suspensions de sol ont été préparées en suspendant 1 g de sol séché et tamisé dans 10 mL d'eau distillée. L'ensemble a été mélangé vigoureusement à l'aide d'un vortex (BIOBLOCK Scientific). Les suspensions de sol ont été laissées au repos pendant 30 min et le pH a été ensuite mesuré dans le surnageant à l'aide d'un pH-mètre (Lee et Hwang, 2002).

– Détermination du pourcentage d’humidité

Dix grammes de sol frais ont été séchés à 105 °C pendant 48 heures (h) dans un four, jusqu’à obtention d’un poids constant (Lee et Hwang, 2002). Le pourcentage d’humidité a été calculé d’après la formule suivante:

$$H: \text{Humidité en pourcent (\%)} \quad H = \frac{PH - PS}{PH} \times 100$$

PH: Poids humide de l’échantillon

PS: Poids sec de l’échantillon

– Détermination du taux de matière organique

Dix grammes de sol frais ont été préalablement séchés à 105 °C pendant 48 h afin d’éliminer l’eau et par la suite incinérés dans un four à moufle à haute température (405 °C) pendant 16 h (Lee et Hwang, 2002). La matière organique a été calculée comme suit:

$$\% \text{ matière organique} = \frac{\text{Poids avant calcination} - \text{poids après calcination}}{\text{poids avant calcination}}$$

II.2.1.2. Isolement, énumération, purification et conservation des actinobactéries

II.2.1.2.1. Isolement des actinobactéries à partir des andosols rhizosphériques

La population d’actinobactérie présente dans les sols rhizosphériques des plants de macabo sains d’apparence prélevés dans les localités autour du Mont Cameroun a été déterminée par la méthode de dilution en série suivant le protocole modifié de Kitouni *et al.* (2005). Un gramme de sol traité a été suspendu dans 10 mL d’eau physiologique (NaCl 9 g/L) stérile afin de constituer la solution mère. Une série de dilution décimale a été réalisée par la suite à partir de la solution mère. Après agitation au vortex pendant 10 min, 100 µL des dilutions 10⁻³, 10⁻⁴ et 10⁻⁵ des suspensions de sol ont étéensemencées à la surface des boîtes de Pétri contenant les milieux de cultures Bennett (annexe 1) et GLM (annexe 1) supplémentés de la nystatine 40 µg/mL (antifongique) et l’acide nalidixique 10 µg/mL (antibactérien Gram négatif). Les boîtes ont été incubées à 28 °C et observées après deux, trois et quatre semaines d’incubation. Les colonies d’actinobactéries ont été reconnues sur la base de leur aspect morphologique et récupérées.

II.2.1.2.2. Enumération des actinobactéries des andosols rhizosphériques

Le nombre d’unité formant colonie par gramme de sol sec (UFC/g) a été calculé pour chaque échantillon en considérant les boîtes de Pétri interprétables renfermant 30-300 colonies suivant la formule:

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V \times n \times d}$$

N: nombre d'unité formant colonies (UFC) par mL de la suspension initiale

Σ : somme des colonies des boîtes interprétables

V: volume de la solution déposée pour ensemercer les boîtes de Pétri (mL)

n: nombre de boîtes considérées pour la dilution retenue

d: facteur de la dilution retenue

II.2.1.2.3. Isolement des actinobactéries à partir des racines de macabo

L'isolement des actinobactéries à partir des racines de macabo a été effectué suivant le protocole modifié de Cao *et al.* (2004). Les racines de macabo ont été lavées à l'eau du robinet. La stérilisation de la surface des racines a été effectuée par immersion de ces dernières dans la solution d'éthanol 70 % pendant 5 min, puis dans l'eau de javel (NaOCl) 15 % pendant 1 min. Les agents de stérilisation ont été éliminés par rinçage trois fois avec de l'eau distillée stérile. La troisième eau de rinçage a été incubée afin de vérifier l'effectivité du protocole de stérilisation. Les racines ont été broyées dans le tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,0) et les broyats ont été transférés dans les tubes éppendorfs stériles. Les tubes ont été chauffés à 55 °C pendant 15 min. Après ce traitement, 100 μ L de broyat ont été étalés sur les boîtes de Pétri contenant le milieu Eau-agar supplémenté d'acide nalidixique (10 μ g/mL) et de la nystatine (40 μ g/mL) pour inhiber la croissance des bactéries Gram négatifs et celle des champignons respectivement. Les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 14 à 21 jours. Les colonies d'actinobactéries ont été reconnues sur la base de leur aspect morphologique et récupérées.

II.2.1.2.4. Purification et conservation des actinobactéries

Les colonies distinctes endophytes et rhizosphériques présentant des aspects macroscopiques et microscopiques typiques aux actinobactéries ont été repiquées par la méthode des stries par épuisement sur le milieu ISP2 (annexe 1). Cette dernière opération a été répétée jusqu'à obtention des isolats purs (Cheraiti et Kirane, 2012) et les isolats purs ont été conservés à 4 °C sur la gélose inclinée pour un usage à court terme et à -20 °C en suspension dans une solution de glycérol 20 % (v/v) pour un usage à long terme (Kitouni, 2007).

II.2.1.3. Préparation du stock de spores d'actinobactéries

Les suspensions de spores des isolats distincts d'actinobactéries ont été préparées selon le protocole décrit par Houda (2011). Les colonies d'actinobactéries pures ont été cultivées dans des erlenmeyers de 150 mL contenant 25 mL de bouillon de culture YME + CaCO₃. Après 2 à 3 jours d'incubation à 30 °C sur un agitateur rotatif à la vitesse 200 rpm, les précultures ont été centrifugées à 4000 g pendant 10 min. Après centrifugation, les surnageants ont été vidés et remplacés par la solution saline ou eau physiologique (NaCl 9 g/L) puis homogénéisés à l'aide

d'un vortex. Les suspensions obtenues ont été centrifugées à 4000 g pendant 10 min. Après la seconde centrifugation, les surnageants ont été vidés et les culots complétés avec un petit volume de solution d'eau physiologique, l'ensemble a été bien mélangé à l'aide d'un vortex. Par la suite, 1 mL de chaque suspension obtenue a été étalé sur le milieu de culture YMEA + CaCO₃ et les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C jusqu'à sporulation. Après sporulation, les spores ont été collectées à l'aide de billes de verre stériles et les suspensions de spores ont été conservées dans une solution de glycérol 20 % à -20 °C. Après 24 h de congélation à -20 °C, la pureté des stocks a été vérifiée pour détecter une éventuelle contamination. De ce fait, les spores ont été inoculées dans le bouillon YME (annexe 1) pendant 48 h puis les cultures ont été observées au microscope optique. Par ailleurs, 10 µL des spores ont été striés par épuisement sur la gélose YMEA (annexe 1) et les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C et la présence ou pas de contaminants a été observée après croissance.

II.2.1.4. Activités antifongiques des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de *Pythium myriotylum* et d'autres champignons phytopathogènes

Les activités antifongiques des isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques ont été évaluées contre quatre champignons phytopathogènes: *P. myriotylum* (agent responsable de la pourriture racinaire du macabo); *P. megakarya* (agent responsable de la pourriture brune du cacaoyer); *F. oxysporum* (agent responsable de la fusariose des racines et du collet de la tomate, de la pomme de terre etc...) et *C. gloeosporioides* (agent responsable de l'antracnose chez l'igname) selon le protocole décrit par Soares *et al.* (2006). Les isolats d'actinobactéries ont été ensemencés sur le milieu PDA (annexe 1) au centre de la boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Ces cultures ont été incubées à 28 ± 2 °C pendant 5 jours. Après incubation, deux disques de 6 mm de diamètre de culture de champignons âgés de 8 jours ont été déposés de part et d'autre de la culture d'actinobactérie. La distance entre le disque du champignon et le bord de la boîte était de 15 mm. Pour chaque souche fongique, un traitement témoin a été réalisé en déposant deux disques sur le milieu PDA exempt des isolats d'actinobactéries.

Toutes les boîtes ont été incubées à 28 ± 2 °C pendant 14 jours et le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule:

$$I = \frac{DT - DE}{DT} \times 100$$

DT: distance parcourue par le champignon en absence des isolats d'actinobactéries (mm).

DE: distance parcourue par le champignon en présence des isolats d'actinobactéries (mm).

I: pourcentage d'inhibition (%).

II.2.1.5. Activités antibactériennes des isolats d'actinobactéries

Les activités antibactériennes des différents isolats d'actinobactéries ont été évaluées vis-à-vis d'*Agrobacterium tumefaciens* (agent responsable de la galle du collet chez la pomme de terre) et de *Streptomyces scabiei* EF-35 (agent responsable de la galle commune de la pomme de terre) tel que décrit par Zhao *et al.* (2012). Les isolats d'actinobactéries ont été ensemencés en stries serrées sur le milieu YMEA et incubés à 30 °C pendant 14 jours. Après la période d'incubation, les disques de 6 mm d'actinobactéries ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et placés sur le milieu Mueller-Hinton (annexe 1) préalablement inoculé avec les bactéries tests à raison de 100 µL de suspension de spores à 10⁷ UFC/mL. Les cultures ont été incubées premièrement à 4 °C pendant 18 h pour permettre la diffusion des substances bioactives. Après cette période, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pour *A. tumefaciens* et 30 °C pour *S. scabiei* EF-35. L'activité antibactérienne a été évaluée après 48 h d'incubation par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètre.

II.2.2. Caractérisation polyphasique des isolats antagonistes

II.2.2.1. Caractérisation morphologique

II.2.2.1.1. Morphologie des colonies

Les isolats d'actinobactéries antagonistes ont été ensemencés sur le milieu ISP2 en utilisant la méthode des quadrants et incubés à 30 °C pendant 5 jours. Après incubation, les colonies isolées ont été observées pour leur forme, taille, élévation, densité, texture, couleur, odeur et croissance puis toutes ces différentes caractéristiques ont été notées. La coloration de Gram a été également réalisée selon la méthode décrite par Aneja (2003) et l'observation a été faite à l'aide d'un microscope optique (SWIFT).

II.2.2.1.2. Microscopie optique (technique des lamelles)

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinobactéries antagonistes, les colonies ont été observées sous microscopie optique en utilisant la technique des lamelles décrite par Williams et Cross (1971). Une colonie d'actinobactérie a été broyée dans les conditions stériles avec une tige en verre, puis introduite dans 3 à 4 gouttes d'eau distillée et déposée sur une lamelle fermement fixée au milieu ISP2 et faisant un angle de 45 °C. Les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C. Après 7 à 14 jours d'incubation, les lamelles ont été retirées puis déposées sur une lame et observées sous microscope optique grossissement 40 X et 100 X. Les différentes formes des hyphes de spores ont été catégorisées suivant la description de « *Bergey's manual of systematic bacteriology* » (Cross, 1989).

II.2.2.1.3. Microscopie électronique

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique a été réalisée selon les recommandations de Rueda *et al.* (2001). Les isolats d'actinobactéries antagonistes ont été ensemencés sur le milieu ISP2 + CaCO₃ et incubés à 30 °C pendant 14 jours. Après incubation, la gélose a été découpée en petits fragments de 1 cm environ à l'aide d'une lame stérile. Les fragments de gélose ont été ensuite immergés avec la solution de glutaraldéhyde 2,5 % et l'ensemble a été incubé à 4 °C pendant 6 h. Après incubation, les fragments de gélose ont été lavés 3 fois pendant 10 min (durée de chaque lavage) avec une solution de tampon de cacodylate de sodium (0,1 M; pH 7,4). Ensuite, les échantillons ont été fixés à l'aide d'une solution d'osmium 1 % (P/V) à 4°C pendant 2 h. Après fixation, les échantillons ont été lavés 3 fois pendant 10 min durée de chaque lavage avec une solution de tampon de cacodylate de sodium (0,1 M; pH 7,4). Après le lavage avec la solution de tampon, les échantillons ont été par la suite lavés tour à tour pendant 10 min durée de chaque lavage avec les solutions d'éthanol 35 %, 50 %, 75 %, 95 % et ensuite lavés 3 fois pendant 15 min, durée de chaque lavage avec la solution d'éthanol 100 %. Les échantillons déshydratés ont été séchés, avec un point critique de dioxyde de carbone liquide comme fluide de transition, et collés sur des montures en aluminium avec du ruban adhésif double stick. Les échantillons montés ont été revêtus de palladium d'or dans une pulvérisation cathodique revêtue (BALTEC SCD 005) et examinés sous microscopie électronique SEM (JEOL-JSM 5600). Les ornements de la surface des spores ont été catégorisées suivant la description de « *Bergey's manual of systematic bacteriology* » (Cross, 1989).

II.2.2.2. Caractérisation culturelle

Les caractères cultureux des différents isolats d'actinobactéries antagonistes ont été étudiés conformément aux directives de l'*International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966) et « *Bergey's manual of systematic bacteriology* » (Cross, 1989). Les isolats ont été ensemencés sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 (Annexe 1) et incubés à 30 °C pendant 14 à 21 jours. Après incubation, la couleur du mycélium aérien, du mycélium de substrat, la croissance (faible, moyenne, bonne, très bonne) et la sporulation ont été enregistrées.

II.2.2.3. Caractérisation physiologique

L'étude physiologique des isolats antagonistes a été basée sur la production des pigments (mélanoïdes et diffusibles), la tolérance au chlorure de sodium, la croissance à différents pH et températures, la résistance aux antibiotiques, la dégradation de différents substrats, sources de carbone et d'azote.

II.2.2.3.1. Production des pigments mélanoïdes et des pigments diffusibles

La mise en évidence de la production des pigments mélanoïdes et diffusibles a été réalisée sur les milieux ISP6 et ISP7 (annexe 1) respectivement. Ces milieux ont étéensemencés avec des isolats d'actinobactéries âgés de 7 jours et incubés à 30 °C. Une boîte nonensemencée a servi de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoïdes a été faite à partir du 4^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour en comparant avec la boîte témoin. S'il y a production des pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brune-noire caractéristique des pigments mélanoïdes, la couleur a été notée (Shirling et Gottlieb, 1966).

II.2.2.3.2. Effet de la température, pH et la salinité sur la croissance des isolats d'actinobactéries

Les isolats d'actinobactéries âgés de 5 jours ont étéensemencés sur le milieu gélosé Bennett à raison de 3 boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne) après 14 jours d'incubation à 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

Les isolats d'actinobactéries âgés de 5 jours ont étéensemencés sur le milieu gélosé Bennett ajusté aux différentes valeurs de pHs (5, 7, 9 et 11). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C pendant 14 jours. Après incubation, la croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne) (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

Le milieu ISP2 supplémenté de NaCl aux concentrations de 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % (P/V) a étéensemencé par les spores prélevées d'une culture de 14 jours. Après incubation à 30°C pendant 14 jours, la croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne). La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la plus grande concentration présentant une croissance (Shirling et Gottlieb, 1966).

II.2.2.3.3. Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des isolats aux antibiotiques a été effectuée sur le milieu ISP2 supplémenté des antibiotiques suivants: érythromycine (10 mg/L), streptomycine sulphate (10 mg/L), pénicilline (10 mg/L), rifampicine (5 mg/L) et chloramphénicol (25 mg/L). Les actinobactéries antagonistes âgées de 5 jours ont étéensemencées sur le milieu ISP2 renfermant les antibiotiques ci-dessus mentionnés et incubées à 30 °C pendant 14 jours (Smaoui, 2010).

II.2.2.3.4. Utilisation de différentes des sources de carbone

L'utilisation des sources de carbone par les isolats d'actinobactéries a été mise en évidence sur le milieu de base ISP9 (annexe 1) tel que recommandé par Pridham et Gottlieb (1949). Les différentes sources de carbones utilisées à savoir glucose, sucrose, maltose, rhamnose et mannitol ont été stérilisées par filtration et ajoutées au milieu de base à une

concentration finale de 1 % (P/V). Après ensemencement et incubation à 30 °C pendant 14 jours, la croissance des isolats a été estimée par comparaison avec les boîtes témoins. Un témoin négatif, contenant le milieu ISP9 exempt de source de carbone et un témoin positif contenant le milieu ISP9 avec le glucose comme source de carbone.

II.2.2.3.5. Utilisation de différentes sources d'azote

Les différentes sources d'azote utilisées à savoir asparagine, glycine, méthionine, valine, tyrosine et cystéine ont été stérilisées par filtration et supplémentées au milieu ISP9 à une concentration finale de 0,1 % (P/V). Après ensemencement et incubation à 30 °C pendant 14 jours, l'assimilation des sources d'azote par les isolats a été notée par comparaison des boîtes témoin. Un témoin négatif contenant le milieu ISP9 sans source d'azote et un témoin positif contenant le milieu ISP9 avec l'asparagine comme source d'azote (Williams *et al.*, 1983a).

II.2.2.4. Caractérisation biochimique

Plusieurs tests biochimiques tels que le test de la catalase, de l'oxydase, de la nitrate reductase, de l'uréase, de la liquéfaction de la gélatine, de l'hydrolyse de l'amidon et de la caséine, de la dégradation de l'arbutine et l'esculine ont été effectués sur les milieux spécifiques.

II.2.2.4.1. Test de la catalase

La mise en évidence de la production de la catalase par les isolats d'actinobactéries antagonistes a été effectuée suivant le protocole décrit par Reynolds (2011).

Principe

En présence d'une goutte de solution fraîche de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la culture bactérienne produisant la catalase décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en molécules d'eau (H₂O) et d'oxygène (O₂). Cette décomposition se traduit par un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles d'air.



Mode opératoire

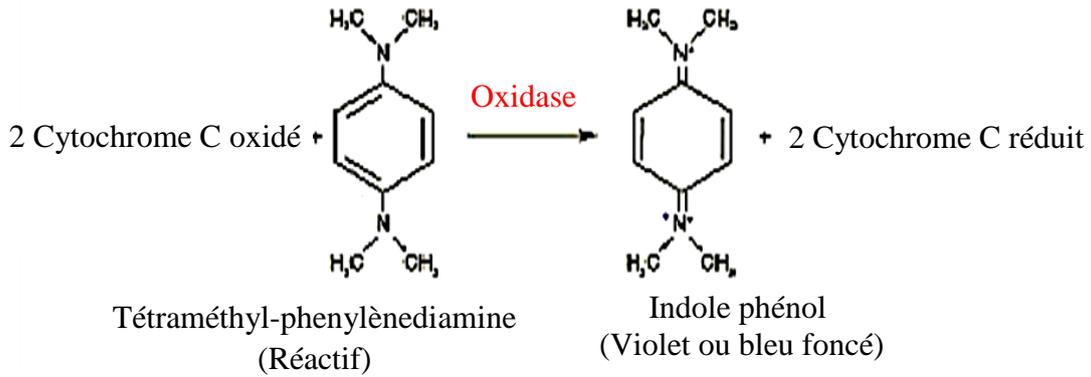
Les isolats antagonistes ont été ensemencés sur le milieu PDA et incubés à 30 °C pendant 5 jours. Après incubation, une petite quantité d'isolats a été placée sur une lame à l'aide d'une anse de platine stérile. Une goutte de solution d'hydroxyde d'hydrogène (3 %) a été prélevée l'aide d'une pipette pasteur et déposée sur les isolats d'actinobactéries. La formation des bulles était caractéristique de la présence de la catalase et l'absence de bulles indiquait l'absence de la catalase.

II.2.2.4.2. Test de l'oxydase

La mise en évidence de la production de l'oxydase par les isolats d'actinobactéries antagonistes a été effectuée suivant le protocole décrit par Reynolds (2012).

Principe

En présence de la Cytochrome C oxydase, la tétraméthyl-phenylènediamine (substrat) est oxydée en indophénols (produit) de couleur violet ou bleu foncé. Quand l'enzyme n'est pas présente, le substrat reste incolore.



Mode opératoire

Les cultures fraîches de 72 h des isolats d'actinobactéries dans le bouillon ISP2 ont été placées sur le papier Whatman stérile n° 1 à l'aide d'une anse de platine stérile. Une goutte de réactif de Kovac (annexe 2) a été additionnée à l'inoculum à l'aide d'un compte goutte. La production de l'oxydase a été caractérisée par le changement immédiat de l'inoculum en violet ou bleu foncé.

II.2.2.4.3. Production de la nitrate réductase

La production de l'enzyme nitrate réductase par les isolats antagonistes a été effectuée suivant le protocole décrit par Lanyi (1987).

Principe

Dans un bouillon de culture contenant le nitrate de potassium (KNO₃), certains microorganismes peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électron terminal durant la respiration en réduisant le nitrate (NO₃) en nitrite (NO₂) par la nitrate reductase et le nitrite est réduit plus tard à son tour en ion ammonium (NH₄⁺) ou en molécule d'ammoniac (NH₃).



Mode opératoire

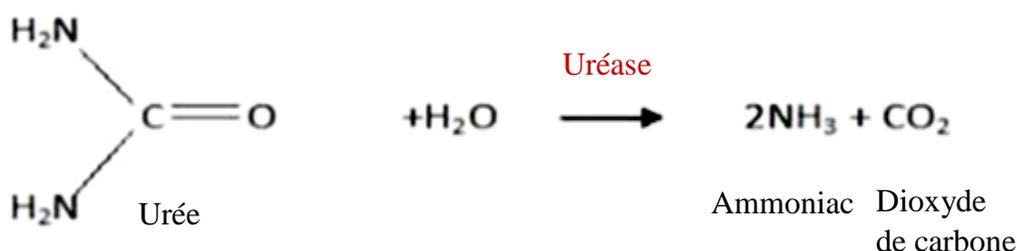
Les isolats d'actinobactéries antagonistes âgés de 5 jours ont été inoculés dans les tubes à essais contenant 10 mL de bouillon nitrate à l'aide d'une anse de platine stérile et incubés à 30 °C pendant 48 h. Après incubation, 5 gouttes de chaque réactif A et B (annexe 2) ont été additionnées aux cultures. La présence de la couleur rouge indique la réduction du nitrate en nitrite.

II.2.2.4.4. Production de l'uréase

La mise en évidence de la production de l'enzyme uréase par les isolats antagonistes a été effectuée suivant le protocole décrit par Lanyi (1987).

Principe

L'urée est un produit de décarboxylation de certains acides aminés. Il peut être hydrolysé en dioxyde de carbone (CO₂) et en ammoniac (NH₃) par les bactéries contenant l'enzyme uréase.



Mode opératoire

Les isolats d'actinobactéries antagonistes âgés de 5 jours ont été inoculés dans les tubes contenant 10 mL de bouillon urée. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 72 h. La présence de la couleur rouge indiquait le test positif tandis que la couleur jaune indiquait le test négatif.

II.2.2.4.5. Dégradation de la gélatine

Le test de la dégradation de la gélatine par les isolats antagonistes a été suivant le protocole décrit par Blazevic et Ederer (1975).

Principe

Les gélatinases hydrolysent la gélatine en polypeptides et en acides aminés. Ces enzymes détruisent la structure de la gélatine et transforment le milieu sémi-solide en milieu liquide en condition réfrigérante.



Mode opératoire

Les isolats d'actinobactéries âgés de 5 jours ont été inoculés dans les tubes contenant le bouillon de gélatine à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes non inoculés ont été utilisés comme témoin. Les tubes (inoculés et non inoculés) ont été incubés à 30 °C pendant 4 jours.

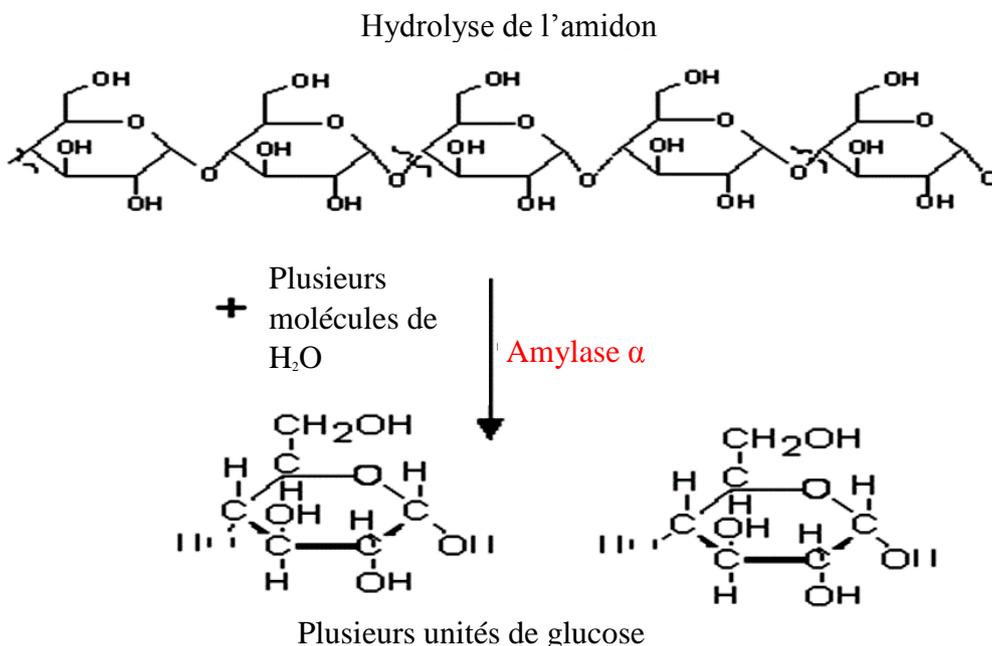
Pour examiner l'hydrolyse de la gélatine après incubation, les tubes ont été conservés à 4 °C pendant 30 min. Lorsque la gélatinase était produite, le milieu restait liquide, tandis que le milieu solide était caractéristique de l'absence d'hydrolyse de la gélatine. Pour chaque isolat, trois répétitions ont été réalisées.

II.2.2.4.6. Hydrolyse de l'amidon

Ce test permet de déterminer l'habilité des microorganismes à produire l'amylase qui hydrolyse l'amidon (large polymère complexe). Ce dernier ne pouvant pénétrer la paroi cellulaire qu'en sous-unités (glucose) utilisables par les microorganismes.

Principe

En présence de la solution d'iode (solution de lugol), l'amidon est hydrolysé en glucose par l'amylase. Cette hydrolyse est caractérisée par la présence des zones claires autour des colonies tandis que la coloration bleue dans le milieu est caractéristique de la présence de l'amidon ou absence de l'amylase.



Mode opératoire

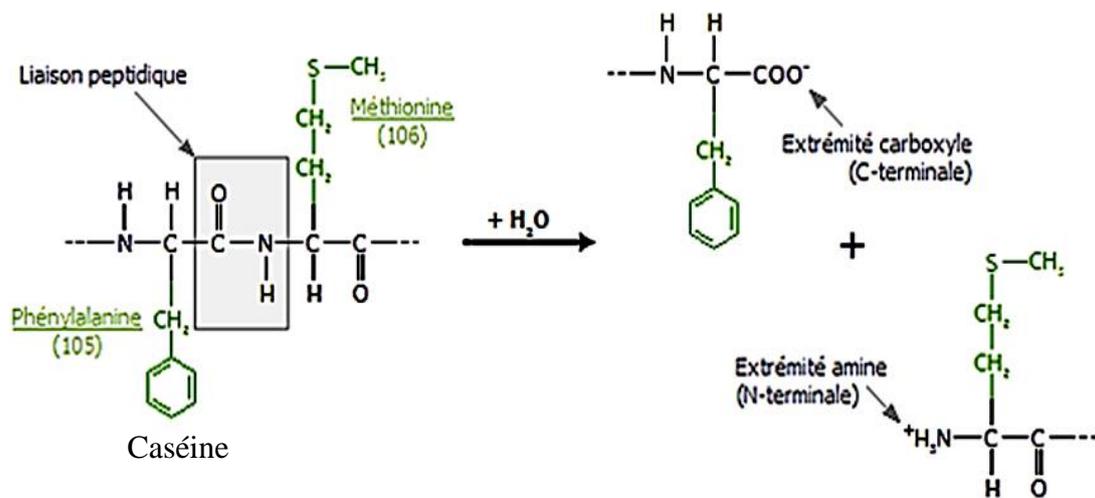
Les isolats d'actinobactéries âgés de 5 jours ont été inoculés sur la gélose nutritive supplémentée de 1 % d'amidon soluble. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures. Après incubation, les boîtes ont été couvertes par la solution de lugol et laissées environ 1 min et l'excès de solution d'iode a été versé. Le développement des zones claires autour des colonies était caractéristique de la dégradation de l'amidon, tandis que la coloration bleue était caractéristique de la présence de l'amidon ou de l'absence de l'amylase (Aouar *et al.*, 2012).

II.2.2.4.7. Hydrolyse de la caséine

La capacité des isolats antagonistes à produire les caséinases hydrolysant la caséine (protéine constituant la majeure partie des composants azotés) a été mise en évidence suivant le protocole décrit par Williams *et al.* (1983b).

Principe

Les caséinases hydrolysent la liaison Phe (105)-Met (106) de la caséine et coupent la molécule en deux. On obtient d'une part le CMP (Caseino-Macro-Peptide) hydrophile et soluble, diffusé à l'extérieur de la micelle de caséines; et d'autre part le PCK (Para-Casein-Kappa) hydrophobe qui reste à l'intérieur.



Mode opératoire

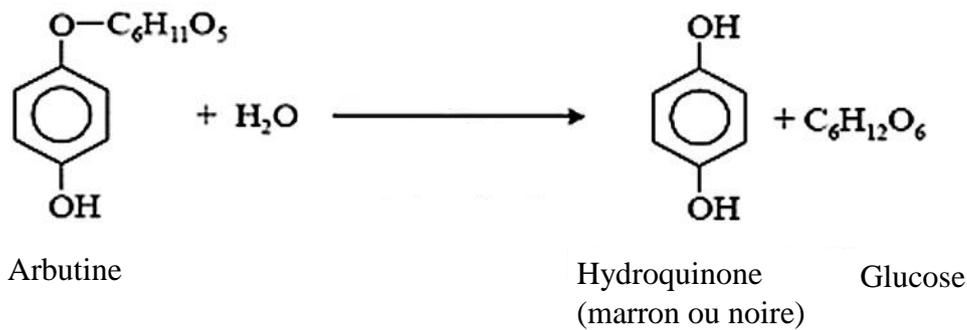
Les isolats d'actinobactéries antagonistes âgés 5 jours ont été ensemencés sur le milieu gélosé Bennett modifié et supplémenté de la caséine (1 % P/V). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C pendant 14 jours. La dégradation de la caséine était caractérisée par la présence des zones claires autour des colonies.

II.2.2.4.8. Hydrolyse de l'arbutine et de l'esculine

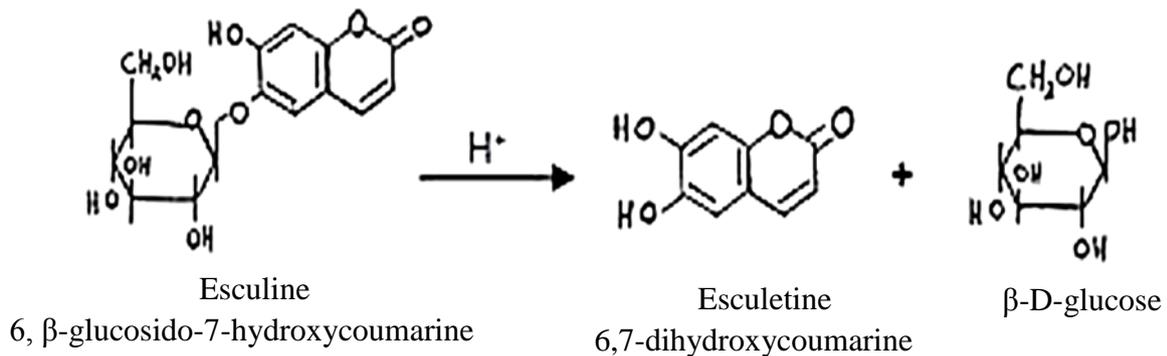
L'habilité des isolats antagonistes à hydrolyser l'arbutine et l'esculine a été mise en évidence suivant le protocole décrit par Williams *et al.* (1983b).

Principe

L'hydrolyse de l'arbutine conduit à la formation de l'hydroquinone et du glucose. L'hydroquinone formée est auto-oxydée et est caractérisée par la présence de la coloration marron ou noire produite dans le milieu nutritif.



L'hydrolyse de l'esculine conduit à la formation d'un composé appelé esculetine et du glucose. L'esculetine réagit en présence des ions ferriques Fe^{3+} provenant des composants nutritionnels du milieu de culture pour former une coloration marron foncé ou noire.



Mode opératoire

Les isolats d'actinobactéries antagonistes âgés de 5 jours ont été ensemencés sur le milieu Bennett amendé à l'arbutine et à l'esculine (0,1 % P/V). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30 °C pendant 14 jours. Après incubation, la présence de la coloration marron foncé ou noire dans le milieu était caractéristique de la dégradation de l'arbutine et de l'esculine.

II.2.2.5. Identification moléculaire

II.2.2.5.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique à partir des isolats d'actinobactéries antagonistes a été effectuée à l'aide du Kit « *Bacterial DNA Extraction* » (Spin-Column) suivant les recommandations du fabricant. Dix colonies pures de chaque isolat ont été inoculées dans 20 mL de bouillon de culture ISP2 et incubées à 30 °C pendant 48 h sur le shaker à une vitesse de 150 rpm. Par la suite, 1 mL de chaque culture a été placé dans les microtubes de volume 2 mL et centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 s. Chaque surnageant a été ensuite éliminé. Deux cent microlitres de tampon de lyse (RB) ont été ajoutés dans chaque tube puis homogénéisés. Le mélange a été ensuite centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 s, le surnageant a été éliminé et le culot suspendu dans 200 µL de tampon RB. Cent microlitres de lysozyme (10 mg/mL dans 10 mM de tampon Tris-HCl, pH 8,0) ont été ajoutés à chaque tube, ensuite mélangés par inversion et incubés dans le bain marie pendant 1 h à 37 °C. Après incubation, les tubes ont été centrifugés

à 10 000 rpm pendant 2 min, les surnageants ont été éliminés et les culots ont été suspendus ensuite dans 200 µL de tampon RB puis homogénéisés. Vingt microlitres de Rnase A (25 mg/mL) ont été ajoutés aux tubes et agités au vortex, puis incubés pendant 10 min pour éliminer l'ARN. Deux cent microlitres de tampon de composition (CB), ont été introduits dans chaque tube, mélangés par inversion et 20 µL de protéinase K (20 mg/mL) ont été ajoutés, ensuite bien homogénéisés et incubés dans le bain marie pendant 30 min à 70 °C. Après refroidissement à température ambiante (T.A), 100 µL d'isopropanol ont été ajoutés à chaque tube, le mélange a été bien homogénéisé par inversion et des précipités (DNAs) ont été formés.

Les solutions ont été transférées et les précipités contenus dans les colonnes AC ont été placés dans les tubes de collection, ensuite centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 min et les filtrats ont été jetés. Cinq cent microlitres de tampon décapant (SB), ont été ajoutés à chaque tube, centrifugés à 12000 rpm pendant 30 s et les filtrats ont été jetés. Sept cent microlitres de tampon de lavage (WB) [additionné avec l'éthanol absolu] ont été ajoutés, centrifugés à 12 000 rpm pendant 30 s et les filtrats ont été éliminés. Cinq cent microlitres de tampon WB ont été ajoutés à chaque tube, centrifugés à 12 000 rpm pendant 30 s et les filtrats ont été une fois de plus éliminés. Les colonnes AC ont été placées dans de nouveaux tubes de collection, centrifugées à 13 000 rpm pendant 2 min pour éliminer tous les résidus d'éthanol dans la colonne.

Les colonnes AC ont été sorties des tubes de collection, transférées ensuite dans les tubes Eppendorf stériles et additionnées avec 100 µL de tampon d'élution (EB) [préchauffé au bain marie à 65-70 °C], les tubes contenant les colonnes ont été laissés à T.A pendant 3-5 min et centrifugés 1 min à 12 000 rpm. Cinquante microlitres de filtrats obtenus ont été remis dans la colonne AC, laissés incuber à T.A pendant 3-5 min et centrifugés à 12 000 rpm pendant 1 min. Le filtrat final obtenu constituait la solution d'ADN éluee. La solution d'ADN a été conservée à 4 °C pour une utilisation à court terme et à -20 °C pour un usage à long terme. La concentration et la pureté des ADN génomiques ont été évaluées en utilisant le NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

II.2.2.5.2. Amplification PCR de la séquence d'ADNr 16S

La «*Polymerase Chain Reaction*» (PCR) consiste à amplifier sélectivement une séquence d'ADN par une action de l'ADN polymérase thermostable. Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le gène ribosomal 16S. Très conservé chez les bactéries, ce marqueur permet d'affilier les séquences obtenues dans cette étude avec celles d'organismes connus. La paire d'amorce universelle BSF 8/20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et BSR 1541/20 (5'-AAA GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') a été utilisée tel que décrit par Monciardini *et al.* (2002). La PCR a été effectuée dans un volume réactionnel final de 25 µL dans un thermocycleur (Thermo Fisher Scientific, USA). Les microtubes

contiennent 1 μL d'ADN de concentration 50 ng/ μL dans le milieu réactionnel. La composition du milieu réactionnel et les cycles employés sont représentés dans les Tableaux IV et V.

Tableau IV: Composition du milieu réactionnel de la PCR.

Composés	Volumes (μL)
Master mix	12,5 μL
Eau dépourvue de nucléotide	9,5 μL
Amorce F (10 μM)	1 μL
Amorce R (10 μM)	1 μL
Solution d'ADN (50 ng/ μL)	1 μL

Tableau V: Cycles d'amplification du gène d'ADN 16S.

	Etapes	Températures ($^{\circ}\text{C}$)	Temps
	Pré-dénaturation	95	3 min
35 Cycles	Dénaturation	95	30 s
	Fixation des amorces	62	30 s
	Elongation	72	2 min
	Elongation finale	72	5 min

II.2.2.5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité et la spécificité de l'amplification ont été vérifiées en effectuant une électrophorèse des produits de la PCR sur un gel d'agarose-TAE 1,5 %. Les produits de la PCR ont été additionnés de 80 μL de Gel red (500 X). La migration a été faite dans un tampon TAE (Tris-HCl 1,6 mM; acétate de sodium 1,6 mM; EDTA 0,04 mM ; pH 8), sous une tension de 90 V. L'électrophorèse a été suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire (100 bp DNA Ladder RTU, GeneDirex) de 100 à 1500 paires de bases. Après la migration, le gel a été visualisé à l'aide du logiciel Image-lab 3.0.

II.2.2.5.4. Séquençage de l'ARNr 16S

Le séquençage a été effectué sur la plate-forme d'Analyses Génomiques de l'Université Laval (Canada) selon le protocole d'Applied Biosystems. La technique du séquençage utilisée a été celle décrite par Sanger *et al.* (1977). Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP) et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluorochromes. L'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on

obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent. Les amorces utilisées pour le séquençage étaient les mêmes utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S.

II.2.2.5.5. Analyse phylogénétique

Les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) sur le site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>). Les alignements des séquences ont été réalisés grâce au logiciel CLUSTAL Omega (Larkin *et al.*, 2007). L'homologie des séquences a été évaluée et le taux de substitution par transformation a été soumis à la méthode à trois paramètres de Kimura (1981). La matrice des taux de substitutions résultantes a été analysée par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) en utilisant le logiciel MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar *et al.*, 2016). Les niveaux de confiance de la topologie des arbres phylogénétiques obtenus par la méthode de Neighbor-joining (MEGA 7), ont été estimés par la méthode des analyses de ré-échantillonnage des données avec 1000 répliques.

II.2.3. Evaluation des traits de biocontrôle et des propriétés promotrices de la croissance de la plante des souches d'actinobactéries antagonistes ainsi que leurs effets sur les vitroplants de macabo

II.2.3.1. Détermination des traits de biocontrôle chez les souches antagonistes

II.2.3.1.1. Recherche de la production des métabolites volatils

L'habilité des souches antagonistes à produire les métabolites volatils capables d'inhiber la croissance de *P. myriotylum* a été évaluée suivant le protocole modifié d'Afsharmannesh *et al.* (2010). Le milieu PDA amendé de glycine (4,4 g/L) a été coulé dans les boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Après solidification du milieu, les souches antagonistes ont été ensemencées en stries serrées sur le milieu de culture. Par ailleurs, les disques de 6 mm de la souche *P. myriotylum* âgée de 7 jours ont été ensemencés au centre des autres boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les deux demi boîtes ont été placées face à face afin d'éviter le contact physique entre l'agent pathogène et les souches d'actinobactéries. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec le papier parafilm pour éviter l'évaporation des composés volatils produits. Dans la boîte témoin, les isolats ont été remplacés par de l'eau distillée stérile et la boîte a été placée face à face avec la boîte contenant *P. myriotylum*. Toutes les boîtes ont été scellées et incubées à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. La croissance de l'agent pathogène a été mesurée et la comparaison a été faite avec celle de la boîte témoin.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante:

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

Où:

I= pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. myriotylum* (%).

C= diamètre moyen du mycélium de *P. myriotylum* dans la boîte témoin (mm).

T= diamètre moyen du mycélium de *myriotylum* dans les boîtes inoculées avec les souches d'actinobactéries (mm).

II.2.3.1.2. Production des enzymes d'intérêt agronomique

– **Activité chitinasique**

La capacité des souches d'actinobactéries antagonistes à produire les chitinases a été évaluée sur le milieu chitine colloïdale agar (annexe 1) suivant le protocole simplifié de Murthy et Bleakley (2012). Les souches antagonistes ont étéensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm des souches d'actinobactéries âgées de 5 jours ont étéensemencés sur le milieu de culture supplémenté de 2 % de chitine colloïdale humide et incubés à 30 °C pendant 7 jours. La présence de la chitinase extracellulaire se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des disques. Le diamètre des halozones a été mesuré pour chaque souche.

– **Préparation de la chitine colloïdale**

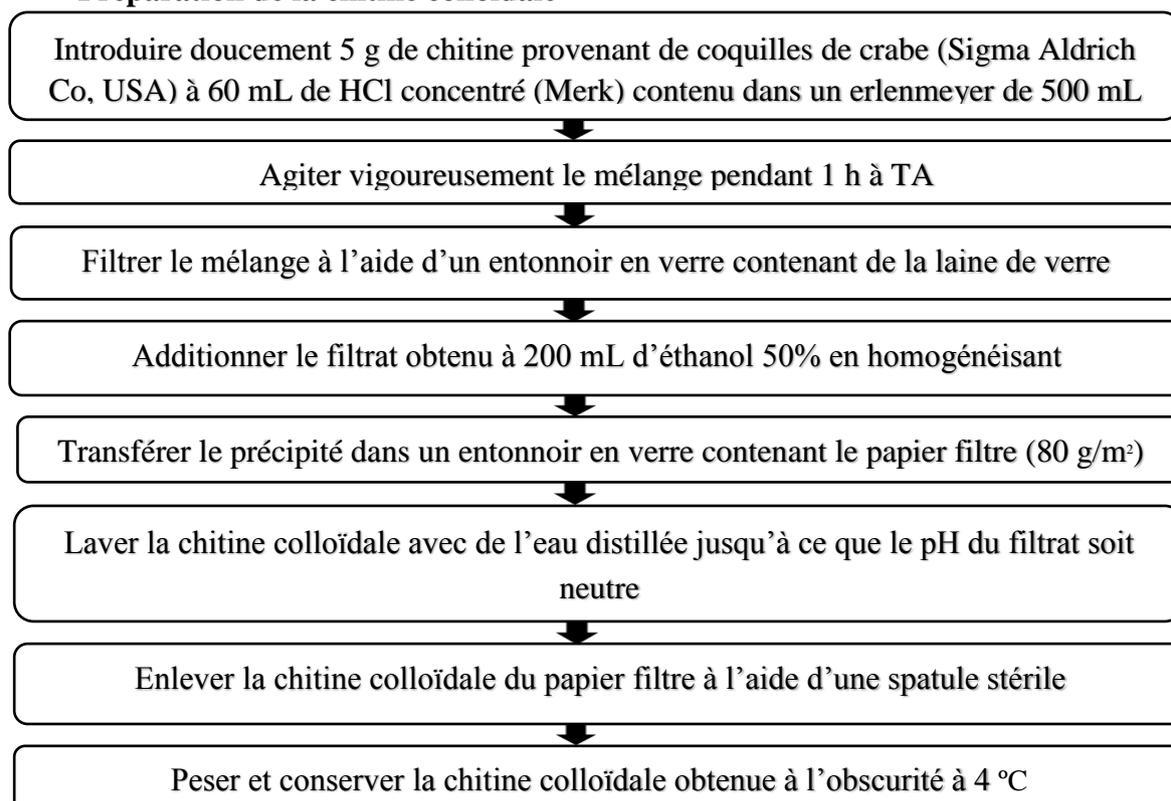


Figure 18: Protocole de préparation de la chitine colloïdale Priya *et al.* (2011) modifié

– **Activité protéasique**

L'habilité des souches antagonistes à produire les protéases a été déterminée suivant le protocole décrit par Sessitsh *et al.* (2004). Les souches antagonistes ont été ensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm d'actinobactéries âgées de 5 jours ont été ensemencés sur le milieu Skim milk agar (annexe 1) et incubés à 30 °C pendant 5 jours. L'activité protéasique se traduit par l'apparition d'halos clairs autour des disques.

-Activité lipasique

La production des lipases par les souches antagonistes a été déterminée selon le protocole de Smibert et Krieg (1994). Les souches antagonistes ont été ensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm d'actinobactéries âgées de 5 jours ont été ensemencés sur le milieu lipase agar (annexe 1) contenant le Tween 80 et incubés à 30 °C pendant 7 jours. Après incubation, le résultat positif pour la production des lipases se traduit par la présence d'halos translucides autour des colonies. L'intensité d'halo zones autour des disques était proportionnelle à la quantité de lipase produite.

– **Activité cellulastique**

La production des cellulases par des souches d'actinobactéries antagonistes a été évaluée selon le protocole de Hendrick *et al.* (1995). Les souches antagonistes ont été ensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm d'actinobactéries âgées de 5 jours ont été ensemencés sur le milieu peptone agar (annexe 1) contenant la carboxyméthylcellulose et incubés à 30 °C pendant 8 jours. Après incubation, une solution de rouge Congo (1 %) a été ajoutée à la surface du milieu de culture contenant les disques. Après 20 minutes, la surface a été inondée avec la solution de NaCl 1 M puis laissée au repos une nuit. La présence d'une cellulase extracellulaire se traduit par l'apparition d'halos clairs autour des disques.

– **Activité pectinastique**

La production des pectinases par les souches antagonistes a été évaluée suivant le protocole décrit par Geetha *et al.* (2014). Les souches antagonistes ont été ensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm d'actinobactéries antagonistes âgées de 5 jours ont été ensemencés sur le milieu PDA (annexe 1) supplémenté avec la pectine (1 % P/V). Après 2 jours d'incubation à 30 °C, les boîtes de pétri ont été inondées avec la solution de HCl de concentration 2 M. La présence d'une pectinase extracellulaire se caractérise par des halos clairs autour des disques.

– **Activité β -1,3-glucanasique**

La production de l'enzyme β -1,3-glucanase par les souches antagonistes a été effectuée selon le protocole décrit par Gopalakrishnan *et al.* (2014). Les souches d'actinobactéries ont été cultivées dans le bouillon TSB (annexe 1) supplémenté avec de la chitine colloïdale (1 % P/V) sous agitation à 180 rpm à 28 °C pendant 4 jours. À la fin de l'incubation, les cultures ont été centrifugées à 10000 g pendant 12 min et les surnageants ont été collectés. 1 mL de chaque filtrat de culture a été additionné à 0,1 mL de solution de laminarine (2 % P/V) (annexe 2) dans la solution tampon acétate 0,2 M, pH 5,4 et l'ensemble a été incubé à 40 °C pendant 1 h. La réaction a été arrêtée par addition de 3 mL de solution d'acide dinitrosalicylique (DNS) (annexe 2) au mélange réactionnel puis portée à ébullition pendant 10 min. Le développement de la couleur rouge foncé indiquait la présence de sucre réducteur et la concentration du sucre réducteur a été déterminée par mesure de la densité optique à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1605, UV-visible). Les concentrations étalons ont été préparées en utilisant le glucose à 0-1 mg/mL à l'intervalle de 0,2 mg/mL. Une unité de l'activité de l'enzyme β -1,3-glucanase a été définie comme la quantité d'enzyme que libère 1 μ mol de glucose par heure sous les conditions définies.

II.2.3.2. Détermination des propriétés promotrices de la croissance de la plante (PGP) des souches antagonistes

II.2.3.2.1. Fixation de l'azote

La capacité des souches antagonistes à fixer l'azote a été évaluée selon la méthode de Jensen (1942). Les souches antagonistes âgées de 5 jours ont étéensemencées sur le milieu Jensen, dépourvu d'azote et incubés à 30 °C pendant 7 jours. Après incubation, les souches capables de croître sur le milieu dépourvu d'azote étaient considérées comme fixatrices de d'azote.

II.2.3.2.2. Solubilisation du phosphate

L'habilité des souches antagonistes à solubiliser le phosphate a été déterminée suivant le protocole de Senthilkumar et Swarnalakshmi (2009). Les souches antagonistes ont étéensemencées sous forme de stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 30 °C pendant 5 jours. Les disques de 6 mm d'actinobactéries âgées de 5 jours ont étéensemencés sur le milieu Pikovskaya's agar (annexe 1) contenant le phosphate tricalcium [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] et incubés à 30 °C. Après 7 jours d'incubation, la présence des zones claires autour des colonies causée par la solubilisation du PO_4 était utilisée comme indicateur positif pour les souches solubilisant le phosphate.

II.2.3.2.3. Production des sidérophores

La production des sidérophores par les souches d'actinobactéries antagonistes a été évaluée selon le protocole décrit par Khamna *et al.* (2009). Les souches antagonistes ont été ensemencées en stries serrées sur le milieu ISP2 et incubées à 30 °C pendant 7 jours. Après incubation, les disques de 6 mm d'actinobactéries âgées de 7 jours ont été inoculés sur le milieu Chrome Azurol Agar (annexe 1) et incubés à 30 °C pendant 5 jours. Les souches présentant les halos zones de couleur jaune-orangé autour des colonies étaient considérées positives pour la production des sidérophores.

