

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département des Sciences Biologiques
Mémoire en Vue de l'Obtention du Diplôme MASTER ACADEMIQUE
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques



Spécialité : Biotechnologie végétale

Préparé par : KENZARI Maroua

Thème

INTERACTION ENTRE LES RHIZOBIA NODULANT L'ARACHIDE
(*Arachis hypogaea* L.) ET QUELQUES CHAMPIGNONS
PHYTOPATHOGENES

Soutenu publiquement

Le 30/06/2021

Devant le jury :

| | | | |
|--------------|------------|------------|-------------|
| Président | SALHI N. | Professeur | UKM Ouargla |
| Promoteur | ATTAB S. | MAA | UKM Ouargla |
| Co-promoteur | AZIB S. | MCB | UKM Ouargla |
| Examineur | CHAABNA A. | MAA | UKM Ouargla |

Année universitaire : 2020 - 2021

Remerciements

Le messager d'Allah dit : « Celui qui emprunte un chemin pour y rechercher la connaissance, Allah lui fait emprunter un chemin parmi les chemins du Paradis. Les anges rabaissent leurs ailes en signe de satisfaction pour celui qui recherche la connaissance. Tout ceux qui sont dans les cieux et la terre, jusqu'aux poissons dans l'eau, implorent le pardon d'Allah pour le savant » Ibn Hibbân, Le Prophète (paix et bénédictions d'Allah soient sur lui) a dit : "Quiconque ne remercie pas les gens ne remercie pas Allah." al-Tirmidhi

Un remerciement à mes très chers parents spécialement ma mère, qui m'ont toujours soutenu, mes mots ne suffisent jamais. Sans eux et bien sûr après dieu, je ne serais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui, Merci mes parents pour le fait d'être toujours avec moi, que dieu vous bénisse, vous accorde santé, longue vie et vous offre le paradis. Je tiens également à remercier mes sœurs, mon frère, ma famille et tous mes amies surtout mes belles Yasmine et Zineb et Bouchra.

Je tiens à remercier, mon encadreur, Madame ATTAB S pour sa disponibilité, sa patience, ses précieux conseils et son appui scientifique, je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie. Mes remerciements s'étendent M. AZIB pour son aide, merci également au professeur SALHI N d'avoir présider mon jury et M. CHAABNA d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, et à différents moments, m'ont apporté leur aide même avec des invocations. Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont directement ou indirectement, participé à ce travail, les auteurs des articles et des thèses citées, et à tous ceux que j'ai oublié de citer et qu'ils mériteraient.

Table de matière

| | |
|--|-----------|
| Liste des abréviations | 5 |
| Liste des annexes | 6 |
| Liste des figures..... | 7 |
| Liste des Photos..... | 9 |
| Liste des tableaux | 10 |
| Introduction Générale..... | 11 |
| 1 Introduction..... | 1 |
| Chapitre I : Revue bibliographique | 4 |
| 1 Origine de l'arachide..... | 5 |
| 2 Systématique et taxonomie d'arachide..... | 4 |
| 2.1 Stades de développement | 4 |
| 2.2 Importance d'arachides | 5 |
| 2.3 Utilisation, Importance nutritionnelle | 5 |
| 2.4 La production mondiale | 6 |
| 2.5 La production algérienne..... | 6 |
| 2.6 Interaction Rhizobium-légumineuses..... | 7 |
| 2.7 Chimiotactisme et dialogue moléculaire | 7 |
| 2.8 Biochimie de la fixation biologique d'azote | 9 |
| 3 Le microsymbionte arachide | 10 |
| 3.1 Taxonomie des rhizobia | 10 |
| 3.2 Utilisation des rhizobia dans la lutte biologique | 12 |
| 4 Les champignons Phytopathogènes..... | 13 |
| 4.1 Définition de la phytopathologie..... | 13 |
| 4.2 Les grands groupes des champignons phytopathogènes | 13 |
| 4.2.1 Les champignons à plasmode (Plasmodiophoromycota)..... | 13 |
| 4.2.2 Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques..... | 13 |
| 4.2.2.1 Ascomycètes et les Deutéromycètes..... | 13 |
| 4.2.2.2 Basidiomycètes..... | 14 |
| 4.3 Les phytopathogènes..... | 14 |
| 4.3.1 Les maladies non parasitaires | 14 |
| 4.3.2 Les maladies parasitaires | 14 |
| 4.4 Les maladies fongiques des Arachides | 14 |
| Chapitre II Matériel et méthodes | 16 |
| 1 Objectif..... | 17 |
| 2 Matériel biologique | 17 |
| 3 Méthodologie | 17 |
| 3.1 Provenance des bactéries..... | 17 |
| 3.1.1 Revivification des bactéries | 17 |