II.2.3.2.4. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l'AIA par les différentes souches d'actinobactéries antagonistes a été déterminée suivant le protocole de Khamna *et al.* (2009). Les souches d'actinobactéries ont été ensemencées en stries serrées sur le milieu YMEA et incubées à 30 °C pendant 7 jours. Après incubation, les disques de 6 mm d'actinobactéries ont été inoculés dans 25 mL de bouillon YME contenant 0,2 % de L-tryptophane et incubés à 180 rpm en agitation à 30 °C pendant 7 jours. Après la période d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 3500 g pendant 30 min. Aux aliquots de 1 mL de chaque surnageant, ont été ajoutés 2 mL de réactif de Salkowski (annexe 2) et les mélanges ont été agités vigoureusement puis incubés à T.A à l'obscurité pendant 25 min. Après incubation, l'apparition de la coloration rose indiquait la production de l'AIA. La densité optique (DO) a été mesurée à 530 nm en utilisant le spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1605, UV-visible). La quantité d'AIA produite ($\mu\text{g/mL}$) dans les filtrats bactériens a été estimée en utilisant la courbe étalon d'AIA pur.

II.2.3.2.5. Production de l'enzyme 1-aminocyclopropane carboxylique (ACC) désaminase (Penrose et Glick, 2003)

Les souches d'actinobactéries antagonistes âgées de 5 jours ont été ensemencées sur le milieu DF minimum (annexe 1) contenant 3 mM d'acide 1-aminocyclopropane carboxylique (ACC) stérile comme seule source d'azote et incubées à 30 °C pendant 6 jours. Après incubation, les souches d'actinobactéries capables de croître sur ce milieu ont été considérées comme positives à la production de l'ACC désaminase.

II.2.3.2.6. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) (Lork, 1948)

Les souches d'actinobactéries antagonistes âgées de 5 jours ont été ensemencées en stries serrées sur le milieu gélosé Bennett supplémenté de glycine (4,4 g/L). Le disque stérile de papier Whatman n°1 de 9 cm de diamètre a été imbibé avec une solution de picrate de sodium (0,5 % d'acide picrique et 2 % carbonate de sodium anhydre) et déposé au fond du couvercle de la boîte de Pétri. La boîte a été fermée et scellée avec le papier parafilm puis incubée à 30 °C pendant 7 jours. Après incubation, le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune

vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN. La capacité des souches d'actinobactéries antagonistes à produire l'acide cyanhydrique a été notée en utilisant l'échelle de Reetha *et al.* (2012) suivante:

Pas de changement de couleur, couleur jaune (-): Pas de production de HCN

Couleur orange (+): Production faible de HCN

Couleur marron clair (++) : Production modérée de HCN

Couleur marron foncé (+++): Production élevée HCN

II.2.3.2.7. Production de l'ammoniac (NH₃) (Cappucino et Sherma, 2008)

Dix microlitres de précultures de 48 h des isolats d'actinobactéries antagonistes dans le bouillon de culture ISP2 ont été inoculés dans 10 mL de bouillon peptone (annexe 1) et incubés sous agitation à 120 rpm à 30 °C pendant 21 jours. Après incubation, 0,5 mL de réactif de Nessler (annexe 2) ont été additionnés aux cultures. Le développement du jaune clair au marron foncé indique la production de l'ammoniac. La quantité d'ammoniac produite a été déterminée par mesure de l'absorbance à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1605, UV-visible). La quantité d'ammoniac produite par chaque isolat a été exprimée en mg/mL en comparaison avec la courbe d'étalonnage préparée en utilisant le sulfate d'ammonium [(NH₄)₂SO₄].

II.2.3.3. Effet des souches antagonistes sur la croissance racinaire des vitroplants de macabo

II.2.3.3.1. Production des vitroplants de macabo

La production des vitroplants de macabo a été effectuée par le procédé de micropropagation selon le protocole de Niemenak *et al.* (2013).

– Milieux de culture

Trois milieux de cultures ont été préparés:

- Un milieu de base ou d'établissement constitué des macro et micro éléments de DKW (Driver et Kuniyuki Walnut), des vitamines de DKW (myo-inositol: 100 g/L; thiamine, HCl: 2 g/L; glycine: 1 g/L; acide nicotinique: 2 g/L), de saccharose à 3 % (p/v) et d'agar à 0,6 % (p/v) (annexe 1), pour l'établissement des cultures;
- Un milieu d'induction des bourgeons constitué du milieu de base enrichi de la 6-benzylaminopurine (BAP) à 2.10⁻⁶ M pour induire le bourgeonnement;
- Un milieu d'expression constitué du milieu de base supplémenté de la BAP à 1.10⁻⁶ M pour le développement des pousses feuillées à partir des bourgeons formés.

Avant ajout et dissolution de l'agar par chauffage, le pH des milieux a été ajusté à 5,6 ± 0,1 à l'aide de la solution de NaOH 0,1N. Ces milieux ont été ensuite distribués dans les tubes de

culture à raison de 30 mL par tube puis autoclavés à 121 °C pendant 15 min à une pression de 1 bar.

– Prélèvement et stérilisation des explants de macabo

Les boutures de macabo (cultivar blanc) préalablement récoltées ont été lavées à l'eau de robinet, puis débarrassées de leur gaine foliaire jusqu'à obtention des explants d'environ 2 cm de long (Figure 19). Ces explants ont été stérilisés par immersion dans les différentes solutions :

- Eau distillée additionnée de Tween 80 (une goutte/100 mL d'eau distillée stérile) pendant 5 min;
- Solution d'hypochlorite de calcium ($\text{Ca}(\text{ClO}_3)_2$) 20 % (m/v) pendant 15 min;
- Ethanol 70 % pendant 5 min;
- Eau distillée stérile, trois rinçages successifs de 5, 10 et 15 min respectivement (Tsafack *et al.*, 2009).



Figure 19: Explants de macabo à stériliser (Photo Djuidje, 2016).

– Conditions de mise en culture

Après les différents procédés de stérilisation ci-dessus évoqués, les repiquages ont été effectués sous une hotte stérile à flux laminaire horizontale (FLUFRANCE) près de la flamme d'un bec Bunsen. Les explants stériles ont été débarrassés de leurs assises externes à l'aide d'une pince et d'un scalpel stériles afin d'isoler les méristèmes apicaux d'environ 1cm de long. Puis, ces méristèmes ont été repiqués verticalement dans les tubes contenant le milieu de base DKW (Annexe 1). Les tubes ont été scellés avec du papier parafilm et les cultures incubées à 25 ± 1 °C pendant 2 semaines dans une chambre de culture avec une humidité relative de 80 %, sous une lumière fluorescente (PHILIPS) et la photopériode : 16h/8h. Après cette phase d'établissement, les explants ont été induits pour le développement des bourgeons en les repiquant aseptiquement sur le milieu d'induction constitué du milieu de base DKW

supplémenté avec la 6-benzylaminopurine (BAP) à la concentration 2.10^{-6} M. L'ensemble a été incubé pendant 3 semaines dans la chambre de culture sous les conditions précédemment mentionnées. Après la phase d'induction, les bourgeons obtenus ont été isolés et repiqués aseptiquement sur le milieu d'expression constitué du milieu de base DKW supplémenté avec la 6-benzylaminopurine (BAP) à la concentration 1.10^{-6} M. L'ensemble a été incubé pendant 3 semaines dans la chambre de culture sous les conditions précédemment mentionnées.

II.2.3.3.2. Co-culture vitroplants de macabo / actinobactéries

– Milieux de la co-culture

Deux milieux de culture ont été préparés :

- Un milieu de base DKW, pour les traitements tests et témoin négatif ;
- Un milieu de base DKW supplémenté de l'acide 1-naphtalène acétique (ANA) à 10^{-6} M, pour le traitement témoin positif.

Les pH des différents milieux ont été ajustés à 5,6, ensuite les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, les milieux ont été coulés dans les boîtes de Pétri carrées 120×120 mm stériles sous une hotte à flux laminaire horizontale.

– Conditions de la co-culture

Les vitroplants de macabo ont été repiqués à 2 cm de l'extrémité supérieure des boîtes de Pétri carrées (120×120 mm) contenant le milieu de base DKW supplémenté de l'agar à 2 % (P/V). Les traitements ont été réalisés en dupliquet et les boîtes repiquées (à raison de 5 vitroplants/boîte) ont été scellées avec du papier parafilm et mises en culture verticalement dans les conditions de culture suivante : température $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; humidité relative 80 % ; photopériode 16/8h et la lumière fluorescente. Après 14 jours, les souches d'actinobactéries issues d'une culture pure et fraîche sur milieu ISP2 ont été striées à 2 cm de la bordure inférieure à l'opposé des vitroplants en culture dans les boîtes de Pétri (Tableau VI) (Palaniyandi *et al.*, 2013).

Tableau VI: Différents traitements réalisés.

Milieu de culture	Traitements					
	TN	TP	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Milieu de base DKW + agar 2 %	Vitroplants	Vitroplants + ANA (10^{-6} M)	Vitroplants + PERM1	Vitroplants + PERM2	Vitroplants + PERM4	Vitroplants + PERM5

TN : témoin négatif, **TP** : témoin positif.

II.2.3.3.3. Extraction et dosage des protéines totales à partir des racines des vitroplants de macabo

– Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été effectuée suivant le protocole modifié de Pirovani *et al.* (2008). Initialement, 1 g de racines fraîches a été broyé à froid dans un mortier en présence de 5 mL de tampon Tris-Maléate (10 mM, pH 7,2). Le broyat obtenu a été homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 10 min et le mélange a été incubé à 4 °C pendant 30 min. Après incubation, l'ensemble a été centrifugé à 10 000 g à 4 °C pendant 25 min. Le surnageant recueilli constituait l'extrait protéique. Les extraits ont été aliquotés dans les tubes éppendorfs et conservés à - 20°C pour les analyses ultérieures.

– Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été effectué suivant la méthode de Bradford (1976), en utilisant le bleu de Coomassie G 250.

Principe

Cette méthode mesure la concentration en protéines en se basant sur la réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu de Coomassie G 250 (réactif de Bradford). En milieu acide, le bleu de coomassie G 250 se fixe sur les résidus hydrophobes des acides aminés pour former une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéine présente dans le milieu. Le complexe formé absorbe à un maximum de 595 nm.

Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, ont été introduit dans l'ordre :

- 10 µL de l'extrait protéique
- 490 µL d'eau distillée
- 500 µL de réactif de Bradford.

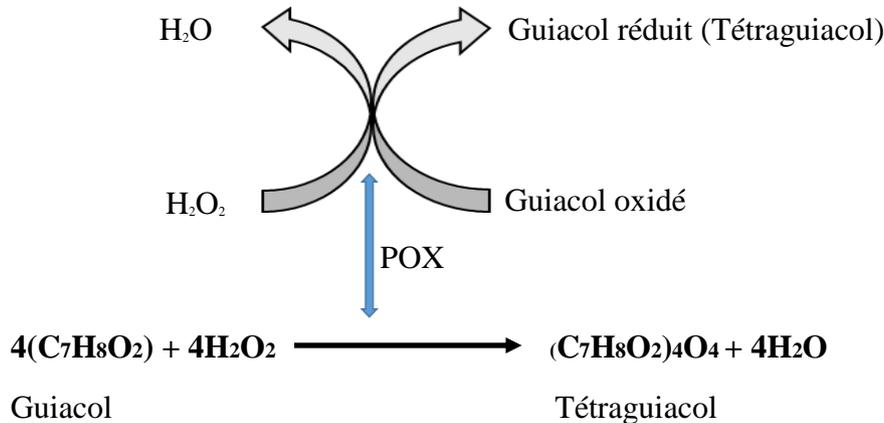
Le mélange a été incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 15 min et la densité optique a été lue à 595 nm en utilisant le spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1605) contre le tube témoin dans lequel l'extrait protéique a été remplacé par l'eau distillée. Pour chaque extrait, trois répétitions ont été réalisées. La concentration des protéines présentes a été exprimée en µg Eq BSA/g de matière fraîche, par extrapolation sur la courbe d'étalonnage réalisée sous les mêmes conditions que celles des échantillons en utilisant le BSA (Bovine Serum Albumine) à 0,1 mg/mL.

II.2.3.3.4. Activité des peroxydases

Le dosage des peroxydases a été effectué suivant le protocole modifié de Baaziz *et al.* (1995).

Principe

Il repose sur la détermination des résidus enzymatiques en utilisant l'eau oxygénée (H_2O_2) pour former un produit coloré en présence du Guiacol absorbant à 470 nm.



Mode opératoire

Le milieu réactionnel était constitué de:

- 925 μ L de tampon Tris Maléate 0,1M, pH 7,2 contenant 1g de Guiacol
- 25 μ L de l'extrait
- 50 μ L de H_2O_2 10 %

Après homogénéisation, le mélange réactionnel a été incubé à T.A pendant 3 min. L'activité des peroxydases a été déterminée suivant la formation du tétraguiacol absorbant à 470 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-1605. L'activité enzymatique a été exprimée en unité enzymatique par gramme de matière fraîche ($\Delta 470/\text{min. UE. Poids frais}$). Pour chaque extrait, trois répétitions ont été réalisées. Le tube témoin a été réalisé en utilisant la même procédure que celle de l'échantillon à la différence que l'extrait a été remplacé par l'eau distillée. L'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui a été libérée à une variation de la densité optique de 0,1.

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\Delta DO \times V_{\text{ext}}}{\Delta t \times TS \times \text{Poids frais (g)} \times 0,1}$$

V_{ext} = Volume d'extraction

TS = No du specimen étudié

P.F = Poids frais

ΔDO = Différence de densité optique

Δt = Différence de temps

II.2.3.4. Identification moléculaire des marqueurs de stimulation de la croissance des plantes et de biocontrôle chez les souches antagonistes

II.2.3.4.1. Détection du gène *iaaM* de l'Acide Indole Acétique

– Amplification PCR du gène *iaaM* de l'Acide Indole Acétique

Le gène *iaaM* de la biosynthèse de l'AIA a été amplifié en utilisant le couple d'amorces *iaaM* F (5'-ATGACGTCCACCGTGCCCAACGCG-3') et *iaaM* R (5'-CTAGTCCTCGGGGAGTTCCACGGG-3') suivant le protocole de Lin et Xu (2013) avec de légères modifications. L'amplification PCR a été réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µL contenant 1 µL d'ADN de concentration 50 ng/µL dans un thermocycleur (Thermo Fisher Scientific, USA) sous les conditions suivantes: pré-dénaturation à 94 °C pendant 5 min suivie de 30 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 40 s, hybridation à 61 °C pendant 30 s, élongation à 72 °C pendant 2 min et une élongation finale à 72 °C pendant 10 min. La composition du milieu réactionnel et les cycles employés sont représentés dans les Tableaux VII et VIII respectivement.

– Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose-TAE 1,2 %. Les produits de la PCR ont été additionnés de 80 µL de Gel red (500 X). La migration a été faite dans un tampon TAE (Tris-HCl 1,6 mM; acétate de sodium 1,6 mM; EDTA 0,04 mM; pH 8), sous une tension de 90 V pendant 3 h. L'électrophorèse a été suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire de 100 à 1000 paires de bases. Après la migration, le gel a été visualisé à l'aide du logiciel Image-lab 3.0.

Tableau VII: Composition du milieu réactionnel de la PCR du gène de l'*iaaM*.

Composantes	Volumes (µL)
Master mix	12,5 µL
Eau	9,5 µL
Amorce <i>iaaM</i> F (10 µM)	1 µL
Amorce <i>iaaM</i> R (10 µM)	1 µL
Solution d'ADN (50 ng/µL)	1 µL

Tableau VIII: Cycles d'amplification du gène *iaaM*.

	Etapes	Températures (°C)	Temps
30 cycles	Pré-dénaturation	94	5 min
	Dénaturation	94	40 s
	Fixation des amorces	61	30 s
	Elongation	72	2 min
	Elongation finale	72	10 in

II.2.3.4.2. Détection du gène *chiC* des chitinases

– Amplification par PCR du gène *chiC*

Le gène *chiC* des chitinases a été amplifié en utilisant les amorces *chiC* F (5'-AAGCTCGCSGCSTTCCTSGC-3') et *chiC* R (5'-GCACTCGAGSGCGCCGTTGAT-3') suivant le protocole modifié de Passari *et al.* (2015). La PCR a été effectuée dans un volume réactionnel final de 25 µL contenant 1 µL d'ADN de concentration 50 ng/µL dans un thermocycleur (Thermo Fisher Scientific, USA) sous les conditions suivantes: pré-dénaturation à 95 °C pendant 5 min suivit de 30 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, hybridation à 52 °C pendant 30 s, élongation à 72 °C pendant 2 min et une élongation finale à 72 °C pendant 10 min. La composition du milieu réactionnel et les cycles employés sont représentés dans les Tableaux IX et X.

– Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose-TAE 1,2 %. Les produits de la PCR ont été additionnés de 80 µL de Gel red (500 X). La migration a été faite dans un tampon TAE (Tris-HCl 1,6 mM; acétate de sodium 1,6 mM; EDTA 0,04 mM; pH 8), sous une tension de 90 V. L'électrophorèse a été suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire de 100 à 1000 paires de bases. Après la migration, le gel a été visualisé à l'aide du logiciel Image-lab 3.0.

Tableau IX: Composition du milieu réactionnel de la PCR du gène *chiC*.

Composantes	Volumes (µL)
Master mix	12,5 µL
Eau dépourvue de nucléotide	9,5 µL
Amorce <i>chiC</i> F (10 µM)	1 µL
Amorce <i>chiC</i> R (10 µM)	1 µL
Solution d'ADN (50 ng/µL)	1 µL

Tableau X: Cycles d'amplification du gène *chiC*.

	Etapas	Températures (°C)	Temps
30 cycles	Pré-dénaturation	95	5 min
	Dénaturation	95	30 s
	Fixation des amorces	52	30 s
	Elongation	72	2 min
	Elongation finale	72	10 min

II.2.4. Caractérisation des métabolites bioactifs produits par les potentiels *Streptomyces* antagonistes

II.2.4.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits bruts des *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 ayant présentés des pourcentages d'inhibition ≥ 80 % vis-à-vis de *P. myriotylum* après confrontation directe ont été préparés en utilisant le procédé de fermentation solide avec le son de blé comme substrat selon le protocole modifié de Selvameenal *et al.* (2009). Les souches d'actinobactéries ont étéensemencées en stries serrées sur le milieu gélosé ISP2 et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Les spores formées ont été raclées aseptiquement, introduites dans 25 mL de bouillon de culture ISP2 contenu dans un erlenmeyer de 150 mL et incubées en agitation à 150 tr/min pendant 48 h. Les pré-cultures pures obtenues ont été transférées dans 250 mL de bouillon ISP2 contenus dans des erlenmeyers de 1000 mL et agitées à 150 rpm à 28° C pendant 7 jours. Les cultures obtenues ont été utilisées à raison de 10 % de l'inoculum pour ensemenecer aseptiquement le son de blé stérile préalablement préparé en mélangeant 50 mL d'eau distillée à 50 g de son de blé et stérilisé à 121 °C pendant 15 min. Le son de blé stérileensemencé par les cultures pures d'actinobactéries a été incubé à 28 °C pendant 30 jours. Après fermentation, chaque fermentat a été macéré dans l'acétate d'éthyle (3× 24 h) puis extrait. Après extraction, les filtrats obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif pour débarasser l'extrait brut de l'acetate d'éthyle restant.

II.2.4.2. Activités antifongiques des extraits bruts vis-à-vis de *P. myriotylum*

La technique des puits a été utilisée pour évaluer les activités antifongiques des différents extraits bruts des souches antagonistes selon le protocole de Patel *et al.* (2011). La détection de l'activité antagoniste des extraits bruts a été effectuée dans les boîtes de Pétri contenant 20 mL de milieu PDA. À l'aide d'un emporte-pièce stérile, les disques fongiques de 6 mm de *P. myriotylum* âgé de 7 jours ont été prélevés et déposés au centre des boîtes de Pétri. Les puits de 6 mm de diamètre ont été créés à 15 mm du disque fongique, ensuite 20 µL de l'extrait brut de concentration 20 mg/mL ont été déposés dans ces puits. Un témoin négatif a été réalisé en

utilisant de l'eau distillée stérile à la place de l'extrait brut. Les boîtes ont été incubées à 28 ± 2 °C et la distance parcourue par la souche fongique dans les boîtes tests et témoin a été mesurée après 14 jours. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule :

$$I = \frac{DT - DE}{DT} \times 100$$

I: pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. myriotylum* par l'extrait brut des souches d'actinobactéries (%)

DT: distance parcourue par le champignon *P. myriotylum* en absence de l'extrait brut des souches d'actinobactéries (mm)

DE: distance parcourue par le champignon *P. myriotylum* en présence de l'extrait brut des souches d'actinobactéries (mm)

II.2.4.3. Détermination de la concentration inhibitrice (CI) des extraits bruts

Les concentrations inhibitrices (CI) des différents extraits bruts ont été déterminées en utilisant la méthode des puits selon le protocole décrit par Patel *et al.* (2011) avec quelques modifications. Les extraits bruts ont été dissouts dans le mélange DMSO/Eau (10/90). Une dilution en série des solutions obtenues a été réalisée afin d'avoir des concentrations finales de 20, 10, 5, 2,5 et 1, 25 mg/mL. À l'aide d'un emporte-pièce stérile, les disques de 6 mm de *P. myriotylum* âgés de 7 jours ont été prélevés et déposés au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les puits de 6 mm de diamètre ont été créés à 15 mm du disque fongique, ensuite 20 µL de l'extrait brut à différentes concentrations ont été déposés dans les puits. Une boîte témoin positif a été réalisée en remplaçant l'extrait brut par 20 µL de solution de DMSO 10 % et une boîte servant de témoin négatif a été réalisée en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée stérile. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Les boîtes ont été incubées à 28 ± 2 °C et la distance parcourue par la souche fongique dans les boîtes tests et témoin a été mesurée après 14 jours. Le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration de l'extrait brut a été calculé en utilisant la formule précédente.

II.2.4.4 Analyse des composés volatils contenus dans les extraits bruts des souches antagonistes par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les composés volatils contenus dans les extraits bruts ont été quantifiés et mesurés en utilisant la technique GC-MS (Hossain et Rahman, 2011). Les échantillons de concentration 100 µg/mL ont été préparés à partir des extraits actifs en utilisant le mélange méthanol/eau (1/1). Un microlitre et demie de l'extrait brut a été injecté dans le GC-MS spectrophotomètre. Un Shimadzu GC-17A attaché au système Shimadzu GCMS-QP5050A a été utilisé pour l'analyse GC-MS des extraits bruts muni d'une colonne de type Phenomex Zebron ZBFFAP utral-low-

bleed Bonded Polyethylene Glycol fused capillary (30 mL x 0,25 mm I.D x 0,25 µm film thickness). L'injection de ratio 20 a été faite. Le gaz transporté était l'hélium au débit de 0,7 mL.min⁻¹, la température de la colonne était maintenue à 70 °C pendant 3 min, suivie par les modifications 5 °C /min à 90 °C et ensuite 5 °C /min à 230 °C. La température de l'entrée et celle du détecteur était 230 °C et 250 °C respectivement, tandis que le temps de dissolution (solvant retardé) était de 5,75 min.

Les hauts pics ont été identifiés avec ceux de la bibliothèque de l'Institut National de Standards et de Technologie (INST) [INST 08 et INST 08s] et par corrélation immédiate avec les données ou les informations publiées. Les analyses ont été effectuées en triplicat et les principaux composés remarquables ont été détectés. La gamme de fréquences des constituants obscurs a été comparée avec la gamme des constituants stockés dans la bibliothèque de la INST 08s. Les noms, les masses moléculaires, les formules brutes et les structures des composés ont été établis. Le logiciel de programmation CG-17 A version 3 a été utilisé pour générer les spectres de masse et les chromatogrammes.

II.2.4.5. Analyse des composés non volatils contenus dans les extraits bruts des souches antagonistes par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

L'analyse LC-MS/MS a été réalisée en utilisant un AB Sciex 5500QTrap (Linear Quadrupole Hybrid Ion Trap Mass Spectrometer, AB Sciex, Toronto, Canada) menu d'un spectromètre fonctionnant en mode d'ionisation négative, par électronébulisation avec un Agilent 1290 et un ultra système de chromatographie à haute performance liquide tel que décrit par Awla *et al.* (2016). Les paramètres pour la haute pureté du gaz utilisé pour le spectromètre de masse ont été 40 psi pour le gaz de source, 40 psi pour le gaz de chauffage, élevés pour le gaz de collision respectivement, et une source de température de 500 °C. Les paramètres de l'ionisation de tension par électronébulation ont été de 4500 KV. L'énergie de collision pour obtenir la fragmentation a été fixée à 35 eV avec une propagation de +/- 15 eV. Un intervalle de masse pour le scan complet a été fixé entre 100-1000 m/z tandis que celui pour le scan MS/MS a été fixée entre 50-1000 m/z. La vitesse de scan a été fixée à 1000 m/z/s.

Les séparations étaient obtenues sur une Phenomenex Synergi Fusion RP (100 mm x 2,1 mm id., 3 µm, particule size, Phenomenex, CA, USA). La phase mobile était constituée du formate d'ammonium aqueux (5 mmol/L) avec 0,1 % d'acide formique (solvant A) et l'acétonitrile avec le formate d'ammonium (5 mmol/L) avec 0,1 % d'acide formique (solvant B). Les métabolites ont été séparés en utilisant le gradient linéaire programmé de solvant suivant: 0 min (10 % B), 10 min (95 % B), 2 min (95 % B), rééquilibrant puis retour à 10% B

pendant 3 min. Le débit de la colonne, sa température et le volume d'injection ont été fixés à 0,25 mL/min, 40 °C et 10 µL respectivement.

II.2.5. Analyses statistiques

Pour chaque essai trois répétitions ont été réalisées. Les différentes variables ont été représentées en termes de moyennes plus ou moins erreurs standards de la moyenne. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test d'analyse de variance ANOVA one way. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 6.01. La différence significative entre les moyennes a été évaluée en utilisant le test de Tukey au seuil de significativité $P < 0,05$ et à l'interval de confiance de 95 %.



*CHAPITRE III:
RESULTATS ET
DISCUSSION*

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Criblage des isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques vis-à-vis de *P. myriotylum* et leur identification

III.1.1. Propriétés physico-chimiques des sols

Au regard des paramètres physico-chimiques des échantillons de sol, il en ressort que les valeurs de pH sont comprises entre 6,25 et 7,61. Seul le sol de la forêt de Kumba présente un pH faiblement acide ($6,25 \pm 0,2b$). Les pourcentages d'humidité des échantillons de sols varient entre 15,56 et 25,16 %. Cette teneur en eau est significativement plus importante dans le sol du champ d'Ekona Lelu1 ($25,16 \pm 0,92a$) %. La teneur en matière organique des échantillons de sol est comprise entre 5,41 et 7,92 %. Les teneurs en matière organique des sols des champs d'Ekona ($5,41 \pm 0,2c$) % et Ekona Lelu 1 ($6,75 \pm 0,26b$) % sont légèrement faibles par rapport à celles des autres localités (Tableau XI).

Tableau XI: Propriétés physico-chimiques des échantillons de sol collectés dans les différents sites d'échantillonnage.

Site d'échantillonnage	Système d'exploitation	pH	Pourcentage d'humidité (%)	Teneur en Matière organique (%)
Bonakanda (Bona)	Champ	$7,57 \pm 0,01a$	$21,2 \pm 0,58b$	$7,13 \pm 0,43a$
Boteva (Bot)	Forêt	$7,48 \pm 0,09a$	$15,56 \pm 0,93c$	$7,92 \pm 0,06a$
Ekona (Eko)	Champ	$7,43 \pm 0,05a$	$17,50 \pm 0,78c$	$5,41 \pm 0,20c$
Ekona Lelu 1(EL1)	Champ	$7,61 \pm 0,05a$	$25,16 \pm 0,92a$	$6,75 \pm 0,26b$
Ekona Lelu 2(EL2)	Forêt	$7,53 \pm 0,08a$	$21,33 \pm 0,29b$	$7,12 \pm 0,10a$
Kumba (Kum)	Forêt	$6,25 \pm 0,2b$	$19,76 \pm 1,08bc$	$7,65 \pm 0,10a$

pH: Potentiel d'hydrogène. Les moyennes dans chaque colonne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$ selon le test de Tukey.

III.1.2. Isolement et dénombrement des isolats d'actinobactéries

Au total, 171 colonies d'actinobactéries endophytes sont isolées des racines de macabo sur le milieu eau-agar (1,5 %). En s'appuyant sur la couleur, la forme et la texture, les 171 colonies sont regroupées et codifiées en sept groupes d'isolats distincts nommés PERM1, PERM2, PERM3, PERM4, PERM5, PERM6 et PERM7. Parmi les 171 colonies d'actinobactéries endophytes, 102 (59,65 %) sont assignés au groupe PERM2 qui est présent dans toutes les localités échantillonnées. En outre, on note une spécificité entre les isolats

représentatifs des autres groupes et les localités échantillonnées excepté pour PERM1 et PERM2. La localité EL2 est la niche la plus diversifiée avec trois groupes d'isolats notamment PERM2, PERM6 et PERM7 (Tableau XII).

Tableau XII: Codes et fréquences d'apparition des isolats d'actinobactéries endophytes des racines de macabo dans différentes localités.

Code des isolats endophytes	Localités d'apparition	Nombre d'isolats similaires	Fréquence d'apparition (%)
PERM1	Bona, Kum	20	11,70
PERM2	Bona, Bot, EL1, EL2, Eko, Kum	102	59,65
PERM3	EL1	08	4,68
PERM4	Bot	04	2,34
PERM5	Eko	18	10,53
PERM6	EL2	13	7,6
PERM7	EL 2	06	3,5

Bona: Bonakanda; **Bot:** Boteva; **Eko:** Ekona; **EL1:** Ekona Lelu 1; **EL2:** Ekona Lelu 2 et **Kum:** Kumba; **PERM:** Peguy Endophyte des Racines de Macabo.

L'isolement des actinobactéries à partir des andosols de la rhizosphère des plants de macabo sains d'apparence s'est fait sur le milieu Bennett et le milieu GLM. Après dénombrement, le plus grand nombre d'actinobactéries est isolé sur le milieu GLM. En effet, le nombre d'unité formant colonies (UFC) est de $27,7 \times 10^6$ sur le milieu GLM, tandis qu'il est seulement de $7,1 \times 10^6$ sur le milieu Bennett. Par ailleurs, plus d'UFC sont dénombrés à partir des forêts ($4,3$ et $7,8$) $\times 10^6$ comparés aux champs ($2,8$ et $4,8$) $\times 10^6$ (Tableau XIII).

Tableau XIII: Nombre d'unité formant colonies (UFC) par gramme de sol sec sur les milieux Bennett et GLM.

Localités	10 ⁶ U.F.C / g de sol séché	
	Bennett	GLM
Champ Bonakanda	N. I	N. I
Forêt de Boteva	4,3	7,8
Champ d'Ekona	NI	3,2
Champ d'Ekona Lelu 1	NI	4,6
Champ Ekona Lelu 2	2,8	4,8
Forêt de Kumba	0,005	7,3
Total	7,1	27,7

N.I.: non interprétable (nombre de colonies inférieures à 30 ou supérieure à 300).

Au total, 287 colonies d'actinobactéries sont isolées des andosols de la rhizosphère des plants de macabo sains d'apparence des localités autour du Mont Cameroun. Sur la base de la couleur, forme et texture, les 287 colonies sont classifiées et codifiées en 12 groupes d'isolats distincts nommés PEKO-1, PEKO-2, PEL1-1, PEL1-2, PFK1, PFK2, PFK4, PFBOT1, PFBOT2, PFBOT4, PFBOT7 et PFEL2. Le plus grand nombre de colonies similaires est assigné au groupe PFK4 (67 isolats), suivi du groupe PFBOT7 (58 isolats) avec des fréquences d'apparition de 23,34 % et 20,09 % respectivement. La majorité des isolats sont présents dans au moins deux localités exceptés les isolats PFK1, PFBOT2 et PFBOT4 qui sont présents uniquement dans la localité de Kumba située à 548 m d'altitude et les isolats PFBOT2 et PFBOT4 qui sont présents dans la localité de Botéva située à 768 m d'altitude. La localité Ekona Lelu 1 est la niche la plus diversifiée avec sept groupes d'isolats notamment PEKO-1, PEKO-2, PEL1-1, PEL1-2, PFBOT1, PFBOT7 et PFEL2 (Tableau XIV).

Tableau XIV: Codes et fréquences des isolats d'actinobactéries obtenus à partir des échantillons de sols.

Code des isolats endophytes	Sites d'apparition	Nombre d'isolats similaires	Fréquence d'apparition (%)
PEKO-1	Champs Eko et EL1, Forêt EL2	27	9,41
PEKO-2	Champs Eko et EL1	05	1,74
PEL1-1	Champ EL1, Forêt EL2	22	7,67
PEL1-2	Champ EL1, Forêt EL2	14	4,87
PFK1	Forêt Kum	08	2,79
PFK2	Forêts Kum et EL2	12	4,18
PFK4	Forêts Kum et Bot, champ Eko	67	23,34
PFBOT1	Forêt Bot, Champs Eko et EL1	32	11,15
PFBOT2	Forêt Bot	03	1,05
PFBOT4	Forêt Bot	08	2,79
PFBOT7	Forêts Bot et Kum, champs Eko et EL1	58	20,21
PFEL2	Forêts EL2 et Kum, champ EL1	31	10,80

PEKO: Peguy Ekona; **PEL1:** Peguy Ekona Lelu 1; **PFK:** Peguy Forêt Kumba; **PFBOT:** Peguy Forêt Boteva et **PFEL2:** Peguy Forêt Ekona Lelu 2.

III.1.3. Tests d'antagonisme

III.1.3.1. Activités antifongiques

La confrontation directe d'un représentant de chacun des 19 isolats d'actinobactéries (7 isolats endophytes et 12 isolats rhizosphériques) contre *P. myriotylum* et trois autres champignons phytopathogènes à savoir : *P. megakarya*, *F. oxysporum* et *C. gloeosporioides* a été faite sur le milieu PDA. Il en ressort que tous les isolats (100 %) présentent une activité antifongique avec des pourcentages d'inhibition variables (Tableau XV).

Tableau XV: Antagonismes des 19 isolats d'actinobactéries contre *P. myriotylum* et 3 autres champignons pathogènes.

Isolats	Pourcentage d'inhibition (%)			
	<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Phytophthora megakarya</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
PERM1	97,82 ± 0,7a	99,12 ± 0,5a	87,51 ± 0,6b	81,81 ± 0,7c
PERM2	99,38 ± 0,6a	99,38 ± 0,6a	99,71 ± 0,3a	93,62 ± 0,6a
PERM3	00,00 ± 0,0i	00,00 ± 0,0j	13,58 ± 1,2h	00,00 ± 0,0p
PERM4	98,39 ± 0,4a	95,06 ± 0,6b	91,36 ± 0,6b	90,74 ± 0,6b
PERM5	64,93 ± 0,5c	67,49 ± 0,8c	71,80 ± 0,6c	74,32 ± 0,7d
PERM6	00,00 ± 0,0j	00,00 ± 0,0j	17,78 ± 0,4g	14,81 ± 1,2n
PERM7	39,82 ± 0,8 ^e	38,94 ± 0,4 ^e	13,81 ± 1,4h	22,59 ± 0,6l
PEKO-1	10,35 ± 0,2i	38,27 ± 0,4 ^e	38,27 ± 0,6 ^e	44,69 ± 0,2h
PEKO-2	10,02 ± 0,4i	34,13 ± 0,5f	30,07 ± 0,3f	26,66 ± 0,4k
PEL1-1	26,19 ± 0,2f	16,98 ± 0,3	41,02 ± 0,4 ^e	29,89 ± 0,3j
PEL1-2	56,54 ± 0,5d	66,10 ± 0,3c	30,12 ± 0,2f	48,21 ± 0,3g
PFK1	22,23 ± 0,7g	16,31 ± 0,3i	11,08 ± 0,2h	15,12 ± 0,3n
PFK2	07,96 ± 0,6i	26,94 ± 0,5g	30,02 ± 0,2f	29,91 ± 0,3j
PFK4	99,87 ± 0,1a	100,00 ± 0,0a	89,46 ± 0,4b	62,58 ± 0,4 ^e
PFBOT1	17,44 ± 0,6h	22,51 ± 0,3h	52,31 ± 0,3d	11,08 ± 0,3o
PFBOT2	20,55 ± 0,5gh	38,25 ± 0,4 ^e	30,34 ± 0,3f	26,82 ± 0,5k
PFBOT4	20,33 ± 0,3gh	23,67 ± 0,3h	18,33 ± 0,3g	18,19 ± 0,8m
PFBOT7	74,52 ± 0,8b	68,80 ± 0,3c	70,90 ± 0,6c	58,99 ± 0,3f
PFEL2	54,44 ± 0,3d	58,85 ± 0,6d	51,37 ± 0,5d	34,26 ± 0,5i

Les moyennes dans chaque colonne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$ selon le test de Tukey.

Seuls les isolats ayant montré au moins 50 % d'inhibition contre *P. myriotylum* et contre deux des trois autres agents phytopathogènes sont sélectionnés. Il s'agit des isolats PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 et PFEL2 (Tableau XV). Les 19 isolats représentatifs des groupes d'actinobactéries montrent des pourcentages d'inhibition contre au moins trois des quatre agents phytopathogènes fongiques testés, seul l'isolat PERM3 n'est actif uniquement contre *F.oxysporum*. Les isolats PERM1, PERM2, PERM4 et PFK4 présentent les plus forts pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. myriotylum* soit 97,82 %, 99,38 %, 98,39 % et 99,87 % respectivement (Figure 20).



Figure 20: Confrontation directe des isolats d'actinobactéries contre *P. myriotylum*. (a) PERM1, (b) PERM2 et (c) PFK4 sur milieu PDA (Photo Djuidje, 2014).

III.1.3.2. Activités antibactériennes

Tous les isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphériques présentent les activités antibactériennes contre la bactérie pathogène *A. tumefaciens* à l'exception de PERM3 (94,74 %). Les diamètres d'inhibition vis-à-vis d'*A. tumefaciens* varient entre $5 \pm 0,3$ mm et $59,33 \pm 0,6$ mm (Figure 21 A). Par ailleurs, 13 isolats (68,42 %) présentent les activités antibactériennes contre *S. Scabiei* EF-35. Les diamètres d'inhibition vis-à-vis de *S. Scabiei* EF-35 sont compris entre $7 \pm 0,3$ mm et $35 \pm 0,5$ mm. Cependant, les 7 isolats ayant présentés des fortes activités antifongiques montrent également des activités antibactériennes vis-à-vis des différentes bactéries pathogènes testées et les grands diamètres d'inhibition sont obtenus avec les isolats PFK4, PERM1 et PERM2 (Figure 21 B).

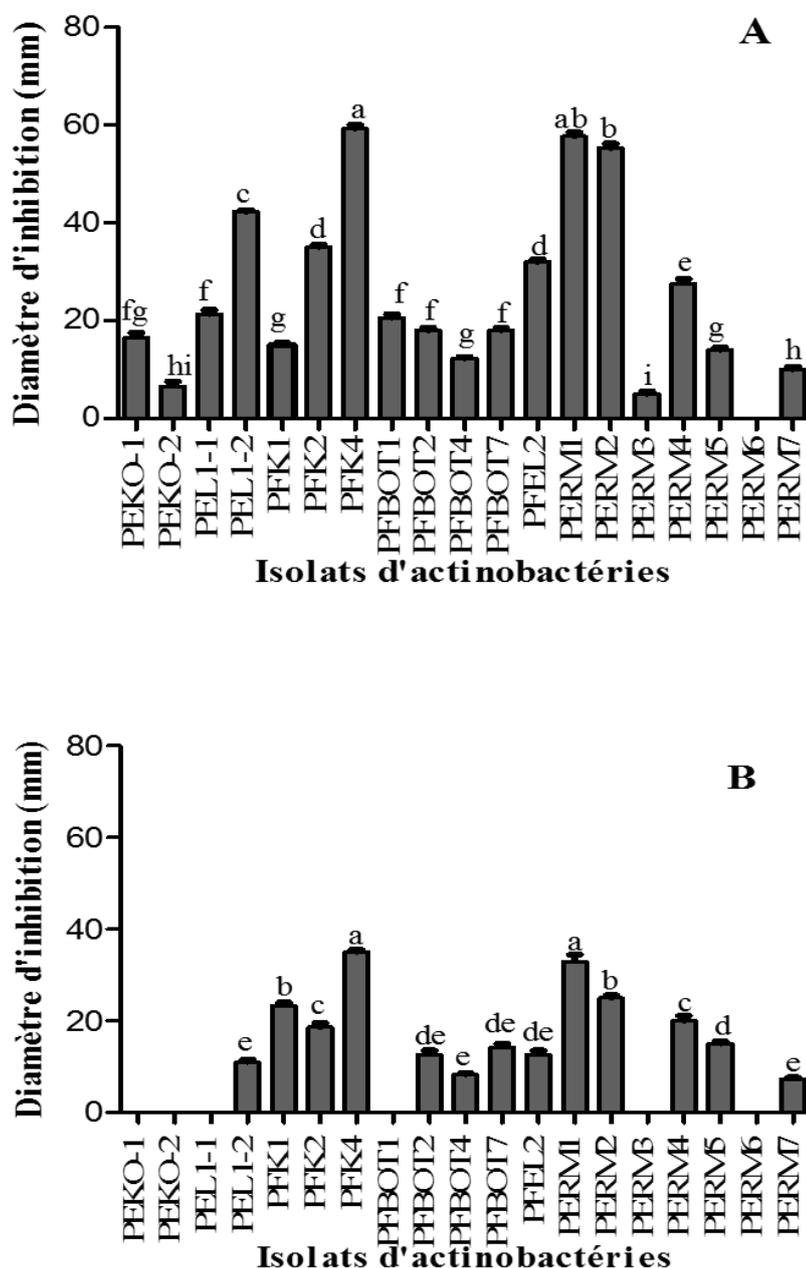


Figure 21: Activités antibactériennes des isolats d'actinobactéries vis-à-vis d'*A. tumefaciens* (A) et *S. scabiei* EF-35 (B).

III.1.4. Caractérisation phénotypique

III.1.4.1. Observation macroscopique et caractères cultureux des isolats antagonistes

Les isolats antagonistes présentent des colonies de tailles différentes (petite et moyenne), de formes variables (lisse, bombée, aplatie, irrégulière), d'aspect opaque ou poudreux (Tableau XVI). Les isolats peuvent être rassemblés en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance, les colonies des isolats (PERM1, PFK4, PFBOT7) apparaissent après 2 à 3 jours d'incubation alors que les colonies des isolats (PERM2, PERM4, PERM5, PFEL2) requièrent 4 à 5 jours d'incubation pour apparaitre. Sur la base des caractères cultureux, les isolats antagonistes présentent presque tous une très bonne croissance sur les différents milieux ISP

excepté sur le milieu ISP5 sur lequel la croissance des isolats PERM4 et PERM5 est faible. Par ailleurs, les isolats antagonistes présentent une bonne sporulation sur les différents milieux ISP excepté sur le milieu ISP1 sur lequel la sporulation est modérée pour les isolats PERM1 et PERM5, faible pour les isolats PERM2 et PERM4.

Tableau XVI: Aspect morphologique des colonies des isolats d'actinobactéries antagonistes sur le milieu ISP2.

Isolats	Taille	Forme	Élévation	Surface	Densité	Couleur	Odeur
PERM1	moyenne	ronde	élevée	rugeuse	opaque	gris	+
PERM2	petite	ronde	en dôme	rugeuse	opaque	marron noir	+
PERM4	moyenne	ronde	en dôme	lisse	opaque	vert jade	+
PERM5	petite	ronde	élevée	épineuse	poudreuse	marron	+
PFK4	moyenne	ronde	élevée	rugeuse	opaque	gris verdâtre	+
PFBOT7	moyenne	ronde	plate	lisse	poudreuse	beige	+
PFEL2	moyenne	irrégulière	plate	lisse	opaque	vert olive	+

L'observation du revers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat. Après maturation des isolats, basé sur la couleur du mycélium aérien, les isolats antagonistes sont groupés en 4 séries de couleur, gris (PERM1, PFK4), marron (PERM2, PERM5), vert (PERM4, PFEL2) et beige (PFBOT7) (Figure 22).

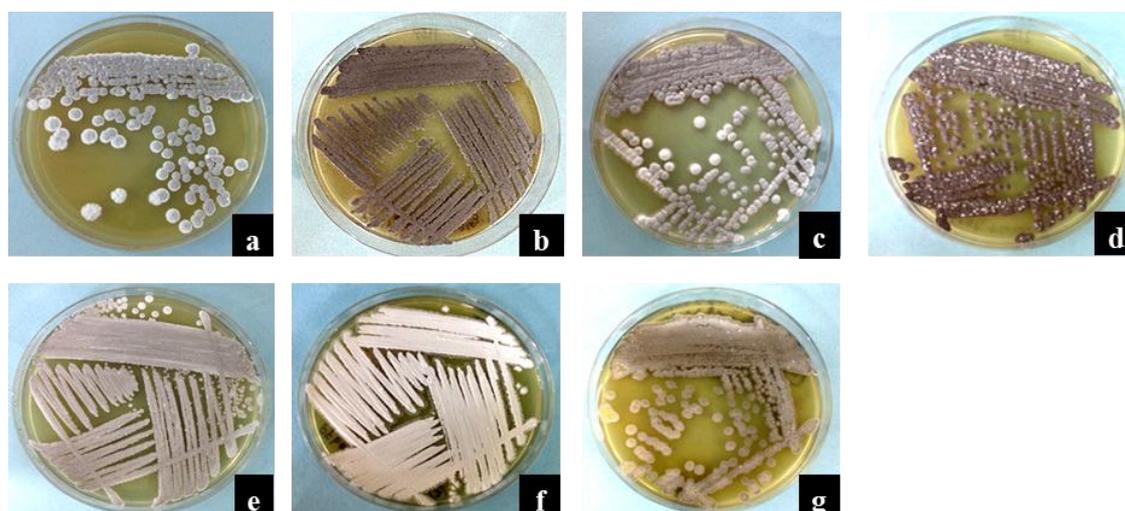


Figure 22: Aspect macroscopique des isolats d'actinobactéries antagonistes sur le milieu ISP2. (a) PERM1, (b) PERM2, (c) PERM4, (d) PERM5, (e) PFK4, (f) PFBOT7 et (g) PFEL2.

Les isolats antagonistes présentent des colorations variées de mycélium aerien et de substrat sur les milieux ISP (Tableau XVII).

Tableau XVII: Caractéristiques culturelles des isolats d'actinobactéries antagonistes sur les différents milieux ISP.

Isolats	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Mycélium aérien	Mycélium de substrat
PERM1	ISP1	très bonne	modérée	blanc cassé	jaune
	ISP2	très bonne	bonne	gris	jaune
	ISP3	très bonne	bonne	gris	crème
	ISP4	très bonne	bonne	blanc	crème
	ISP5	bonne	bonne	blanc	incolore
PERM2	ISP1	bonne	faible	jaune clair	jaune
	ISP2	très bonne	bonne	marron noir	jaune
	ISP3	très bonne	bonne	noire	jaune
	ISP4	très bonne	bonne	gris noir	jaune
	ISP5	bonne	bonne	blanc	incolore
PERM4	ISP1	bonne	faible	crème	incolore
	ISP2	très bonne	bonne	vert jade	jaune orangé
	ISP3	très bonne	bonne	verdâtre	jaune
	ISP4	très bonne	bonne	marron clair	jaune
	ISP5	faible	bonne	blanc	incolore
PERM5	ISP1	moyenne	modérée	crème	incolore
	ISP2	très bonne	bonne	marron	jaune foncé
	ISP3	très bonne	bonne	marron	crème
	ISP4	très bonne	bonne	marron	jaune
	ISP5	faible	modérée	jaunâtre	jaune
PFK4	ISP1	très bonne	bonne	gris	jaune
	ISP2	très bonne	très bonne	blanc-gris	jaune
	ISP3	très bonne	bonne	gris	Jaune
	ISP4	très bonne	bonne	gris	jaune
	ISP5	bonne	bonne	blanc	blanc
PFBOT7	ISP1	très bonne	bonne	beige	jaune
	ISP2	très bonne	très bonne	beige	jaune orangé
	ISP3	très bonne	très bonne	beige foncé	crème
	ISP4	bonne	très bonne	beige clair	incolore
	ISP5	moyenne	bonne	beige clair	incolore
PFEL2	ISP1	bonne	bonne	gris	jaune
	ISP2	très bonne	bonne	vert olive	jaune
	ISP3	très bonne	bonne	vert olive	jaune
	ISP4	bonne	bonne	vert blanchâtre	jaune
	ISP5	moyenne	bonne	beige clair	incolore

III.4.1.2. Aspects microscopiques des isolats antagonistes

III.4.1.2.1. Microscopie optique

Les isolats antagonistes présentent majoritairement des chaînes de spores en spirale. Par ailleurs, tous les isolats développent un mycélium de substrat et les hyphes du mycélium de substrat sont pour la plupart fins et ramifiés. Le mycélium aérien quant- à lui est épais, plus foncé et moins ramifié. Il est peu abondant pour l'isolat PERM4, mais très abondant pour les autres isolats (Figure 23).

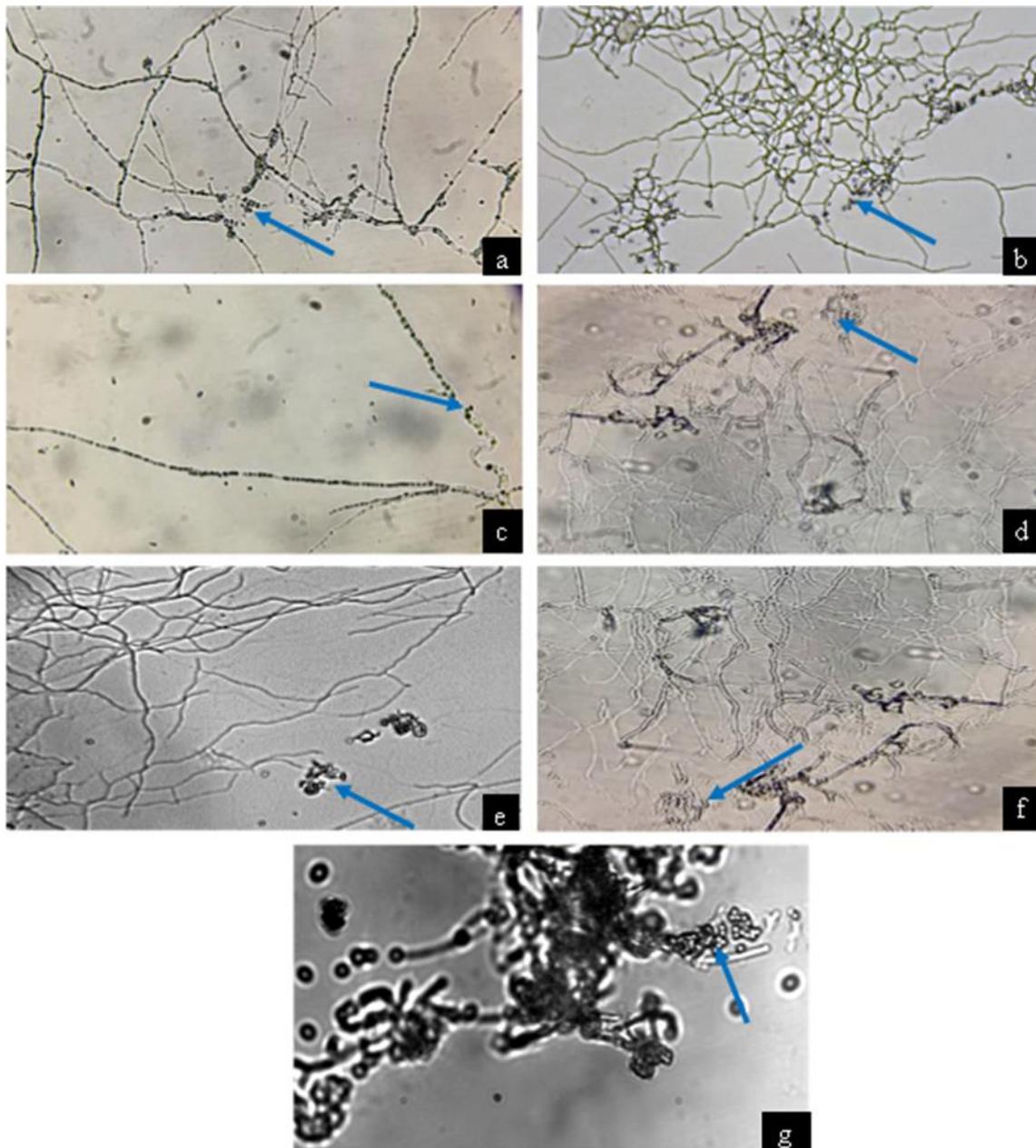


Figure 23: Apparence microscopique de la morphologie des chaînes de spores des isolats d'actinobactéries antagonistes après 14 jours de culture à 30 °C sur le milieu ISP2 (G. 1000x). (a) PERM1, (b) PERM2, (c) PERM4, (d) PERM5, (e) PFK4, (f) PFBOT7 et (g) PFEL2.

III.4.1.2.2. Microscopie électronique

La microscopie électronique des isolats d'actinobactéries antagonistes révèle que tous présentent des chaînes de spores spirales à l'exception de l'isolat PERM5 dont les chaînes de spores sont rectiflexibles. Les isolats PERM4, PFBOT7, PFK4 et PFEL2 présentent des spores avec les surfaces d'ornementation lisses tandis que les isolats PERM1 et PERM2 présentent les spores avec les ornements rugueux. Seul l'isolat PERM5 présente des spores avec les ornements épineux (Figure 24).

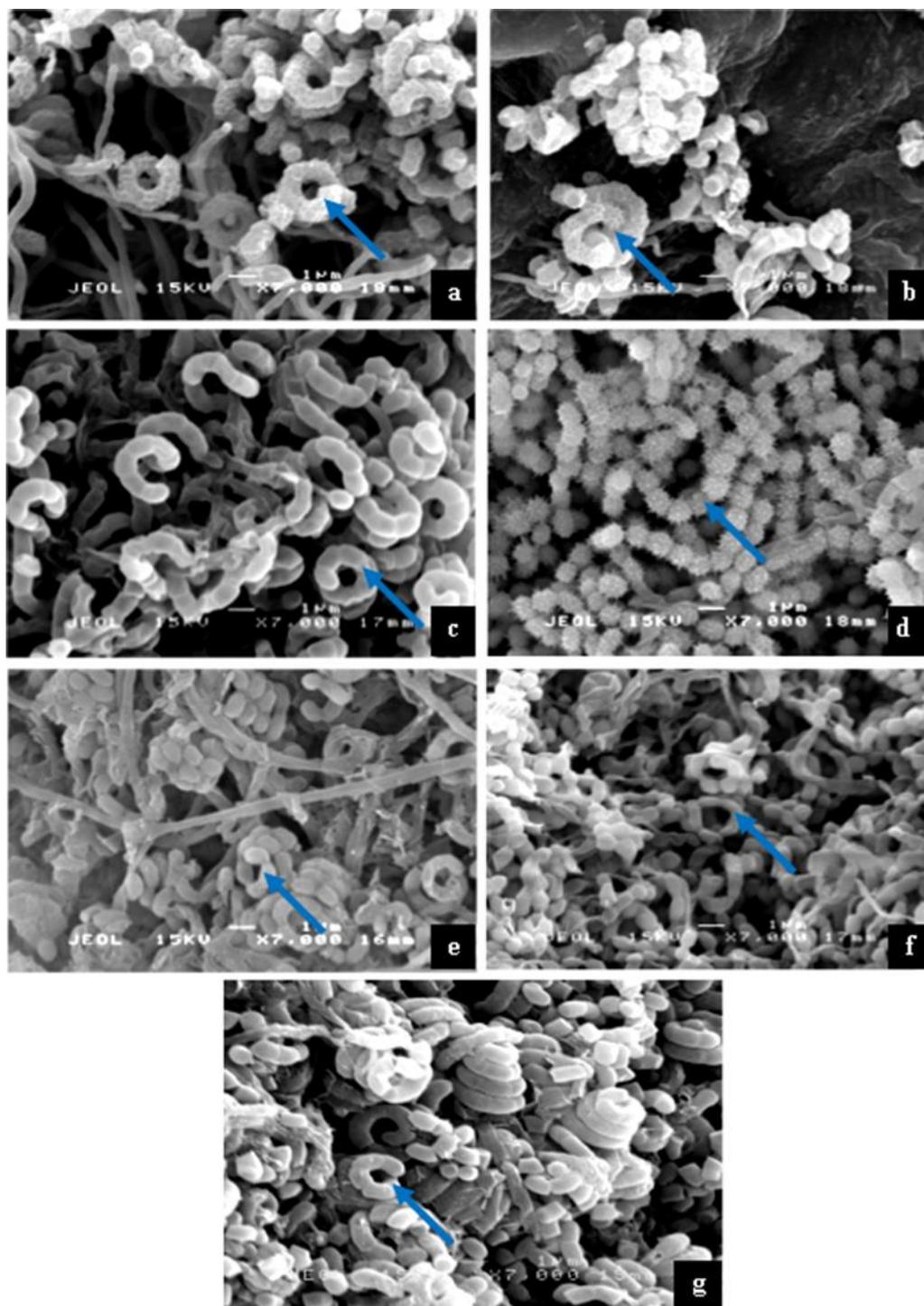


Figure 24: Morphologie des surfaces d'ornementations des spores des isolats d'actinobactéries antagonistes (x7000, 15KV). (a) PERM1, (b) PERM2, (c) PERM4, (d) PERM5, (e) PFK4, (g) PFBOT7 et (h) PFEL2, après 14 jours de croissance sur le milieu ISP2 + CaCO₃.

III.4.1.3. Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats antagonistes

Au regard de la production des pigments mélanoides sur le milieu ISP6, aucun isolat antagoniste n'est capable de produire ces pigments. Par contre, les isolats PERM1, PERM4, PFK4 et PFEL2 produisent des pigments diffusibles de couleurs variées sur le milieu de culture ISP7 (Tableau XVIII).

En fonction de la température, tous les isolats antagonistes présentent une bonne croissance à des températures comprises entre 25 °C et 37 °C. Seuls les isolats PFBOT7 et PFEL2 sont capables de croître à 45 °C. Aucun isolat ne présente de croissance à 4 °C et 55 °C. Les résultats des isolats d'actinobactéries antagonistes testés à un gradient de pH (5-11), indiquent que tous croissent aux différentes valeurs de pHs testées à l'exception du pH 11. Les isolats PERM5 et PFBOT7 à pH 5 présentent une très bonne croissance. Tous les isolats présentent une très bonne croissance à pH 7 et pH 9 (Tableau XVIII).

Pour la totalité des isolats antagonistes, en présence des concentrations en NaCl de 2 %, 4 % et 6 %, leur croissance n'est pas affectée. Une tolérance de NaCl à la concentration 8 % et 10 % a été enregistrée pour les isolats PERM5, PFBOT7 et PFEL2 (Tableau XVIII). La majorité des isolats d'actinobactéries antagonistes sont sensibles ou résistants à au moins un des cinq antibiotiques utilisés. Tous les sept isolats antagonistes sont résistants à la streptomycine et au chloramphénicol. La résistance à la pénicilline est observée chez tous les isolats excepté chez PERM4. Seuls les isolats PERM1, PERM2 et PFK4 sont résistants aux différents antibiotiques testés. Quatre isolats à savoir PERM4, PERM5, PFBOT7 et PFEL2 sont sensibles à la rifampicine (Tableau XVIII).

Tous les isolats antagonistes sont capables d'assimiler la totalité des sources de carbones testées. Par rapport à l'assimilation des sources d'azotes, tous les isolats assimilent l'asparagine et la valine. Quant-aux isolats PERM4 et PFEL2, ils assimilent 5 acides aminés sur les 6 testés, tandis que l'isolat PFBOT7 utilise 3 sur les 6 acides aminés testés. L'habilité des isolats d'actinobactéries antagonistes à assimiler les différents substrats carbonés (1 %) ou azotés (0,1 %) comme seule source de carbone et d'azote est représentée dans le Tableau XVIII.

Sur la base des caractères biochimiques, tous les isolats antagonistes produisent la catalase, l'oxydase et l'uréase. Seuls les isolats PFBOT7 et PFEL2 sont incapables de produire l'enzyme nitrate nitrate réductase. Tous les isolats antagonistes sont capables de dégrader la caséine, la gélatine, l'arbutine et l'esculine (Tableau XVIII). En outre, tous les isolats antagonistes sont amylolytiques et l'activité amylolytique est caractérisée par la présence des zones claires autour des disques d'actinobactéries sur le milieu gélosé contenant l'amidon (Figure 25).

Tableau XVIII: Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats antagonistes

Paramètres	PERM1	PERM2	PERM4	PERM5	PFK4	PFBOT7	PFEL2
Caractéristiques morphologiques							
Couleur mycélium aérien (ISP2)	Gris verdâtre	Marron noire	Vert jade	Marron chocolat	Gris blanchâtre	beige	Vert jaune
Pigments mélanoides (ISP6)	-	-	-	-	-	-	-
Pigments diffusibles (ISP7)	+	-	+	-	+	-	+
Chaînes de spores	spirale	spirale	spirale	rectiflexible	spirale	spirale	spirale
Ornementation de la surface des spores	rugueuse	rugueuse	lisse	épineuse	lisse	lisse	lisse
Caractéristiques physiologiques							
Croissance à différentes températures °C							
4 °C	-	-	-	-	-	-	-
25 °C	**	***	***	***	**	***	***
30 °C	***	***	***	***	***	***	***
37 °C	***	***	***	***	***	***	***
45 °C	-	-	-	-	-	***	**
55 °C	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à différents pH							
pH 5	**	**	*	***	**	***	**
pH 7	***	***	***	***	***	***	***
pH 9	***	***	***	***	***	***	***
pH 11	-	-	-	-	-	-	-
Tolérance aux différentes concentrations de NaCl							
2	***	***	***	***	***	***	***
4	***	***	***	***	***	***	**
6	***	**	***	***	***	***	*
8	-	-	-	**	-	**	*
10	-	-	-	**	-	**	*
Tolérance aux antibiotiques							
Erythromycine (10 mg/L)	R	R	S	R	R	R	S
Pénicilline (10 mg/L)	R	R	S	R	R	R	R
Streptomycine (10 mg/L)	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicine (15 mg/L)	R	R	S	S	R	S	S
Chloramphénicol (25mg/L)	R	R	R	R	R	R	R
Utilisation des sources de carbones (sucres 1%)							
D-Glucose	***	***	***	***	***	***	***
D-Maltose	***	***	***	***	***	*	***
D-Mannitol	*	***	***	***	*	***	***
Rhamnose	*	***	***	***	*	*	***
Sucrose	*	**	*	*	*	**	***
Utilisation des sources d'azotes (azotes 0,1%)							
L-Asparagine	**	***	*	***	**	*	*
Glycine	*	*	-	***	*	*	*
Méthionine	*	*	*	*	*	-	-
L-valine	***	***	***	***	***	*	*
L-tyrosine	*	*	*	**	*	-	*
L-cystéine	*	*	*	*	*	-	*
Caractéristiques biochimiques							
Catalase	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Oxydase	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Uréase	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Nitrate réductase	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve	-ve
Amidon	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Caséine	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Gélatine	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
Arbutine	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve

-:absence de pigment ou absence de croissance; +: présence de pigment ; *: croissance faible; **: croissance moyenne; ***: bonne croissance; **R**: résistant; **S**: sensible; **-ve**: réaction négative; **+ve**: réaction positive.

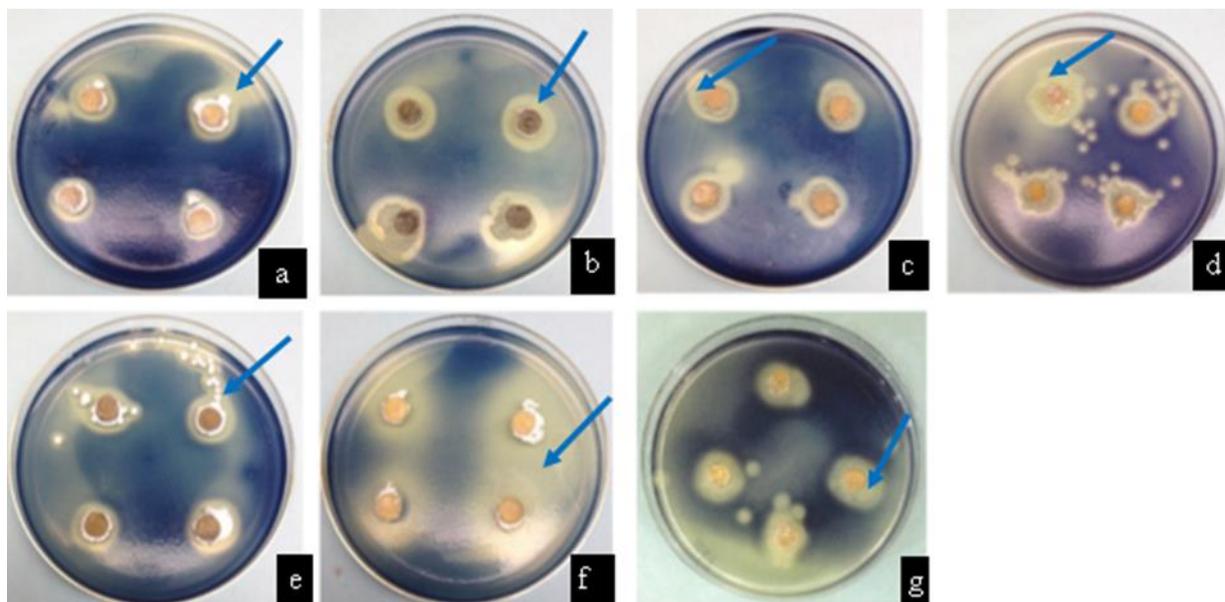


Figure 25: Activités amylasiques des isolats d'actinobactéries antagonistes après 48 h d'incubation à 30 °C. (a) PERM1, (b) PERM2, (c) PERM4, (d) PERM5, (e) PFK4, (f) PFBOT7 et (g) PFEL2.

III.4.1.5. Identification moléculaire des isolats antagonistes

L'électrophorèse des amplicons issus de l'amplification du gène 16S des isolats antagonistes a permis l'obtention du profil des séquences nucléotidiques de 1400-1500 paires de bases en moyenne (Figure 26).

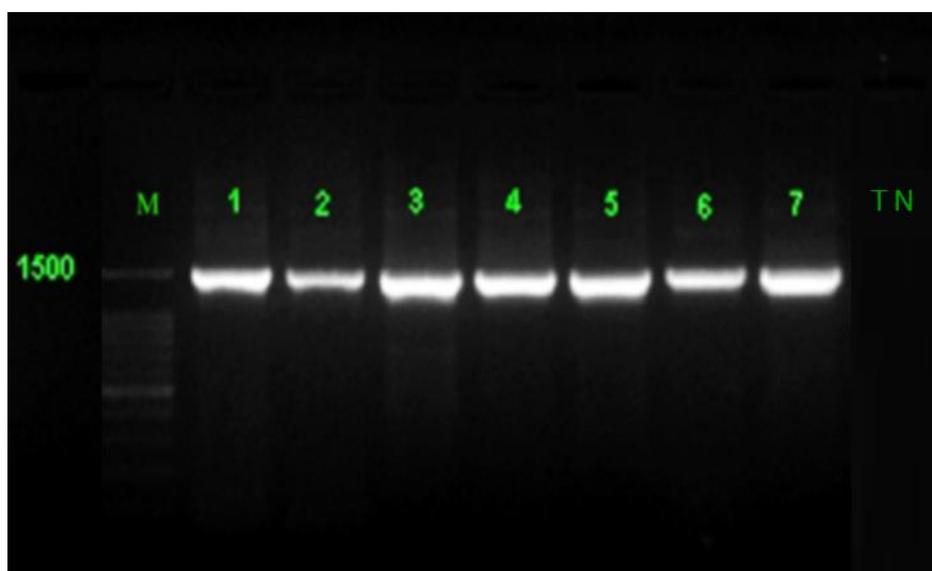


Figure 26: Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des isolats antagonistes. **M**: Marqueur de poids moléculaire (100-1500 pb); **1**: PERM1; **2**: PERM2; **3**: PERM4; **4**: PERM5; **5**: PFK4; **6**: PFBOT7; **7**: PFEL2 et **TN**: témoin négatif.

Les résultats du séquençage des fragments d'ADNr amplifiés des isolats d'actinobactéries antagonistes par les amorces universelles BSF 8/20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et BSR 1541/20 (5'-AAA GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts, puis visualisés et analysés par le logiciel Sequence Scanner. Les alignements du couple des séquences sens et antisens sont effectués par le programme Clustal Omega. Les séquences ainsi obtenues sont soumises via internet et à l'aide du logiciel Blast pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée GenBank, pour déterminer leur affiliation phylogénétique. Les résultats du BLAST et la construction de l'arbre phylogénétique révèlent que tous les isolats d'actinobactéries sélectionnés sont affiliés au genre *Streptomyces* spp. (Figure 27). Les numéros d'accèsions NCBI et les pourcentages de similarité des souches à identifier avec le taxon le plus proche sont représentés dans le Tableau XIX.

Tableau XIX: Identification moléculaire selon NCBI des souches d'actinobactéries antagonistes.

Isolats	Numéro d'accesion	Espèces proches	Pourcentage de similarité	Longueur des séquences (pb)
PERM1	KY400012	<i>S. albulus</i>	99 %	1414
PERM2	KY400013	<i>S. malaysiensis</i> <i>S. samsunensis</i>	98 %	1407
PERM4	KY400014	<i>S. brunneogriseus</i> <i>S. tendea</i>	97 %	1412
PERM5	KY400015	<i>S. macrosporeus</i>	99 %	1411
PFK4	KY400017	<i>S. albulus</i>	99 %	1425
PFBOT7	KY400018	<i>S. albus</i>	99 %	1428
PFEL2	KY400019	<i>S. gandocaensis</i> <i>S. shenzhenensis</i>	99 %	1419

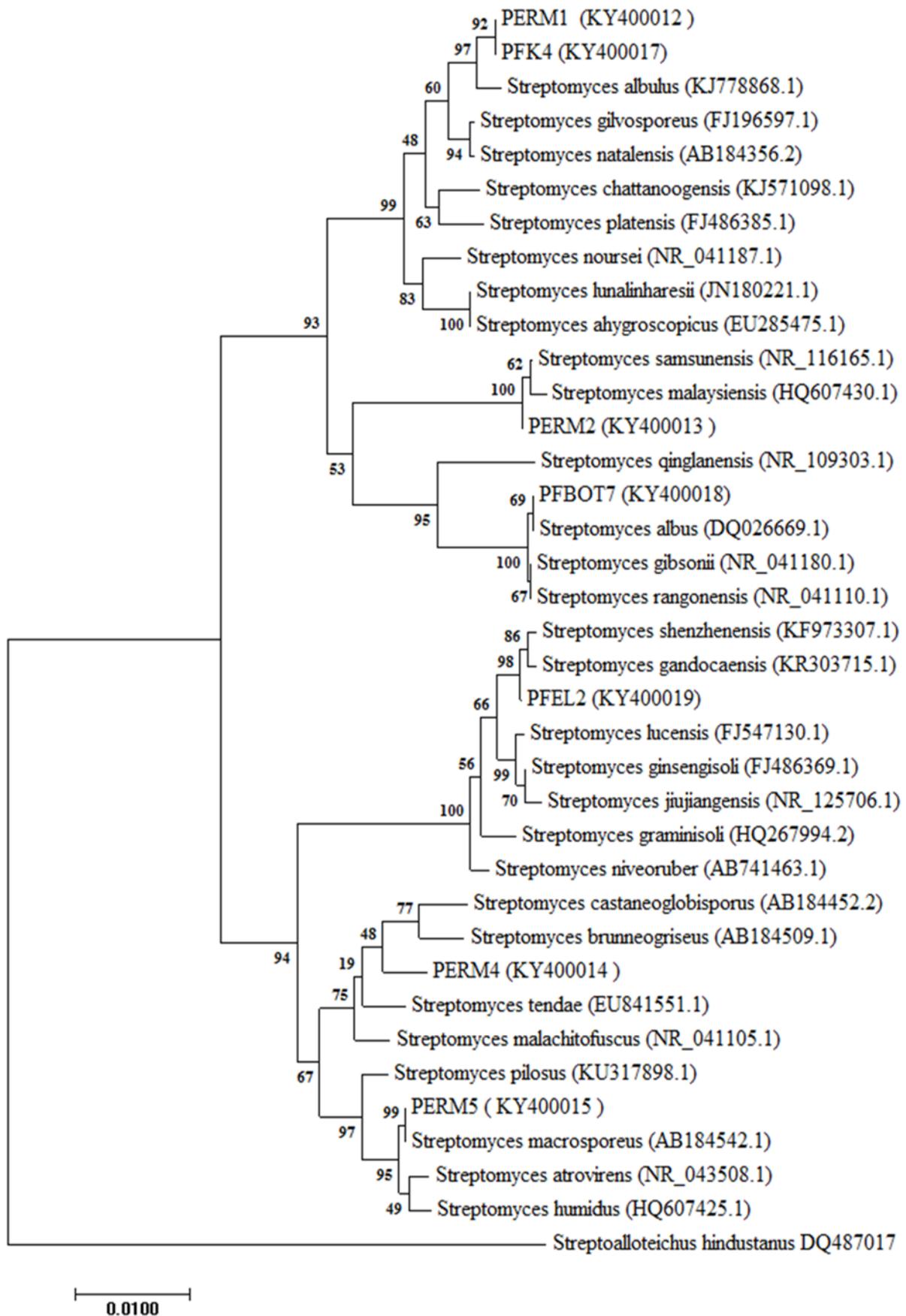


Figure 27: Relation phylogénétique entre les isolats antagonistes et les espèces représentatives basée sur les séquences 16S d'ARNr construite en utilisant la méthode de neighbor-joining et le logiciel MEGA 7.

Discussion partielle 1

La première partie de cette étude a pour but d'isoler, de déterminer les activités antagonistes et d'identifier sur la base des caractères polyphasiques les actinobactéries des racines et de la rhizosphère des plants de macabo asymptomatiques prélevés dans les localités Bonakanda, Botéva, Ekona, Ekona Lelu 1, Ekona Lelu 2 et Kumba situées autour du Mount Cameroun. Dans la présente étude, seul le sol de la forêt de Kumba a présenté un pH faiblement acide. Par ailleurs, seuls les sols des champs des champs d'Eko et EL1 ont présenté des taux en matière organique légèrement faibles. Le taux de matière organique significativement élevé dans les autres localités et les valeurs de pH obtenues dans ces localités montrent que ces sols seraient propices au développement des actinobactéries. Errakhi *et al.* (2009) ont montré que les paramètres physicochimiques du sol tels que le pH et la teneur en matière organique sont des facteurs qui influencent la croissance et la colonisation des actinobactéries. D'autre part, le pourcentage d'humidité (25,16 %) a été significativement élevé dans le sol du champ d'EL1. Cette forte teneur en eau contenue dans le sol du champ d'EL1 pourrait s'expliquer par la position géographique de cette localité située à 940 m d'altitude.

Après dénombrement des colonies d'actinobactéries, un plus grand nombre d'unités formant colonies soit $27,7 \times 10^6$ UFC ont été obtenus sur le milieu GLM comparé au milieu Bennett où $7,1 \times 10^6$ UFC ont été obtenus. De ce fait, le milieu GLM a été retenu comme meilleur milieu d'isolement des actinobactéries rhizosphériques. Ce résultat pourrait s'expliquer par la composition chimique des deux milieux de culture, car le milieu GLM est très riche en sources azotés comparé au milieu Bennett, ce qui stimulerait la croissance des actinobactéries et faciliterait leur isolement. Boussaber *et al.* (2012) ont également montré l'efficacité du milieu GLM pour l'isolement des actinobactéries à partir des sols rhizosphériques. Au regard de l'isolement des actinobactéries, un total de 287 colonies a été isolé sur le milieu GLM supplémenté de nystatine et d'acide nalixique à partir des andosols de la rhizosphère des plants de macabo asymptomatiques prétraités au CaCO_3 . Sur la base de leurs caractères morphologiques, ces colonies ont été regroupées en 12 isolats d'actinobactéries distincts. Ce résultat est différent de celui obtenu par Anwar *et al.* (2016) qui ont montré la présence de 98 isolats d'actinobactéries distincts sur le milieu ISP2 supplémenté de nystatine et d'acide nalidixique à partir de six échantillons de la rhizosphère de blé et quatre échantillons de la rhizosphère tomate prétraités au CaCO_3 . Par ailleurs, un total de 171 colonies a été isolé à partir des racines des plants de macabo asymptomatiques sur le milieu Eau agar et ces colonies ont été regroupées en 07 isolats distincts sur la base de leurs caractères morphologiques. Ce résultat est différent de celui obtenu par Goudjal *et al.* (2016) qui ont montré la présence de 16 isolats distincts d'actinobactéries endophytes à partir des racines de plantes natives d'Algérie sur le milieu Chitine-vitamine agar supplémenté des antibiotiques nystatine et acide nalidixique. Cette

différence pourrait être liée à la composition chimique des milieux d'isolement, car le milieu Eau agar utilisé est moins riche en éléments nutritifs que le milieu Chitine-vitamine agar, ce qui limiterait la croissance des actinobactéries.

La recherche de nouveaux agents de lutte biologique capables d'inhiber le développement des agents pythopathogènes est devenue une priorité majeure en raison des préoccupations environnementales (Islam et Hossain, 2013). Les actinobactéries ont reçu une attention particulière en raison de leur capacité à contrôler les différentes classes d'agents pathogènes des plantes à travers plusieurs modes d'action et la possibilité d'utilisation combinées avec d'autres méthodes de contrôle (Vitullo *et al.*, 2012). Dans cette étude, parmi les 19 isolats représentatifs de chaque groupe d'actinobactéries (12 isolats rhizosphériques et 07 isolats endophytes), 07 isolats à savoir PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 et PFEL2 ont montré de fortes activités antagonistes contre *P. myriotylum* et vis-à-vis des autres champignons et bactéries phytopathogènes testés. Ce résultat montre la capacité de ces isolats d'actinobactéries à produire divers métabolites bioactifs dotés des activités antifongiques et antibactériennes dont la diffusion des principes actifs dans le milieu de culture inhiberait la croissance des agents pathogènes fongiques et bactériens testés. Plusieurs auteurs ont également montré les activités antifongiques et antibactériennes des actinobactéries isolées de la rhizosphère et des tissus de plantes (Mouafo Tchinda *et al.*, 2016; Shaheen *et al.*; 2017; Kumal rai *et al.*, 2018).

Dans la présente étude, les critères de détermination que nous avons utilisés sont ceux préconisés par le guide pratique de l'identification générique des actinomycètes « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ». A cet effet, la majorité des isolats antagonistes présente des chaînes de spores spiralées. Selon Miyadoh *et al.* (2002), ces formes de chaînes de spores seraient caractéristiques du genre *Streptomyces* spp. Les résultats de la microscopie électronique ont révélé que les isolats PERM1 et PERM2 présentaient des surfaces d'ornementation des spores rugueuses tandis que les isolats PERM4, PFK4, PFBOT7 et PFEL2 présentaient des surfaces lisses. Seul l'isolat PERM5 présentait une surface d'ornementation épineuse. Les différentes surfaces d'ornementations des spores notées chez les isolats antagonistes sont des caractères microscopiques propres aux *Streptomyces* spp. (Gottlieb et Shirling, 1966; Nonomura, 1974).

Les facteurs physiologiques tels que la température, le pH et la salinité sont d'une grande importance pour la caractérisation phénotypique des actinobactéries. Dans cette étude, tous les isolats antagonistes ont présenté une bonne croissance entre 25 °C et 37 °C, seuls les isolats PFBOT7 et PFEL2 ont été capables de croître à 45 °C. Au regard du pH, tous les isolats ont présenté une croissance entre pH 5 et pH 9 avec une croissance optimale à pH 7 et pH 9. Le test de la salinité quant-à lui a révélé que seuls les isolats PERM5, PFBOT7 et PFEL2 étaient

capables de tolérer jusqu'à 10 % de concentration en NaCl. L'habilité des actinobactéries à tolérer le stress lié aux facteurs abiotiques tels que la température, le pH et la salinité a été reporté par Gopalakrishnan *et al.*(2014) et par Sreevidya *et al.*(2016).

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme un critère taxonomique additionnel de grande valeur pour l'identification des actinobactéries. Dans cette étude, la majorité des isolats antagonistes ont montré une multi-résistance vis-à-vis de l'antibiotique streptomycine (glycosamides), chloramphenicol, erythromycine (macrolides) et pénicilline (des β -lactamines). Cette multirésistance des isolats aux différentes classes d'antibiotiques testées indique qu'ils appartiendraient au genre *Streptomyces* spp. Car, la majorité des antibiotiques appartenant à la classe des β -lactamines, des céphalosporines et des macrolides reconnus sont étant inefficaces contre les *Streptomyces* (Rigali, 2008). D'où leurs multirésistances dans cette étude pour éviter leur propre destruction.

La capacité des souches à produire les pigments sur les milieux ISP6 et ISP7 est considérée par Shirling et Gottlieb (1966) comme une clé pour la classification des genres *Streptomyces*. Dans la présente étude, les isolats PERM1, PERM4, PFK4 et PFEL2 ont été capables de produire les pigments diffusibles sur le milieu ISP7. Ce résultat est proche de celui obtenu par Aouar *et al.* (2012) qui ont montré dans leur étude que trois isolats antagonistes Lac1, Pru 16 et Vic produisaient des pigments diffusibles sur le milieu ISP7. En outre, les isolats antagonistes ont utilisé les différentes sources de carbone testés (D-glucose, D-maltose, D-rhamnose, D-mannitol et sucrose) et la plupart des sources d'azote testées (L-asparagine, L-valine, L-tyrosine et L-cystéine, glycine et méthionine). Bhosale et Kadam (2015) ont montré la dégradation des sources de carbone et d'azote ci-dessus cités par les isolats d'actinobactéries de la rhizosphère et des racines de la canne à sucre.

Avec les approches biochimiques, la composition chimique de certaines substances présentes dans les cellules bactériennes peut être détectée par des tests spécifiques et les résultats sont utilisés comme outils d'identification de ces microorganismes. Dans la présente étude, tous les isolats antagonistes (100 %) ont été capables de produire la catalase. Ce résultat est différent de celui obtenu par Geetha *et al.* (2014) et Joshi *et al.* (2018) qui ont montré respectivement que 50 % des bactéries rhizosphériques et 80 % des bactéries endophytes étaient capables de produire la catalase. Par ailleurs, tous les isolats antagonistes ont montré l'habilité à produire l'oxydase. Ce résultat est contraire à ceux obtenus par les auteurs Kamal Rai *et al.* (2018) et Mohan *et al.* (2014) qui ont montré dans leur étude qu'aucun des isolats d'actinobactéries n'était capable de produire l'oxydase. D'autre part, cinq parmi les sept isolats d'actinobactéries antagonistes (71 %) ont été capables de produire la nitrate réductase. Ce résultat est différent de celui obtenu par Kamal Rai *et al.* (2018) qui ont montré que 67 % des isolats d'actinobactéries antagonistes produisaient la nitrate réductase. L'habilité des isolats d'actinobactéries

antagonistes à produire la nitrate réductase indique ces isolats sont capables de réduire le nitrate (NO_3) en nitrite (NO_2) dans les conditions environnementales. D'autre part, tous les isolats antagonistes ont été capables de produire l'uréase. Ce résultat est différent de celui obtenu par Joshi *et al.* (2018) qui ont montré qu'un seul isolat des bactéries endophytes d'*Ocimum sanctum* et d'*Aloe vera* produisait l'uréase. Cette habilité des isolats antagonistes à produire l'uréase, montre qu'ils sont capables d'hydrolyser l'urée présente dans la nature en ammoniac qui est un métabolite bénéfique pour la croissance et la suppression des maladies des plantes. Par ailleurs, tous les isolats antagonistes ont été capables de dégrader l'arbutine, l'esculine, l'amidon, la caséine et la gélatine. Au regard de la dégradation de l'esculine et de l'arbutine, nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Aouar *et al.* (2012). Quant-à la dégradation de l'amidon, la caséine et la gélatine, nos résultats sont différents de ceux obtenus par Joshi *et al.* (2018) qui ont montré que 70 %, 40 % et qu'aucun (0 %) d'isolats bactériens endophytes étaient capables de produire les amylases, caséinases et gélatinases respectivement.

L'amplification des ADN génomiques et le séquençage du gène de l'ARNr 16S des 7 isolats antagonistes nous a permis de les identifier. La comparaison des séquences des isolats antagonistes avec celles disponibles dans la base de données internationales Genbank nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces isolats. Tous les isolats antagonistes appartiennent au genre *Streptomyces* spp. et ont pour la plupart le pourcentage d'homologie égale à 99 % avec les souches de références les plus proches. Les souches *Streptomyces* sp. PERM2 et PERM4 bien que proches de *S. samsunensis* et *S. malaysiensis* (97 et 98 % de similarité) et *S. brunneogriseus* et *S. tendae* (97 et 98 % de similarité) respectivement, sont apparus dans des sous-clades différents. Ces deux souches seraient par conséquent de nouvelles espèces du genre *Streptomyces* spp. Meier-Kolthoff *et al.* (2013) ont montré que les souches ayant des pourcentages d'homologie inférieurs à 99 % avec les souches de référence proches seraient de nouvelles espèces.

Conclusion partielle 1

Parmi les 19 groupes représentatifs d'isolats d'actinobactéries distincts isolés dans les localités situées autour du Mont Cameroun, 07 notamment PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 et PFEL2 montrent de fortes activités antagonistes contre de *P. myriotylum* et vis-à-vis des autres champignons et bactéries phytopathogènes testés.

Les caractères phénotypiques (macroscopiques, microscopiques, culturels, physiologiques et biochimiques) combinés à l'identification moléculaire des 07 isolats antagonistes révèlent leur appartenance au genre *Streptomyces* spp. Cependant, les souches *Streptomyces* sp. PERM2 et PERM4 avec des pourcentages d'homologies de 97 % et 98 % respectivement avec les souches proches de références proches seraient de nouvelles espèces.

III.2. Evaluation des *Streptomyces* antagonistes pour les traits de biocontrôle, les propriétés promotrices de la croissance de la plante

III.2.1. Evaluation des propriétés de biocontrôle des *Streptomyces* antagonistes

III.2.1.1. Production des métabolites volatils

Tous les *Streptomyces* antagonistes produisent des métabolites volatils qui inhibent significativement la croissance de *P. myriotylum*. Les pourcentages d'inhibition varient entre 42,92 % et 95,84 % et les plus hauts pourcentages sont obtenus avec les souches *Streptomyces* sp. PERM1 et PFK4 soit 89,59 % et 95,84 % respectivement (Tableau XX).

Tableau XX: Pourcentages d'inhibition de la croissance de *P. myriotylum* par les métabolites volatils produits par les *Streptomyces* antagonistes après 7 jours d'incubation sur le milieu PDA.

Souches de <i>Streptomyces</i>	Métabolites volatils	
	Croissance de <i>P. myriotylum</i> (mm)	Pourcentage d'inhibition (%)
Témoin	80,00	00,00 ± 0,0 ^e
PERM1	08,33	89,59 ± 0,4 ^a
PERM2	35,00	55,83 ± 0,8 ^c
PERM4	26,67	66,67 ± 0,1 ^b
PERM5	36,33	54,58 ± 0,1 ^c
PFK4	03,33	95,84 ± 0,5 ^a
PFBOT7	20,66	86,68 ± 0,7 ^b
PFEL2	45,67	42,92 ± 0,5 ^d

Les moyennes dans chaque colonne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$ selon le test de Tukey.

III.2.1.2. Production des enzymes hydrolytiques

Toutes les souches antagonistes produisent les chitinases. L'activité de dégradation de la chitine colloïdale représentée par le diamètre de l'halozone est plus élevée chez la souche *Streptomyces* sp. PERM5 ($36,67 \pm 0,7^a$) mm (Figure 28A). Par ailleurs, les *Streptomyces* antagonistes produisent les protéases et la plus grande activité de dégradation des protéines est observée chez les souches *Streptomyces* sp. PFK4 ($60,00 \pm 0,0^a$) mm et *Streptomyces* sp. PERM5 ($58,33 \pm 0,3^{ab}$) mm (Figure 28B). En outre, tous les *Streptomyces* antagonistes produisent les lipases et la plus grande activité lipidique représentée par le diamètre de l'halozone de dégradation du Tween 80 est observée chez la souche *Streptomyces* sp. PFBOT7 ($52,66 \pm 0,6^a$) mm (Figure 28C). Parmi les souches de *Streptomyces* antagonistes, PERM2, PERM4, PFBOT7 et PFEL2 produisent les cellulases et le plus grand diamètre d'halozone de

dégradation de la carboxyméthylcellulose est obtenu avec la souche *Streptomyces* sp. PERM2 ($18 \pm 0,0a$) mm (Figure 28D). Au regard de la production des pectinases, les souches *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PFK4 et PFBOT7 dégradent la pectine et le plus grand diamètre de dégradation de la pectine est obtenu avec la souche *Streptomyces* sp. PERM2 ($18,00 \pm 0,0a$) mm (Figure 28E). L'enzyme β -1,3-glucanase est produite par toutes les souches antagonistes et *Streptomyces* sp. PERM2 ($23,49 \pm 0,0$ μ mol de glucose/h), *Streptomyces* sp. PERM5 ($23,42 \pm 0,07$ μ mol de glucose/h) et *Streptomyces* sp. PFBOT7 ($23,49 \pm 0,0$ μ mol de glucose/h) montrent les plus grandes activités β -1,3-glucanasiques (Figure 28F).

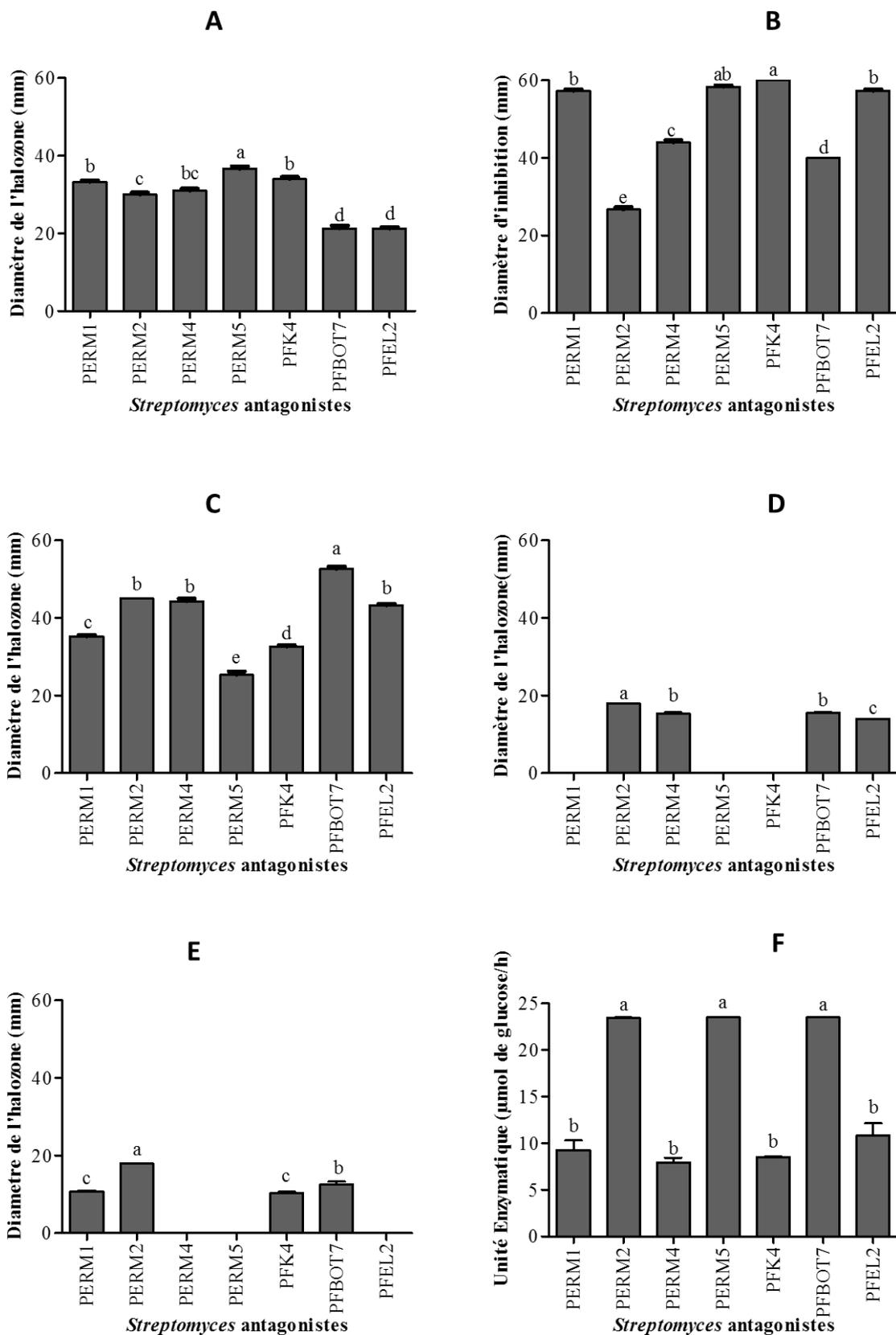


Figure 28: Activités enzymatiques des *Streptomyces* antagonistes. (A): chitinase; (B): protéase ; (C): lipase; (D): cellulase; (E): pectinase et (F): β -1,3-glucanase.

Les données représentées par chaque colonne sont les moyennes de trois valeurs indépendantes tripliquées. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne. Les moyennes dans chaque colonne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes suivant le test de Tukey à $P < 0,05$.

III.2.2. Quelques propriétés promotrices de la croissance de la plante (PGP)

III.2.2.1. Fixation de l'azote et solubilisation du phosphate

Cinq des sept souches antagonistes à savoir *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4, PERM5, PFBOT7 et PFEL2 sont capables de fixer l'azote (Tableau XXI). En outre, toutes les souches antagonistes sont capables de solubiliser le phosphate tricalcium présent dans le milieu Pikovskaya caractérisé par la formation des halozones claires autour des disques après 7 jours d'incubation (Tableau XXI).

III.2.2.2. Production de l'acide cyanhydrique (HCN), des sidérophores et de l'ACC désaminase

L'analyse qualitative de production de HCN par les souches antagonistes révèle que cinq souches produisent ce métabolite. La souche *Streptomyces* sp. PFK4 produit la plus grande quantité de HCN caractérisée par la coloration du papier Whatman en marron foncé suivit des souches *Streptomyces* sp. PERM1 et *Streptomyces* sp. PFBOT7 dont la coloration du papier Whatman est marron clair et enfin les souches *Streptomyces* sp. PERM2 et *Streptomyces* sp. PERM4 dont la coloration du papier whatman est orange (Tableau XXI). Par ailleurs, toutes les souches antagonistes produisent les sidérophores et cette production est caractérisée par la formation des halozones orangés autour des disques après 7 jours d'incubation sur le milieu Chrome Azurol (Figure 29). En outre, toutes les souches antagonistes produisent l'ACC désaminase (Tableau XXI).

Tableau XXI: Traits promoteurs de la croissance de plante des *Streptomyces* antagonistes

<i>Streptomyces</i>	Traits PGP				
	Solubilisation du phosphate	HCN	ACC désaminase	Sidérophores	Fixation de l'azote
PERM1	+	2	+	+	-
PERM2	+	1	+	+	+
PERM4	+	1	+	+	+
PERM5	+	0	+	+	+
PFK4	+	3	+	+	-
PFBOT7	+	2	+	+	+
PFEL2	+	0	+	+	±

-: Réponse négative ou absence du trait PGP recherché; +: Réponse positive ou présence du trait PGP recherché. Production de HCN: **0**: pas de production de HCN, couleur jaune; **1**: production faible de HCN, couleur orange; **2**: production modérée, couleur marron clair; **3**: production élevée de HCN, couleur marron.

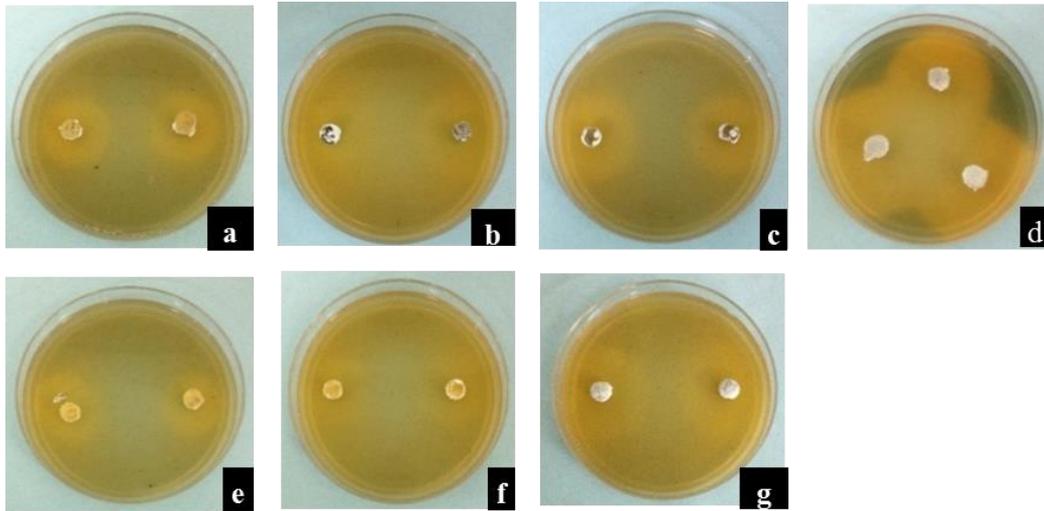


Figure 29: Production des sidérophores sur le milieu chrome azurol (CAS) agar par les *Streptomyces* antagonistes après 7 jours d'incubation à 30 °C. (a) PERM1, (b) PERM2, (c) PERM4, (d) PERM5, (e) PFK4, (f) PFBOT7 et (g) PFEL2.

Les halozones orangées autour des disques d'actinobactéries, indiquent la production des sidérophores.

III.2.2.4. Production de l'ammoniac (NH₃) et de l'Acide Indole Acétique (AIA)

L'analyse quantitative des cultures des souches antagonistes révèle qu'elles produisent toutes l'ammoniac et l'AIA en quantité variable. La gamme de concentration en ammoniac est comprise entre 261,71-633,42 mg/mL. Les plus grandes quantités d'ammoniac sont produites par les souches *Streptomyces* sp. PERM1 (633,42 ± 0,4 mg/mL), *Streptomyces* sp. PFBOT7 (630,90 ± 0,2 mg/mL) et *Streptomyces* sp. PFK4 (623,69 ± 0,6 mg/mL) (Figure 30A). Quant-à la production de l'AIA, la plus grande concentration est produite par *Streptomyces* sp. PERM2 (20,30 ± 0,2 µg/mL), suivit de *Streptomyces* sp. PERM4 (16,94 ± 0,1 µg/mL) (Figure 30B).

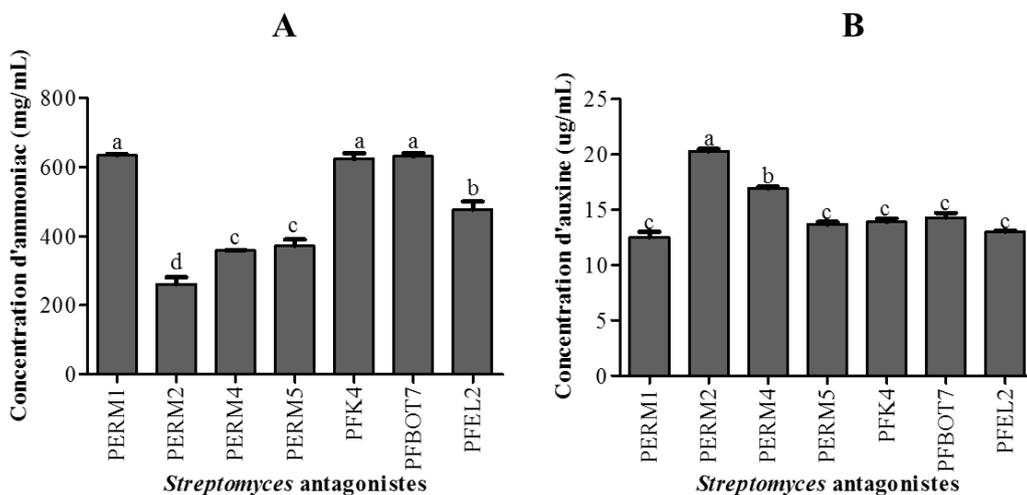


Figure 30: Production de l'ammoniac (A) et de l'Acide Indole Acétique (B) par les différents *Streptomyces* antagonistes.

Les données représentées par chaque colonne sont les moyennes de trois valeurs indépendantes tripliquées. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard de la moyenne. Les moyennes dans chaque colonne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes suivant le test de Tukey à $P < 0,05$.

III.2.3. Effet des *Streptomyces* sur la croissance racinaire de macabo *in vitro*

III.2.3.1. Production des vitroplants de macabo

Les explants sont cultivés sur le milieu DKW pendant 2 semaines (Figure 31A), ensuite transférés sur le milieu de base DKW supplémenté de BAP 2.10^{-6} M et après 3 semaines d'incubation, les bourgeons sont observés (Figure 31B et C). Les bourgeons ensuite cultivés sur le milieu DKW supplémenté de BAP 1.1^{-6} M et incubés pendant 3 semaines pour induire le développement des vitroplants. Les vitroplants de macabo dérivés à partir de cette condition, sont isolés et cultivés sur le milieu DKW (Figure 31D).



Figure 31: Micropropagation de *Xanthosoma sagittifolium* (cultivar blanc).

A. Explants après 2 semaines d'incubation sur le milieu de base DKW; **B.** Développement des bourgeons après 2 semaines d'incubation sur le milieu DKW supplémenté de BAP 2.10^{-6} M; **C.** Prolifération des bourgeons obtenus après 3 semaines d'incubation sur le milieu DKW supplémenté de BAP 1.1^{-6} M; **D.** Vitroplants de macabo produit par micropropagation.

III.2.3.2. Co-culture des vitroplants de macabo avec les *Streptomyces* antagonistes

Les *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PERM4 et PERM5 ayant montré les meilleurs attributs promoteurs de la croissance *in vitro* sont co-cultivés avec les vitroplants de macabo et leur comportement varie en fonction du traitement (Figure 32).

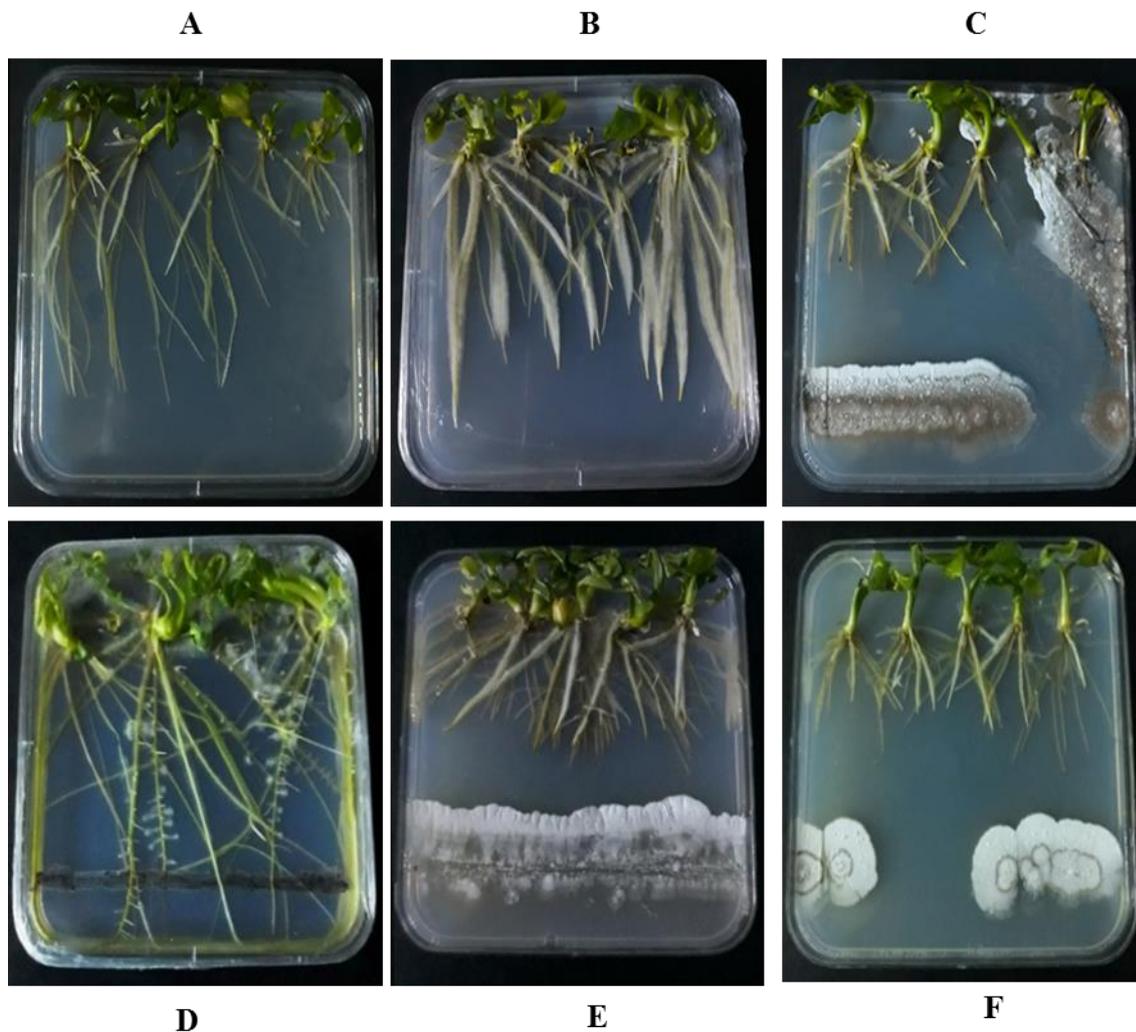


Figure 32: Effet *in vitro* des souches d'actinobactéries antagonistes sélectionnées sur la croissance racinaire des vitroplants de macabo après 35 jours de co-culture sur milieu DKW.

(A) milieu de base DKW ; (B) milieu de base DKW+ANA 10^{-6} M ; (C) milieu de base DKW+PERM1 ; (D) milieu de base DKW+PERM2 ; (E) milieu de base DKW+PERM4 ; (F) milieu de base DKW+PERM5.

III.2.3.3. Effet des *Streptomyces* antagonistes sur la longueur racinaire des vitroplants de macabo

La co-culture des vitroplants de macabo avec les différents *Streptomyces* antagonistes montre que la croissance des vitroplants varie en fonction des traitements. *Streptomyces* sp. PERM2 augmente significativement la longueur des racines principales des vitroplants ($14,26 \pm 0,5a$) cm comparativement au témoin positif ($6,87 \pm 0,3b$) cm et au témoin négatif ($5,01 \pm 0,8c$) cm (Figure 33).

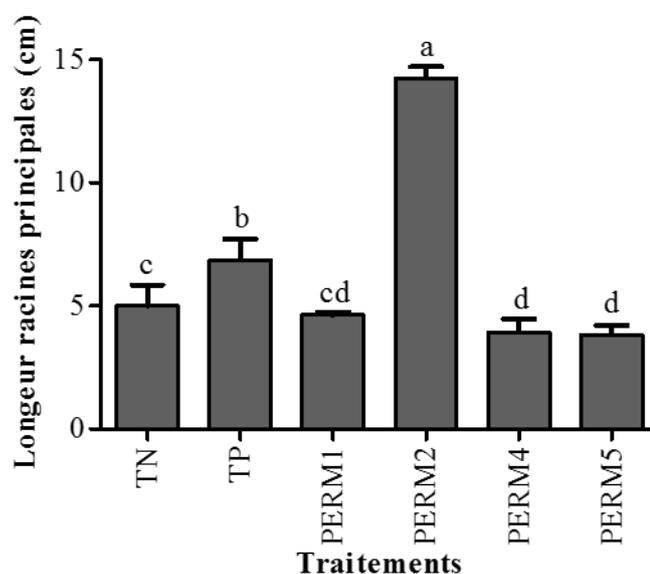


Figure 33: Effet des *Streptomyces* antagonistes sur la longueur des racines principales des vitroplants de macabo.

III.2.3.4. Effet des *Streptomyces* antagonistes sur le nombre de racines primaires et secondaires des vitroplants de macabo

Après co-culture des souches antagonistes sélectionnées avec les vitroplants de macabo, il en ressort que le nombre de racines primaires est significativement plus élevé chez les vitroplants co-cultivés avec *Streptomyces* sp. PERM4 ($19,4 \pm 0,6a$) racines primaires comparativement aux autres traitements (Figure 34A). Par ailleurs, le nombre de racines secondaires est significativement plus élevé chez les vitroplants co-cultivés avec *Streptomyces* sp. PERM4 ($18,2 \pm 0,9a$) racines secondaires et PERM2 ($12,6 \pm 0,6b$) racines secondaires comparé au traitement témoin négatif ($1,6 \pm 0,2d$) racines secondaires (Figure 34B).

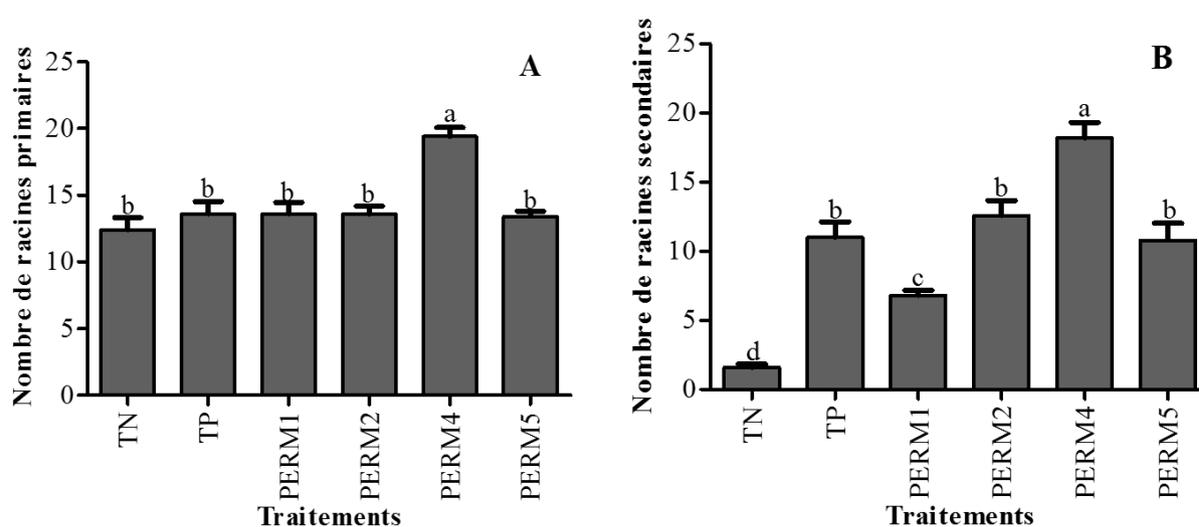


Figure 34: Effet des *Streptomyces* antagonistes sur le nombre de racines primaires (A) et de racines secondaires (B) des vitroplants de macabo.

III.2.3.5. Effet des *Streptomyces* antagonistes sur le poids frais racinaire des vitroplants de macabo

Les valeurs du poids frais moyens des racines des vitroplants de macabo co-cultivés avec *Streptomyces* sp. PERM2 ($1,903 \pm 0,06b$) g et *Streptomyces* sp. PERM4 ($1,355 \pm 0,04c$) g sont significativement plus élevés que celle du traitement témoin négatif ($0,371 \pm 0,06c$) g. Cependant, ces valeurs sont significativement inférieures à celle du témoin positif ($2,360 \pm 0,2$ g) (Figure 35).

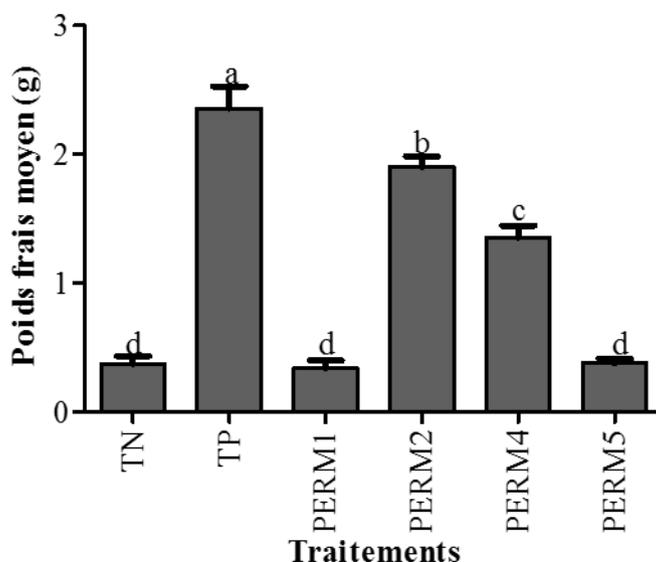


Figure 35: Effet des *Streptomyces* antagonistes sur le poids frais racinaire des vitroplants de macabo.

III.2.4. Effet des *Streptomyces* sur les marqueurs biochimiques

III.2.4.1. Effet des *Streptomyces* antagonistes sur la teneur en protéine totale

Après quantification de la teneur en protéine totale dans les différents lots de racines de vitroplants co-cultivés avec les souches sélectionnées, il en ressort que cette teneur est significativement plus élevée dans les racines co-cultivées avec *Streptomyces* sp. PERM1 ($17,083 \pm 1,5 \mu\text{g EqBSA/g de MF}$) et *Streptomyces* sp. PERM5 ($17,083 \pm 0,9 \mu\text{g EqBSA/g de MF}$) comparativement au témoin négatif ($10,764 \pm 0,7 \mu\text{g EqBSA/g de MF}$). Cependant, ces teneurs en protéines totales sont significativement inférieures à celle du traitement témoin positif ($21,59 \pm 0,7 \mu\text{g EqBSA/g de MF}$) (Figure 36).

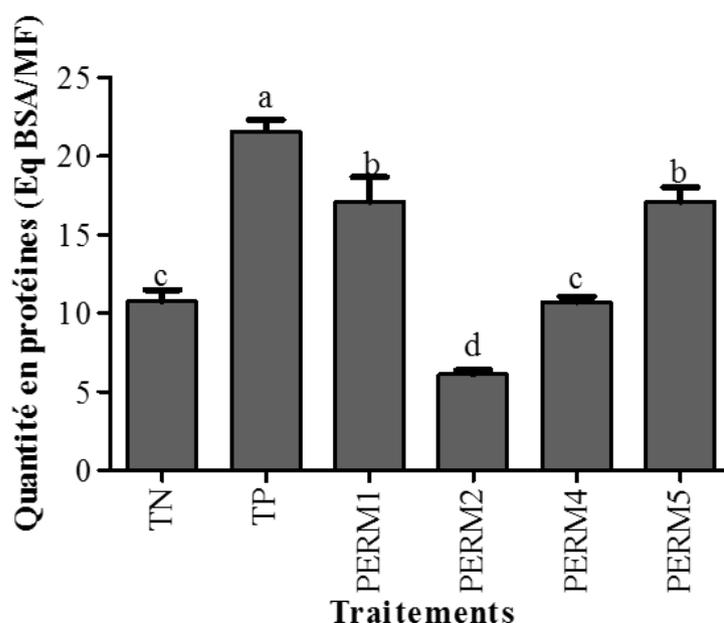


Figure 36: Teneur en protéines totales en équivalence de BSA/g de matière fraîche dans les racines de vitroplants de macabo en fonction des traitements.

III.2.4.1. Effet des *Streptomyces* antagonistes sur l'activité des peroxydases

Les activités peroxydasiques sont significativement élevées dans les extraits protéiques des racines de vitroplants co-cultivées avec *Streptomyces* sp. PERM5 ($0,019 \pm 0,0005$ UE/ μ g/protéine) et *Streptomyces* sp. PERM1 ($0,016 \pm 0,0002$ UE/ μ g/protéine) comparativement à celles des extraits protéiques des traitements témoin négatif ($0,001 \pm 0,0003$ UE/ μ g/protéine), et témoin positif ($0,0006 \pm 0,00002$ UE/ μ g/protéine) (Figure 37).

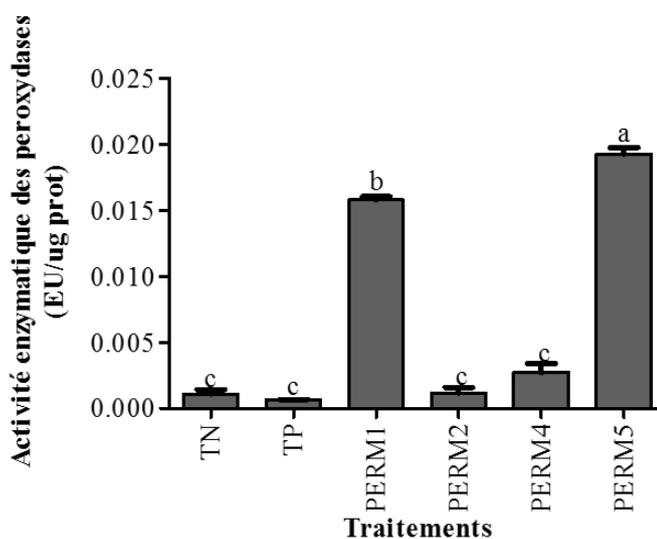


Figure 37: Variation de l'activité peroxydasique en UE/min/g de matière fraîche dans les racines de vitroplants de macabo en fonction des traitements.

III.2.5. Détection du gène (*chiC*) des chitinases et du gène (*iaaM*) de l'Acide Indole Acétique chez les *Streptomyces* antagonistes

Après amplification PCR du gène (*chiC*) des chitinases, il en ressort du profile électrophorétique que la bande de 400 pb caractéristique du gène *chiC* est détectée chez la quasi-totalité des souches antagonistes excepté chez *Streptomyces* sp. PERM1. Cependant, d'autres bandes de 500 et 700 pb sont détectées chez *Streptomyces* sp. PERM4. Au regard de la détection du gène (*iaaM*) de l'Acide Indole Acétique, aucune bande n'est observée entre 100 et 1000 pb chez tous les *Streptomyces* antagonistes, seuls les dimères d'amorces sont observés sur le gel après visualisation (Figure 38).

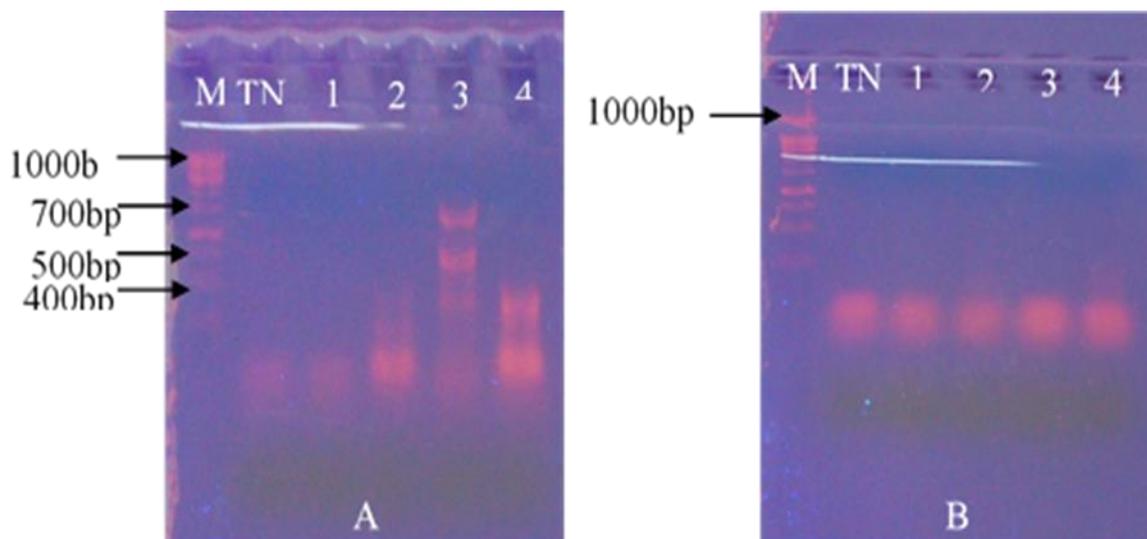


Figure 38: Profils électrophorétiques issus du produit de l'amplification PCR du gène *chiC* des chitinases (A) et du gène *iaaM* de l'Acide Indole Acétique (B) chez les *Streptomyces* antagonistes.

M: marqueur de poids moléculaire (100bp-1kb), TN: témoin négatif, 1: PERM1, 2: PERM2, 3: PERM4 et 4: PERM5.

Discussion partielle 2

La seconde partie de notre étude a pour but d'évaluer les *Streptomyces* antagonistes pour l'habilité à produire les molécules impliquées dans le biocontrôle des maladies des plantes, la promotion de la croissance de la plante et leurs effets sur les vitroplants de macabo. Dans cette étude, tous les *Streptomyces* antagonistes ont été capables de produire les métabolites volatils inhibant significativement la croissance de *P. myriotylum*. Cette habilité des souches antagonistes à produire les métabolites volatils inhibant la croissance de *P. myriotylum* montre qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la suppression des maladies des plantes à travers la synthèse des métabolites volatils inhibant la croissance des agents phytopathogènes. L'inhibition de la croissance des agents phytopathogènes fongiques par les métabolites volatils produits par les *Streptomyces* a été montrée par Arzanlou *et al.* (2016) et Awla *et al.* (2016).

Outre les métabolites volatils, les enzymes extracellulaires d'origine microbienne jouent également un rôle important dans la suppression des maladies plantes. Parmi les enzymes extracellulaires d'origine microbienne, les chitinases jouent un rôle crucial dans la dégradation, le recyclage du carbone et de l'azote (Kim-chi *et al.*, 2011) et sont très utilisées pour la préparation des biopesticides (Kumaran *et al.*, 2012). Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes (100 %) ont été capables de produire les chitinases. Les résultats différents ont été obtenus par Shariffah-Muzaimah *et al.* (2018) qui ont montré que 50 % des *Streptomyces* produisaient les chitinases. Les β -1,3-glucanases sont également les enzymes très importantes à cause de leurs fortes activités contre les champignons phytopathogènes (Neeraja *et al.*, 2010). Dans la cette étude, toutes les souches antagonistes ont montré l'habilité à produire les β -1,3-glucanases. Ce résultat est différent de celui obtenu par Shariffah-Muzaimah *et al.* (2018) qui ont montré la production des β -1,3-glucanase par une seule des souches de *Streptomyces* spp. isolées de la rhizosphère du palmier à huile.

Les protéases jouent en plus de leur rôle important dans la minéralisation des nutriments, celui des agents de biocontrôle des phytopathogènes. Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes ont montré l'habilité à produire les protéases. Les résultats similaires ont été obtenus par Sreevidya *et al.* (2016). Les lipases d'origine microbienne sont de plus en plus sollicitées à cause de leur large spécificité de substrats et leur grande robustesse (Zouaoui et Bouziane (2011); elles agissent sur une large gamme de substrats et ont plusieurs applications dans divers secteurs biotechnologiques tels que la fabrication des biopesticides (Faisal *et al.*, 2014; Pliego *et al.*, 2015). Dans cette étude, toutes les souches antagonistes ont été capables de produire les lipases. Joshi *et al.* (2018) ont obtenu les résultats contraires avec les bactéries endophytes d'*Ocimum sanctum* et d'*Aloe vera*.

Les pectinases constituent un groupe d'enzymes hydrolytiques dégradant la pectine qui est un polymère d'acide galacturonique présent principalement dans les parois cellulaires

végétales. Parmi les souches antagonistes, *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PFK4 et PFBOT7 ont montré l'habilité à produire les pectinases. Plusieurs auteurs ont montré la production des pectinases par les *Streptomyces* (Shrivastava *et al.*, 2015; Sreevidya *et al.*, 2016; Awla *et al.*, 2017). Les cellulases sont largement utilisées en agriculture (Kuhad *et al.*, 2011). Elles jouent un rôle dans la dégradation des débris de plantes, des parois cellulaires fongiques, dans le biocontrôle des pathogènes et des maladies de plantes (Bhat, 2000). Dans cette étude, quatre souches antagonistes (57 %) à savoir *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4, PFBOT7 et PFEL2 ont montré la capacité de produire les cellulases. Dinesh *et al.* (2015) ont montré les résultats différents où seuls 25 % des isolats bactériens testés produisaient des cellulases. Cette habilité des *Streptomyces* antagonistes à produire les enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que les chitinases, les glucanases, les protéases, les lipases, les pectinases et les cellulases montre d'une part qu'elles pourraient jouer un rôle important dans le biocontrôle d'une large gamme d'agents phytopathogènes et d'autre part dans la transformation des nutriments complexes en des formes minérales simples utilisables par les plantes pour leur développement.

Outre des traits de biocontrôle, les *Streptomyces* antagonistes ont été évalués pour les propriétés promotrices de la croissance de la plante. A cet effet, cinq des sept souches antagonistes (PERM2, PERM4, PERM5, PFBOT7 et PFEL2) ont été capables de fixer l'azote sur le milieu Jensen. Ce résultat est différent de celui obtenu par Neethu *et al.* (2016), qui ont montré que deux isolats bactériens endophytes de la plante médicinale *Curcuma longa* étaient capables de fixer l'azote sur le milieu Jensen. La capacité des souches antagonistes à fixer l'azote, indique leur habilité à convertir l'azote atmosphérique (N₂) en une forme utilisable par les plantes. Après l'azote, le phosphore (P) est le second plus important élément nutritif dont la plante a besoin pour sa croissance et son développement, mais sa disponibilité dans les sols agricoles est faible. Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes (100 %) ont été capables de solubiliser le phosphore sur le milieu Pikovskaya. Ce résultat est différent de ceux obtenus par Jog *et al.* (2014) et Joshi *et al.* (2018) qui ont montré respectivement que 28 % et 20 % des *Streptomyces* endophytes et rhizosphériques étaient capables de solubiliser le phosphore sur le milieu Pikovskaya. Cette habilité des souches antagonistes à solubiliser le phosphore montre que ces dernières peuvent convertir le phosphate organique naturellement présent dans le sol en une forme utilisable par la plante.

Généralement, l'éthylène est essentiel pour la croissance normale et le développement des plantes (Khalid, 2010). Cependant, le taux élevé d'éthylène peut causer la défoliation et d'autres processus cellulaires reliés qui peuvent concourir à la réduction de la performance de la culture (Saleem *et al.*, 2007). Ce taux d'éthylène est généralement baissé par l'enzyme ACC désaminase. Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes (100 %) produisent l'ACC désaminase. Ce résultat est différent de celui obtenu par Kaur *et al.* (2017), qui ont montré que

38 % des actinomycètes endophytes et rhizosphériques de la plante *Gladiolus* étaient capables de produire l'ACC désaminase. Cette habilité des souches antagonistes à produire l'ACC désaminase leur confert les aptitudes à convertir l'ACC en ammoniac, réduire le taux d'éthylène dans la plante, induire la tolérance au sel et réduire la sécheresse causée par le stress dans les plantes.

Il est suggéré par Tan *et al.* (2009), que la production des sidérophores est un important facteur pour l'inhibition des agents phytopathogènes et la promotion de la croissance des plantes. Les sidérophores aident à satisfaire les besoins en fer des organismes en chelatant des formes inorganiques et les rendant disponibles pour les bactéries et les plantes (Arora *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes ont été capables de produire les sidérophores. Les études récentes ont montré la production des sidérophores par les *Streptomyces* (Anwar *et al.*, 2016; Shariffah-Muzaimah *et al.*, 2018). La production de HCN par les *Streptomyces* a retenu une attention particulière ces dernières décennies à cause de son rôle essentiel dans la suppression des maladies des plantes (Gopalakrishnan *et al.*, 2014; Bhosale et Kadam, 2015). Dans la présente étude, cinq souches antagonistes (71 %) à savoir *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PERM4, PFK4 et PFBOT7, ont été capables de produire l'HCN. Kaur *et al.* (2017) ont montré les résultats différents où 38 % des souches de *Streptomyces* endophytes et rhizosphériques de la plante *Gladiolus* étaient capables de produire l'HCN. L'ammoniac (NH₃) est un autre métabolite volatil doté d'activité antifongique qui joue un rôle important dans la suppression des maladies des plantes (Anwar *et al.*, 2016). L'ammoniac produit par les microorganismes est également important pour l'élongation des racines et par conséquent augmente la biomasse de la plante. Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes ont montré l'habilité à produire l'ammoniac avec des concentrations variantes entre 261,71 et 633,42 mg/mL. Cette gamme de concentration en ammoniac est supérieure à celle obtenue par Passari *et al.* (2015) avec les actinomycètes endophytes des plantes médicinales. La synthèse des phytohormones ou régulateurs de croissance appartenant au groupe des auxines tel que l'Acide Indole Acétique (AIA) par les microorganismes est bien connue et constitue l'un des traits majeurs de promotion de la croissance chez les plantes. Dans la présente étude, toutes les souches antagonistes ont montré l'habilité à produire l'AIA. La concentration maximale d'AIA (20,30 µg/mL) produit par *Streptomyces* sp. PERM2 est supérieure à celles reportées par Damam *et al.* (2016) qui étaient de 2,50 µg/mL et par Nimnoi *et al.* (2010) qui étaient de 15,4 µg/mL.

Après co-culture des souches antagonistes *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PERM4 et PERM5 ayant présentées de meilleures activités PGP *in vitro* avec les vitroplants de macabo, il en ressort au regard de la longueur racinaire que la souche PERM2 a montré des effets significatifs. L'effet remarquable de PERM2 sur la longueur des racines principales des

vitroplants de macabo pourrait être expliqué par l'effet synergique des métabolites AIA, ACC désaminase et ammoniac produits par cette souche. Les études récentes ont montré que les métabolites tels que AIA, ACC désaminase et ammoniac produit par les microorganismes sont bénéfiques pour l'élongation racinaire (Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Shutsrirung *et al.*, 2013). Par ailleurs, les souches PERM2 et PERM4 ont présenté les effets significatifs sur le poids frais racinaire et sur le nombre de racines secondaires des vitroplants de macabo comparé au traitement témoin négatif. L'effet significatif de PERM2 et PERM4 sur le poids frais racinaire des vitroplants de macabo pourrait être attribué à l'action synergique des métabolites tels que l'AIA, l'ammoniac, l'ACC désaminase, les sidérophores produits par ces deux souches ainsi qu'à leur capacité à fixer l'azote et à solubiliser le phosphore. Palaniyandi *et al.* (2014) ont montré que les métabolites AIA, ACC désaminase, ammoniac, sidérophores produit par *Streptomyces* sp. PGPA39 ainsi que l'habilité de cette souche à fixer l'azote atmosphérique étaient bénéfiques pour l'augmentation significative du poids frais des vitroplants d'*arabidopsis*. D'autre part, l'effet considérable de PERM2 et PERM4 sur la stimulation du nombre de racines secondaires des vitroplants de macabo pourrait être attribué à l'effet individuel ou synergique des métabolites promoteurs de la croissance de la plante tels que l'AIA et / ou l'ACC désaminase produits par ces souches. Des études récentes ont montré que les métabolites AIA et /ou l'ACC desaminase produits par les microorganismes jouent un rôle important dans la stimulation de la croissance des racines secondaires des plantes (Palaniyandi *et al.*, 2013; Sreevidya *et al.*, 2016).

Au regard des marqueurs biochimiques, la teneur en protéines totales ainsi que l'activité peroxydasique ont été significativement élevées dans les racines co-cultivées avec les souches PERM1 et PERM5 comparé au traitement témoin négatif. Les études récentes ont montré l'augmentation de la teneur en protéines totales et de l'activité peroxydasique par les bactéries co-cultivées avec les plants tests (Akbari *et al.*, 2011 ; Singh *et al.*, 2015). Les enzymes étant reconnues comme étant des protéines, l'activité peroxydasique élevée dans les racines co-cultivées avec les souches *Streptomyces* sp. PERM1 et PERM5 pourrait s'expliquer par la teneur accrue en protéines totales dans les racines co-cultivées avec ces deux souches.

Sur le plan moléculaire, la bande de 400 pb caractéristique du gène *chiC* des chitinases a été détectée chez la quasi-totalité des souches antagonistes. Cependant, d'autres bandes de 500 et 700 pb ont été détectées chez PERM4. La présence de plusieurs isoformes de l'enzyme chitinase chez la souche PERM4 pourrait être liée au polymorphisme du gène *chiC* des chitinases chez cette souche. Les résultats contraires ont été obtenus par Passari *et al.* (2015), qui ont montré la présence des bandes de 400 pb caractéristique du gène *chiC* chez toutes les souches d'actinobactéries endophytes des plantes médicinales ayant présenté les activités chitinasiques *in vitro*. Par ailleurs, le gène *iaaM* de l'Acide Indole Acétique n'a été détecté chez

aucune souche antagoniste. Ceci pourrait s'expliquer par la non spécificité des amorces utilisées, car le gène codant pour la synthèse de l'AIA chez les bactéries est présent sous deux isoformes à savoir *iaaM* et *iaaH* (Spaepen *et al.*, 2007). Notre résultat est contraire à celui obtenu par Passari *et al.* (2015), qui ont montré la présence des bandes de 150 pbs caractéristiques du gène *iaaM* chez toutes les souches d'actinobactéries endophytes des plantes médicinales ayant montré la production de l'AIA *in vitro*.

Conclusion partielle 2

Les *Streptomyces* antagonistes produisent les métabolites impliqués dans le biocontrôle des maladies des plantes à l'instar des métabolites volatils et des enzymes de lyse de la paroi des agents phytopathogènes fongiques et bactériens à savoir les chitinases, les β -1,3- glucanases, les protéases, les lipases, les cellulases et les pectinases.

Les souches antagonistes produisent également les molécules associées à la promotion de la croissance de la plante telles que l'AIA, NH₃, HCN, ACC désaminase, les sidérophores; En outre, elles montrent l'habilité à solubiliser le phosphore et à fixer l'azote atmosphérique (N₂).

Les *Streptomyces* sp. PERM2 et PERM4 montrent des effets significatifs sur l'élongation des racines principales, le nombre de racines primaires et secondaires et sur le poids frais des racines des vitroplants de macabo. De plus le gène *chiC* des chitinases est détecté chez ces deux souches.

III.3: Caractérisation partielle des métabolites bioactifs produits par les *Streptomyces* antagonistes

III.3.1. Production des extraits bruts

Après extraction à l'acétate d'éthyle des fermentats des *Streptomyces* sp. PERM1, PERM2, PERM4 et PFK4 puis quantification, il en ressort que les masses des extraits bruts varient en fonction des souches avec une quantité plus prononcée chez *Streptomyces* sp. PERM2 (Tableau XXII).

Tableau XXII: Masses des extraits bruts (g) obtenus après fermentation solide.

Souches de <i>Streptomyces</i>	PERM1	PERM2	PERM4	PFK4
Masse de l'extrait (g)	25,128	28,861	19,786	12,723

III.3.2. Activité antifongique des extraits bruts

Les extraits bruts des *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 inhibent significativement la croissance de *P. myriotylum* et les pourcentages d'inhibition varient entre 75,31 % et 80,25 % (Figure 39).

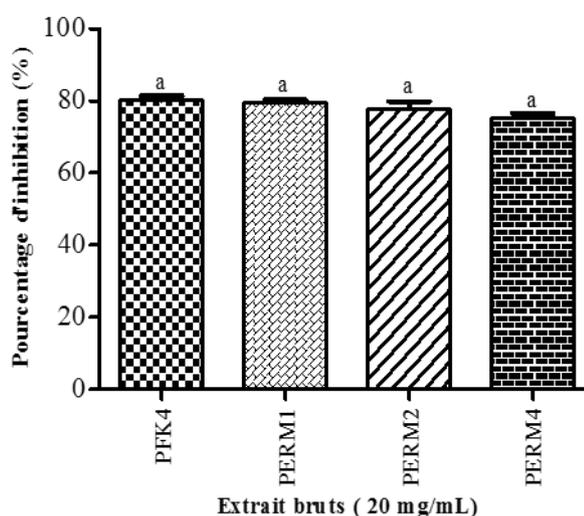


Figure 39: Effet des extraits bruts sur la croissance de *P. myriotylum* après 7 jours d'incubation à 28 ± 2 °C.

III.3.3. Détermination des concentrations minimales efficaces (CME) des différents extraits bruts

Toutes les concentrations (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 1,25 mg/mL) de l'extrait brut des souches testées présentent une inhibition significative de la croissance de *P. myriotylum* (Figure 40).

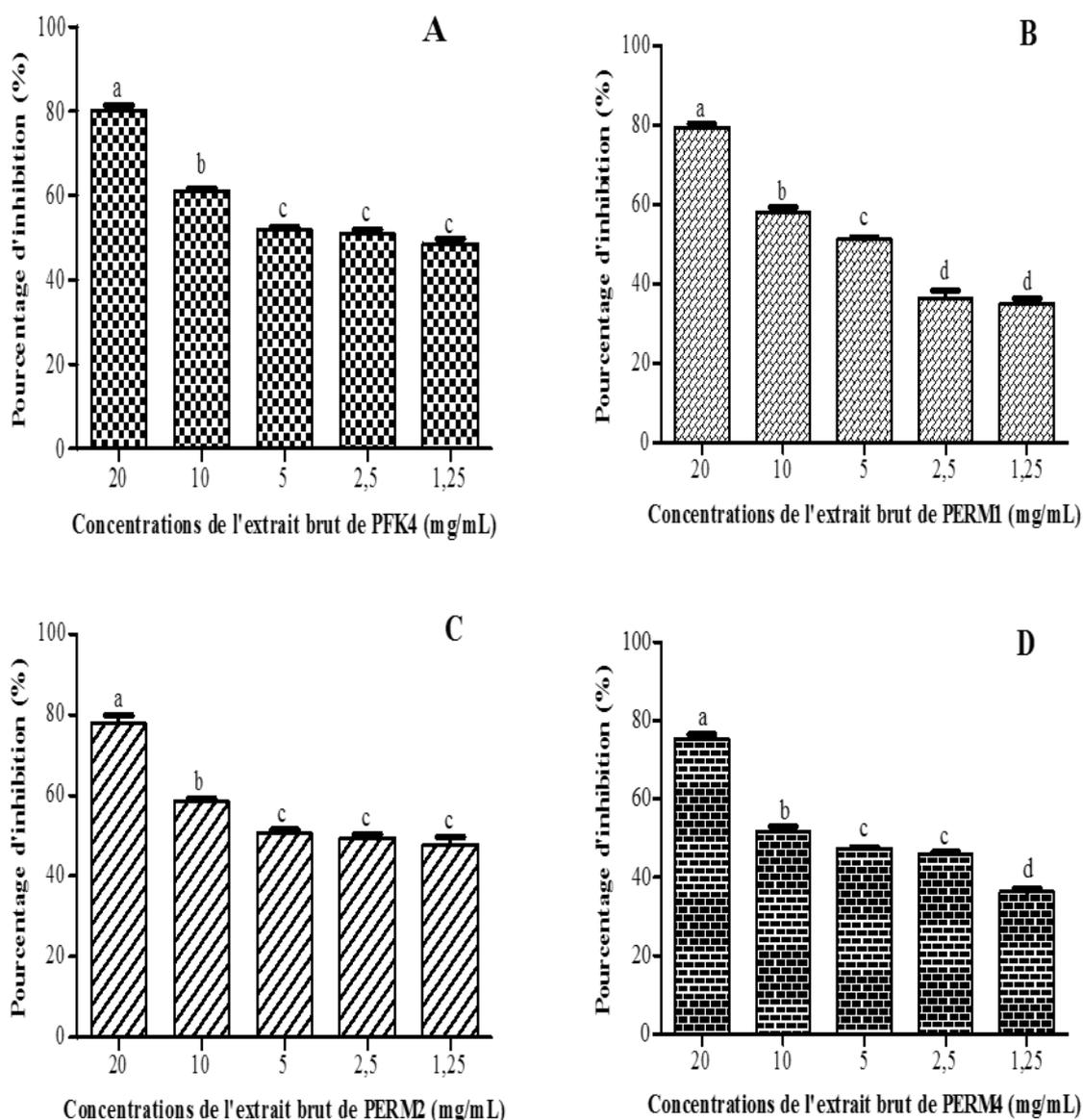


Figure 40: Effet des différentes concentrations des extraits bruts de *Streptomyces* sp. PFK4 (A), PERM1 (B), PERM2 (C) et PERM4 (D) sur la croissance de *P. myriotylum* après 7 jours d'incubation à 28 °C.

III.3.4. Analyse des molécules volatiles contenues dans les extraits bruts en utilisant la Chromatographie en Phase Gaseuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)

III.3.4.1. Analyse GC-MS de *Streptomyces* sp. PFK4

Les résultats de l'analyse GC-MS révèlent la présence de plusieurs métabolites volatils dans les différents extraits bruts des souches antagonistes. Le chromatogramme issu de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 montre la présence de 157 composés dont les majoritaires sont représentés par les hauts pics (Annexe 4.1). Parmi les 157 composés détectés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4, vingt-un (21) ont un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % (Tableau XXIII).

Tableau XXIII: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur à égale à 1 % contenus dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 obtenus après chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

No pic	T.R (min)	% S.A	% H	Noms du composé	F.B	M.M
5	2,987	4,91	5,26	Butane-2,3-diol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90
6	3,091	3,63	3,94	Butane-2,3-diol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90
13	5,627	2,04	2,01	Ethanoate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	88
17	6,392	2,14	2,36	3-Hydroxyisovaline	C ₅ H ₁₁ NO ₃	133
33	8,397	1,56	1,87	Acide malique	C ₇ H ₁₄ O ₂	130
35	8,748	3,82	5,06	Tétraméthylpyrazine	C ₈ H ₁₂ N ₂	136
108	16,851	11,60	12,56	Acide 2,6-dihexadécanoate-1(+)-ascorbique	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	652
118	18,009	21,88	18,35	Acide (9Z,12Z)-Octadéc-9,12-diénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
119	18,039	9,07	14,71	(9Z)-Hexadéc-9-éнал	C ₁₆ H ₃₀ O	238
120	18,167	1,52	3,12	Acide stéarique	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
121	18,175	1,20	2,94	Octa-9,12-diénoate de dibutyle	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336
125	18,517	1,13	0,35	(11Z)-Tétradéc-11-èn-1-ol	C ₁₄ H ₂₈ O	212
126	18,599	1,09	0,41	Acide (9Z,12Z)-Octadéc-9,12-diénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
131	19,204	1,25	0,93	Acide stéarique	C ₂₂ H ₄₄ O	310
133	19,520	1,02	0,49	Acide (3Z)-éicos-3-énoïque	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
140	20,894	2,92	1,26	Octa-9,12-diénoate de dibutyle	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	322
154	24,038	1,21	0,71	Acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
155	24,100	1,08	0,47	2,3-dihydroxypropylélaïdate	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	356

T.R: Temps de rétention, **%S.A:** pourcentage surface aérienne, **%H:** pourcentage hauteur, **F.B:** formule brute et **M.M:** masse moléculaire.

Parmi les 21 composés, les majoritaires de l'extrait brut de la souche PFK4 tels qu'indiqués par les pics élevés sont identifiés comme:

- Butane-2,3-diol avec un pic apparaissant aux temps de rétention de 2,91 min et 3,63 min;
- Éthanoate d'éthyle avec un pic apparaissant au temps de rétention de 5,627 min;
- 3-hydroxyisovaline avec un pic apparaissant au temps de rétention de 6,392 min;
- Acide malique avec un pic apparaissant au temps de rétention 8,397 min;
- Tétraméthylphénazine avec un pic apparaissant au temps de rétention 8,748 min;
- Acide 2,6-dihexadécanoate-1(+)-ascorbique ou acide linoléique avec un pic apparaissant au temps de rétention 16,851 min;
- Acide (9Z, 12Z) -octadéc-9,12-diénoïque avec un pic apparaissant au temps de rétention 18,005 min;
- (9Z) hexadéc-9-éнал avec un pic appartenant au temps de rétention 18,039 min;
- Acide stéarique avec un pic apparaissant au temps de rétention 18,167 min;

- Octa-9,12-diénoate de dibuthyle avec un pic apparaissant au temps de rétention 18,175 min.

III.3.4.2. Analyse GC-MS de *Streptomyces* sp. PERM1

Le chromatogramme issu de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 montre la présence de 150 composés dont les majoritaires sont représentés par les hauts pics (Annexe 4.2). Parmi les 150 composés détectés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1, seize (16) composés possèdent un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % (Tableau XXIV).

Tableau XXIV: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % contenus dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

No pic.	T.R (min)	% S.A	% H	Noms des composés	F.B	M.M
5	2,996	1,28	1,21	Butane-2,3-diol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90
6	3,096	1,38	1,33	Butane-2,3-diol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90
7	3,21	1,01	0,66	Penten-3-én-2-one	C ₆ H ₁₀ O	98
101	16,847	19,78	20,98	Acide 2,6 dihexadecanoate-1-(+)-ascorbique	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	652
112	18,005	24,96	24,91	Acide (9Z,12Z)-Octadec-9,12-diénoïque ou acide linoléique	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
113	10,037	15,79	21,65	Acide (9Z)-octadéc-9-énoïque ou acide oléique	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
114	18,167	1,74	3,34	Acide Octadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
115	18,175	1,54	3,13	2-(octadéc-9,12-diényloxy)éthanol	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
116	18,208	1,5	1,55	Hexadéc -9-énoate d'éthyle	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
118	18,368	1,01	0,58	Acide octadéc-9,12-diénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
123	19,209	1,76	1,20	Acide stéarique	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	356
124	19,378	1,10	0,64	Acide octadéc-9,12,15-trénoïque	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278
125	19,523	1,41	0,64	Acide (3Z)-eicos-3-énoïque	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
132	20,251	1,58	0,32	Ergost-5-én-3-ol	C ₂₈ H ₄₈ O	400
134	20,897	2,66	1,19	Octadéc-9,12-dién-1-ol	C ₁₈ H ₃₄ O	266
147	23,763	1,34	0,38	Stigmast-5-én-3-ol	C ₄₇ H ₈₂ O ₂	678

T.R: Temps de rétention, **%S.A:** pourcentage surface, **%H:** poucentage hauteur, **F.B:** formule brute et **M.M:** masse moléculaire.

Parmi les seize (16) composés, les majoritaires tels que représentés par les pics élevés sont identifiés comme:

- L'acide 2,6 dihexadecanoate-1(+)-ascorbique avec un temps de rétention de 16,852 min;
- L'acide (9Z, 12Z)-Octadéc-9,19-diénoïque ou acide linoléique avec un temps de rétention de 18,005 min;
- L'acide 9-Octadécanoïque avec un temps de rétention de 18,037 min.

III.3.4.3. Analyse GC-MS de *Streptomyces* sp. PERM2

Le chromatogramme de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2 montre la présence de 112 composés (Annexe 4.3). Parmi les 112 composés détectés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2, dix (10) composés possèdent un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % (Tableau XXV).

Tableau XXV: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égale 1 % contenus dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC- MS).

No Pic	T.R (min)	% S.A	% H	Noms des composés	F.B	M.M
7	3,217	1,11	0,68	Pent-3-è-2-one	C ₆ H ₁₀ O	98
24	8,758	1,01	1,27	Trétraméthylpyrazine	C ₈ H ₁₂ N ₂	136
67	16,849	19,62	22,34	Acide 2,6-dihexadecanoate1-(+)-Ascorbique	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	652
75	18,003	32,76	29,75	Acide octadéca-9,12-dienoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
76	18,034	17,98	24,82	Acide Trifluoroacétique	C ₁₅ H ₂₇ F ₃ O ₂	296
77	18,167	3,67	3,95	2-(octadéc-9,12-diényloxy)Ethanol,	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
98	20,860	1,53	0,61	2-(octadéc-9,12-diényloxy)Ethanol,	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
102	21,601	1,46	0,24	Acide benzène-1,2-dicarboxylique	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278
108	24,968	1,63	1,00	Acide octadéc-9,12-diénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
109	25,968	1,56	0,66	Chlorue d'oléolye	C ₁₈ H ₃₃ Cl	300

T.R: Temps de retention, **%S.A:** pourcentage surface, **% H:** pourcentage hauteur, **F.B:** formule brute et **M.M:** masse moléculaire.

Parmi les dix (10) composés, les majoritaires tels que représentés par les pics élevés sont identifiés comme:

- Acide 2,6-dihexadecanoate-1(+)-ascorbique avec un temps de rétention de 16,849 min;

- Acide 9,12-(Z, Z) -Octadécadiénoïque ou acide linoléique avec un temps de rétention de 18,003 min;
- Acide trifluoroacétique avec un pic apparaissant au temps de rétention 18,034 min.

III.3.4.4. Analyse GC-MS de *Streptomyces* sp. PERM4

L'analyse GC-MS révèle la présence de 142 composés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 (Annexe 4.4). Parmi les 142 composés détectés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4, dix (10) composés possèdent un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égal à 1 % (Tableau XXVI).

Tableau XXVI: Composés volatils ayant un pourcentage de surface aérienne supérieur ou égale 1 % contenus dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC- MS).

No. Pic	T.R (min)	% S.A	% H	Noms des composés	F.B	M.M
90	16,847	16,73	18,62	Acide 2,6 dihexadecanoate 1-(+)-Ascorbique	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	652
91	17,058	1,58	2,01	Acide hexadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
100	18,001	29,74	27,45	Acide octadéca-9,12-dinoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
101	18,033	16,12	21,71	Acide (9Z)-octadéc-9-énoïque	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
102	18,167	4,33	4,53	Octa-9,12-diénoate de dibutyle	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336
103	18,207	1,58	2,14	Oléate d'éthyle	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310
125	20,888	1,07	0,45	Acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354
137	24,030	1,10	0,67	Acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354
140	25,961	1,54	0,61	Acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	534
142	29,193	1,10	0,21	5-pentadécylbenzène-1,3-diol	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320

T.R: Temps de rétention, **%S.A:** pourcentage surface, **%H:** pourcentage hauteur, **F.B:** formule brute et **M.M:** masse moléculaire.

Parmi les dix composés, les majoritaires tels que représentés par les pics élevés sont identifiés comme:

- Acide 2,6-dihexadécanoate-1(+)-ascorbique avec un temps de rétention de 16,852 min;
- Acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque ou acide linoléique avec un temps de rétention de 18,005 min;
- Acide octadéc-9-énoïque avec un temps de rétention de 18,037 min.

III.3.5. Analyse des molécules non volatiles

III.3.5.1. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4.

L'analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* sp. PFK4 révèle la présence de vingt-deux composés non volatils. Parmi les vingt-deux composés détectés, cinq sont identifiés à partir de la base de données utilisée comme:

- Acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, de formule brute ($C_{16}H_{10}O_8$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 7,514 min et une masse moléculaire de 330,01 g/mol (Figure 41);
- Amicoumacine A, de formule brute ($C_{20}H_{29}N_3O_7$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 15,137 min et une masse moléculaire de 423,35g/mol (Figure 42);
- Fongichromine, de formule brute ($C_{35}H_{58}O_{12}$) avec un pic apparaissant au temps 15,734 min et une masse moléculaire de 669,55 g/ mol (Figure 43);
- N-Acétyl-D, L-phénylalanine, de formule brute ($C_{11}H_{13}NO_3$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 5,358 min et une masse moléculaire 206,08 g/mol (Figure 44);
- Rapamycine, de formule brute ($C_{51}H_{79}NO_{13}$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 20,329 min et une masse moléculaire de 914,69 g/mol (Figure 45).

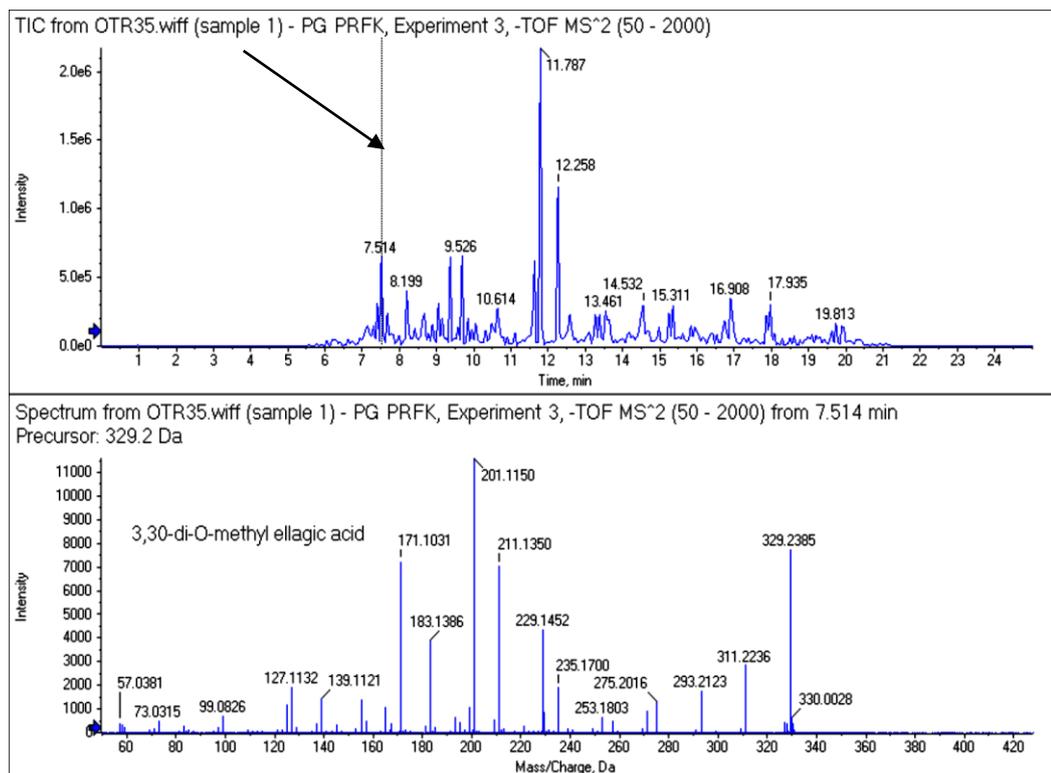


Figure 41: Détection de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

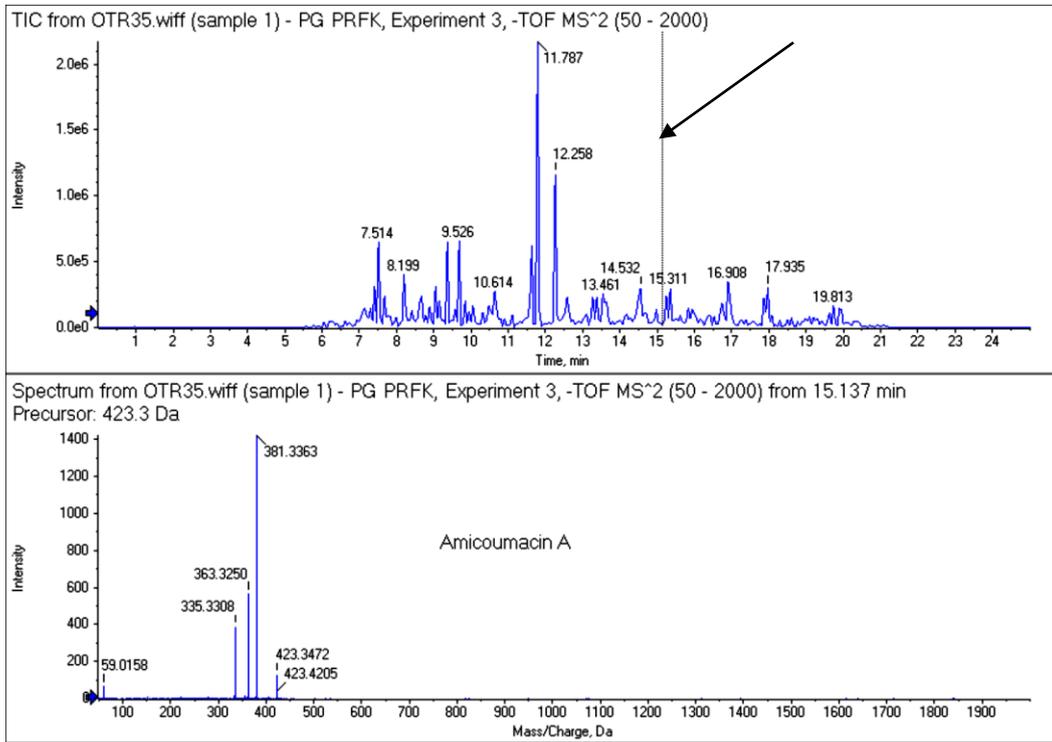


Figure 42: Détection de l'amicoumacine A dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

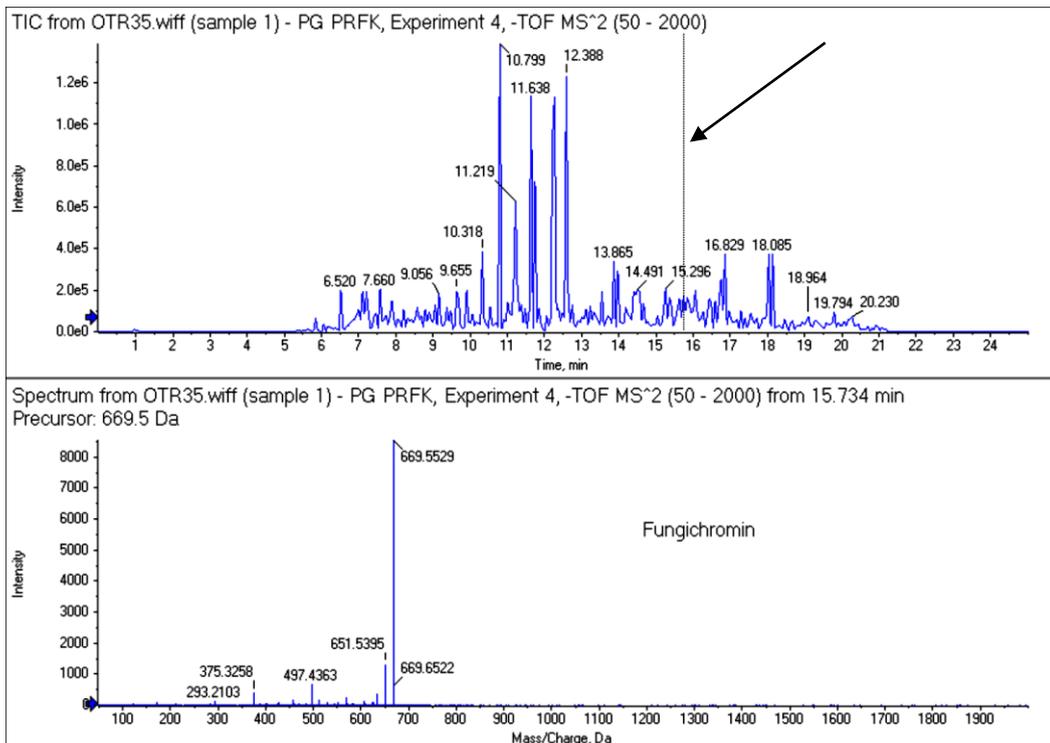


Figure 43: Détection de la fongichromine dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

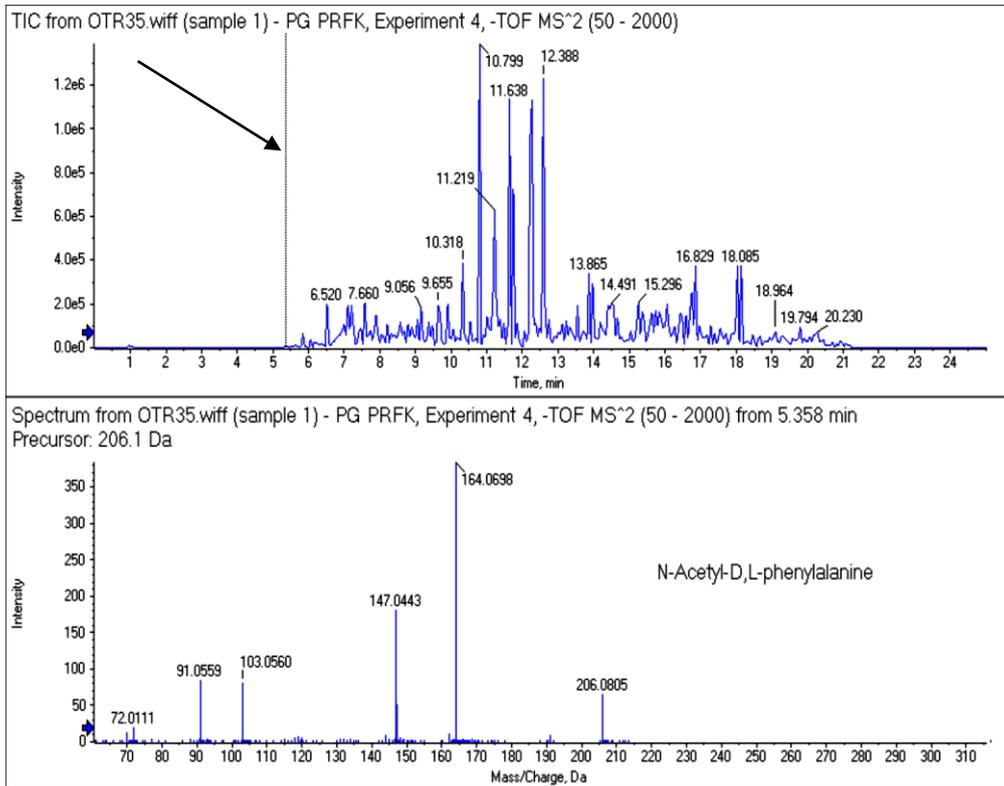


Figure 44: Détection de la N-Acetyl-D, L-Phénylalanine dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

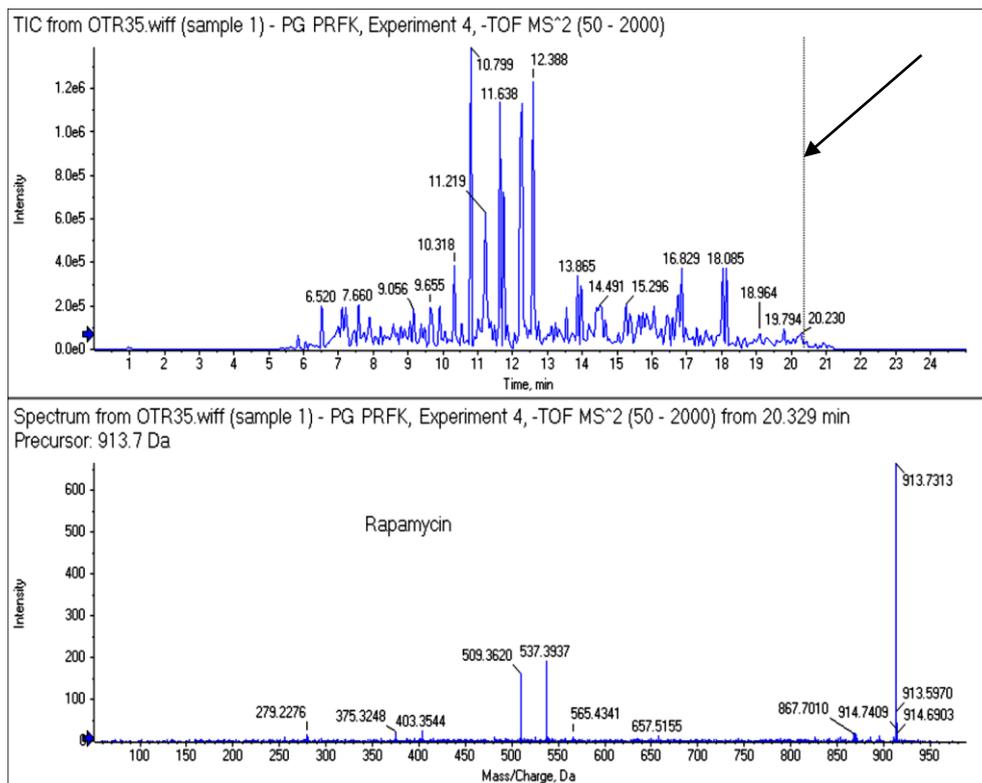


Figure 45: Détection de la rapamycine dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

Tous les composés détectés par LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4 sont représentés dans le Tableau XXVII et les structures chimiques des ceux identifiés sont représentées sur la Figure 46.

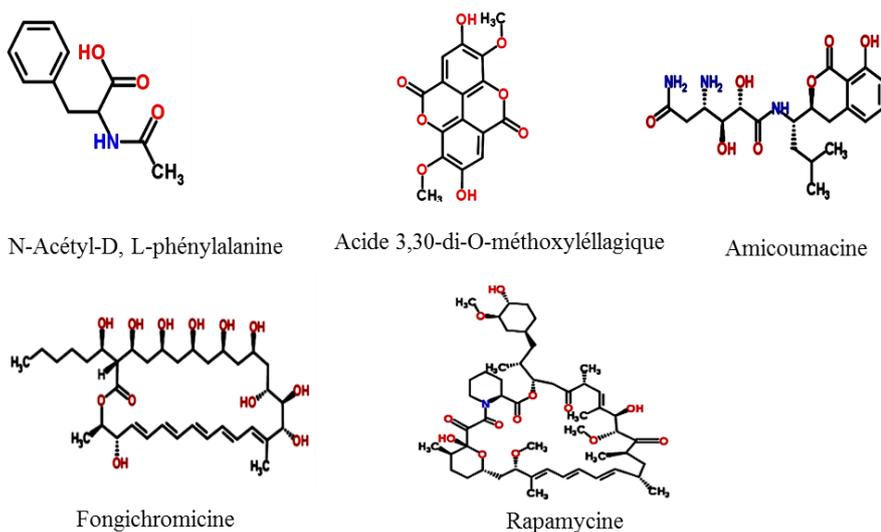


Figure 46: Structures des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de la souche *Streptomyces* sp. PFK4, l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, l'amicoumacine A, la fongichromine, N-Acetyl-D, L-phénylalanine et la rapamycine A.

Tableau XXVII: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* sp. PFK4.

No de pic	Temps de retention (min)	Fragments	Formule brute	Identification
1	5,358	72,011; 91,0560; 103,056; 147,044; 164,098 et 206,080	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	N-Acétyl-D, L-phénylalanine
2	7,514	57,038; 73,031; 99,083; 127,113, 139,112; 171,103; 183,139; 201,115; 211,135; 229,145; 235,170; 253,180; 275,202; 293,212; 229,238 et 330,008	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique
3	8,199	74,028; 196,170; 313,238; 370, 266 et 414,292	-	Non identifié
4	8,673	59,017; 74,027; 183,139; 358,252; 412,273; 426,288 et 456,304	-	Non identifié
5	9,044	184,019; 183,014 et 297,157	-	Non identifié
6	9,363	97,029; 183,015; 311,174 et 311,927	-	Non identifié
7	9,681	183,015; 197,028; 325,189 et 325,955	-	Non identifié
8	10,633	72,048,74,027; 290,249; 292, 265; 318,247; 336,258 et 380,284	-	Non identifié
9	11,629	679,489; 969,693; 1007,666 et 1009, 726	-	Non identifié
10	11,787	359,205; 452,290; 692,505; 1036,355; 1036,518; 1036,774; 137,011; 1037, 073; 1037,517	-	Non identifié
11	12,578	171,101; 279,233; 293,211; 295,225; 313,237; 329,225; 576,432 et 591,466	-	Non identifié
12	13,536	171,100; 279,232; 281,248; 293; 311,223; 329,231; 331,247 et 593,483	-	Non identifié
13	13,629	171,101; 255,233; 293,223; 329,232; 567, 369 et 567,467	-	Non identifié
14	14,550	195,137; 277,216; 255,234; 281,246; 295,229, 313,238 et 551,473	-	Non identifié
15	15,137	59,016; 335,831; 363,325; 381,336; 423,420 et 423,347	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₇	Amicoumacine A
16	15,351	361,347; 403,380; 429,338; 431,358 et 475,346	-	Non identifié
17	15,734	293,210; 375,326; 497,436; 651,539; 669,652 et 669,553	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₂	Fungichromine
18	15,939	122,035; 346, 2852; 581,531, 607,515; 625,524 et 625,626	-	Non identifié
19	16,901	122,036; 374,318; 609,565; 635,546; 653,561 et 653,654	-	Non identifié
20	17,970	402,3490; 637,596; 663,577 et 681,696	-	Non identifié
21	19,732	458.4122, 719.6339, 737.6526 et 737.7449	-	Non identifié
22	20,329	279,228; 375,325; 403,354; 509,36.2; 537,394; 565,434; 567,515; 867,010; 913,597; 914,7409; 913,731 et 914.690	C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃	Rapamycine

III.3.5.2. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1

L'analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche *Streptomyces* sp. PERM1 révèle la présence de trente-trois composés non volatils différents. Cependant, six composés sont identifiés à partir de la base de données utilisée comme :

- Acide 3,30-di-O-méthyléllagique, de formule brute ($C_{14}H_6O_8$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 5,20 min et une masse moléculaire de 330,26 g/mol; (Figure 47);
- Un dérivé de l'acide caféique, de formule brute ($C_9H_8O_4$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 4,308 min et une masse moléculaire de 194,09 g/mol (Figure 48);
- Acide férulique, de formule brute ($C_{10}H_{10}O_4$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 2,145 min et une masse moléculaire de 192,99 g/mol (Figure 49);
- N-Acétyl-D, L-Phénylalanine, de formule brute ($C_{11}H_{13}NO_3$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 3,086 min et une masse moléculaire 206,1 g/mol (Figure 50);
- Acide *p*-hydroxybenzoïque, de formule brute ($C_7H_6O_3$); avec un pic apparaissant au temps de rétention 1,369 min et une masse moléculaire de 137,20 g/mol (Figure 51);
- Acide vanilique de formule brute ($C_8H_8O_4$), avec un pic apparaissant au de rétention 3,252 min et une masse moléculaire de 167,22 g/mol (Figure 52).

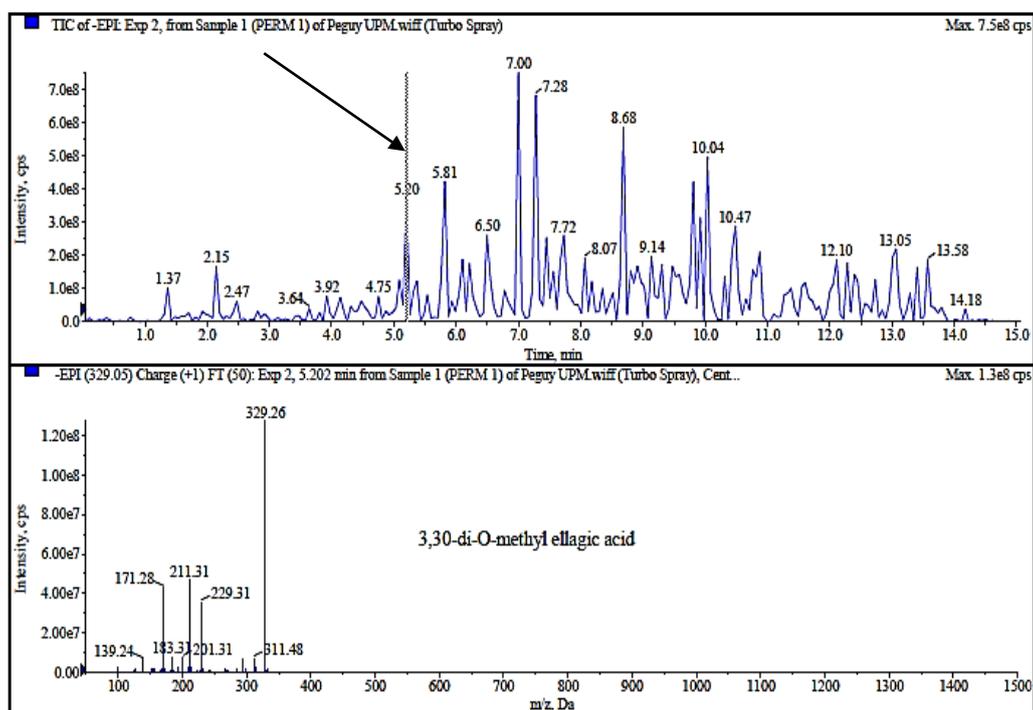


Figure 47: Détection de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

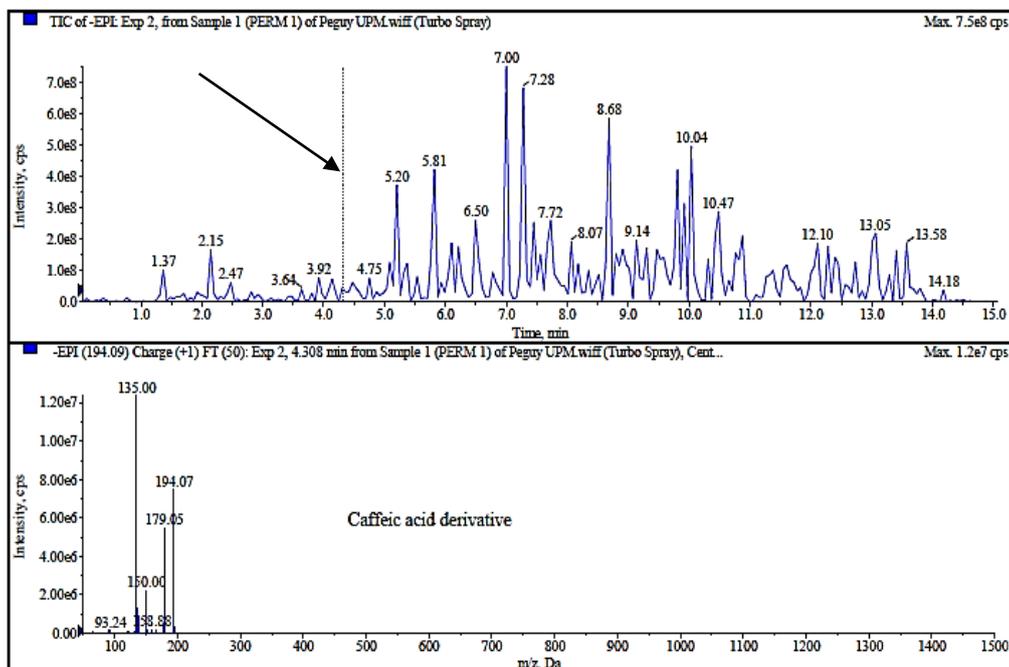


Figure 48: Détection du dérivé de l'acide cafeïque dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

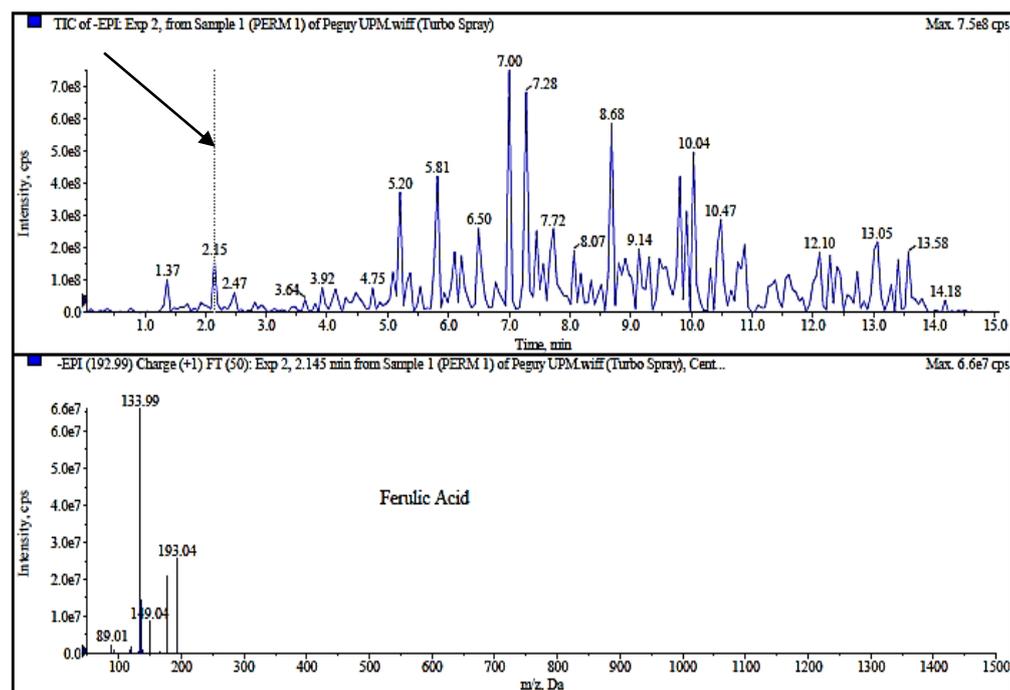


Figure 49: Détection du dérivé de l'acide férulique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

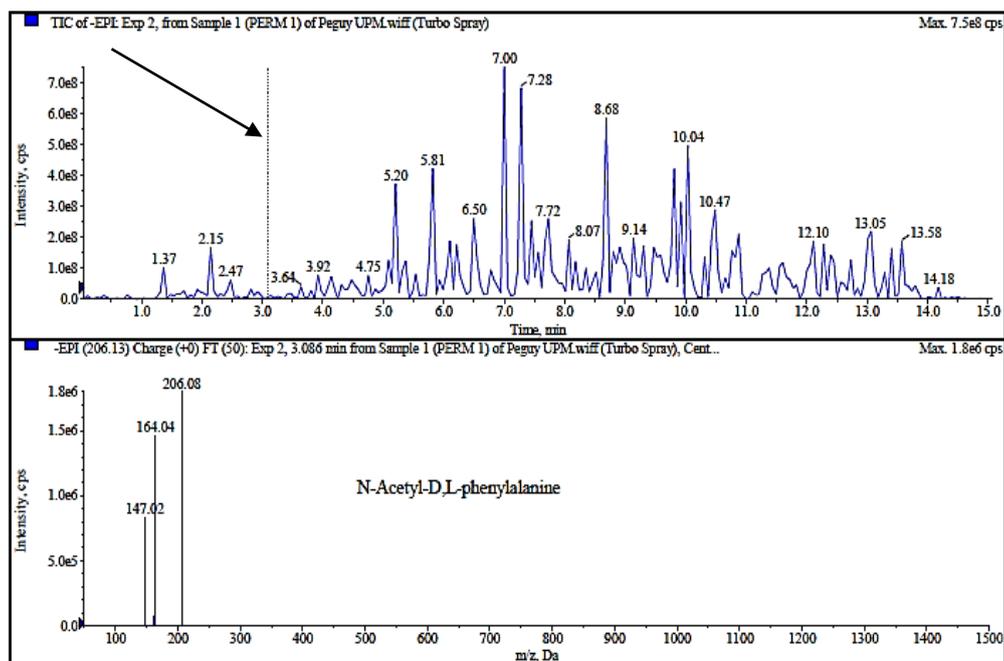


Figure 50: Détection de N-Acetyl-D, L-phénylalanine dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

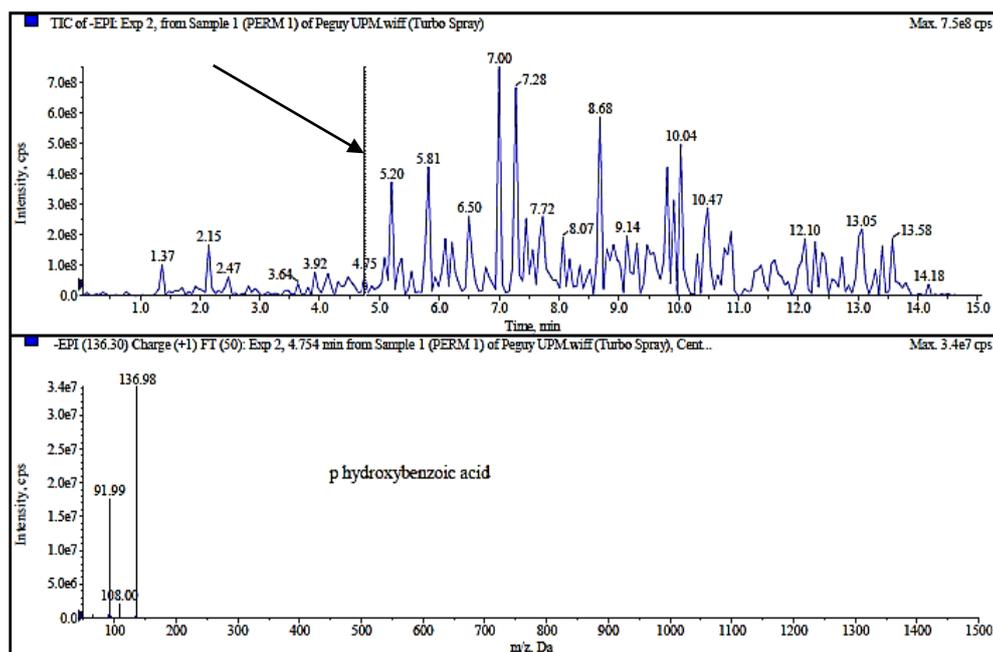


Figure 51: Détection de l'isomère de l'acide *p*. hydroxybenzoïque dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

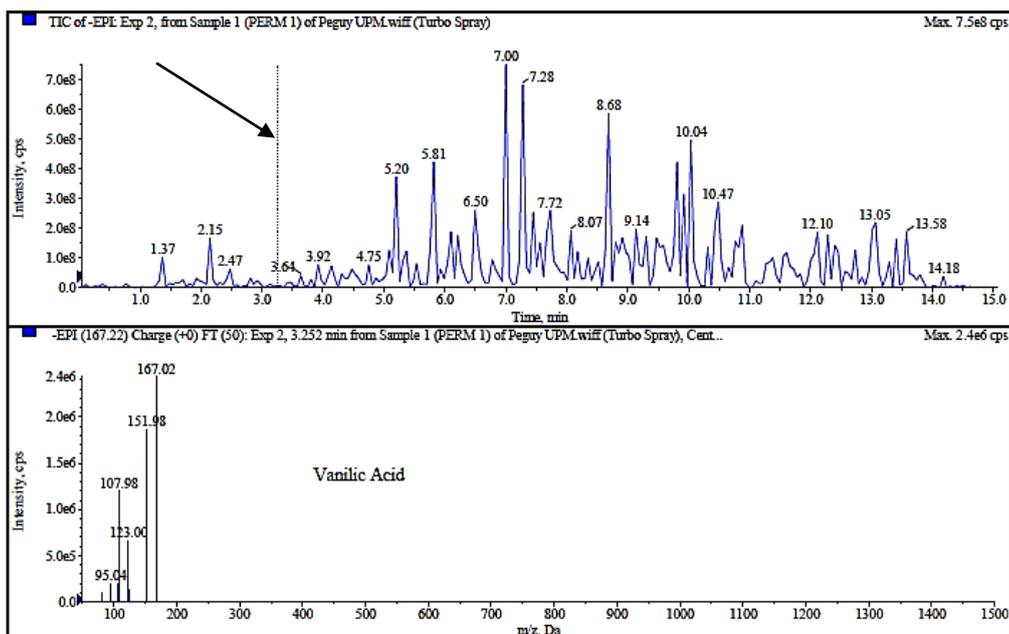


Figure 52: Détection de l'acide Vanilique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

Les composés détectés par LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 sont représentés dans le Tableau XXVIII et les structures chimiques des composés identifiés sont représentés sur la Figure 53.

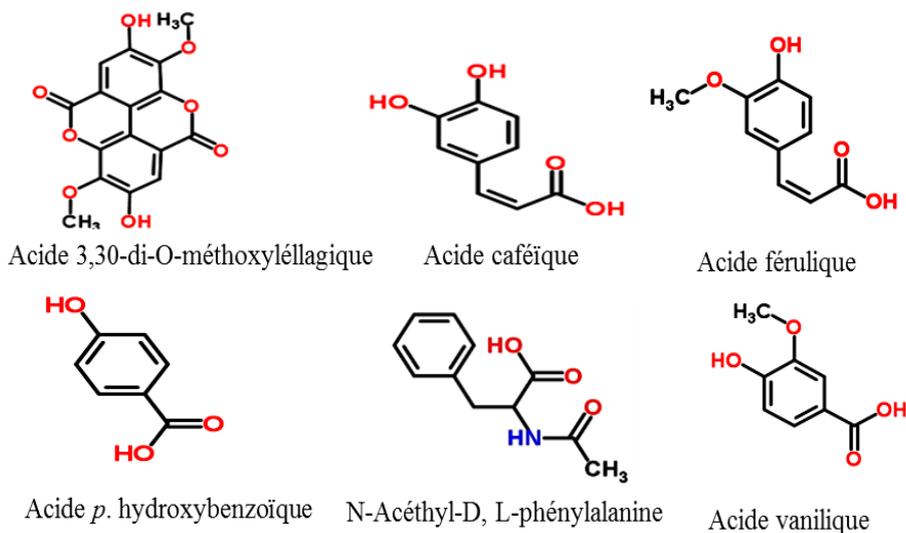


Figure 53: Structures des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1: l'acide 3,3'-d-O-méthoxyléllagique, N-Acéthyl-D, L-phénylalanine, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide *p.* hydroxybenzoïque et l'acide vanilique.

Tableau XXVIII: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* sp. PERM1.

No de pic	Temps de retention (min)	Fragments	Formule brute	Identification
1	1,369	93,00; 108,00 et 136,98	C ₇ H ₆ O ₃	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
2	1,702	97,02; 117,00 et 159,05	-	Non identifié
3	1,979	72,96; 118,94; 134,98, 150,96; 163,01 et 181,07	-	Non identifié
4	2,145	89,01; 133,99; 149,04 et 193,04	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Acide féruilique
5	2,47	58,99; 113,04 et 131,04	-	Non identifié
6	2,92	79,92; 96,99 et 125,04	-	Non identifié
7	3,086	147,02; 164,04 et 206,08	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	N-Acétyl-D, L-phénylalanine
8	3,252	95,04; 123,00; 107,98; 151,98 et 167,02	C ₈ H ₈ O ₄	Acide valinilique
9	3,640	83,04; 111,02; 129,00 et 173,06	-	Non identifié
10	3,918	93,00; 120,96; 135,99; 151,05 et 195,05	-	Non identifié
11	4,140	139,11; 157,12; 183,12 et 201,14	-	Non identifié
12	4,308	93,24; 135,00; 150,00; 158,88; 179,05 et 194,07	C ₉ H ₇ O ₄	Dérivé de l'acide cafeïque
13	4,75	93,00 et 119,00	-	Non identifié
14	4,754	91,99; 108,00 et 136,98	C ₇ H ₆ O ₃	Isomère de l'acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
15	5,20	139,24; 171,28; 183,31; 201,31; 211,31; 229,31; 311,49 et 329,26	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Acide 3,30-d-O-méthoxylélagique
16	5,31	211,40; 229,49; 293,54; 311,53; 329,54; 473,62 et 491,23	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Dérivé de l'acide 3,30-d-O-méthoxylélagique
17	5,370	171,12; 212,19; 230,16; 313,23 et 330,28	-	Non identifié
18	5,539	211,08; 294,30; 330,27; 474,31; 492,31 et 534,33	-	Non identifié
19	6,101	88,97; 211,14; 293,29; 329,29; 357,22; 383,27 et 401,30	-	Non identifié
20	6,213	58,66; 171,12; 229,10; 293,26; 311,27; 329,25; 352,18 et 370,26	-	Non identifié
21	6,494	171,12; 201,12; 212,20; 276,28; 294,30; 312,29; 330,26 et 372,28	-	Non identifié
22	7,731	79,89; 96,91 et 265,55	-	Non identifié
23	8,068	171,14; 196,19; 278,28 et 296,29	-	Non identifié
24	8,687	183,42; 171,30; 195,49; 233,62; 251,66; 277,58 et 295,72	-	Non identifié
25	9,136	183,29; 211,28; 239,30 et 257, 28	-	Non identifié
26	9,810	333,43; 375,42; 401,38 et 419,38	-	Non identifié
27	10,035	197,60; 225,39; 253,59 et 271,70	-	Non identifié
28	10,484	693,01; 1017,26 et 1034,61	-	Non identifié
29	12,113	333,43; 375,42; 401,38 et 419,38	-	Non identifié
30	13,573	234,29; 255,31; 277,25; 295,28 et 534,49	-	Non identifié
31	13,068	279,29; 295,29; 471,55; 514,36 et 558,42	-	Non identifié

III.3.5.3. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2

L'analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait à l'acétate d'éthyle de PERM2 révèle la présence de vingt-cinq composés non volatils. Cependant, un seul composé est identifié à partir de la base de données utilisée comme:

- Acide 3,30-di-O- méthoxyléllagique, de formule brute ($C_{14}H_6O_8$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 8,274 et une masse moléculaire de 429,2 (Figure 54).

Tous les composés détectés par analyse LC-MS/MS en tandem sont représentés dans le Tableau XXIX et la structure chimique de la molécule identifiée est représentée sur la Figure 55

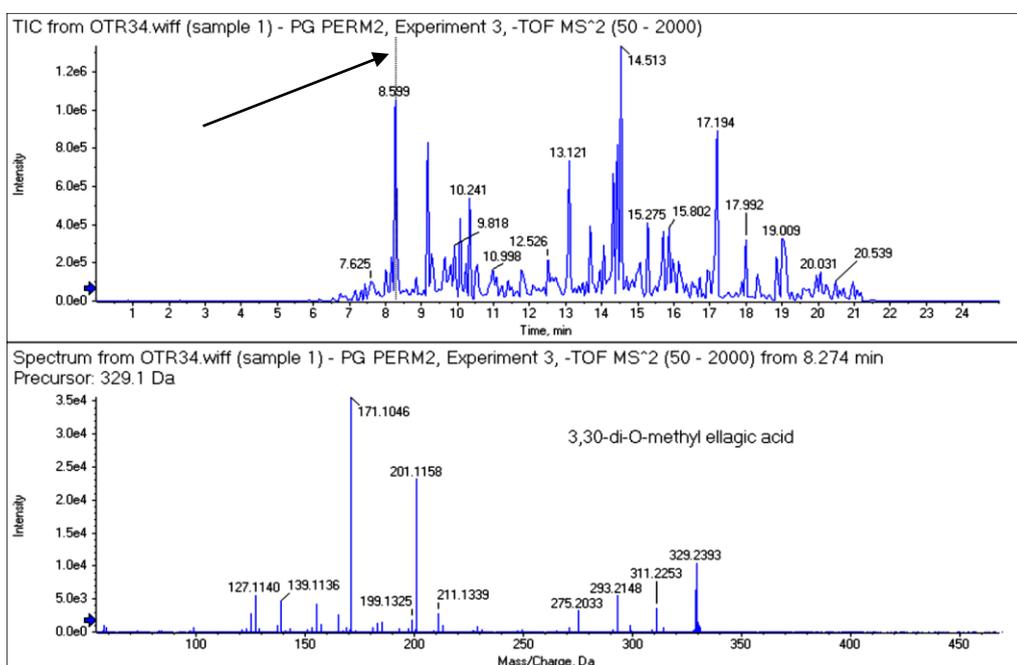


Figure 54: Détection de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

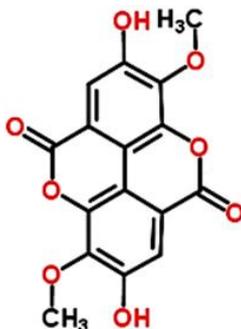


Figure 55: Structure de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique identifié dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2 par analyse LC-MS/MS en tandem.

Tableau XXIX: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* sp. PERM2

N° de pic	Temps de rétention (min)	Fragments	Formules brutes	Identification
1	7,168	97,029; 99,009; 110,038; 125,097; 163,111; 191,122; 199,133; 207,024; 225,113 et 243, 124	-	Non identifié
2	7,696	79,959; 191,073; 263,095 et 399,199		Non identifié
3	8,274	127,114; 139, 114; 171,105; 199,132; 201,116; 211, 134; 275,203; 293, 215; 311, 225 et 329,239	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Acide 3,30-di-O- méthoxyléllagique
4	9,171	58,008; 99,093; 127,076; 129,093; 171,102; 189,141; 195,139; 201,14; 279,119; 295,231 et 313,243	-	Non identifié
5	9,648	59,017; 129,092; 171,102; 183,139; 195,139; 277,218; 295,231; 309,207; 313,240 et 356,250	-	Non identifié
6	9,913	171,103; 195,139; 211,170; 277,220; 295,232 et 341,271	-	Non identifié
7	10,072	123,118; 171,105; 195,140; 223,228; 259,207; 277,222 et 58,9295,232	-	Non identifié
8	10,337	152,937; 171,007; 402,245; 476,297 et 477,216		Non identifié
9	10,974	399,220; 413,233; 416,221; 431,247; 446,271 et 461,296		Non identifié
10	11,821	130,89; 349,329 et 392,322	-	Non identifié
11	12,509	171,101; 277,216; 279,232; 291,196; 293,212; 295,227; 309,207; 311,2323; 313,287, 327,217; 589,453	-	Non identifié
12	13,096	171,102; 279, 236; 293,214; 311,227; 313,239; 329,235 et 591,473	-	Non identifié
13	13,682	279,232; 281,250; 293,212; 311,225; 313,235; 329,233 et 593, 485	-	Non identifié
14	14,319	211,134; 255,296; 296,213; 311,226; 329,234 et 567,472	-	Non identifié
15	14,425	277,219; 279,236; 295,231; 313,239 et 575,467	-	Non identifié
16	14,532	333,213; 574,434; 575,450; 575,484; 575, 656;575 et 576,014	-	Non identifié
17	15,062	156,137; 256,237; 266,296; 278,220; 296,232; 313,299; 314,241et 552,477	-	Non identifié
18	15,275	361,349; 365,340; 403,363; 429,340 et 447,354	-	Non identifié
19	15,328	241,216; 275,200; 276, 204, 277, 216, 279,232; 296,230; 360,220; 404,361, 5543,444; 556,514, 556, 449, 584,444; 602,391 et 602,477	-	Non identifié
20	15,915	346,287; 581, 466; 607,513 et 625, 524	-	Non identifié
21	17,194	374, 321; 635, 550 et 563, 565	-	Non identifié
22	17,992	402,351, 663, 579 et 681, 592	-	Non identifié
23	19,002	663,579 et 681, 596	-	Non identifié
24	20,007	635, 543; 708, 606; 710, 578; 754, 510 et 607	-	Non identifié
25	20,915	562, 522; 580,533; 742, 592 et 788, 639	-	Non identifié

III.3.5.4. Analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4

L'analyse LC-MS/MS en tandem de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche *Streptomyces* sp. PERM4 révèle la présence de vingt-six (26) composés non volatils. Cependant, seuls quatre (04) composés sont identifiés à partir de la base de données utilisée comme:

- Un isomère de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, de formule ($C_{14}H_6O_8$) avec un pic apparaissant au temps de rétention 5,262 possédant une masse moléculaire de 330,26 g/mol (Figure 56);
- Acide hydroxycinamique ou acide coumarique de formule brute ($C_9H_8O_3$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 3,367 min et une masse moléculaire de 164,95 g/mol (Figure 57);
- Acide 7-oxooctadécanoïque, de formule brute ($C_{18}H_{34}O_3$), avec un pic apparaissant au temps de rétention 7,618 min et une masse moléculaire de 297,05 g/mol (Figure 58),
- Acide vanilique, de formule brute ($C_8H_8O_4$), avec un pic de rétention 2,481 et une masse moléculaire de 167,05 g/mol (Figure 59).

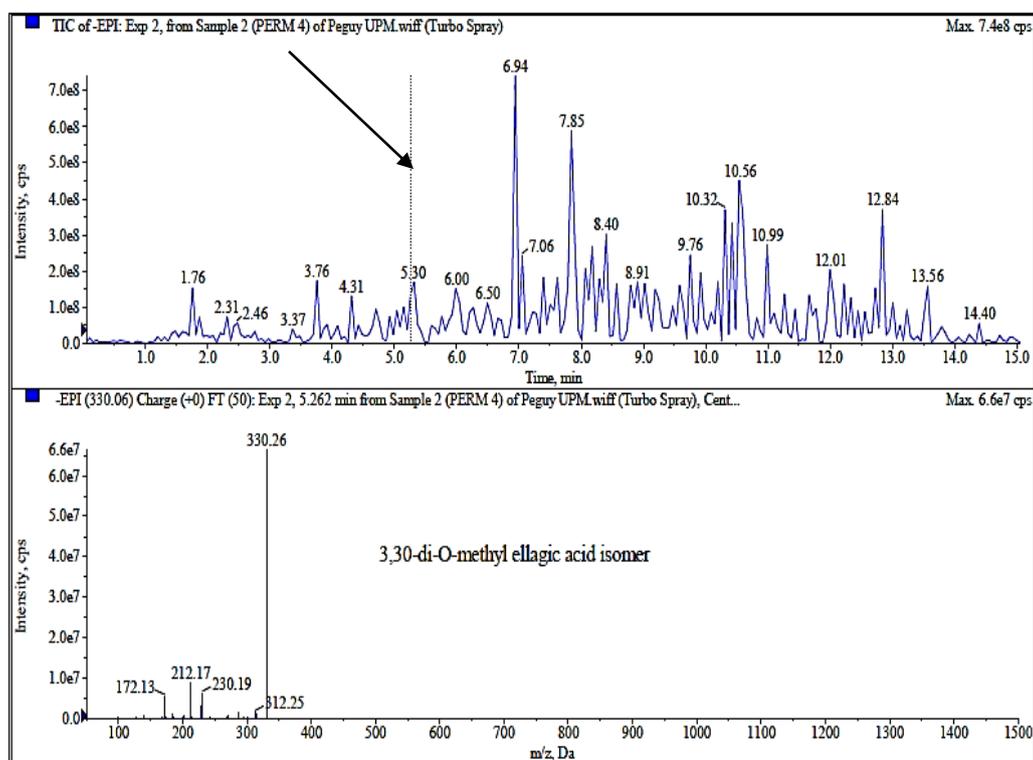


Figure 56: Détection de l'isomère de l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

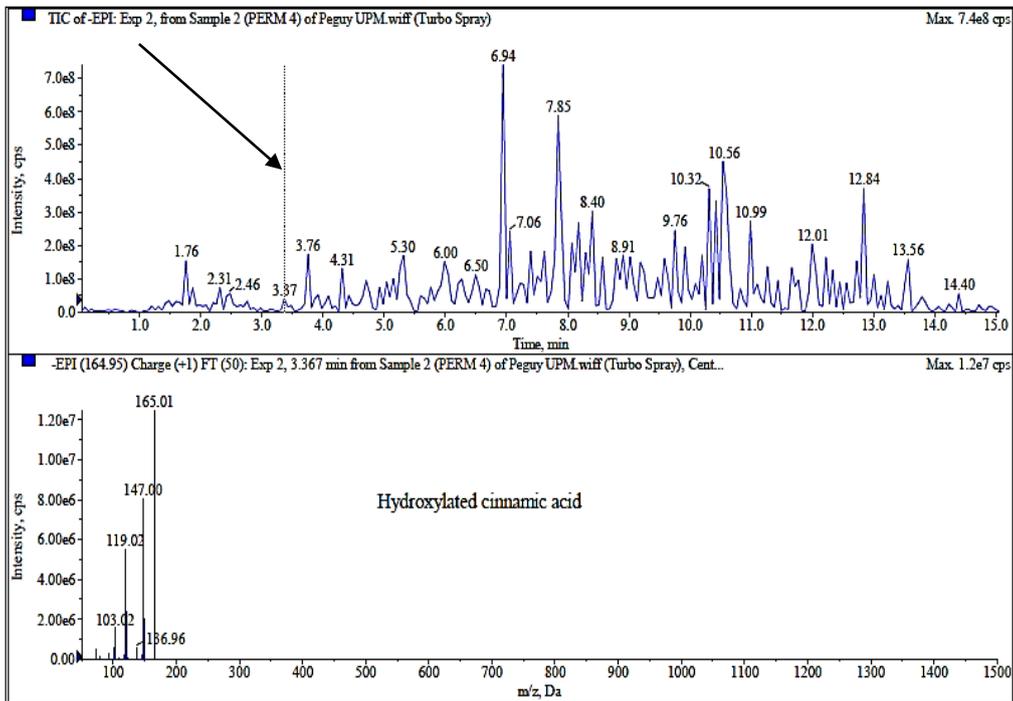


Figure 57: Détection de l'isomère de l'acide hydroxycinnamique ou acide coumarique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

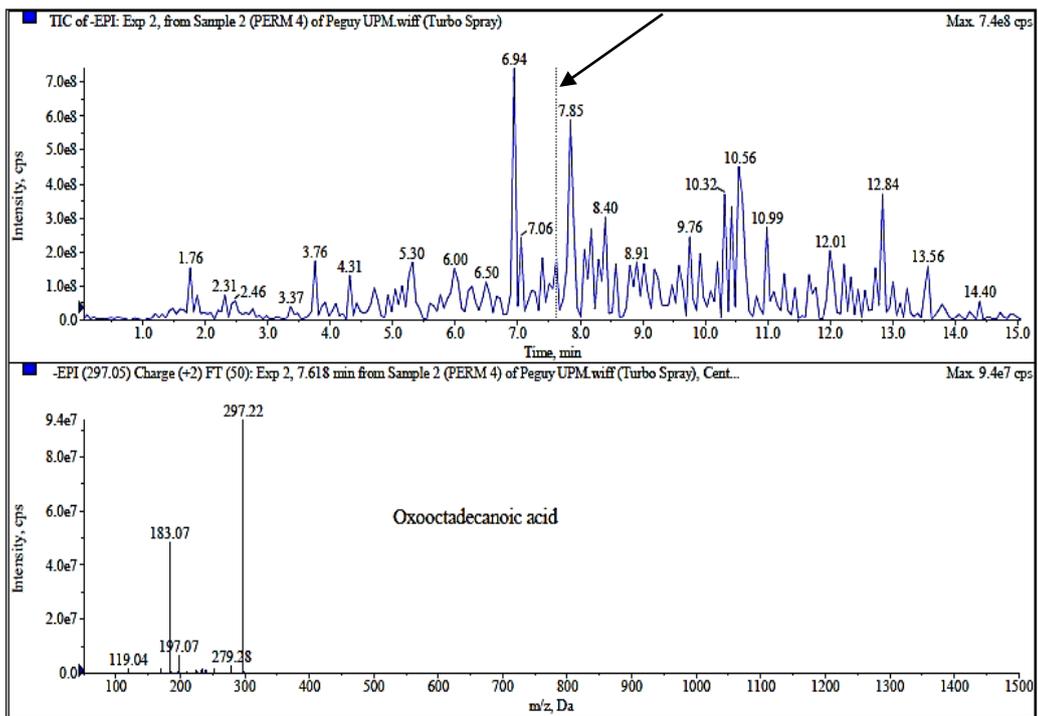


Figure 58: Détection de l'acide 7-oxooctadécanoïque dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

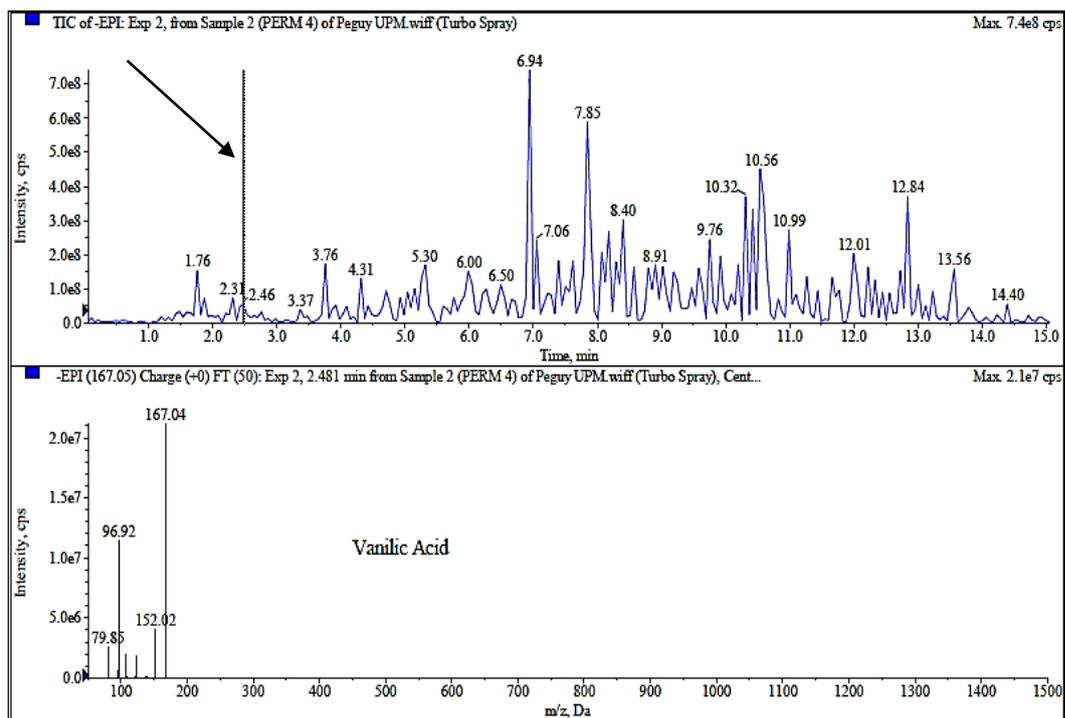


Figure 59: Détection de l'acide vanilique dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 en utilisant l'analyse LC-MS/MS en tandem.

Tous les composés diffusibles détectés par l'analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4 sont représentés dans le Tableau XXX et les structures chimiques des composés identifiés sont représentées sur la Figure 60.

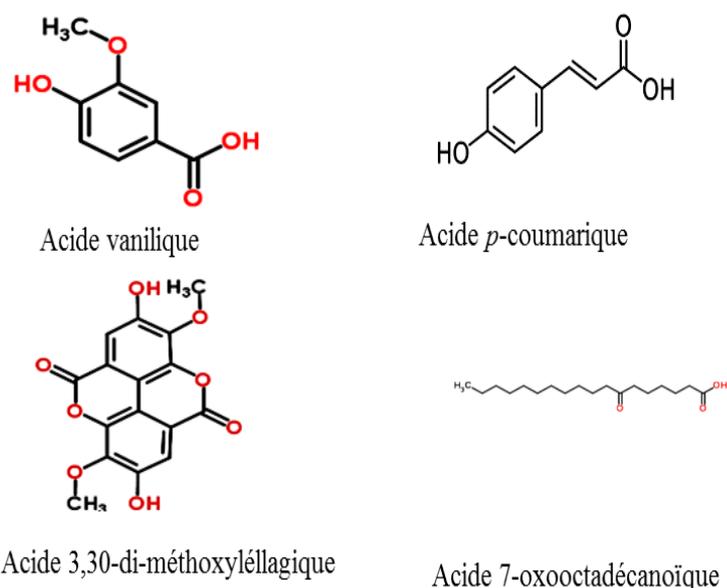


Figure 60: Structure des métabolites secondaires non volatils identifiés après analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4: le dérivé de l'acide 3,3'-d-O-méthoxyléllagique, l'acide vanilique et l'acide 7-oxooctadécanoïque.

Tableau XXX: Composés non volatils détectés par analyse LC-MS/MS en tandem dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* sp. PERM4.

N° de pic	Temps de retention (min)	Fragments	Formule brute	Identification
1	1,758	93,00; 120,97; 136,01; 151,03; 177,08 et 195,08	-	Non identifié
2	2,314	72,14; 82,99; 145,04; 185,07 et 203,09	-	Non identifié
3	2,481	79,85; 96,92; 152,02 et 167,04	C ₈ H ₈ O ₄	Acide Vanilique
4	2,758	167,04; 211,16; 237,01 et 255,24	-	Non identifié
5	3,367	103,02; 119,02; 136,96; 147,00 et 165,01	C ₉ H ₈ O ₃	Acide hydroxycinamique ou coumarique
6	4,313	155,10; 193,20; 229,14; 255,20 et 273,20	-	Non identifié
7	5, 262	172,13; 212,17; 230,19; 312,25 et 330,26	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Isomère de l'acide 3,30-d-O-méthoxyléllagique
8	5,317	139,15; 193,19; 237,17; 255,19 et 273,22	-	Non identifié
9	5,988	89,01; 145,03; 185,04; 329,29; 383,17 et 401,22	-	Non identifié
11	6,494	98,88; 183,16; 313,29; 351,27 et 395, 22	-	Non identifié
12	7,618	119,04; 183,07; 197,07; 279, 28 et 297,22	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	Acide 7-Oxoocadécanoïque
13	7,843	58,81; 171,33; 195,42; 211,42; 233,43; 277,55; 295,38; 313,37 et 355,30	-	Non identifié
14	8,181	87,96; 226,24; 256,24; 293,34; 357,31; 453,38; 495,42 et 513,36	-	Non identifié
15	8,405	171,22; 195,28; 183,25; 209,30; 251,46; 277,35 et 295, 31	-	Non identifié
16	8,910	157,13; 172,11 et 270,28	-	Non identifié
17	9,191	86,95; 163,08; 169,14; 197,16; 205,08; 291,21; 479,28; 507,31 et 677,41	-	Non identifié
18	9,753	665,79; 990,05 et 1007,67	-	Non identifié
19	10,539	323,22; 452,33; 693,84; 795,43; 999,53; 1017,81 et 1034,03	-	Non identifié
20	10,989	109,01; 304,36; 358,44; 396,45; 414,41; 432,35 et 458,35	-	Non identifié
21	11,663	183,05; 171,12; 211,11; 275,26; 293,26 et 311,26	-	Non identifié
22	12,00	333,50; 375,45; 401,43 et 419,36	-	Non identifié
23	12,225	171,12; 281,29; 293,29; 311,27; 329,27; 352,33 et 592,41	-	Non identifié
24	12,843	334,78; 358,99; 376,80 et 404,77	-	Non identifié
25	13,572	352,44; 380,44 et 398,40	-	Non identifié

Discussion partielle 3

La troisième partie de cette étude a pour but de caractériser partiellement les métabolites bioactifs produits par les potentiels *Streptomyces* antagonistes. Plusieurs études ont montré l'influence des solvants et des techniques d'extraction sur les métabolites secondaires bioactifs obtenus à partir des extraits bruts des microorganismes. L'acétate d'éthyle a été utilisé et standardisé comme meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires bioactifs des actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* spp. (Balachandar *et al.*, 2016; El-Naggar *et al.*, 2017). Parmi les méthodes d'identification et d'élucidation structurale des métabolites bioactifs, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en tandem sont prisées de nos jours (Awla *et al.*, 2016 ; Xing *et al.*, 2018). Dans la présente étude, les techniques d'analyse GC-MS et LC-MS/MS nous ont permis d'avoir le profil des métabolites volatils et non volatils des différents extraits bruts, d'identifier les métabolites connus et de détecter les potentiels métabolites non connus. Ainsi, l'analyse GC-MS a révélé la présence de 157, 150, 112 et 142 composés volatils dans les extraits bruts de PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 respectivement. Tandis l'analyse LC-MS/MS en tandem a permis d'identifier les métabolites secondaires appartenant au groupe des antibiotiques, des acides phénoliques, des acides aminés et de détecter plusieurs présumés nouveaux métabolites dans les extraits bruts obtenus par le procédé de fermentation solide. Ce nombre considérable de métabolites dans les différents extraits bruts pourrait s'expliquer par le fait que les streptomycètes dans le sol et dans les tissus de plantes se développent très bien sur les particules solides occupées aussi par d'autres microorganismes, avec lesquels ils se complètent pour les ressources nutritionnelles. Ainsi, les streptomycètes ont tendance à produire une grande variété de métabolites secondaires bioactifs au cours du procédé de fermentation solide où les conditions sont plus proches de celles de leur environnement naturel comparé à celles du procédé de fermentation liquide qui sont artificielles. Les études récentes ont montré que le procédé de fermentation solide permet la production d'une grande variété de métabolites secondaires bioactifs et un rendement élevé en extrait brut comparé au procédé de fermentation liquide (Martins *et al.*, 2011; Kribet *et al.*, 2018).

Dans cette étude, l'acide (9Z,12Z)-Octadéc-9,12-diénoïque (C₁₈H₃₂O₂) communément appelé acide linoléique et qui a été identifié dans tous les extraits bruts appartient au groupe des acides gras insaturés. Les études récentes ont montré la présence de l'acide (9Z,12Z)-Octadéca-9,12-diénoïque dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle des souches *Streptomyces* AS1 (Balachandar *et al.*, 2016) et *Streptomyces anulatus* NEAE-94 (El-Naggar *et al.*, 2017) en utilisant l'analyse GC-MS. Par ailleurs, les propriétés antibactériennes, antifongiques,

antioxydantes, antimalariques, hypocholesterolémiques, antidrogéniques, antieczémiques, anticancéreuses de l'acide linoléique ont été démontrées (Kumar *et al.*, 2010; Pohl *et al.*, 2011; Jaina *et al.*, 2012).

L'acide 2,6-dixadécanoate-1-(+)-Ascorbique (C₃₈H₆₈O₈) qui a été identifié dans tous les extraits bruts est un dérivé de l'acide Ascorbique ou vitamine C et un antioxydant (Meena *et al.*, 2008). Raningsih *et al.* (2015), ont montré l'activité antibactérienne de l'acide 2,6-dixadécanoate-1-(+)-Ascorbique produit par les actinobactéries contre *Staphylococcus aureus*. D'autres part, l'acide (9Z)-octadéc-9-énoïque (C₁₈H₃₄O₂) communément appelé acide oléique appartenant à la classe des acides gras insaturés a été identifié dans les extraits bruts des souches *Streptomyces* sp. PERM1 et PERM4. Balachandar *et al.* (2016), ont également montré la présence de l'acide (9Z)-octadéc-9-énoïque dans les extraits bruts à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces* AS1 et AS3 après analyses GC-MS. Plusieurs études ont montré l'activité antifongique de l'acide oléique vis-à-vis de *Crinipellis perniciosa*, *Pythium ultimum*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum* ainsi que sa capacité à promouvoir la croissance du comcombre et de la tomate (Walters *et al.*, 2004; Lui *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'acide oléique a été montrée vis-à-vis de *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.coli* et *B.typhi* (Jubie et Dhanabal, 2012).

Dans cette étude, le composé butane-2,3-diol (C₄H₁₀O₂) qui a été identifié dans les extraits bruts de *Streptomyces* sp. PFK4 et PERM1 est reconnu pour son habilité à stimuler la croissance et induire la résistance systémique chez les plantes (Ryu *et al.*, 2005). Schulz et Dickschat (2007) ont également identifié le butane-2,3-diol dans l'extrait brut des *Streptomyces*. Yi *et al.* (2016) ont montré l'activité antifongique du butane-2,3-diol vis-à-vis de plusieurs champignons pathogènes telluriques et son impact sur la stimulation de la croissance et l'induction des gènes de défense au niveau des racines du poivre. Par ailleurs, le composé tétraméthylpyrazine (C₈H₁₂N₂) qui a été identifié dans les extraits bruts de *Streptomyces* sp. PFK4 et PERM2 appartient au groupe des pyrazynes. Les pyrazynes sont reconnus comme étant un groupe de potentiels composés naturels doués d'activités antimicrobiennes (Kumar et Lown, 2003). Les activités antibactériennes des pyrazynes isolés à partir du champignon *Mortierella alpina* ont été montré contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* (Melo *et al.*, 2014).

Sur la base de l'analyse LC-MS/MS en tandem, les métabolites bioactifs non volatils appartenant au groupe des antibiotiques ont été identifiés dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4. Il s'agissait de l'antibiotique amicoumacine A appartenant à la famille des isocoumarines qui sont de potentiels inhibiteurs de la synthèse des protéines (Polikanov *et al.*, 2014). Les travaux d'Awla *et al.* (2016) ont également montré la production de l'amicoumacine par *Streptomyces* sp. UPMRS4 ainsi que son activité antifongique contre *Pyricularia oryzae*. Par

ailleurs, l'activité antibactérienne de l'amicoumacine a été montrée contre *Staphylococcus aureus* (Lama *et al.*, 2012) et *Bacillus cereus* (Motta *et al.*, 2004). En outre, la fongichromine encore appelée pentamycine qui est un antibiotique du groupe des macrolides. Les études récentes ont montré la production de la fongichromine par *Streptomyces sp. padanus* JUA4234 (Xiong *et al.*, 2012) et *Streptomyces sp. UPMRS4* (Awla *et al.*, 2016). Enfin, l'antibiotique rapamicine A. Les études récentes ont identifié la rapamycine A dans l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de *Streptomyces sp. UPMRS4* isolé de la rhizosphère du riz en Malaisie et son activité antifongique contre *P. oryzae*. (Awla *et al.*, 2016). Bien que le mécanisme d'action de la rapamycine soit connu pour plusieurs champignons ascomycètes et basidiomycètes (Bastidas *et al.*, 2012), il n'est pas encore clair concernant la façon par laquelle ces agents antifongiques agissent et leurs mécanismes d'action dans les lignées fongiques de base tels que les champignons pathogènes ayant une importance clinique et environnementale.

D'autre part, les acides phénoliques ont été identifiés dans les différents extraits bruts. Parmi eux, l'acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique qui a été identifié dans tous les extraits bruts est reconnu comme possédant les activités antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antiinflammatoires, antidiabétiques, antifibrotiques et cytotoxiques (Chan *et al.*, 2014) et les propriétés neuroprotectrices (Bansal et Kumar, 2018). L'acide *p*-hydroxybenzoïque qui a été identifié dans l'extrait brut de *Streptomyces sp. PERM1* est un acide phénolique appartenant à la classe des dérivés d'acides benzoïques (Shahriar et Robin, 2010). Plusieurs études ont montré les activités antifongiques, antibactériennes, antimutagéniques, oestrogéniques et les propriétés stimulatrices de la croissance de la plante de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (Kamaya *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2009). L'acide vanilique (acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque) qui a été identifié dans les extraits bruts de *Streptomyces sp. PERM1* et *PERM4* est un important acide phénolique appartenant à la classe des dérivés d'acide benzoïque et reconnu comme possédant des activités antibactériennes (Ghosh *et al.*, 2007). Ce composé interviendrait également dans la suppression des fibroses hépatiques dans les blessures chroniques du foie (Itoh *et al.*, 2010). Des études similaires ont montré la production de l'acide vanilique par la souche *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637 (Ghosh *et al.*, 2007). L'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) qui a été identifié dans l'extrait brut de *Streptomyces sp. PERM1* est appartient au sous groupe des acides hydroxycinnamiques. Son activité antifongique a été montrée vis-à-vis des champignons phytopathogènes (Ou et Kwork, 2004; Guzman *et al.*, 2014). Les études récentes ont montré les activités antibactériennes de l'acide férulique contre *Staphylococcus aureus* 209, *Streptococcus pyogenes* 10535, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC et *E. coli* CECT 434 (Georgiev *et al.*, 2012 ; Borges *et al.*, 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont montré les activités antioxydantes, anti-allergiques, antiinflammatoires, antivirales, antimicrobiennes, les propriétés stimulatrices de la croissance des plantes de l'acide férulique et

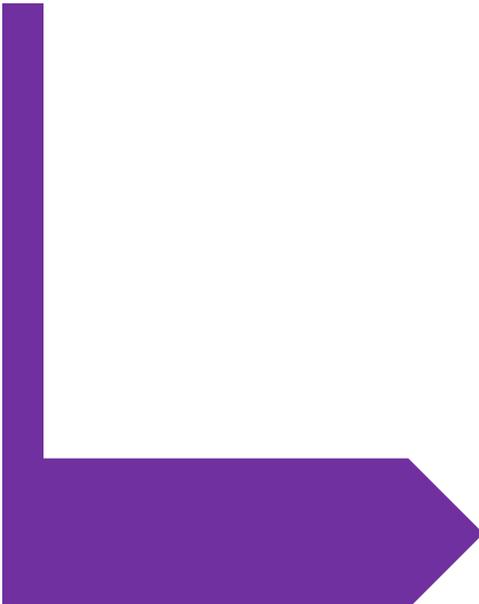
ses nombreuses applications industrielles (Kumar et Pruthi, 2014). Dans la présente étude, l'acide caféique identifié dans l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1 a été démontré comme possédant les activités antifongiques contre plusieurs champignons phytopathogènes (Zabka et Pavela, 2013). Par ailleurs, les activités antibactériennes de l'acide caféique ont été montrées vis-à-vis de *Candida albicans* (Georgiev *et al.*, 2012; De Vita *et al.*, 2014). L'acide hydroxycinnamique ou acide coumarique identifié dans l'extrait brut de PERM4, est un acide phénolique appartenant à la classe des dérivés d'acides cinnamiques (Shahriar et Robin, 2010), principalement produit pour lutter contre les stress, les blessures et les radiations ultraviolettes (Xue *et al.*, 2013b).

Les acides phénoliques présents dans les différents extraits bruts des *Streptomyces* pourraient également provenir du son de blé utilisé comme substrat lors du procédé de fermentation solide; car le son de blé est reconnu comme contenant des traces d'acides phénoliques (0,1-0,7 %). Ces composés phénoliques présents dans le son de blé sont majoritairement représentés par les acides *p*-coumariques (précurseurs des lignines), les acides féruliques et en moindre quantité par les acides vaniliques et acides para-hydroxybenzoïques (Zhou *et al.*, 2004).

Conclusion partielle 3

L'analyse GC-MS des extraits bruts à l'acétate d'éthyle des *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4, a révélé la présence d'un nombre significatif de métabolites secondaires volatils dotés d'activités antimicrobiennes dont les majoritaires sont: acide (9Z, 12Z) -Octadéc-9,12-diénoïque, acide (9Z)-octadéc-9-énoïque, acide 2,6-dixadécanoate-1(+)-Ascorbique, acide trifluoroacétique, tétraméthylphénazine et butanediol-2,3-diol.

Sur la base de l'analyse LC-MS/MS en tandem, les métabolites secondaires non volatils appartenant au groupe des antibiotiques (amicoumarine, fongichromine, rapamycine), des acides phénoliques (acide 3,30-di-O-méthoxyléllagique, acide *P*-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide férulique, acide hydroxycinnamique, acide 7-oxooctadécanoïque et acide vanilique) et des acides aminés (N-actétyl-D-phénylanine) et ayant les propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, antitumorales, stimulatrices de la croissance de la plante etc. sont identifiés dans les différents extraits bruts.



*CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES*



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

L'objectif de ce travail portait sur la contribution des actinobactéries isolées des andosols du Mont Cameroun dans le développement des outils de lutte biologique contre *P.myriotylum*, agent responsable de la pourriture des racines du macabo. Il ressort au terme de ce travail que:

Sept (07) isolats d'actinobactéries à savoir PERM1, PERM2, PERM4, PERM5, PFK4, PFBOT7 et PFEL2 ont montré de fortes activités antagonistes vis-à-vis de *P. myriotylum*, des autres champignons et bactéries phytopathogènes testés. Les caractères phénotypiques (macroscopiques, microscopiques, culturaux, physiologiques et biochimiques) combinés à l'analyse moléculaire des 7 isolats antagonistes ont révélé leur appartenance au genre *Streptomyces* spp. Cependant, PERM2 et PERM4 avec les pourcentages d'homologies de 98 % et 97 % respectivement avec les souches répertoriées dans la base de données Genbank seraient de nouvelles espèces.

Les souches de *Streptomyces* endophytes et rhizosphériques antagonistes ont montré l'habilité à produire les molécules impliquées dans le biocontrôle des maladies de plantes telles que les métabolites volatils inhibant significativement la croissance de *P. myriotylum* et les enzymes de lyse de la paroi des champignons et des bactéries à l'instar des chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases, lipases et pectinases. Ces souches antagonistes ont également été capables de produire les molécules promotrices de la croissance de la plante telles que l'Acide Indole Acétique (AIA), les sidérophores, l'acide cyanhydrique (HCN), de l'ACC désaminase, l'ammoniac (NH_3); elles sont également capables de solubiliser le phosphore et de fixer l'azote atmosphérique (N_2). Cependant, *Streptomyces* sp. PERM2 et PERM4 ont montré des effets significatifs sur l'élongation des racines principales, le poids frais racinaire et le nombre de racines primaires et secondaires de vitroplants de macabo.

Les différents extraits bruts à l'acétate d'éthyle des *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 ont présenté les activités antifongiques significatives vis-à-vis de *P. myriotylum*. L'analyse GC-MS a révélé la présence de 157, 150, 112 et 142 métabolites secondaires volatils dans les extraits bruts à l'acétate d'éthyle de PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 respectivement. Parmi ces composés, les majoritaires représentés par les hauts pics sont acide (9Z,12Z)-Octadéc-9,12-diénoïque, acide 2,6-dixadécanoate-1(+)-Ascorbique, acide oléique, butanediol-2,3-diol et tétraméthylphénazyne. L'analyse LC-MS/MS en tandem a permis d'identifier un nombre considérable de métabolites secondaires non volatils à l'instar des antibiotiques (amicoumarine, fonigichromine, rapamycine), des acides phénoliques (3,30-di-O-méthoxyléllagique, acide *p*-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide férulique, acide

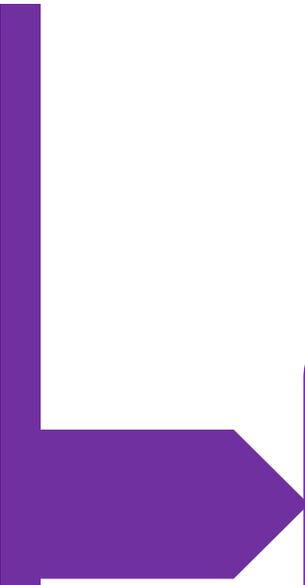
hydroxycinnamique, acide 7-oxooctadécanoïque, acide vanilique) et des acides aminés (N-actétyl-D-phénylanine). Ces différents métabolites volatils et non volatils identifiés dans les extraits bruts des *Streptomyces* sp. PFK4, PERM1, PERM2 et PERM4 sont reconnus comme possédant des activités antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, antitumorales, antimalariques, hypocholestérolémiques, antidrogéniques, antieczémiques, antipostatiques, stimulatrices de la croissance et de la résistance systémique de la plante.

Au regard de ces résultats, les souches antagonistes en particulier *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4 et PFK4 sont d'excellentes sources de composés bioactifs et constituent de potentiels candidats pour la formulation des biofongicides et biofertilisants utilisables comme alternatifs aux pesticides et fertilisants chimiques fortement utilisés en agriculture; permettant ainsi de promouvoir une agriculture durable, compétitive, économique et respectueuse de la santé et l'environnement. Ce travail contribue d'une part à la valorisation des ressources génétiques et de la biodiversité de la région du Sud-Ouest Cameroun (Mont Cameroun, 4100 m). D'autre part, ce travail permet de montrer l'importance des actinobactéries dans le contrôle des agents phytopathogènes en particulier *P. myriotylum* et dans la promotion de la croissance de la plante à l'instar de *X. sagittifolium* afin de mettre en évidence de nouveaux potentiels candidats de lutte biologique appartenant au genre *Streptomyces*.

2. Perspectives

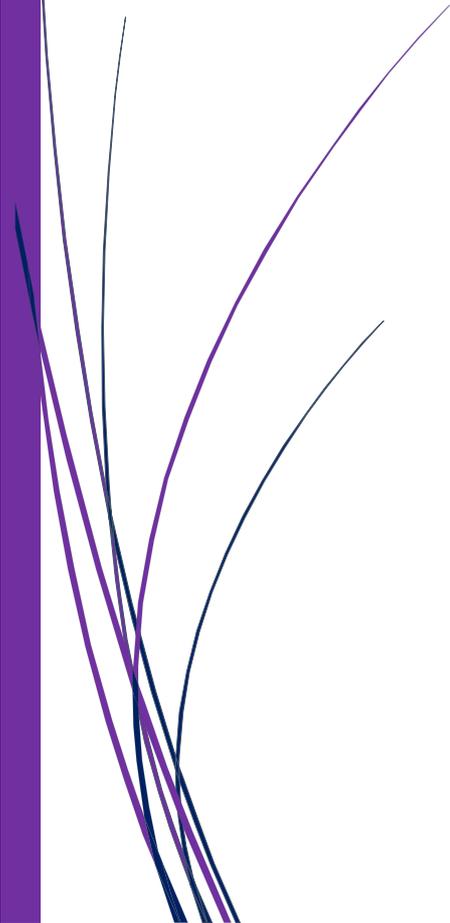
Dans l'optique d'apporter une plus value à ce travail, il sera important de (d'):

- Evaluer l'efficacité des potentiels agents de lutte biologique *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4 et PFK4 en serre puis en champ;
- Compléter l'identification des *Streptomyces* sp. PERM2 et PERM4 via l'analyse chimiotaxonomique de leur paroi cellulaire et l'hybridation ADN-ADN avec leurs homologues proches repertoriées dans la base de données Genbank;
- Purifier et élucider les structures des métabolites bioactifs produits par les *Streptomyces* sp. PERM2, PERM4 et PFK4 pour les utiliser dans la formulation de biofongicides et de biofertilisants.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaid-Ullah M., Hassan M.N., Jamil M., Brader U., Shah M.K.N., Sessitsch A., Hafeez F.Y. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: An Alternate way to improve yield and quality of Wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture*. 17: 51-60.
- Abd-Allah M.H., El-Sayed E.S.A., Rasmey A.H.M. (2013). Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atroviens*. *Journal of Biology and Earth Science*. 3: 82-93.
- Abdulrashid M and Agwunobi L.N. (2012). Tannia (*Xanthosoma sagittifolium*) Cocoyam as dietary substitute for maize in broiler chicken. *Greener Journal of Agricultural Sciences*. 2 (5):167-171.
- Adegboye M. F and Babalola O.O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*. 7(15):2255-2261.
- Adiobo A., Oumar O., Perneel M., Zok S., Holfte M. (2007). Variation of *Pythium*-induced cocoyam root rot severity in response to type of soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2915-2925.
- Afsharmanesh H., Ahmadzadeh M., Javan-Nikkhah M., Behboudi, K. (2010). Characterization of the antagonistic activity of a new indigenous strain of *pseudomonas fluorescens* isolated from onion rhizosphere. *Journal of Plant Pathology*.187-194.
- Agueguia A., Fontem D.A., Bikomo R., Mboua J.C., Mouen M., Ndana X., Tchuango M., Zok S. (2000). Les plantes à racines et tubercules en Afrique: une contribution au développement des technologies de récoltes et après récoltes. *Congrès international de biochimie, Agadir*.17-21 p.
- Akbari P., A Ghalavand A.M., Modares S., AghaAlikhani M., Shoghi Kalkhoran S. (2011). Comparison of different nutritional levels and the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the grain yield and quality of sunflower. *Australian Journal of Crop Sciences*. 5 (12): 1570-1576.
- Alabi D.A., Onibudo M.Z., Amiza N.A. (2005). Chemicals and nutritional composition of four botanicals with fungitoxic proprieties. *World Journal of Agricultural Sciences*. 1(1): 84-88.

Almaris N and Alonso. (2007). Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytic actinomycetes *Thermobifida fusca*. UMI. 134 p.

Anfal M.J., Kamaruzaman S., Radziah O., Zainal A.M.A. (2014). Isolation and Characterization of Actinomycetes with In-vitro Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* from Rhizosphere of chilli. *International Journal of Enhanced Research in Science Technology and Engineering*. 3 (12): 54-61.

Aneja K.R. (2003). Staining methods: Gram staining of bacteria. In New Age. *Experiments in Microbiology Plant Pathology and Biotechnology*. New Age International Limited Publishers 102-106 p.

Anon. (1991). Tropical Roots and Tubers Research Project. Fifth Annual Report. Institute of Agronomic Research, Cameroon.

Anwar S., Ali B and Sajid I. (2016). Screening of rhizospheric actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Frontiers in Microbiology*.7:1-11.

Aouar L., Lerat S., Ouffroukh A., Boulahrouf A., Beaulieu C. (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 34 (2): 165-176.

Arhin L., Mintah L.O., Impraim R. (2014). Genetic diversity and adaptation to different tillage and farming systems of cocoyam genotypes (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in the Eastern region of Ghana. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. 6 (12): 185-193.

Arora N.K and Verma M. (2017). Modified microplate method for rapid and estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotechnology*. 7: 381.

Arora N.K., Tewari S., Singh R. (2013). Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*; Springer: New Delhi, India, 411-449 p.

Arshad I.U.M., Chuadhry M.J.I., Noureen U., Jadoon W.A., Jadoon M.A. (2012). Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec Zoological Survey of Pakistan*. 21:10-13.

Arzanlou M., Mousavi S., Bakhshi M., Khakvar R., Bandehagh A. (2016). Inhibitory effects of antagonistic bacteria inhabiting the rhizosphere of the sugarbeet plants, on *Cercospora beticola* Sacc., the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease on sugarbeet. *Journal of Plant Protection Research*. 56 (1): 6-14.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Montiel H. (1992). *Bactériologie clinique*. 2^{ème} édition. Paris.ellipses. 511 p.

Awla H.K., Kadir J., Othman R., Rashid T. S., Wong M.Y. (2016). Bioactive Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Isolate UPMRS4 and Antifungal Activity against *Pyricularia oryzae*. *American Journal of Plant Sciences*. 7: 1077-1085.

Awla H.K., Kadir J., Otman R., Rashid T.S., Hamid S., Wong M.Y. (2017). Plant growth promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*. *Biological Control*. 112: 55-63.

Baaziz M., Qacif N., Bendiab K., Aouad A. (1995). Les Péroxydases des plantes. Aspect théorique et Applications pratiques. *Enzymologie et métabolisme*. 17-21.

Balachandar R., Kumar K.A., Karmegam N. (2016). GC- MS analysis of ethyl acetate extract of *Streptomyces* species isolated from vermicast. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 7 (4): 416-419.

Bansal N and Kumar M. (2018). Evaluation of Neuroprotective Properties of Ellagic Acid and Caffeic Acid Phenethyl ester. *Annals of Short Reports-Pharmacology*. 1: 1-5.

Barka E.A., Vasta P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant., Jacquard C., Klenk., Clément C., Ouhdouch., Gilles P., Wezel V. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 1- 43.

Bastidas R. J., Shertz C. A., Lee S. C., Heitman, J., Cardenas M. E. (2012). Rapamycin exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryotic Cell*. 11 (3): 270-281.

Barreto T.R., Da Silva A.C.M., Soares A.C.F., De Souza J.T. (2008). Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of theobroma cacao. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39 (3): 464-465.

- Basilio A., Gonzalez I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A., Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 814-23.
- Beaulieu C., Sidibé A., Jabloune R., Simao-Beaunoir A-M., Lerat S., Monga E., Bernards M.A. (2016). Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabiei*. *Microbes and Environments*. 31:427-434
- Berdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*. 65: 385-395.
- Bhat M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18 (5): 355-383.
- Bhattacharyya P.N and Jha D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 (4): 1327-1350.
- Bhosale H.J and Kadam T.A. (2015). Generic diversity and a comparative account on plant growth promoting characteristics of actinomycetes in roots and rhizosphere of *Saccharum officinarum*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(1): 230-244.
- Bharathi V., Sudhakar R., Parimala K., Reddy V.A. (2013). Evaluation of Bioagents and Biofertilizers for the Management of Seed and Seedling Diseases of *Sesamum indicum* (Sesame). *Journal of Plant Pathology*. 2 (3): 179-186.
- Blazevic D.J and Ederer G.M. (1975). Principles of biochemical tests in diagnostic Microbiology, *Wiley and company*, New York. 13-45 p.
- Blok W.J., Lamers J.G., Termorhuizen A.J., Bollen G.J. (2000). Control of soil borne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*. 90 (3): 253-259.
- Boakye A.A., Wireko-Manu F.D., Oduro I., Ellis W.O., Gudjónsdóttir M., Ioannis S., Chronaki I.S. (2018). Utilizing cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) for food and nutrition security: A review. *Food science and Nutrition*. 1-11.

Book A.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Takasuka T.E., Doering D.T., Adams A.S., Blodgett J.A.V., Clardy J., Raffa K.F., Fox B.G., Currie C.R. (2014). Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:4692-4701.

Borges A., Ferriera C., Saavedra M.J., Simoes M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drugs Resistance*. 19 (4): 256-265.

Boudjeko T., Adème-Onzighi C., Vicré M., Omokolo-Ndoumou., Driouich. (2006). Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta*. 223 (2): 271-282.

Boudjeko T., Omokolo N.A., Driouich A., Belangé A.P. (2005). Peroxydase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) root upon *Pythium myriotylum* inoculation. *Journal of Phytopathology*. 153 (7-8): 409-416.

Boudjeko T., Mouafo-Tchinda R.A., Zitouni M., Tchatchou-Nana V.A.J., Lerat S., Beaulieu C. (2017). *Streptomyces cameroonensis* sp. nov, a gelgaminycin producer that promotes *Theobroma cacao* growth. *Microbiology Environment*. 32 (1): 24-31.

Boussaber E., Kadmiri I.M., Hilali L., Hilali. (2012). Isolation of actinomycetes strains producing antifungal substances. *ScienceLib Editions Mersenne*. 4: 1-13.

Bown D. (2000). Aroids. Plants of the Arum Family. 2nd edition. Timber press. Portland, Oregon, USA. 392 p.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*. 72 (1-2): 248-254.

Cappucino J.G and Sherman N. (2008). Microbiology: a laboratory manual. New York, Pearson Benjamin: *Cummings Publishing Company*. 9: 569.

Cao L., Zhiqi Q., Xin D., Hongming T., Yongcheng L., Shining Z. (2004). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 501-504.

Chan E.W.C., Tan L.N., Wong S.K. (2014). Phytochemistry and Pharmacology of Lagerstroemia speciosa: A Natural Remedy for Diabetes. *International Journal of Herbal Medicine*. 2 (1): 81-87.

Chandra A., Saxena R., Dubey A., Saxena P. (2007). Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against Rhizoctonia solani. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29 (4): 361-367.

Charter K.F., Biro S., Lee K.J., Palmer T., Schrempf H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*. 34 (2): 171-198.

Cheraiti N and Kirane D.G. (2012). Isolement des souches d'actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques. *Review of Industrial Microbiology Sanitary and Environmental*. 6 (1): 18-34.

Chitra R.S., Sumitra V.C., Yash D.S. (2002). Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase and glutamate synthase activities of radish cotyledons. *Bulgarian Journal Plant Physiology*. 28 (3-4):46-56.

Chong K.P., Rossall F., Atong M. (2009). *In vitro* antimicrobial activity and fungitoxicity of syringic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid against Ganoderma Boninense. *Journal of Agriculture and Science*. 1 (2): 15-20.

Collins C.H., Patricia M.L., Grange J.M. (1995). In Collins and Lyne's Microbiological Methods, 7th Ed Butterworth-Heimann, UK 17 p.

Couillerot O., Vatsa P., Loqman S., Ouhdouch Y., Jane H., Renault J-H., Clément C., Barka E.A. (2013). Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulatus* S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities. *IOBC-WPRS Bulletin*. 86:271-276.

Cox P.W., Paul G.C., Thomas C.R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*. 144: 817-827.

Cross. (1989). The actinomycetes II. Growth and examination of actinomycetes some guidelines. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 4:2340-2343.

Damam M., Moinuddin M.K., Kausar R. (2016). Isolation and screening of plant growth promoting actinomycetes from rhizosphere of some forest medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*. 9 (5): 521-528.

Davelos A.L., Xiao K., Samac D.A., Martin A.P., Kinkel L.L. (2004). Spatial variation in *Streptomyces* genetic composition and diversity in a prairie soil. *Microbial Ecology*. 48: 601-612.

Demain A.L and Sanchez S. (2009). Microbial Drug Discovery: 80 Years of Progress. *The Journal of Antibiotics*. 6:5-16.

DeVita D., Friggeri L., D'Auria F.D., Pandolfi F., Piccoli F., Panella S., Palamara A.T., Simonetti G., Scipione L., Santo R. (2014). Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 24(6):1502-1505.

Dib H. (2010). Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de doctorat en Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociétés, Environnement » Spécialité: Sciences Agronomiques. 28 p.

Dinesh R., Anandaraja M., Kumarb A., Binia Y.K., Subilaa K.P., Aravind R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects. *Microbiological Research*. 173:34-43.

Dombou C.L., Salove M.K.H., Crawford D.L., Beaulieu C. (2001). Actinomycetes promising tools to control plant diseases and promote plant growth. *Phytoprotection*. 82: 85-102.

Doolotkeldieva T., Bobusheva S., Konurbaeva M. (2015). Effects of *Streptomyces* Biofertilizer to Soil Fertility and Rhizosphere's Functional Biodiversity of Agricultural Plants. *Advances in Microbiology*. 5:555-571.

Effmert U., Kalderas J., Warnke R., Piechulla B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*. 38: 665-703.

Ejikeme J.O., Presidor K., Oscar O., Charles A. (2016). Towards an Enhanced Breeding in Cocoyam: A Review of Past and Future Research Perspectives. *Journal of Botanical Sciences*. 5: 22-23.

- Ejoh S.I., Obatolu V.A., Olanipekun O.T., Farinde E.O. (2013). Extending the use of an underutilised tuber I: Physicochemical and pasting properties of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) flour and its suitability for making biscuits. *African Journal of Food Science*. 7(9): 264-273.
- Ekwe K.C., Nwosu K.I., Ekwe C.C., Nwachukwu I. (2009). Examining the underexploited values of cocoyam (*Colocasia* and *Xanthosoma* spp.) for enhanced household food security, nutrition and economy in Nigeria. In H Jaenicka, J. Ganry, I. Zeledon Hoeschle & R Kahara (Eds.), Proceedings of the international symposium on underutilized plants for food security, income and sustainable development. *Acta Horticulture*. 86: 71-78.
- Elad Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*. 19: 709-714.
- El-Mehalawy A.A., Hassanein N.M., Khater H.M., El-Din E.Z.A.K., Yousef Y.A. (2004). Influence of Maize Root Colonization by the Rhizosphere Actinomycetes and Yeast Fungi on Plant Growth and on the Biological Control of Late Wilt Disease. *International journal of agriculture and biology*. 6 (4): 599-605.
- El-Naggat N.E., El-Bindary A.A., Abdel-Mogib M., Nour N.S. (2017). *In vitro* activity, extraction, separation and structure elucidation of antibiotic produced by *Streptomyces anulatus* NEAE-94 active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*. 31(2): 418-430.
- El-Tarabily K.A. (2006). Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-Streptomycete capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Canadian Journal of Botany*. 84 (2): 211-222.
- El-Tarabily K and Alkhajeh. (2016). A field performance of endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Fusarium oxysporum* a pathogen of tomato. *American phytopathological Society*. 106: 55-55.
- El-Tarabily K.A and 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 (7): 1505-1520.

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.

Errakhi R, Lebrihi A., Mustaphate B. (2009). *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from morrocan rhizospherical soils against *Scerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta Vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 107 (2): 676-681.

Esitken A., Pirlak L., Turan M., Shin F. (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yields, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*. 110 (4): 324-327.

Faisal P.A., Hareesh E.S., Priji P., Unni K.N., Sajith N., Sreedevi S, Josh M.S., Benjamin S. (2014). Optimization of Parameters for the Production of Lipase from *Pseudomonas* sp. BUP6 by Solid State Fermentation. *Advances in Enzyme Research*. 2 (4): 125-133.

Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (2006). The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. *Springer*. 3: 1146 p.

FAOSTAT. (2012). FAO statistical yearbook. World food and agriculture. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAOSTAT. (2013). FAO statistical yearbook. World food and agriculture. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAOSTAT. (2014). FAO statistical yearbook. World Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAOSTAT. (2018). FAO statistical yearbook. World Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Farr D.F., Rossman A.Y., Palm M.E., McCray E.B. (2007). Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA.

Floss H.G and Yu T.W. (1999). Lessons from the rifamycin biosynthetic gene cluster. *Current Opinion in Chemical Biology Journal*. 3 (5):592-597.

Fodil D., Badis A., Jaouadib B., Zarai N., Ferradji F.Z., Boutoumi H. (2011). Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a

decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65:470-478.

Folasire O.F., Oridupa O.A., Owolabi A.J., Adepoju O.T. (2016). Anti-hyperglycemic effect of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) corm in alloxan-induced diabetic albino rats. *International Journal of Nutrition and Metabolism*. 8: 24-29.

Geetha K., Rajithasri A.B., Bhadrachari. (2014). Isolation of plant growth promoting rhizo bacteria from rhizosphere soils for green gram, biochemical characterization and screening for antifungal activity against pathogenic fungi. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 3(9): 47-54.

George M., Anjumol A., George G., Mohamed Hatha A.A. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African Journal of Microbiology Resources*. 6 (10):2265-2271.

Georgiev L., Chochkova M., Ivanova G., Najdenski H., Ninova M., Milkova T. (2012). Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse Journal*. 89: 91-102.

Getha K., Vikineswary S., Wong WH., Seki T., Ward A., Goodfellow M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32 (1): 24-32.

Ghosh S., Sachan A., Sen S.K., Mitra A. (2007). Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34 (2):131-138.

Giacometti D.C and Leon J. (1994). Tannia, Yautia (*Xanthosoma sagittifolium*) In: *Plant Physiology Biochemistry*. 25: 659-666.

Glick B.R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation. *Scientifica*. 2012: 1-15.

Glick B.R., Cheng., Czarny J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 329-339.

- Goodfellow M and Cross T. (1984). Classification *In: The Biology of Actinomycetes*. Goodfellow MM, Williams ST. (Eds). Academic Press, London. 7-164 p.
- Goodfellow M and Minnikin D.E. (1981). Lipids in the classification of actinomycetes. *Zentralblatt für Bakteriologie and Hygiene*. 11: 99-109.
- Goodfellow M and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 37: 189-216.
- Gomez Ramirez M., Rojas Avelizapa L.I., Rojas Avelizapa N.G., Cruz Camarillo R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*. 56 (2): 213-219.
- Gopalakrishnan S., Pande S., Sharma M., Humayun P., Kiran B.K., Sandeep D., Rupela O. (2011). Evaluation of Actinomycetes isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. *Crop Protection*. 30:1070-1078.
- Gopalakishnan S., Vadlamudi S., Bandikinda P., Sathya A., Vijayabharathi R., Rupela O., Kudapa H., Katta K., Varshney R.K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*. 169 (1): 40-48.
- Gordon R.E., Barnett D.A., Handerhan J.E., Pang C.H.N. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the *nocardia* strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24 (1): 54-63.
- Gos F.M.W.R., Savi D., Shaaban K.A., Thorson J.S., Aluizio R., Possiede Y.M., Rohr J and Glienke C. (2017). Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Voschysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers in Microbiology*. 8(1642): 1-17.
- Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni Z. (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: Indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29 (10): 1821-1829.

- Goudjal Y., Zamoum M., Sabaou N., Matthieu F., Zitouni A. (2016). Potential of endophytic *Streptomyces* spp. For biocontrol of *Fusarium* root rot disease and growth promotion on tomato seedlings. *Biocontrol and Science Technology*. 26 (12): 1691-1705.
- Gowdar S.B., Deepa H., Amaresh Y.S. (2018). A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of *Streptomyces* sp. For the management of plant diseases. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (5): 3-7.
- Grobelak A., Napora A., Kacprzak M. (2014). The impact of plant growth promoting bacteria (PGPB) on the development of phytopathogenic fungi. *Folia Biologica and Oecologic*. 10: 107-112.
- Gupta A., Gopal M., Tilak K.V.B.R. (2000). Mechanism of plant growth promotion by rhizobacterie. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38: 856-862.
- Gupta G., Singh Parihar S., Kumar Ahirwar N., Kumar Snehi S., Singh V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbiology and BiochemistryTechnology*.7 (2): 96-102.
- Guzman J.D. (2014). Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*. 19 (12): 19292-19349.
- Harvery R.A., Champe P.C. (2009). In: Lippincott's Illustrated Reviews: *Pharmacology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 560 p.
- Hassan A.A., Al-Barawy A.M., Morkhtar El., Nahel M. (2011). Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *Journal of American Science*. 7:752-60.
- Hastuti R.D., Yulin L., Antonius S., Rasti S. (2012). Endophytic *Streptomyces* spp. as biocontrol agents of rice bacterial leaf blight pathogen (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Hayati Journal of Bioscience*. 19: 155-162.
- Hawker L.E and Linton A.H. (1971). *Micro-organismes*. 325-333 p.
- Hendrick C.W., Doyle J.D., Hugley. (1995). A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied and environmental microbiological*. 61(5): 2016-1019.
- Hinsinger P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*. 237: 173-195.

- Hölfte M and Altier N. (2010). *Pseudomonas Fluorescent* as biological control agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*. 161 (6): 464-71.
- Holguin G and Glick B.R. (2001). Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecology*. 41:281-288.
- Hossain M.A and Radman A. (2011). Chemical composition of bioactive compounds by GC-MS screening and antifungal proprieties of the crude extracts of cabbage samples. *Asian Journal of Biotechnology*. 3: 68-76.
- Houda Morakchi. (2011). Isolement et identification des souches d'actinomycètes productrices des molécules bioactives au niveau du lac Oubeira: Étude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité. Thèse de Doctorat en microbiologie, option microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, *République Algérienne Démocratique et Populaire*. 19 p.
- Islam M.S., Aktar M.B., Rahman M.M., Uddin K.M.M. (2014). Isolation and characterization of *Streptomyces* spp collected from Bangladeshi soils on the basis of morphological and biochemical studies. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3 (11): 734-742.
- Islam M.T and Hossain M.M. (2013). Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist. Maheshwari D.K. (eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. 176-218 p.
- Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M., Yagi K. (2010). Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33 (6): 983-987.
- Jaina S.C., Boskey P., Renuka J. (2012). Antimicrobial, free radical scavenging activities and chemical composition of *Peltophorum pterocarpum* Baker ex K. Heyne stem extract. *Der Pharma Chemica*. 4: 2073-2079.
- Janseens M. (2001). Crop production tropical in Africa. Bonn Germany: Institut fur obstund germusebeau, abt. Tropicsher pflanzenbau, Rheinische Friedich-Universitat Bonn, auf dem Hugel 6, D-53121 Bonn, Germany. Directorate general for international co-operation, Karmelietenstraat 15, B-1000 Brussels, Belgium. 221-228 p.
- Jensen H. L. (1942). *Pro Line Soc. N.S.W.* 57:205-212.

- Jespers B.K., Davidse L.C., Waard M.A. (1994). Interference of the phenyl pyrrole fungicide fenpiclonil with membranes and membranes functions. *Journal of Pesticide Science*. 40 (2): 133-140.
- Jijakli M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, *In* : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Jinhua C., Yang S.H., Palaniyandi S.A., Han J.S., Yoon T.M., Kim T.J., Suh J.W. (2010). Azalomycin F complex is an antifungal substance produced by *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 isolated from agricultural soil. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 53 (5): 545-552.
- Jog R., Pandya M., Nareshkumar G., Rajkumar S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 160 (4): 778-788.
- Joo G.J. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*. 27 (19): 1483-1486.
- Jones S.E and Elliot M.A. (2017). *Streptomyces* exploration: competition, volatile communication and new bacterial behaviours. *Trends in Microbiology*. 25(7): 522-531.
- Joshi M., Singh A.V., Prasad B. (2018). Enzymatic Activity and Plant Growth Promoting Potential of Endophytic Bacteria Isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(6): 2314-2326.
- Jubie S and Dhanabal S.P. (2012). Gas Chromatography- Mass Spectrometry Analysis and Antibacterial Activity of Fatty acid Mixture of *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 4 (6):1836-1838.
- Judd. S. W., Campbell. C.S., Kellogg. E. A., Stevens. P. (2001). Botanique systématique: une perspective phylogénétique, De Boeck : Bruxelles. 467 p.
- Kaberi D., Bibhas D., Pyush P. (2014). Screening the Rhizobium from *Cajanus Cajan* for Plant Growth Promoting Factors. *The International Journal of Science and Technoledge*. 2: 134-138.
- Kalakoutskii L.V and Agre N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*. 40 (2): 469-524.

Kamal Rai., Sujan K., Bidya S. (2018). Actinomycetes: Isolation, Characterization and Screening for Antimicrobial Activity from Different Sites of Chitwan, Nepal. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. 3(1): 25-30.

Kamaya Y., Tsuboi S., Takada T., Suzuki K. (2006). Growth stimulation and inhibition effects of 4-hydroxybenzoic acid and some compounds on the freshwater green alga *Pseudokirschneriella subcapitata*. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. 51 (4): 537-541.

Kang S-M., Khan A.L., Hamayun M., Hussain J., Joo G-J., You Y-H., Kim J-G., Lee I-G. (2012). Gibberellin-Producing *Promicromonospora* sp. SE188 Improves *Solanum lycopersicum* Plant Growth and Influences Endogenous Plant Hormone. *The Journal of Microbiology*. 50 (6): 902-909.

Kang S-M., Waqas M., Khan A.L., Lee I-J. (2014). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellines Production and Crop Growth Promotion. In: M. Miransari (ed.), Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses. New York. 1: 1-19 p.

Karthikeyan N., Pandiyan K., Sahu P.K, Srinivasan R., Singh U.B. (2018). Actinomycetes: A Promising Tool for Plant Growth Promotion and Disease Control. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(7): 2418-2429.

Kaur J., Gangwar M., Kaur S. (2017). Screening of Endophytic and Rhizospheric Actinomycetes with Potential Application for Biocontrol of Fusarium Wilt of *Gladiolus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (7): 1345-1355.

Kefeli V.I., Kalevitch M.J., Borsari B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2: 13-18.

Kennedy A.C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems agriculture. *Ecosystem and Environment*. 74: 65-76.

Kim-Chi H., Tzu-Hsuan L., Chung-Sheng L., Ying-Tsong C., Chun-Yi L. (2011). The Chitinolytic Activities of *Streptomyces* sp. TH-11. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 56-65.

Kim J and Rees D.C. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*. 33: 389-397.

- Kinkel L.L., Schlatter D.C., Bakker M.G., Arenz B.E. (2012). Streptomyces competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Research in microbiology*. 163: 490-499.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96 (8): 473-480.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. (2006). Phytohormones: microbial production and applications. In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. (Eds.): N. Uphoff, A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, Florida. 207-220 p.
- Khamna S., Yokata A., Lumyong S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compound, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 649-655.
- Kimura M. (1981). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16 (2): 111-120.
- Kitouni Mahmoud. (2007). Isolement des bactéries actinomycetales productrice d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation primaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat d'état en microbiologie appliquée. *Université Mentouri-Constantine, République Algérienne Démocratique et Populaire*. 58 p.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghoua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactives substances from water, soil and tree bark samples of the North-east of Algeria. *Journal de mycologie médicale*. 15 (1): 45-51.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10th ed. Wallingford, UK: CAB International.
- Klan M.S., Zidi A., Wani P.A., Oves M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters*. 7: 1-19.
- Khalid. (2010). Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil and Environ*. 29 (1): 38-46.

Khan N.I., Filonow A.B., Singleton L.L. (1997). Augmentation of soil with sporangia of *Actinoplanes* spp. for biological control of *Pythium* damping-off. *Biocontrol Science and Technology*. 7 (1): 11-22.

Kollef M.H. (2009). New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Critical Care and Resuscitation*. 11 (4):282-286.

Kremer L.C., van Dalen E.C., Offringa M. (2001). Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term followup study. *Journal of Clinical Oncology*. 19 (1):191-196.

Kribet M., Guerrero-Garzon J.F., Urban E., Zehl M., Wronski V-K., Rückert C., Busche T., Kalinowski J., Rollinger J.M., Abate D., Zotchev S.B. (2018). *Streptomyces* spp. From Ethiopia Producing Antimicrobial Compounds: Characterization via Bioassays, Genome Analyses, and Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology*. 9 (1270): 1-13.

Kuchareck T and Mitchell D. (2000). Disease of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. *Plant Pathology Fact Sheet*. 1-14.

Kuhad R.C., Gupta R., Singh A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. 2011: 1-10.

Kumar P.P., Kumaravel S., Lalitha C. (2010). Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of vitexnegundo. *African Journal of Biochemistry Research*. 4 (7):191-195.

Kumar N and Pruthi V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 4: 86-93.

Kumar R and Lown J.W. (2003). Design, synthesis and *in vitro* cytotoxicity studies of novel pyrrolo [2, 1] [1, 4] benzadiapenine-glycosylated pyrrole and imidazole polymide conjugates. *Organic and biomolecular Chemistry*. 1: 3327-3342.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA 7: Molecular Genetics Analysis Version 7.0 for bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33 (7): 1870-1874.

Kumaran S., Deivasigamani B., Uttara V. (2012). Chitinase application-review. Lambert Book publishing house, Germany: ISBN 978-3-8484-4920-0.

Kumari Amrita., Jain Nitin., Subathra Devi C. (2012). Novel bioactive compounds from mangrove derived actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy*. 3: 26-29.

- Lama A., Pané-Farré J., Chon T., Wiersma A.M., Sit C.S., Vederas J.C., Nakono M.M. (2012). Response of methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* to amicumacin A. *Plos one*. 7 (3): 340-347.
- Lanyi B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiology*. 19: 1-67.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., Mc William H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*. 23 (21): 2947-2948.
- Lee J.Y and Hwang B.K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. NRC Research Press. *Canadian Journal of Microbiology*. 48 (5): 407-417.
- Lee J.G., Yoo I.D., Kim W.G. (2007). Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 30 (4): 795-797.
- Lee O., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Park D.J. (2008). Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18 (11): 1741-1746.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales, dans: Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A et Schlegel H.G. The prokaryote (volume 2). *Springer-Verlag Edition Berlin*: 1915-1922.
- Lechevalier M.P and Lechevalier H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomomyces* in: Biology of industrial microorganisms. *The Benjamin Cummings Publishing Compagny INC*. 315-360.
- Lechevalier M.P and Lechevalier H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 20 (4): 435-443.
- Leminor L and Veron M. (1989). Bacteriologie médicale. 2^{ème} édition. 335-349 p.
- Li Y., Xu Y., Liu L., Han Z., Lai P.Y., Guo X., Qian P.Y. (2012). Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Marine Drugs*. 10 (12): 319-328.

Limaye L., Patil R., Ranadive P., Kamath G. (2017). Application of Potent Actinomycete Strains for Bio-Degradation of Domestic Agro-Waste by Composting and Treatment of Pulp-Paper Mill Effluent. *Advances in Microbiology*, 7: 94-108.

Lin L and Xu X. (2013). Indole-3-Acetic Acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Current Microbiology*. 67 (2): 209-217.

Liu X., Bolla K., Ashforth E.J., Zhuo Y., Gao H., Huang P., Stanley S.A., Hung D.T., Zhang L. (2012). Systematic-guided bioprospecting for bioactive natural products. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101: 55-66.

Lo C.W., Lai N.S., Cheah H.Y., Wong., Ho C.C. (2002). Actinomycetes isolated from soil samples from the Crocker range Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*. 1-6.

Lock H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum*. 1 (2):142-1146.

Lopez M., Vasquez E., Lopez F. (1995). Raices y tuberculos. *Pueblo y Education, Universidad Centra de la Villas (Cuba)*. 312 p.

Loqman S., Ait-Barka E., Clément C., Ouhdouch Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (1): 81-91.

Lui C.G., Liu W.C., Qiu J.Y., Wang H.M., Liu T., Liu D.W. (2008). Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol Actinomyces strain A01. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 701-707.

Lu T.J., Chen J.C., Lin C.L., Chang Y.H. (2005). Properties of starches from cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) tubers planted in different seasons. *Food Chemistry*. 91 (1): 69-77.

Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V., Woeng C.A., Thomas F.C. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. 153: 503-523.

Lynd L.R., Weimer P.J., Van Z.W.H., Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (3): 506-77.

Lyonga S.N., Steiner K.G., Pfeitter H., Nzeitchung S. (1979). The Cameroon National Roots Crops Improvement Program (CNRCIP). Annual Technical Report, Centre IRA Njombé, Cameroon. 25 p.

Ma Z., Hoang-Hua G.K., Ongena M., Höfte M. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental Microbiology Reports*. 5: 896-904.

Maier R. M., Pepper I. L., Gerba. C. P. (2009). Environmental microbiology. Academic Press: London. 598p.

Mahandevan B and Crawford D.L. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent of *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbiota Technology*. 20: 489-493.

Malleswari Damam., Mohd K. M., Rana K. (2016). Isolation and screening of plant growth promoting actinomycetes from rhizosphere of some forest medicinal plants. *International Journal of Chemical and Technical Research*. 9 (5): 521-528.

Malik K.A. (2006). Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*. 43: 163-170.

Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S-K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*. 169 (2014):262-278.

Mariastuti H.D., Listiyowati S., Wahyudi A.T. (2018). Antifungal activity of soybean rhizosphere actinomycetes producing bioactive compounds against *Fusarium oxysporum*. *Biodiversitas*. 19(6):2127-2133.

Martins S., Mussatto S.I., Martinez-Avila G., Montanez-Saenz J., Aguilar C.N., Teixeira J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*. 29: 365-373.

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

Mathews P.J. (2002). An introduction to the history of taro as a food. In: Potential of root crops for food and industrial resources. Twelfth symposium of the international for Tropical Root Crops (ISTRC). (Eds. M. Nakatami and K. Komaki). Tsukuba, Japan. 484-497 p.

Matsumoto A and Takahashi Y. (2017). Endophytic actinomycete: promising source of novel bioactive compounds. *Journal of Antibiotics*.70: 514-519.

Mazzola M. (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuw*. 81 (1-4): 557-564.

Mbarga J.B., Hoopen G.M.T., Kuate J., Adiobo A., Ngonkeu M.E.L., Ambang Z., Akoa A., Tondje P.R., Begoude B.A.D. (2012). *Trichoderma Asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum* causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop protection*. 36: 18-22.

Mbeta H.P and Saika (2006). Antibacterial activity of essential oil from *Ocinum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. *Internet Journal of Food Safety*. 7: 15-19.

Mbouobda H.D., Boudjeko T., Djocgoue P.F., Tsafack T.J.J., Omokolo N.D. (2007). Morphological characterization and agronomic evaluation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. schott) germplasm in Cameroon. *Journal of Biology and Science*. 7 (1): 27-33.

Mbouobda H.D., Boudjeko T. Djocgoue P.F., Fotso., Tsafack T.J.J., Omokolo DN. (2010). Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester (BTH) stimulates defense reactions in *Xanthosoma sagittifolium*. *Phytoparasitica*. 38. 71-79.

McKenna F., El-Tarabili K.A., Petrie S., Dell B. (2002). Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. *Letters in Applied Microbiology*. 35: 107-112.

McKinney R.E. (2004). Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press: New York. 448 p.

Meena R.K., Patni V., Arora D.K.J. (2008). Study on phenolics and their oxidative enzyme in *Capsicum annuum* L, infected with *geminivirus*. *Asian*. 22:307-10.

Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Spröe C., Klenk H-P. (2013). «When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy ». *Archive of Microbiology*. 195: 413-418.

Melo I.S., Santos S.N., Rosa L.H., Parma M.M., Silva L.J., Queiroz S.C., Pellizari V.H. (2014). Isolation and biological activities of an endophytic *Morteilla alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarcticum*. *Extremophiles*. 18 (1): 15-23.

Messaoudi Omar. (2013). Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkhah de Kenadsa (Bechar). Maîtrise de la qualité microbiologique et de développement microbien, Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen, République Algérienne Démocratique et Populaire. 33 p.

Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*. 6 (2):177-185.

Miethke M and Marahiel M.A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 413-451.

Mirza M.S., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moenne-Loccoz Y., Bally R., Miyashita K., Fujii T., Sawada Y. (1991). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology*. 137: 2065-2072.

Miyadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J., Hotta K. (2002). Digital atlas of actinomycetes. The Society for Actinomycetes. Tokyo: Japan

Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V. Antonova-Nikolova S., Bogatzevska N. (2002). Characteristics of actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*. 3: 3-14.

Mohamed H., Miloud B., Zohra F., Garcia-Arenzena J.M., Veloso A., Rodriguez-Couto S. (2017). Isolation and characterization of actinobacteria from Algerian Sahara soil with antimicrobial activities. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 6(2): 109-120.

Mohan Y.S.Y.V.J., Sirisha B., Prathyusha K., Rao P. (2014). Isolation, Screening and Characterization of Actinomycetes from Marine Sediments for their Potential to Produce Antifungal Agents. *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Science*. 3 (4):131-137.

Mohandas S., Poovarasan S., Panneerselvam P., Saritha B., Upreti K.K., Kamal R., Sita T. (2013). Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes. *Scientia Horticulturae*. 150: 371-376.

Monaghan P., Fardis M., Revill W.P., Bell A. (2005). Antimalarial effects of macrolactones related to FK520 (ascomycin) are independent of the immunosuppressive properties of the compounds. *Journal of Infectious Diseases*. 191 (8): 1342-1349.

Monciardini P., Sosio M., Cavaletti L., Chiocchini C., Donadio S. (2002). New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*. 42 (3): 419-429.

Montaldo A. (1991). Cultivo de ra'ices y tub'erculos tropicales. IICA (Ed), 2da Edic'ion san Jos'e Costa rica. 407 p.

Monteagre J.R., Reyes R., Pérez L.M., Herrera R., Silva P., Besoain X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 115-127.

Monteiro P., Borba M.P., Van Der S., S.T. (2017). Evaluation of the antifungal activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the growth promotion of wheat plants. *Journal of Agricultural Science*. 9 (12):229.

Moornam G.W., Kang S., Geiser D.M., Kim S.H. (2002). Identification and characterization of *Pythium* species associates with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease*. 86 (11): 1227-1231.

Morath S.U., Hung R., Bennett J.W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*. 26: 73-83.

Motta A.S., Cladera-Olivera., Brandelli A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35 (4): 307-310.

Mouafo Tchinda.R.A., Boudjeko T., Simao-Beaunoir A.M., Lerat S., Tsala E., Monga E., Beaulieu C. (2016). Morphological, physiological and Taxonomic characterization actinobacteria isolates living as endophytes of cacao pods and cacao seeds. *Microbes and Environments*. 0 (0): 1-7.

Mukhtar S., Zaheer A., Aiysha D., Malik K.A., Mehnaz S. (2017.) Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. 10 (12): 316-319.

Murray R.G.E. (1989). The higher taxa, or, a place for everything *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. S.T. Williams, M.E. Sharpe & J.G. Holt (eds.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 4: 2329-2332 p.

- Murthy N and Bleakley B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *The internet Journal of microbiology*. 10 (2): 2-8.
- Mwenye O.J. (2009). Genetic diversity analysis and nutritional assessment of cocoyam genotypes in Malawi, Magister scientiae Agriculturae, University of the Free State, Bloemfontein, South-Africa. 2 p.
- Nafis A., Raklami A., Betchaoui N., El Khalloufi F., El Alaoui A., Glick B.R., Hafidi M., Kouisni L., Ouhdouch Y., Hassani L. (2019). Actinobacteria from extreme niches in Morocco and their plant growth promoting potentials. *Diversity*. 11 (139): 1-15.
- Nakouti I and Hobbs G. (2012). Characterization of five siderophore producing Actinomycetes from soil samples and the use of antibiotic resistance to differentiate the isolates. *International Journal of Agricultural Sciences*. 4: 202-206.
- Nanjappan K., Kuppusamy P., Pramod K.S., Ramakrishnan S., Udai B. S. (2018). Actinomycetes: A Promising Tool for Plant Growth Promotion and Disease Control. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7 (7): 2418-2429.
- Nanjani S.G and Soni H.P. (2011). Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. *Bioinformatica*. 1:1-15.
- Nanjawade B.K., Chandrashekhara S., Ali M.S., Prakash S.G., Fakirappa V.M. (2010). Isolation and morphological characterization of antibiotic producing Actinomycetes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (3):231-236.
- Nautiyal C.S. (2000). Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. *In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture*. Upadhyay RK, Mukherji KG, Chamola BP. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. 9-23 p.
- Neeraja C., Anil K., Purushotha P., Suma K., Sarma P. V. S. R. N., Moerschbacher B. M., Podile A. R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30 (3): 231-241.
- Neethu S., Vishnupriya S., Jyothis M. (2016). Isolation and functional characterisation of endophytic bacterial isolates from *curcuma longa*. *International Journal of Pharma and Bio Science*. 7 (1): 455-464.

- Neilands J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 270 (45): 26723-26726.
- Ngouo L.V. (1988). Contribution of the study of Cocoyam (*Xanthosoma sp.*): identification and analyse of some constraints to the hybrids production. Doctorate thesis 3rd cycle, University of Yaounde I, Cameroon. 128 p.
- Nicot P.C. (2002). Lutte biologique avec des microorganismes contre les maladies aériennes: situation actuelle et perspectives de développement. 2^{ème} Conférence Internationale sur les moyens alternatifs de lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux, 4-7 mars, Lille, France. 28-36 p.
- Niemenack N., Noah-Mboene A., Omokolo D. (2013). Micropropagation cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in temporary immersion bioreactor. *Plant Biotechnology Reports*. 7: 383-390.
- Nimnoi P and Pongsilp N. (2009). Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soil as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus religiosa* L., *Leucaena leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5 (1): 29-41.
- Nimnoi P., Pongsilp N., Lumyong S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoter's production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26 (2):193-203.
- Nonomura H. (1988). Isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* 03: 45-54.
- Nyochembeng L.M., Beyl C.A., Pacumbala R.P. (2007). Peroxidase activity, isozyme patterns and electrolyte leakage in roots of cocoyam infected with *Pythium myriotylum*. *Journal of Phytopathology*. 155 (7-8): 454-461.
- Nzietchueng S. (1983). La pourriture racinaire du macabo (*Xanthosoma Sagittifolium*) au Cameroun: symptomatologie et étiologie de la maladie. *Agronomie Tropicale*. 38:321-325.
- O'Donnel A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M., Parlett J.H. (1982). The analysis of actinomycetes wall aminoacids by gas chromatography. *FEMS Microbiology Letter*. 15: 75-78.

O’Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (2008). *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. John Wiley & Sons: Weinheim. 192 p.

Okay A., Tamer U., Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *African Journal of Biotechnology*. 3 (9): 441-446.

Okami Y. (1956). A study for classification of *Streptomyces*. On the *S. Iavendulae* group, with reference to its immunological properties. *Journal of General Microbiology*. 2: 63.

Olanrewaju O.S and Babalola O.O. (2019). Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103:1179-1188.

Omenyo E.L., Quain M.D., Moses E., Asumadu H., Acheampong P.P., Ankomah A.A. (2013). Farmer participatory development of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*, Linn, Schott) cultivars. *International Journal of sciences innovations and discoveries*. 3 (1): 74-85.

Omokolo N.D., Boudjeko T., Tsafack T.J.J (2003). *In Vitro* tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod. *Science Horticulture*. 98: 337-345.

Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C., Bélanger R.R. (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with *fluorescent Pseudomonas*. *Plant Pathology*. 49 (4):523-530.

Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C, Cornelis P., Koedam N., Belanger R.R. (1999). Protection of cucumber against *Pythium* root rot *fluorescence pseudomonas*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology*. 48: 55-76.

Ongena M., Giger A., Jacques P., Dommès., Thonart P. (2002). Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *European Journal of Plant Pathology*. 108 (3): 187-196.

Onokpise O.U., Wutoh J.G., Ndzana X., Tambong J.T., Mebeka M.M., Sama A.E., Nyochembeng L., Agueguia A., Nzietchueng S., Wilson J.G., Borns M. (1999). Evaluation of macabo, cocoyam germplasm in Cameroon. Perspective of new uses. In: J. Janick (ed) Alexandria: 394-396 p.

Onwueme I.C and Charles W.B. (1994). "Cultivation of cocoyam", in *Tropical root and tubers crops. Productions, perspectives and future prospects*. FAO plant production and protection paper 126, Rome, Italy. 139-161 p.

Onwuene I.C. (1978). *Colocasia and Xanthosoma (Cocoyams)*. In: *The tropical tubers crops: yam, cassava, sweet potato, and cocoyam*. Eds J. Wiley and Sons Ltd, New York, 589-606 p.

Onyenweaku C.E and Okye B.C. (2007). Technical efficiency of small-holder cocoyam farmers in Anambra State Nigeria. *International Journal of Agriculture*. 9: 1-6.

Opoku-Ageyman M.O., Bennett-Lartey S.O., Markwei C. (2004). Agro-morphological and sensory characterization of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Shott) germplasm in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science*. 37: 27-31.

Ou S and Kwork Kin-Chor. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:1261-1269.

Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats, isolation and screening of antifungal activities. *European Journal of Cell Biology*. 37 (2): 69-74.

Owusu-Darko P.G., Paterson A., Omenyo E.L. (2014). Cocoyam (Corms and Cormels)-An underexplored food and feed resource. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. 3 (1): 22-29.

Pacumbaba R.P., Wutoh J.G., Eyang S.A., Tambong J.T., Nyochembeng L.M. (1992). Isolation and pathogenicity of rhizosphere fungi of cocoyam in relation with cocoyam root rot disease. *Journal of Phytopathology*. 135 (4): 265-273.

Padilla-Reynaud R., Simao-Beaunoir A-M., Lerat S., Bernards M.A., Beaulieu C. (2015). Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. *Microbes and Environments*. 30:245-253.

Pal K.K and Gardener B.M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 111: 1-25.

Palaniyandi S.A., Damodharan K., Yang S.H., Suh J.H. (2014). *Streptomyces* sp. strain PGPA39 salt stress and promotes growth of Micro Tom tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*. 117 (3):766-773.

- Palaniyandi S.A., Yang S.H., Damodharan K., Suh J.W. (2013). Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria with yam rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*. 00: 985-995.
- Passari A.K., Mishra V.K., Gupta V.K., Yadav M.R., Saikia R., Singh B.P. (2015). In Vitro and In Vivo Plant Growth Promoting Activities and DNA Fingerprinting of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Associates with Medicinal Plants. *Plos one*. 10 (9): 1-18.
- Patel J.B., Tenover F.C., Turnidge J.D., Jorgesen J.H. (2011). Susceptibility test methods: dilution and disk methods. *Manual of clinical Microbiology*. 1122-1143.
- Pathma J., Kennedy R.K., Sakthivel N. (2011). Mechanisms of *fluorescent pseudomonas* that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In *bacteria in agrobiolgy: plant growth responses*. Springer Berlin Heigelberg. 77-105 p.
- Patrick Z.A and Koch L.W. (1958). Inhibition of respiration, germination and growth by substances arising during the decomposition of certain plant residues in the soil. *Canadian Journal of Botany*. 36 (5): 621-647.
- Patten C.L and Glick B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic acid in development of the host plant root ststem. *Applied and Environ Microbiology*. 68 (8): 3795-3801.
- Paul K.K and Bari M.A. (2013). Genetic variability, correlation and path coefficient study in elephant food yam (*Amorphophallus companulatus* B1). *Journal of Scientific Research*. 5 (2): 371- 381.
- Payal D., Renu S., Monisha K. (2014). Isolation and Screening of Cellulolytic Actinomycetes from Diverse Habitats. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 5 (3): 438-451.
- Pemila E.C.R. (2018). Actinomycetes: Dependable Tool for Sustainable Agriculture. *Current Investigations in Agriculture and Current Research*. 1(5): 1-3.
- Penrose D.M and Glick B.R. (2001). Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 47 (4): 368-372.

- Penrose D.M and Glick B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*. 118: 10-15.
- Perez E., Schultz F.S., Delahaye E.P. (2005). Characterization of some properties of starches isolation from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocasia esculenta* (taro). *Carbohydrates Polymers*. 60: 139-145.
- Pérez-Montano F., Alías-Villegas C., Bellogín R.A., Cerro P.A., Espuny M.R., Jiménez-Guerrero I., López-Baena F.J., Ollero F.J., Cubo T. (2013). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169 (5-6): 325-336.
- Perez P.J. (2010). Cocoyam, in quality declared planting material protocols and standards for vegetatively propagated crops. FAO Plant Production and Protection, Rome, Italy. 195:41-48.
- Perneel M., Tambong J.T., Adiobo A., Floren C., Sabario F., Léveque A., Höfte M. (2006). Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycological Research*. 110 (5): 583-593.
- Perneel M., Herman J., Adiobo A., De Maeyer K., Raaijmakers J.M., De Vos P., Höfte M. (2007). Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent pseudomonas strain from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (4): 1007-1020.
- Perneel M., Amayanab A., De Maeyer K., D'ae J., Höfte M. (2008). Pseudomonas bacteria antagonistic to *Pythium myriotylum* associated with cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) in Cameroon. In first international workshop on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) cultivation, Genetic improvement and disease management. *Program and Abstract Book*. 12 p.
- Perseglove J. (1972). Tropical crops: Monocotyledons 1: London: Longman. 66-74 p.
- Pinchuck I.V., Bressollier P., Sorokulova I.B., Verneuil B., Urdaci M.C. (2002). Amicounacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research in Microbiology*. 153 (5): 269-276.
- Pirovani C.P., Carvalho H.A., Machado R.C and Gomes D.S. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*. 29 (11): 2391-2401.

Pliego J., Mateos J.C., Rodriguez J., Valero F., Baeza M., Femat R., Camacho R., Sandoval G., Herrera-López E.J. (2015). Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using p-Nitrophenyl Butyrate. *Sensors*. 15: 2798-2811.

Pohl C.L., Kock J.L.F., Thibane V.S. (2011). Antifungal free fatty acids: A Review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (Ed). 61-71 p.

Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitky V.N., Serebryakova M.V., Kusochek P., Konevega A.L. (2014). Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. *Molecular Cell*. 56 (4): 531-540.

Ponmurugan P and Gopi C. (2006). Distribution pattern and screening of phosphate solubilizing bacteria isolated from different food and forage crops. *Journal of Agronomy*. 5: 600-604.

Prakash A., Satyanarayana T., Johri B.N. (2012). *Microorganisms in Environmental Management*. Springer. 819 p.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2010). *Microbiologie*. 2^{ème} édition De Boeck : Bruxelles. 1088 p.

Prescott. L. M., Harley. J. P., Klein D. A. (2003). *Microbiologie*. 2^{ème} édition De Boeck: Bruxelles. 1164 p.

Pridham T.G and Gottlieb D. (1949). The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *Journal of Bacteriology*. 56: 107-114.

Priya C.S., Jagannathan N., Kalaichelvan P.T. (2011). Production of chitinase by *Streptomyces Hygroscopicus* VMH2 by optimization of cultural conditions. *International Journal of Pharma and Bio sciences*. 2 (2): 210-219.

Priya E., Thenmozhi R., Nagasathya A., Kumar D.P., Thajuddin N., Muralitharan G. (2017). Antagonistic potential of *Streptomyces flavomacrosporus* GACMPT-57 against plant pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 4(1): 68-73.

Purseglove P.W. (1985). *Tropical crops: Monocotyledons*, Longman, London, UK. 618 p.

Raja A., Prabakaran P., Gajalakshmi P., Rahman A.H. (2010). A Population Study of Psychrophilic Actinomycetes Isolated from Rothang Hill-Manali Soil Sample. *Journal of Pure Applied Microbiology*. 4 (2): 847-851.

- Rajan B.M and Kannabibirani K. (2014). Extraction and Identification of antibacterial secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 3: 130.
- Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28 (3): 142-149.
- Rangaswami G., Bagyaraj D. J., Bagyaraj D.G. (2004). *Agricultural Microbiology*. PHI: New Delhi. 440 p.
- Raningsih N.M., Kawuri R., Darmayasa I.B.G. (2015). Antibacterial Effect of *Nocardia* sp. Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International journal of pure and applied bioscience*. 3 (4): 154-157.
- Reetha A.K., Pavani S.L., Mohan S. (2012). Hydrogen Cyanide Production Ability by bacterial antagonist and their Antibiotics Inhibition Potential on *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3 (5): 172-178.
- Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K., Cole E.C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spore. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10): 3807-3812.
- Reyes Castro G., Nyman M., Ronnberg-Wastljung A.C. (2005). Agronomic performance of three cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) genotypes grown in Nicaragua. *Euphytica*. 142: 265-272.
- Reynolds J. (2011). Catalase test. In: Richland College, Biol 2421 manual.1 July 2013. <http://delrio.dccd.edu/J_Reynolds/microbiology/2421/Lab-manual/catalase-pdf>.
- Reynolds J. (2012). Oxidase test. In: Richland College, Biol 2421 manual.1 July 2013. <http://delrio.dccd.edu/J_Reynolds/microbiology/2421/Lab-manual/catalase-pdf>.
- Ridings W.H and Hartman R.D. (1976). Pathogenicity of *Pythium myriotylum* and others species of *Pythium* to caladium derived from shoot-tip culture. *Phytopathology*. 66: 704-709.
- Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W., Hopwood D.A., Van wezel G.P. (2008). The Global Regulator DasR Links Nutrient Stress to Antibiotic « Feast or Famine Production by *Streptomyces* ». *EMBO Reports*. 7 (9): 670-675.
- Rodriguez F.M., Bou J., Prat S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*. 57:151-180.

Rueda B., Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. (2001). Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*. 47 (11): 1042-1047.

Rungin S., Indananda C., Suttiviriya P., Kruasuwan W., Jaemsaeng P., Thamchaipenet A. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie van Leeuwenhoek*. 102 (3): 463-472.

Ryu C.M., Farag M.A., Paré P.W., Kloepper J.W. (2005). Invisible Signals from the Underground: Bacterial Volatiles Elicit Plant Growth Promotion and Induce Systemic Resistance. *Plant Pathology Journal*. 21 (1): 7-12.

Saito A., Fujii T., Miyashita K. (2003). Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: Involvement of gene–duplication and domain–deletion. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*. 84 (7): 7-16.

Saitou N and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (97): 406-425.

Saha R., Saha N., Donofrio R.S., Bestervelt L.L. (2013). Microbial siderophores: a mini review: Microbial Siderophores. *Journal of Basic Microbiology*. 53: 303-317.

Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34 (10): 635-648.

Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed.3.Cold Spring Harbor (New York): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1626 p.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academic Sciences. USA*. 74 (12): 5463-5467.

Sanglier J.J., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S. (1996). Review of actinomycetes compounds 1990, 1995. *Expert Opin Invest Drugs*. 5 (2): 207-223.

Sankar Subramaniam., Venkatraman R., Guru Krupa N. (2012). Studies on Production of Enzyme Chitinase from *Streptomyces sp.* and its anti-fungal activity. *Journal of Pharmacy Research*. 5(3): 1409-1413.

Sarah R. (2007). Pathogen profile: for *Pythium myriotylum* soil borne pathogen. NC state University. 728 p.

Sarkar A., Islam T., Biswas G., Alam S., Hossain M., Talukder. (2012). Screening for phosphate solubilizing bacteria inhabiting the rhizoplane of rice grown in acidic soil in Bangladesh. *Acta microbiologica and immunologica Hungarica*. 59 (2): 199-213.

Sarker A., Talukder N.M., Islam M.T. (2014). Phosphate solubilizing bacteria promote growth and enhance nutrient uptake by wheat. *Plant Science Today*. 1 (2): 86-93.

Sathya A., Vijayabharathi R., Srinivas V., Gopalakrishnan S. (2016). Plant growth-promoting actinobacteria on chickpea seed mineral density: an upcoming complementary tool for sustainable biofortification strategy. *Biotechnology*. 6 (138):1-6.

Sathya A., Vijayabharathi R., Srinivas V., Gopalakrishnan S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech* 7. 102: 1-10.

Saugar I., Sanz E., Rubio M.A., Espinosa J.C., Jimenez A. (2002). Identification of a set of genes involved in the biosynthesis of the aminonucleoside moiety of antibiotic A201A from *Streptomyces capreolus*. *European Journal of Biochemistry*. 269 (22): 5527-35.

Schafer J.L. (1999). Amélioration du système de culture du macabo, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott en pays Bamiléké (Ouest Cameroun). *Cahiers Agricultraux*. 8 (1): 9-20.

Schulz S and Dickschat J.S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Report*. 24 (4): 814-842.

Sefa-Dedeh S and Agyir-Sackey K.E. (2004). Chemical composition and effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma sagittifolium* and *Colocasia esculenta* cormels. *Food Chemistry*. 85 (4): 479-487.

Selvameenal L., Radhakrishnan M., Balagurunathan R. (2009). Antibiotic Pigment from Desert Soil Actinomycetes; Biological Activity, Purification and Chemical Screening. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 71 (5): 499-504.

Senthilkumar M and Swarnalakshmi K. (2009). Biocontrol potential of soybean endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology*. 58: 288-293.

Sessitsch A., Reiter B., Berg G. (2004). Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 239-249.

Sexana A., Upadhyay R., Kumar D., Kang N. (2013). Isolation, antifungal activity, characterization of soil actinomycetes. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 72:491-497.

Shaheen K., Mukherjee S., Ningthoujam D.S. (2017). Biocontrol and PGP Potential of Endophytic Actinobacteria from Selected Ethnomedicinal Plants in Manipur, India. *Journal of Bacteriology and Mycology*. 4 (6): 1-8.

Shariffah-Muzaimah S.A., Idris A.Z., Madihah A.Z., Dzolhifli O., Kamaruzzaman S., Maizatul-Suriza. (2018). Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of oil palm and evaluation for their ability to suppress basal stem rot disease in oil palm seedlings when applied as powder formulations in glasshouse trial. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34 (1): 1-14.

Shukla. G. (2010). *Soil Enzymology*. Springer: Berlin. 384 p.

Shahidi B.G.H., Fooladi M.H., Mahdavi M.J., Shahghasi A. (2004). Broad spectrum, a Novel Antibacterial from *Streptomyces* sp. *Biotechnology*. 3: 126-130.

Shahriar K and Robin J.M. (2010). Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*. 15:7985-8005.

Shih H.D., Lui Y.C., Hsu F.L., Mulabagal V., Dodda R., Huang J.W. (2003). Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 95-99.

Shirling E.B and Gottlieb D.D. (1966). Methods for characterization of *streptomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16 (3): 313-340.

Shrivastava P., Kumar R., Yandigeri M.S., Malviya N., Arora D.K. (2015). Isolation and Characterization of *Streptomyces* with Plant Growth Promoting Potential from Mangrove Ecosystem. *Polish Journal of Microbiology*. 64 (4): 339-349.

- Shutsrirung A., Chromkaew Y., Pathom-Aree W., Choonluchanon S., Boonkerd N. (2013). Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science of Plant and Nutrition*. 59(3): 322-330.
- Singh N., Yadav A., Varma A. (2015). Effect of plant growth promoting activity of rhizobacteria on Cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) plant growth and biochemical constituents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.4 (5): 1071-1082.
- Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S., Chung Y.R. (1999). Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*. 89 (1): 92-99.
- Singh R., Pandey K.D., Monika S., Kumar A. (2017). PGPR Isolates from the Rhizosphere of Vegetable Crop Momordica charantia: Characterization and Application as Biofertilizer. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.6: 1789-1802.
- Smaoui Slim. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat, *Université de Toulouse, France*. 89 p.
- Smibert R.M and Krieg N.R. (1994). Phenotypic characterization. In Gerhart P. (ed) methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*. 604-654 p.
- Soares F.C.A., Soussa S.D.A., Garrido S.D.M., Perez O.J., Almeida D.S.M. (2006). Soils *streptomyces* with *in vitro* activity against the yam's pathogens *Curvularia Eragrostides* and *Colletotrichum Gloleosporiodes*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37 (4): 456 - 461.
- Some N.F., Heine D., Holmes N., Knowles F., Chandra G., Seipke R.F., Hoskisson P.A., Wilkinson B., Hutchings M.I. (2017). The MtrAB two-component system controls antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*. 163(10): 1415-1419.
- Spaepen S and Vanderleyden J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 (4): 14-38.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology and Evolution*. 31: 425-448.

- Sreevidya M., Gopalakrishnan S., Kudapa H., Varshney R.K. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 (1): 85-95.
- Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G., Nilanjan D. (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soil borne fungal phytopathogens. *European Journal of Experimental Biology*. 2 (1): 163-173.
- Stevens P.F. (2012). Angiosperm Phylogeny Website. Version 13. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, University of Missouri.
- Stutz J.C., Copeman R., Martin C.A., Morton J.B. (2000). Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of south-western Namibia. Africa. *Canadian Journal of Botany*. 78 (2): 237-245.
- Sureshbabu K., Amaresan N., Kumar K. (2016). Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5 (2): 661-683.
- Sutherland E.D and Lockwood J.L. (1984). Hyperparasitism of oospores of some Peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 6 (2): 139-145.
- Suwan N., Boonying W., Nalumpang S. (2012). Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Technology*. 8 (2): 725-737.
- Szkop M and Bielawski W. (2013). A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103 (3): 683-691.
- Tan H., Deng Z., Cao L. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Letters in Applied Microbiology*. 49 (2): 248-253.
- Tambong J.T and Holfe M. (2001). Phenazines are involved in biological control of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *European Journal of Plant Pathology*. 107 (5): 511-521.
- Taiwo M.A and Adekiya A.O. (2016). Effects of Sole and Combined Application of Maize Cob Ash and Poultry Manure on Soil Properties and Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.)

- Schott) Growth and Yield. *International Journal of Agriculture and Economic Development*. 4 (1): 1-20.
- Tjamos E.C. (2005). Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olives. *EPPO Buletin*. 23 (3): 505-512.
- Thenmozhi M and Kannabiran K. (2010). Studies on Isolation, Classification and Phylogenetic Characterization of Novel Antifungal *Streptomyces* sp. VITSTK7 in India. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2 (5): 306-312.
- Thirup L., Johsen K., Winding A. (2001). Succession of indigenus *Pseudomonas* spp. and *Actinomycetes* on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens DR54* and the fungicide imazalil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (3): 1147-1153.
- Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M., Crawford D.L., Salove M.H., Deobald L.A., Bailey J.F., Morra M.J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2161-2171.
- Toussaint V. (1996). Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Trejo-Estrada S.R., Paszczynski A., Crawford D.L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21 (1-2): 81-90.
- Tsafack T.J.J., Charles G., Hourmant A., Omokolo N.D., Branchard. (2009). Effect of photoperiod and thermoperiod on microtuberization and carbohydrate levels in Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 96: 151-159.
- Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiology*. 25(4): 280-292.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Ryals J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 4: 645-656.
- Uyeda M. (2004). Metabolites produced by actinomycetes-antiviral antibiotics and enzyme inhibitors. *The Pharmaceutical Society of Japan*. 124 (8): 469-479.

- Vakil R., Knilans K., Andes D., Kwon G. S. (2008). Combination antifungal therapy involving amphotericin B, rapamycin and 5-fluorocytosine using PEG-phospholipid micelles. *Pharmaceutical Research*. 25: 2056-2064.
- Van West P., Appiah A.A., Gow N.A.R. (2003). Advanced in research on oomycete root pathogens. *Plant Pathology*, 62 (2): 99-113.
- Vaneker K and Slaats E. (2013). Mapping edible aroids. *Iridescent Icoграда*. 2 (3): 34-45.
- Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N., Jaiswal D.K. (2014). Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum L.*) in India. *Soil Biology and Biochemistry*. 70: 33-37.
- Verma V.C., Singh S.K., Prakash S. (2012). Bio-control and plant growth promoting potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*. 51 (3): 550-556.
- Vitullo D., Di Pietro A., Romano A., Lanzotti V., Lima G. (2012). Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*. 61 (4): 689-699.
- Walters D., Raynor L., Mitchell A., Walker R., Walker K. (2004). Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*. 157 (1): 87-90.
- Wang L., Huang Y., Liu. Z., Goodfellow M., Rodriguez C. (2006). *Sreptacidiphilus oryzae sp. nov.* an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 56 (6): 1257-1261.
- Wang L., Xing M., Di R., Luo Y. (2015). Isolation, Identification and Antifungal Activities of *Streptomyces aureoverticillatus* HN6. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 6 (6): 1-5.
- Wang Q., Duan B., Yang R., Zhao Y., Zhang L. (2015). Screening and Identification of Chitinolytic Actinomycetes and Study on the Inhibitory Activity against Turfgrass Root Rot Disease Fungi. *Journal of Biosciences and Medicines*. 3: 56-65
- Waksman S.A. (1961). The actinomycetes. vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC: Baltimore. 327 p.

- Waksman S.A. (1967). Distribution, isolation and methods of study. In: The actinomycetes- a summary of current knowledge. *The Ronald Press Company*. New York. 9-21 p.
- Williams S.T and Cross T. (1971). Actinomycetes. In: *Methods in Microbiology*. Booth C.Ed. *Academic Press, London*. 4: 295-334 p.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In “Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. 2452-2492 p.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sackin H.J. (1983a). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*. 129: 1743-1813.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H.A. (1983b). A probability matrix for identification of some streptomycetes. *Journal of General Microbiology*. 129: 1815-1830.
- Winn W.C and Koneman E.W. (2006). *Koneman’s color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins: Washington. 1565 p.
- Xing M., Zheng L., Deng Y., Xu D., Xi P., Li M., Kong G., Jiang Z. (2018). Antifungal Activity of Natural Volatile Organic Compounds against Litchi Downy Blight Pathogen *Peronophythora litchi*. *Molecules*. 23(358): 1-15.
- Xiong Z.Q., Zhang Z.P., Li J.H., Wei S.J., Tu G.Q. (2012). Characterization of *Streptomyces panadanus* JAU4234, a producer of actinomycin X2, fongichromin, and new polyene macrolite antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 589-592.
- Xu T., Omokolo N.D., Tsala N.G., Ngonkeu M.E. (1995). Identification of the causal agent of root rot disease in Cameroon. *Acta Mycologica sinica*. 14: 37-43.
- Xue L., Xue Q., Chen Q., Lin C., Shen G., Zhao J. (2013a). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Protection*. 43: 231-240.
- Xue Y., Zhang Y., Cheng D., Daddy S., Quinfang H. (2013b). Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite *p*-coumaric acid. *Applied Biological Sciences*. 111 (26): 9449-9454.

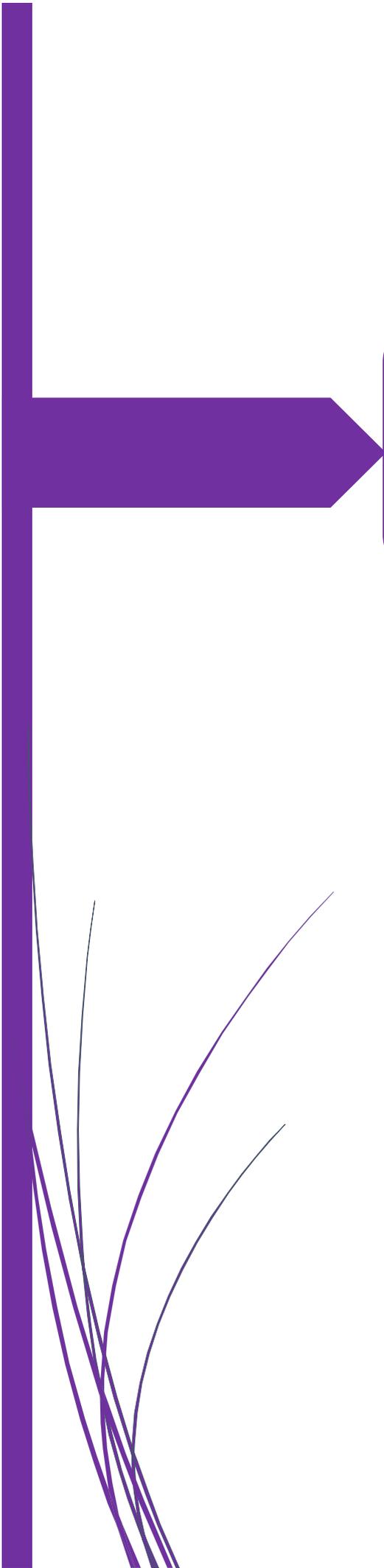
- Yadav N., Yadav A.N., College G.N.P.G., Purvanchal S.B.V. (2019). Actinobacteria for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 6 (1): 38-41.
- Yahaya I.A., Nok2 A.J., Bonire J.J. (2013). Chemical Studies of the Peel of *Xanthosoma sagittifolium* (Tannia Cocoyam). *Pakistan Journal of Nutrition*. 12 (1): 40-44.
- Yandigeri M.S., Malviya N., Solanki M.K., Shrivastava P., Sivakumar G. (2015). Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and bio-control efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31:1217-1225.
- Yi H., Ahn Y., C. Song G., Ghim S., Lee S., Lee G., Ryu C. (2016). Impact of a Bacterial Volatile 2, 3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-11.
- Yuan W.M and Crawford D.L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (8): 3119-3128.
- Zabka M and Pavela R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*. 93 (6): 1051-1056.
- Zaida A., Khan M., Ahemad M., Oves M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica and immunologica Hungarica*. 56 (3): 263-284.
- Zaitlin B and Watson S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. *Water Resources*. 40 (9): 1741-1753.
- Zang B.Q and Yang X.Y. (2000). Pathogenicity of *Pythium* population on corn-soybean rotation fields. *Plant Disease*. 84 (1): 94-99.
- Zarate N.A.H., Vieira M.D.C., Faccin F.C., Vieira D.A.H., Gassi R.P., Santos A.L.F. (2013). Sustainable production of 'comum' tannia in the hiling and function of seedling type in three crop seasons. *Acta Scientiarum Agronomy Maringa*. 35: 247-255.
- Zhao H., Song Z., Cowins J.V., Olubajo O. (2008). Microwave-Assisted Esterification of *N*-Acetyl-L-Phenylalanine Using Modified Mukaiyama's Reagents: A New Approach Involving Ionic Liquids. *International Journal of Molecular Sciences*. 9 (1): 33-44.

Zhao J., Xue Q.H., Shen G.H., Xue L., Duan J.L., Wang D.S. (2012). Evaluation of *Streptomyces* spp for biocontrol of gummy stem blight (didymellabryoniae) and plant growth promotion of *Cucumis melo* L. *Biocontrol Science Technology*. 22 (1): 23-37.

Zhou K., Su L., Yu L. (2004). Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (20): 6108-6114.

Zhu M., Burman W.J., Jaresko G.S., Berning S.E., Jelliffe R.W., Peloquin C.A. (2011). Population pharmacokinetics of intravenous and intramuscular streptomycin in patients with tuberculosis. *Pharmacotherapy*. 21 (9): 1037-1045.

Zouaoui B and Bouziane A. (2011). Isolation, Optimisation and Purification of Lipase Production by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*. 1 (7): 1-4.



ANNEXES

ANNEXES

ANNEXES I : Milieux de cultures utilisés

Milieu ISP1

Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7-7,2

Milieu ISP2

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3

Milieu ISP3

Solution d'avoine*	100 mL
Solution d'oligo- éléments**	1 mL
Agar	18 g
pH	7,2

Milieu ISP4

Amidon soluble	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0 – 7,4

Milieu ISP5

Asparagine	1 g
Glycérol	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution d'oligo-éléments**	1 mL
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,4

Milieu ISP6

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sodium thiosulfate	0,08 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0-7,2

Milieu ISP7

Glycérol	15 g
L-tyrosine	0,5 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7-7,2

Milieu ISP9

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Solution d'oligo-éléments***	1 mL
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0

Milieu YMEA + CaCO₃

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
CaCO ₃	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Agar- eau

Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0

Milieu TSB

Hydrolysate pancréatique de caséine	17 g
Hydrolysate pancréatique de soja	3 g
Dextrose	2,5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0

Milieu TSA

Hydrolysate pancréatique de caseine	17 g
Hydrolysate pancréatique de soja	3 g
Dextrose	2,5 g
NaCl	5 g

K ₂ HPO ₄	2,5 g
Eau distillée	1000 mL
Agar	15 g
pH	7,0

Gélose nutritive

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Milieu Bennett

D-Glucose anhydre	10 g
Casaminoacides	2 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3

Milieu GLM

Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0-7,2

Milieu PDA

Poudre "potatoe dextrose agar"	39 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	15 g
pH	7,0

Milieu Chitine colloïdale agar (production des chitinases)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Agar	15 g

Chitine Colloïdale	12 g
Eau distillée	1000 mL

**Milieu Skim milk agar
(production des protéases)**

Hydrolysate pancréatique de caséine	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1,0 g
Solution de skim milk (7 %)	100 mL
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Lipase agar (production des lipases)

Peptone	10 g
NaCl	1,0 g
Tween 80	1 mL
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

**Milieu peptone agar
(production des cellulases)**

Extrait de levure	0,1 g
Peptone	0,5 g
Rouge congo	0,2 %
Carboxyméthyl cellulose	0,5 %
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

**Milieu Pikovskaya's
(solubilisation du phosphate)**

Glucose	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	traces
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0-7,2

Milieu CAS agar (production des sidérophores)

Chrome azurol	0,062 / 50 mL
Hexadexyltriméthylammonium bromide	0,072 / 40 mL
Solution de FeCl ₃ .6H ₂ O(dans HCl 10mM)	10 mL
Milieu King's base	950 mL

Milieu King's base

Protéose peptone	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu DF minimum (activité ACC désaminase)

ACC	3 mM
K ₂ HPO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Glucose	2 g
Acide citrique	2 g
Solution d'éléments	0,1 mL
Solution de FeSO ₄	0,1 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Acide gluconique	2 g
Eau distillée	1000 mL

Milieu Jensen (Fixation de l'azote)

Sucrose	20g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
NaCl	0,5g
FeSO ₄	0,1g
Sodium molybdate	0,005g
CaCO ₃	2g
Agar	15 g

Bouillon Nitrate (nitrate reduction)

Peptone	5 g
Extrait de boeuf	3 g
Nitrate de potassium	5 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0

Bouillon de l'urée (production de l'uréase)

NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Rouge phénol	0,2 % (6 mL)
Urée	20 % solution aqueuse
Eau distillée	1000 mL
pH	7,0 -7,2

Bouillon peptone (production de l'ammoniac)

Peptone 10 g
Eau distillée 1000 mL

N.B: L'ajustement des pH des différents milieux de culture se fait à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou d'une solution de HCl 1N selon le cas.

Constituants du complexe minérale DKW (Driver et Kuniyuki, 1984)

	Constituants	Solution mère (g/L)	Volume de prélèvement (pour 1 L)
Macroéléments DKW	A	Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	100 mL
		NH ₄ NO ₃	
		K ₂ SO ₄	100 mL
	B	KH ₂ PO ₄	
		CaCl ₂ , 2H ₂ O	
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 mL	
Microéléments DKW			MnSO ₄ , H ₂ O
			ZnSO ₄ , 6H ₂ O
			H ₃ BO ₃
			Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O
			CuSO ₄ , 5H ₂ O
			Na ₂ , EDTA
		FeSO ₄ , 7H ₂ O	

Constituants de la vitamine DKW (Driver et Kuniyuki, 1984)

	Constituants	Solution mère (g/100 mL)	Volume de prélèvement (pour 1L)
Vitamines DKW	Myo-inositol	10,0	5 mL
	Thiamine, HCl	0,2	
	Glycine	0,1	
	Acide nicotinique	0,2	

ANNEXES II: Solutions et Réactifs

Solution d'avoine*

Poudre d'avoine	20 g
Eau distillée	1000 mL

Faire bouillir pendant 20 min. Filtrer et réajuster le volume à 1000 mL avec de l'eau distillée.

Solutions d'oligo-éléments**

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
Eau distillée	100 mL

Solution d'oligo-éléments***

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,15 g
Eau distillée	100 mL

Solution d'éléments*

H ₃ BO ₃	0.01 g
MnSO ₄ .1H ₂ O	0.02 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.12 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08 g
MoO ₃	0.01 g
Eau distillée stérile	100 mL

Solution FeSO₄

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Eau distillée stérile	10 mL

Solution de laminarine 2 %

Laminarine	2 g
Eau distillée	100 mL

Solution d'acide dinitrosalicylique DNS (dosage des β-1,3-glucanases)

Acide 3,5-dinitrosalicylique	7,5 g
NaOH	14 g
Tatane de sodium de potassium	216 g
Na ₂ S ₂ O ₅	5,9 g
Phénol	5,4 mL
Eau distillée	1000 mL

Solution d'acide picrique (Test de HCN)

Acide picrique	0,5 g
Na ₂ CO ₃	2 %
dH ₂ O stérile	100 mL

Solution de BSA (Bovine Serum Albumine)

1 mg/mL de solution de BAS a été préparé par dissolution de 1 mg de poudre de BSA dans 1 ml d'eau distillée

Solution de Triton X-100

Mésurer 2,5 ml de Triton X-100

Compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée

Solution de Tris-HCl, Triton X-100C, C=100 mM, pH 7,5, V=1000 mL

Peser 1,58 g de Tris base

Dissoudre dans 500 mL d'eau distillée

Additionner 100 mL de Triton X-100

Compléter le volume à 1000 ml avec l'eau distillée

Ajuster le pH à 7,5

Solution de Tampon Tris-Maléate pH 7,2, C=0,1 M, V=500 mL

Peser 6 g Tris base

Dissoudre dans in 400 mL d'eau distillée

Additionner 6,7 g d'acide malique

Additionner 277 mg de CaCl₂

Additionner 1 g de Guiacol et compléter le volume à 500 mL

Ajuster le pH à 7.2

Réactif pour la réduction des nitrates

Solution A: 0,6 g 1-naphthylamine dans 100 mL d'acide acétique (5N)

Solution B: 0,8 g d'acide sulphanilique acide dans 100 mL d'acide acétique (5N)

Réactif de Salkowski (dosage de l'auxine)

H ₂ SO ₄ conc	150 mL
-------------------------------------	--------

FeCl ₃ .6H ₂ O (0,5 M)	7,5 mL
--	--------

Eau distillée stérile	250 mL
-----------------------	--------

Réactif de Bradford

Le réactif de Bradford a été préparé 50 mg de Bleu de Commassie G 250 dans 25 mL d'éthanol 95 %. Le mélange a été agité pendant 30 min, ensuite 50 ml d'acide orthophosphorique 85 % ont été additionnés et le mélange a été homogénéisé pendant 10 min. le volume a été complété à 500 ml avec de l'eau distillée, puis filtré et conservé à 4°C.

ANNEXES III: Figures des protocoles des différents dosages et les courbes d'étalonnage

10 colonies pures d'actinobactéries âgées de 5 jours

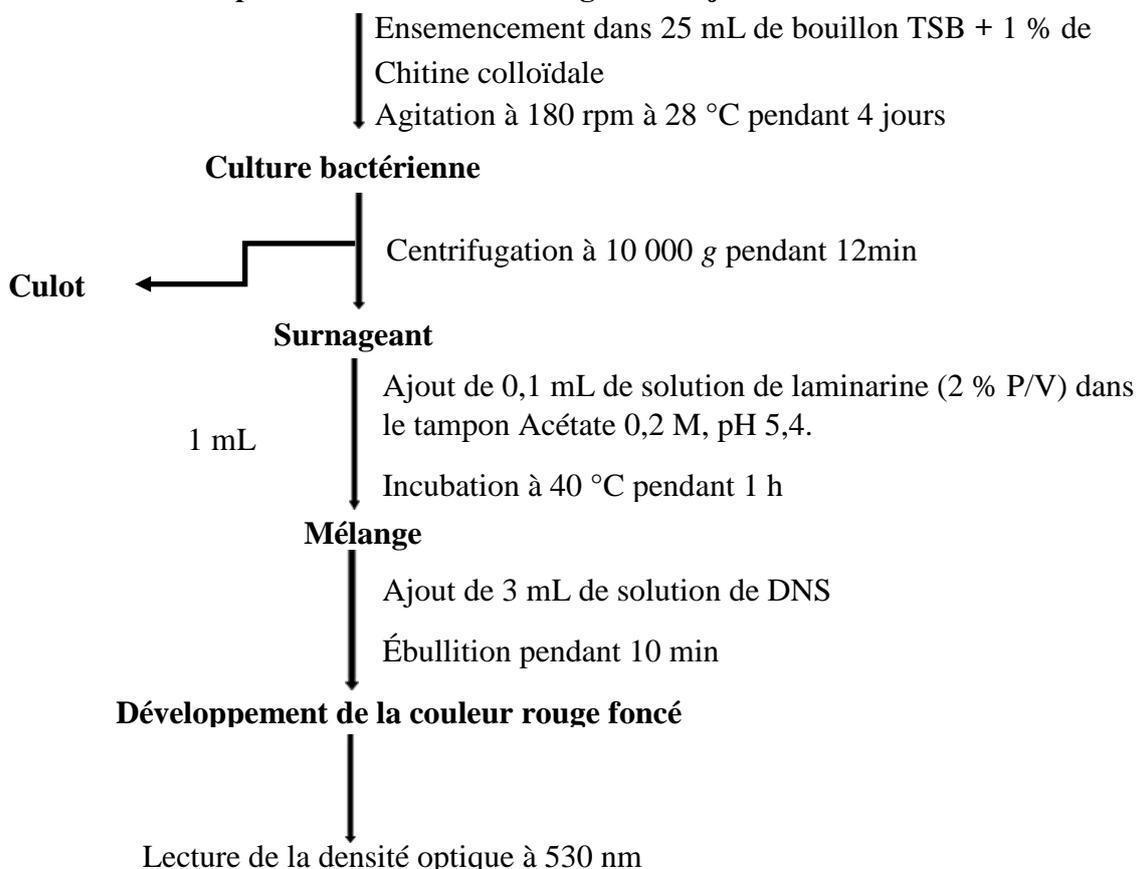


Figure annexe 3.1: Protocole de dosage de l'enzyme β -1,3-glucanase.

Courbe d'étalonnage du dosage des β -1,3-glucanases

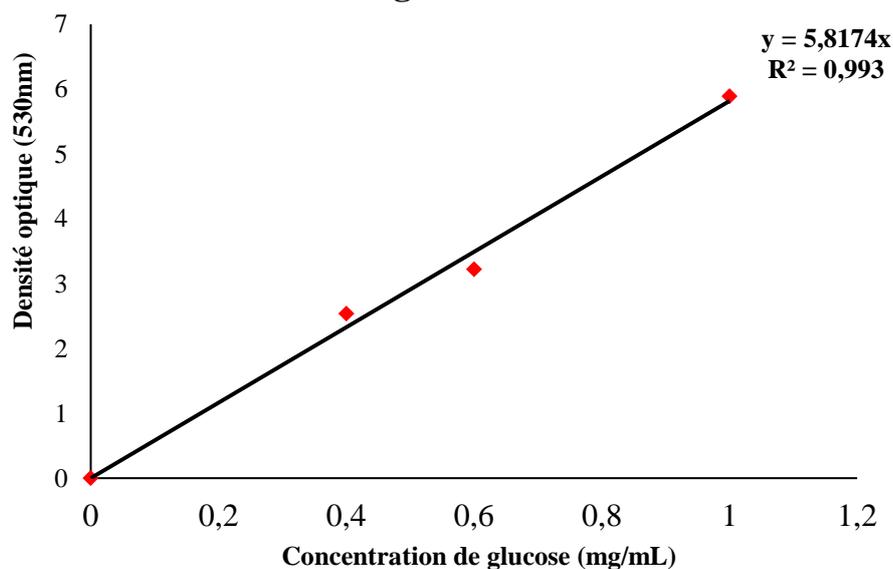


Figure annexe 3.2: Courbe d'étalonnage du dosage de l'enzyme β -1,3-glucanase.

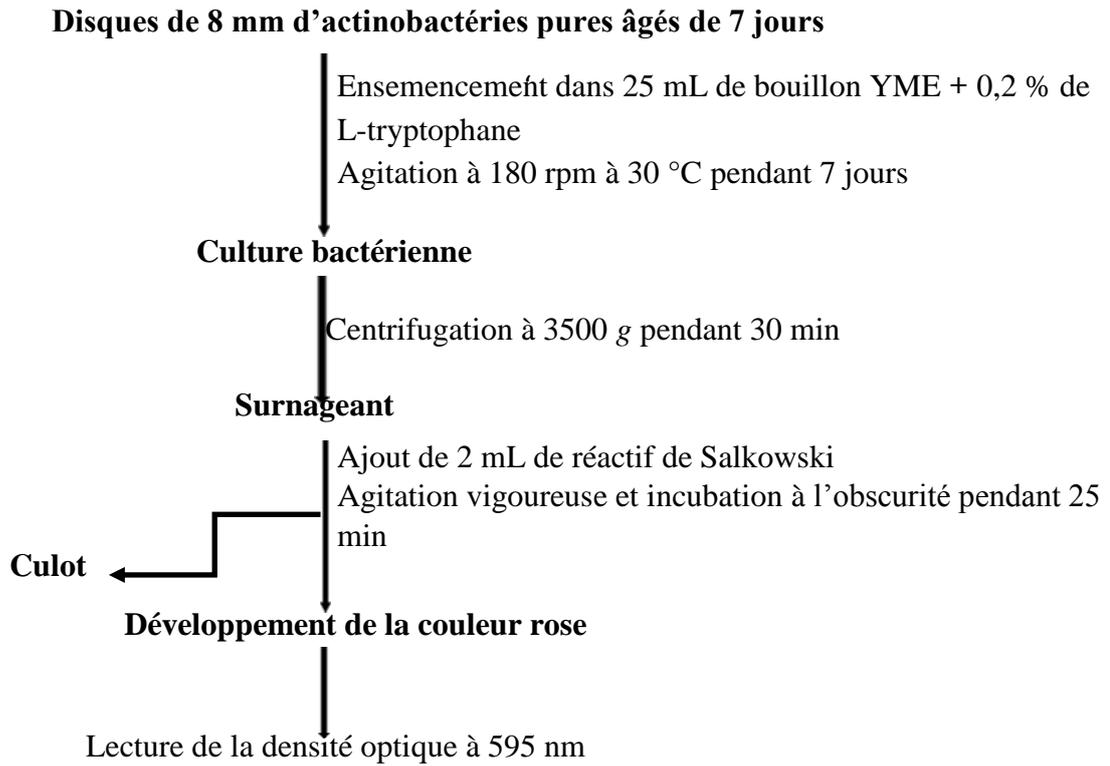


Figure annexe 3.3: Protocole de dosage de l'Acide Idole Acétique.

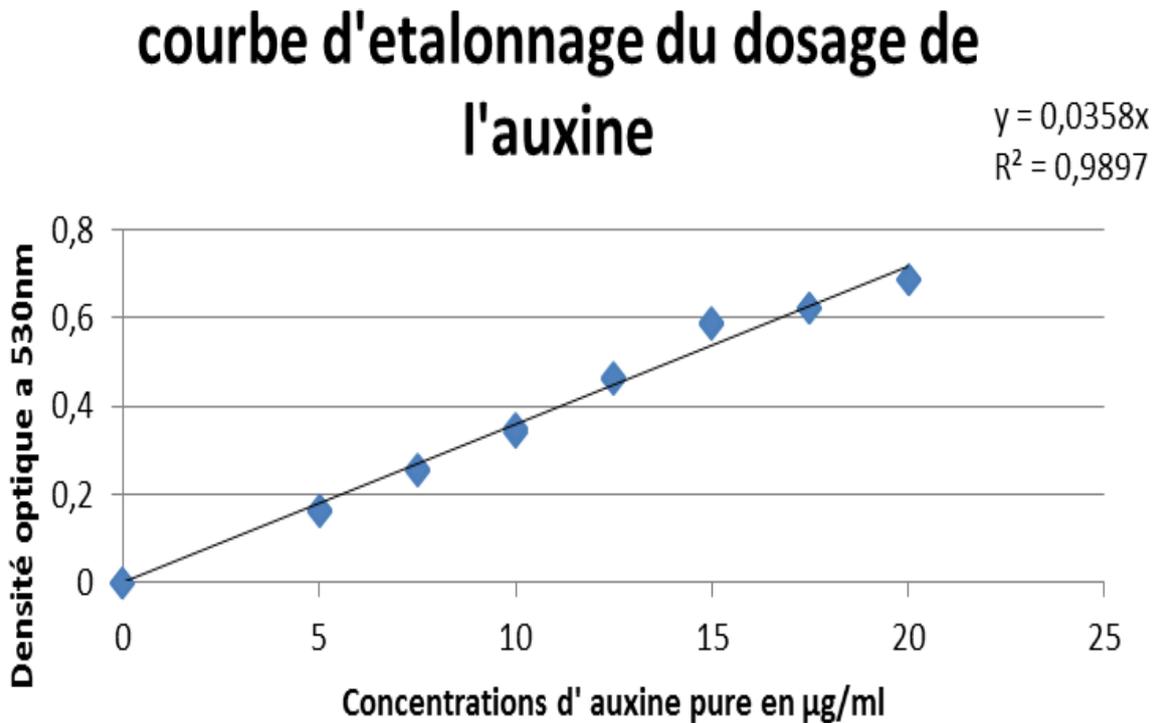


Figure annexe 3.4: Courbe d'étalonnage du dosage de l'Acide Indole Acétique.

10 colonies pures d'actinobactéries âgés de 5 jours

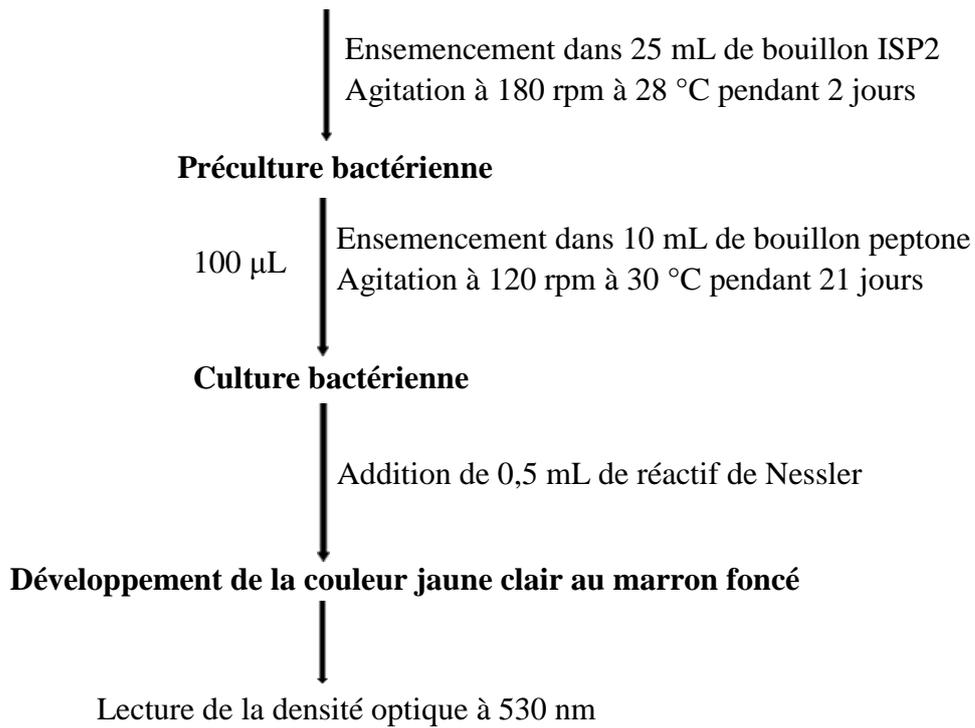


Figure annexe 3.5: Protocole de dosage de l'ammoniac.

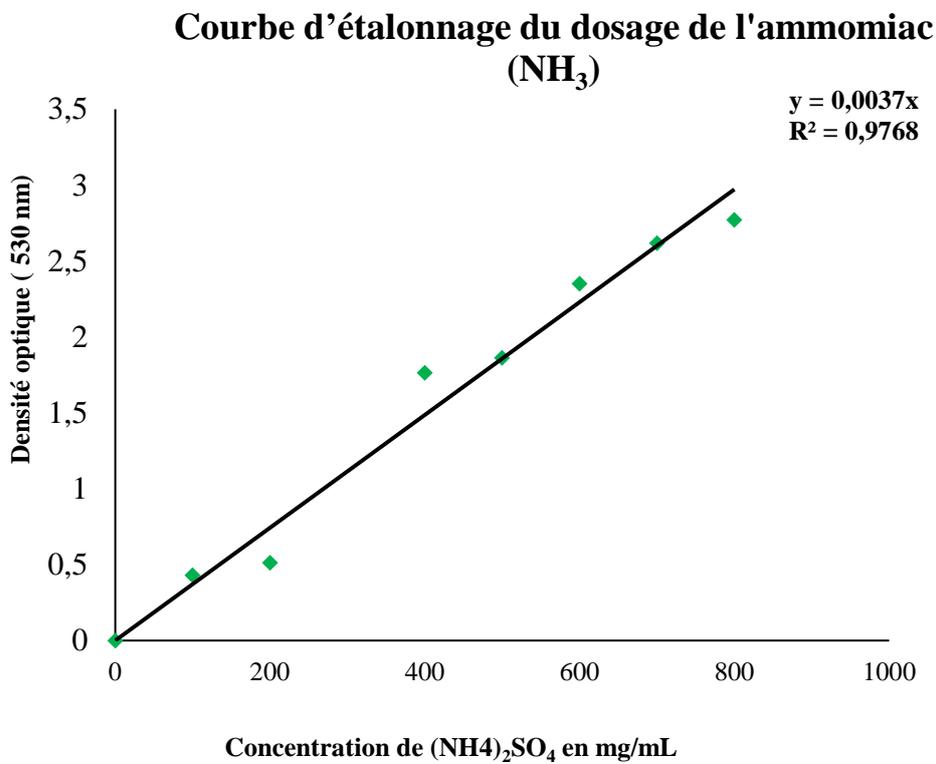


Figure annexe 3.6: Courbe d'étalonnage du dosage de l'ammoniac.

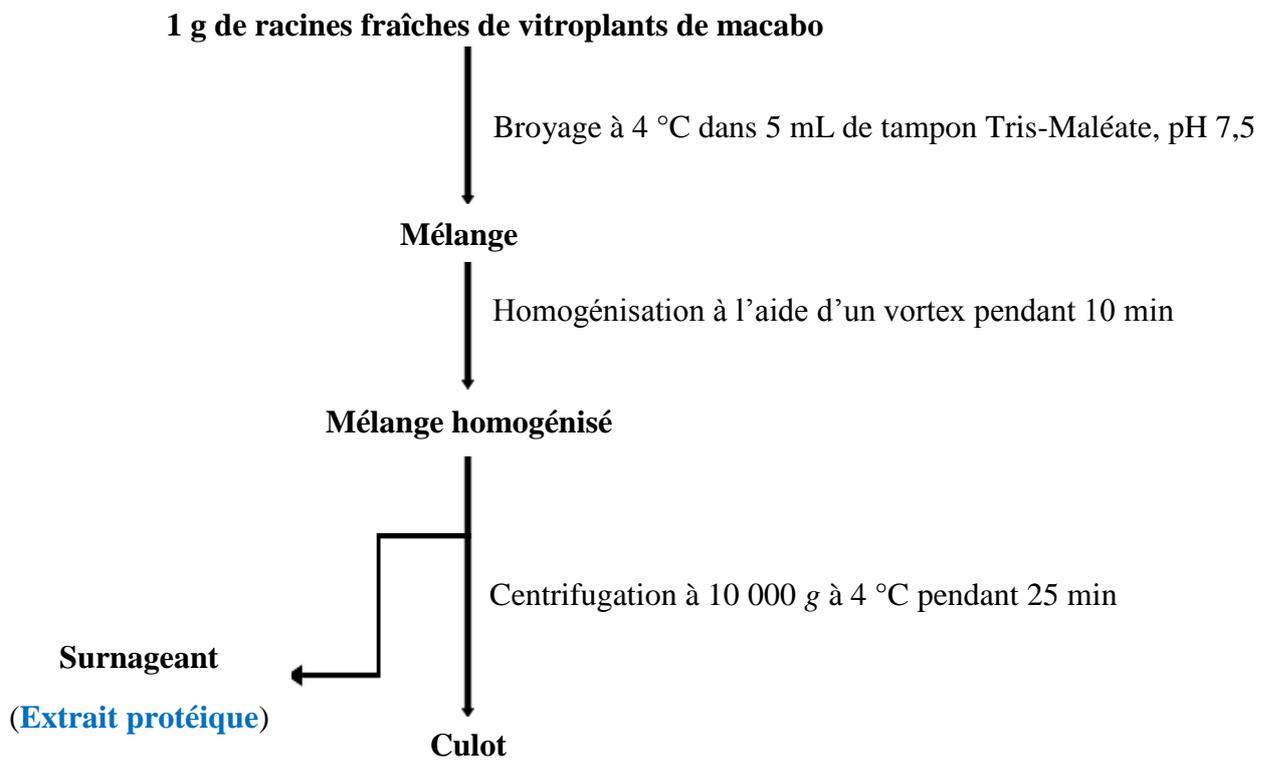


Figure annexe 3.7: Protocole d'extraction des protéines totales.

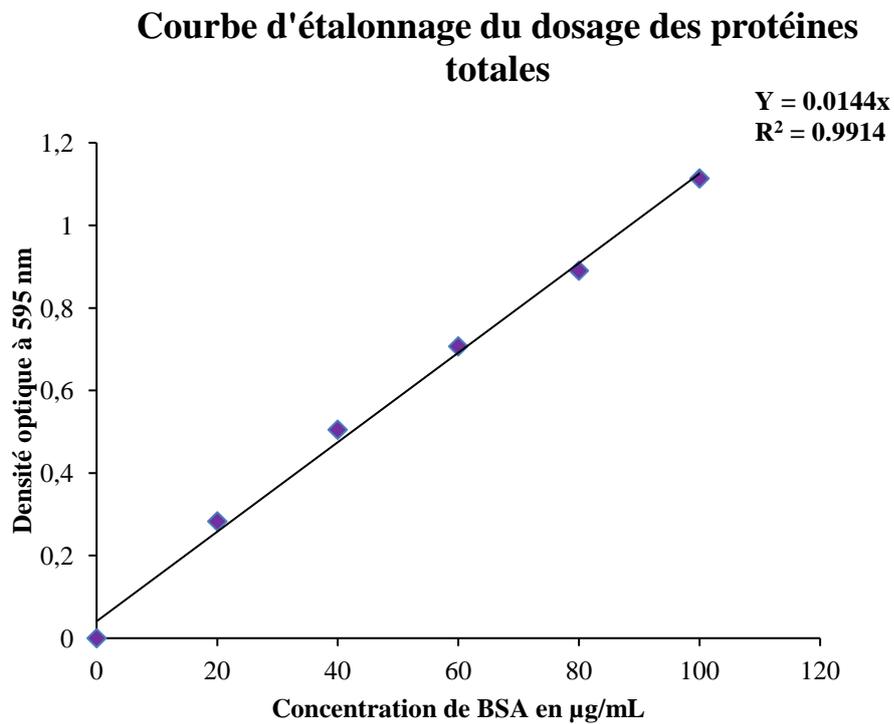


Figure annexe 3.8: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines totales.

Annexe 4: Chromatogrammes issus de l'analyse GC-MS des extraits bruts des souches sélectionnées

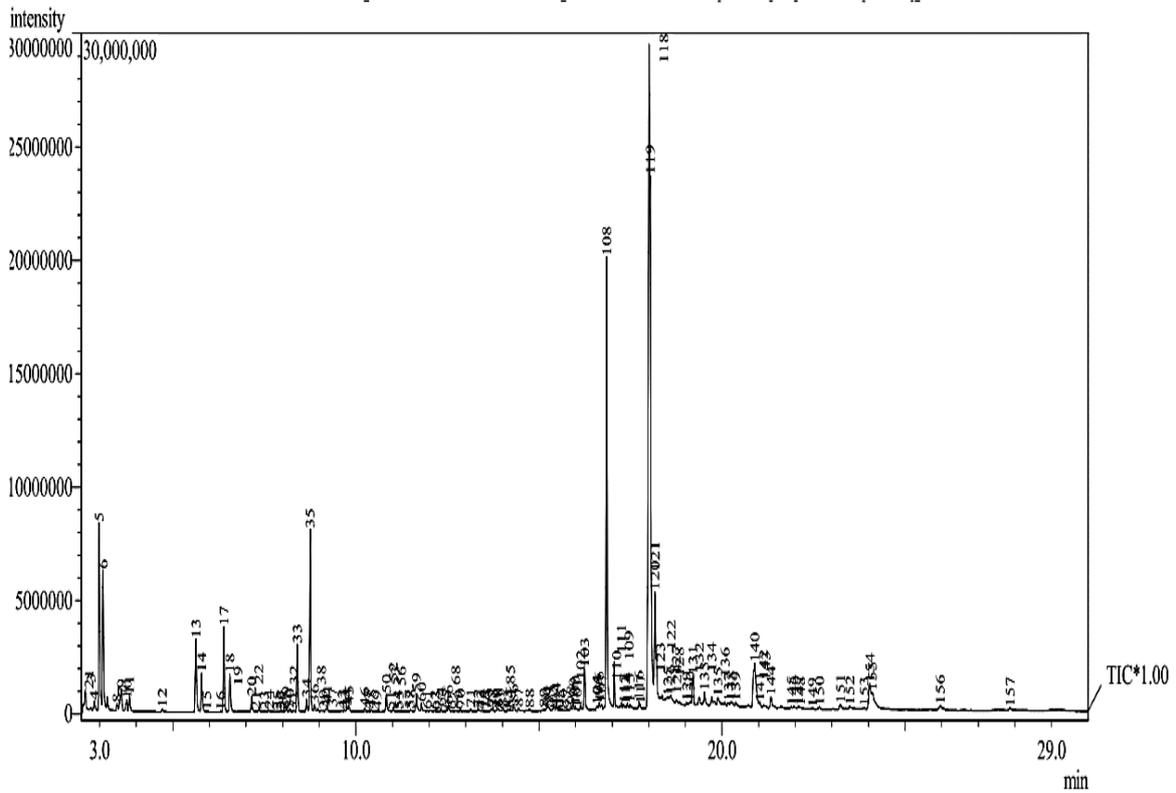


Figure annexe 4.1: Chromatogramme de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PFK4

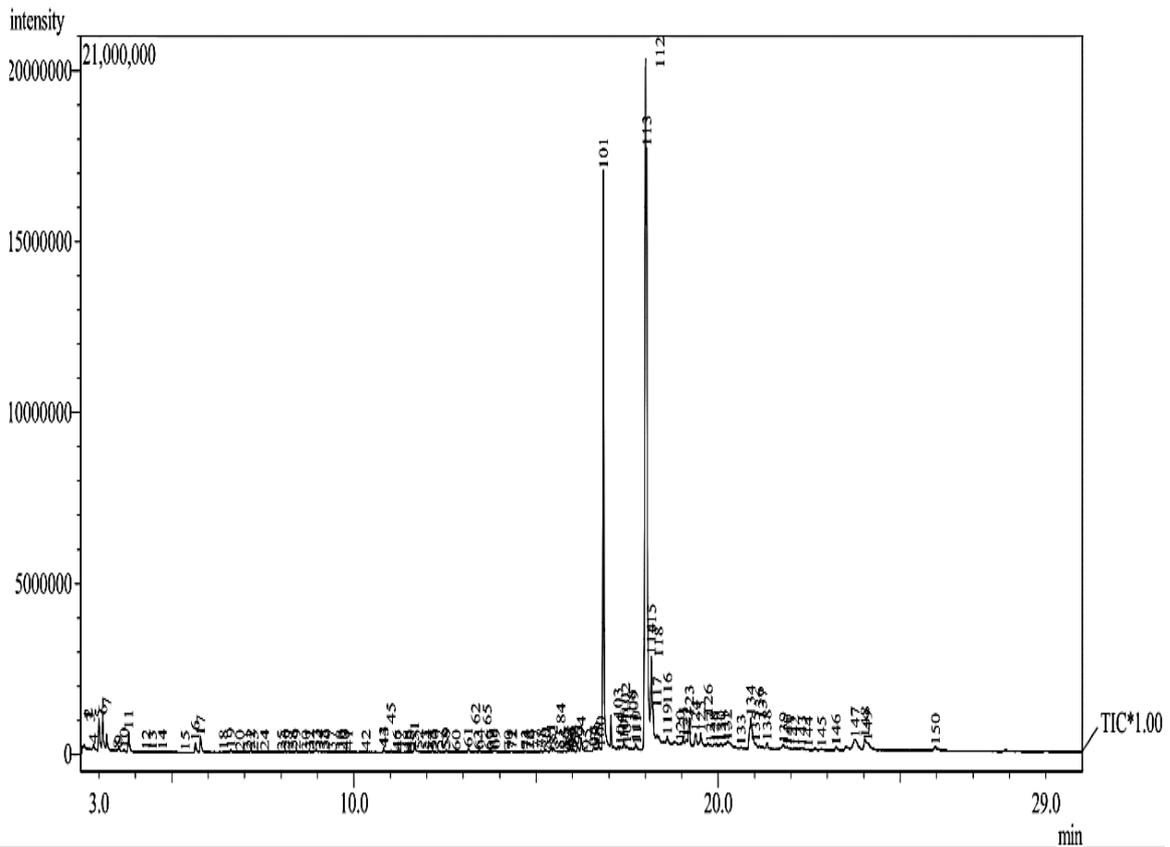


Figure annexe 4.2: Chromatogramme de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM1.

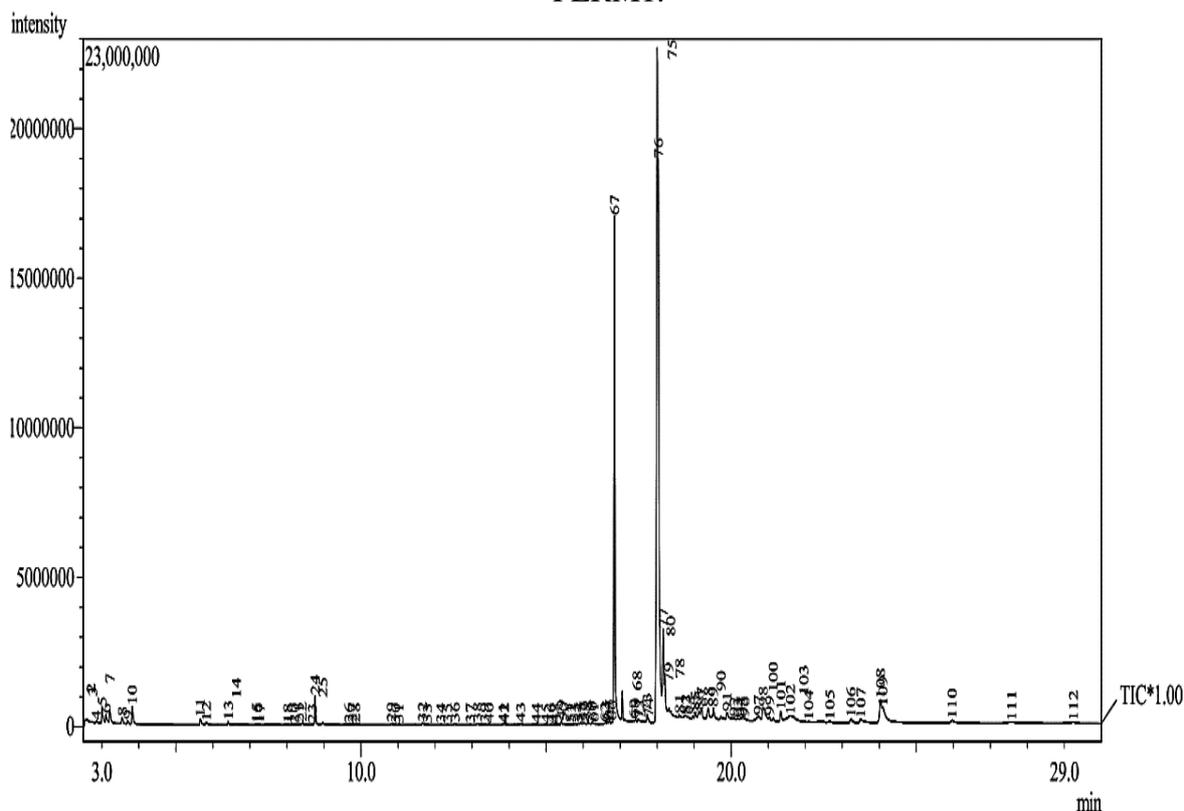


Figure annexe 4.3: Chromatogramme de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM2.

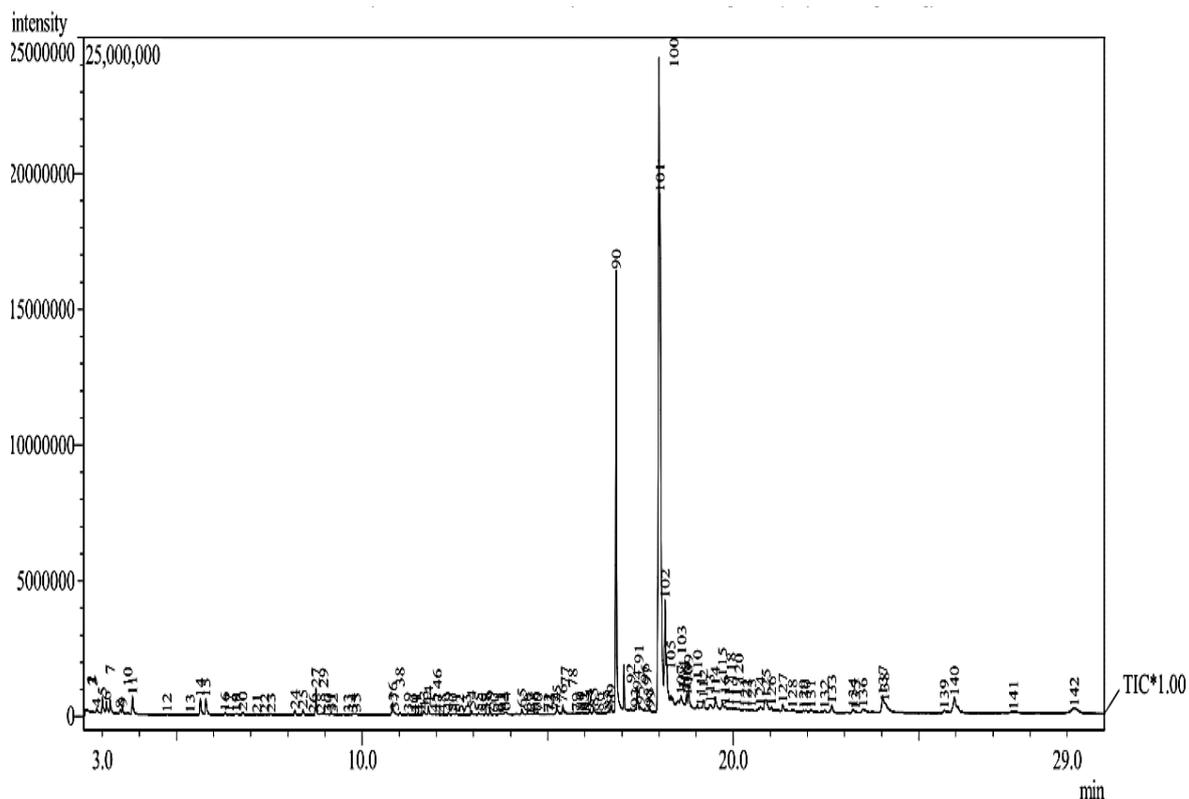


Figure annexe 4.4: Chromatogramme de l'analyse GC-MS de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. PERM4

Annexe 5: Séquences de l'ADNr 16S des isolats antagonistes obtenus après amplification avec des amorces universelles BSF 8/20 et BSR 1541/20

Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PERM1 (KY400012)

TGCAGTCGAACGATGAACTTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAGTGGGCAA
TCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATCGCAT
GGTCTCCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGAT
GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGAYTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCMCAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCG
ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGC
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCGGATGTGAAAGCCCGGG
GCTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAATCGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCT
TGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGGCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCAGCGGAGCA
TGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATAACCCGAAAGCATCAGG
ACGGTGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTATGTTGGG
TTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGTGGGGACTC
ACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATT
CTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTAATGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGC
AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGT
CGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGA

Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PERM2 (KY400013)

TGCAGTCGAACGATGAAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACGCGTTCCCGCA
TGGGATACGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT
GATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCMCACTGGGACTGAG
ACMCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCTGAG
TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCGGATGTGAAAGCC
CGGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC
GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTT
CCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATAACCCGAAAM
CTCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGG
GGACTCACAGGAGACTGCCCGGGTCAACTTCGRAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC
CCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGG
AGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGT
CGTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGGTC
ACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGT
GGGACTGGCG

Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PERM4 (KY400014)

TGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
TCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGTTTCACAGGCAT
CTGTGATTCTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAA
CGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACMCG
GCCAGAYTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCMCAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CSCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACG
GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGG
CTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATAC
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCGG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAG
CATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAG
AGATAGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCSTCAGCTCGTGTGCTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGG
GACTCACGGGARAACCGCCGGGGTCAACTCGRAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCC
CTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAG
CGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCG
CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGT
GGGACTGGCGA

Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PERM5 (KY400015)

TGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
TCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCCGCCTGGGCA
TCCAGGCGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGTAA
CGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCMCAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGS
GACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCGA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCG
GGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGA
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCG
GAGCATGTGGCTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCT
GGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCT
GGGACTCACGGRARACCGCCGGGGTCAACTCGGARGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC
CCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGA
GCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTC
GCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGG
TGGGACTGGCG

Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PFK4 (KY400017)

TGCAGTCGAACGATGAACCTTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATCGCA
TGGTCTCCGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT
GATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCMCAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACSCCGCKTRAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGT

GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCG
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCGTCGGATGTGAAAGCCC
GGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCC
TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG
ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTC
CCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGC
GGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATAACCCGGAAAGC
ATCRRAGACGSKGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGKGTCKT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGT
GATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA
TGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATAACCGCGAGG
TGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG
AGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCG
AAGTGGGACTGGCGATTGGACGAAGT

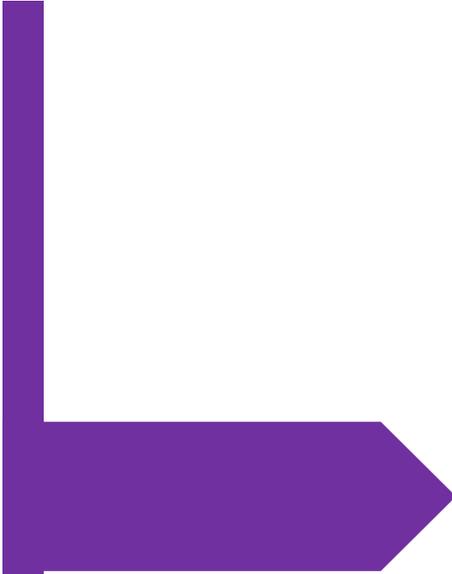
Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PFBOT7 (KY40018)

TGCAAGTCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATCGC
ATGGTCTCCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGG
TGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGAYTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGSGACGCCCGTGTAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCSCGAG
TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCGTCGGATGTGAAAGCC
CGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGGCAGGGGAGATTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC
GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTG
CCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATAACCCGGAAG
CCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTCC
TGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAACTCCTTTCGGGG
AGGTTGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGACGCGATGCCGTGAGG
TGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCG
AAGTGGGACTGGCGATTGGACGAAGT

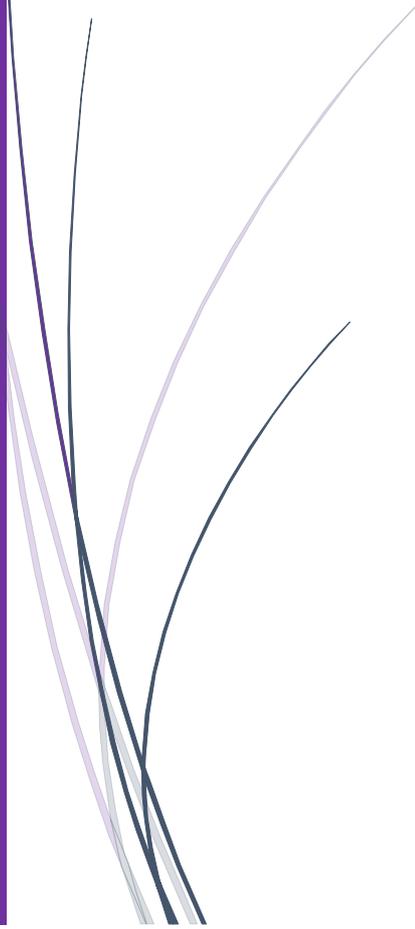
Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces* sp. PFEL2 (KY40019)

TGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
TCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGAGCCTGGGAGGCAT
CTCCTGGGTTGTAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTTAA
TGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGSCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGAYTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCCGTGTAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCG
AGGCTTAACCTTCGGTCTGCAGTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCG

GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCA
TTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCTGA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGKGC
TGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGARGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG
CCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTG
GAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCTGTCGAAGG
TGGACTGGCGATTGGACGAAG



PUBLICATIONS



– COMMUNICATIONS ORALES ET PRESENTATIONS POSTERS

Peguy Flora Kouomou Djuidje; Thaddée Boudjeko; Maurice Tagatsing; Gwendoline; Sylvain Lerat; Carole Beaulieu; Mui-Yun Wong. Efficacité Biocontrôle de *Streptomyces* sp. PFK4 et l'activité antifongique de ses métabolites bioactifs contre *Phythium myriotylum*, agent causal de la pourriture racinaire du macabo. **Communication Orale** présentée à la **6^{ème} Conférence Internationale organisée par l'Institut de l'Excellence PKFOKAM du 11 au 13 Juin 2019 à Yaoundé-Cameroun sur la thématique «Science et Technologies».**

Peguy Flora Djuidje Kouomou; T Boudjeko; W Sultan; S.B Nouemssi; Lerat S; C Beaulieu; M-Y. Wong. *Streptomyces* endophytes antagonistes contre *Pythium myriotylum* et attributs promoteurs de la croissance du macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). **Communication Orale** présentée à la **5^{ème} Conférence Internationale organisée par l'Institut de l'Excellence PKFOKAM du 12 au 14 Juin 2018 à Yaoundé-Cameroun** sur la thématique «Technologies (ou arts utiles) et Recherche Scientifique Appliquée» Clé du success ?

Peguy Flora Djuidje Kouomou; Thaddée Boudjeko; Wael Asultan; Serges Basile Nouemssi; Sylvain Lerat; Carole Beaulieu; Mui-Yun Wong. *Streptomyces* antagonistes, caractérisation taxonomique, propriétés promotrices de la croissance du macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) et analyse des composants biochimiques. **Communication Orale** présentée à la **24^{ème} Conférence Annuelle de la Société Camerounaise de Biosciences sur la thématique organisée du 30 Novembre au 02 Décembre 2017 à l'Université de Buea–Cameroun** sous la thématique «Recherche pour un Cameroun Emergent».

Djuidje Kouomou P.F. Ewane, C.E., Lerat, S., Beaulieu C; Boudjeko, T. Évaluation des activités antagonistes et traits promoteurs de la croissance des actinobactéries isolées de la rhizosphère du macabo (*Xanthosoma Sagittifolium* L. Schott) autour du Mont Cameroun. **Présentation Poster** lors de la **5^{ème} Conférence Internationale de l'OWSD (organization for Women in Science and Technology for Developing World) organisée du 16 au 19 Mai 2016, à Kowait city au Koweït.**

Djuidje Kouomou Peguy Flora., Ewane Cecile Annie., Lerat Sylvain., Beaulieu Carole and Boudjeko Thaddee. Évaluation des activités antagonistes et traits promoteurs de la croissance de la plante des actinobactéries isolées de la rhizosphère du macabo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) autour du Mont Cameroun. **Communication Orale** présentée lors de à la **9^{ème} Conférence Annuelle sur la Protection des Plantes dans les Tropiques organisée du 03 au 05 Août 2016 à Kuching, Sarawak-Malaisie.**

Djuidje Kouomou Peguy Flora, Ewane Cecile Annie, Lerat Sylvain, Beaulieu Carole, Wael Alsultan, Wong Mui Yun; Boudjeko Thaddee. Actinobactérie antagoniste contre *P. myriotylum*, agent causal de la pourriture racinaire du macabo, caractérisation taxonomique et propriétés promotrices de la croissance de la plante. **Communication Orale** présentée lors de la **Conférence Internationale sur les Innovations en Chimie, Agriculture et Sciences Biologiques organisée du 07 au 08 Décembre 2016 à Singapour.**

Djuidje Kouomou P.F., Ewane, C.E., Lerat, S., Beaulieu, C., Boudjeko T. Actinobactéries antagonistes contre *P. myriotylum*, agent causal de la pourriture racinaire du macabo, caractérisation taxonomique et propriétés promotrices de la croissance de la plante. **Présentation Poster** lors de la **22^{ème} Conférence de la Société Camerounaise des Biosciences organisée du 03 au 05 Décembre 2015 à IRAD de Nkolbisson, Yaoundé-Cameroun.**

Djuidje Kouomou P.F., Boudjeko T., Lerat S., Simao-Beaunoi A.M., Beaulieu C. Criblage et caractérisation des bactéries promotrices de la croissance de la plante isolées des sols rhizosphériques du (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) de la région du Sud-Ouest Cameroun. **Communication Orale** présentée à la **8^{ème} Conférence Annuelle de la Journée du Centre Sève organisée du 13 au 14 Novembre 2014 à Orford-Canada.**