| | | |
|---|---|----|
| 3.1.2 | Caractérisation Morphologique et physiologique..... | 17 |
| 3.1.3 | Tolérance de température..... | 17 |
| 3.1.4 | Tolérance au sel..... | 16 |
| 3.1.5 | Résistance intrinsèque aux antibiotiques..... | 16 |
| 3.2 | Provenance des champignons..... | 16 |
| 3.2.1 | Revivification des champignons..... | 16 |
| 3.3 | Tests d'antagonisme..... | 16 |
| 3.4 | Potentialités antagonistes <i>in vitro</i> des isolats..... | 17 |
| 3.4.1 | Méthode de confrontation directe bactérie/champignons en boîte de Petri..... | 17 |
| 3.4.2 | Méthode de confrontation indirecte bactérie/champignons en boîte de Petri..... | 18 |
| 3.4.3 | Lecture de la croissance des champignons..... | 19 |
| 3.4.4 | Mise en évidence de sécrétion de substance inhibitrice..... | 19 |
| 3.4.5 | Coloration et observation microscopique des champignons..... | 19 |
| Chapitre III Résultats et discussion..... | | 21 |
| 1 | Résultats..... | 21 |
| 1.1 | Résultat de l'antagonisme par confrontation directe sur boîte de Petri..... | 21 |
| 1.1.1 | Action des rhizobia sur le <i>Fusarium Oxysporum</i> | 21 |
| 1.1.2 | Action des rhizobia sur <i>Cladosporium sp.</i> | 22 |
| 1.1.3 | Action des rhizobia sur <i>Aureobasidium sp</i> | 23 |
| 1.1.4 | Résultats de confrontation indirecte bactérie/champignons dans des boîtes de Petri..... | 23 |
| 1.2 | Mise en évidence des substances inhibitrices sécrétées..... | 25 |
| 1.2.1 | Confrontation directe à partir des zones d'inhibition obtenues..... | 25 |
| 1.2.2 | Confrontation indirecte à partir des zones d'inhibition obtenues..... | 25 |
| 1.2.3 | Résultats d'observation microscopique..... | 26 |
| 2 | Discussion..... | 28 |
| Conclusion..... | | 31 |
| Référence bibliographique..... | | 33 |
| Annexe..... | | 41 |
| Résumé :..... | | 47 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| BNL | Bactéries Nodulant les Légumineuses |
| PDA | Milieu Potatoes Dextrose Agar. |
| YEM | Milieu Yeast Extract Mannitol Agar |
| Réf | Référence électronique |
| PGPR | Plant growth promoting rhizobacteria |

Liste des annexes

Liste des annexes

| | | |
|-----------------|--|----|
| Annexe 1 | Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) | 40 |
| Annexe 2 | Milieu YEM (Yeast Mannitol Agar) | 40 |
| Annexe 3 | Photo 1. Les deux types de coloration dans les lames Prépare | 40 |
| Annexe 4 | Photo 2. La confrontation directe sur les boites des pétri | 40 |
| Annexe 6 | Photo 4 : Confrontation directe à partir des zones D'inhibition obtenues | 43 |
| Annexe 7 | Photo 5 : Confrontation à partir des zones d'inhibition Obtenues | 46 |

Liste des figures

Liste des figures

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 1 | Représentation d'une plante d'arachide. | 3 |
| Figure 2 | Arbre phylogénétique des Papilionoideae | 4 |
| Figure 3 | Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia Légumineuse | 8 |
| Figure 4 | Comparaison des phylogénies moléculaires bactériennes Et des légumineuses | 8 |
| Figure 5 | Structure du complexe enzymatique de la nitrogénase | 9 |
| Figure 6 | Nodule de d'arachide <i>Arachis hypogaea</i> | 10 |
| Figure 7 | Représentation schématique des mécanismes action directe et Indirecte employés par Les RGPR | 12 |
| Figure 8 | Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme. | 17 |
| Figure 9 | Méthode de confrontation indirecte sur milieu de culture par action des substances Volatiles entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène. | 18 |
| Figure 10 | Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons par confrontation indirecte | 21 |
| Figure 11 | Figure 11. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> confrontation directe | 22 |
| Figure 12 | Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de <i>Cladosporium</i> sp confrontation | 22 |
| Figure 13 | Figure 13 directe Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance d' <i>Aureobasidium</i> sp confrontation directe | 23 |
| Figure 14 | Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons par confrontation indirecte | 24 |
| Figure 15 | Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons de confrontation indirecte | 24 |
| Figure 16 | Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons à partir les zones d'inhibition en confrontation directe. | 25 |

Liste des figures

- Figure 17** Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons à partir les zones d'inhibition de confrontation indirect 25

Liste des Photos

Liste des Photos

| | | |
|----------------|--|----|
| Photo 1 | Mise en évidence de sécrétion de substance inhibitrice | 19 |
| Photo 2 | Observation microscopique des hyphes des champignons phytopathogènes dans la zone de confrontation avec les rhizobia (X100). | 27 |

Liste des tableaux

| | | |
|------------------|---|----|
| Tableau 1 | Les principaux pays producteurs d'arachide. | 6 |
| Tableau2 | Classification des rhizobia | 11 |
| Tableau3 | Liste des maladies fongiques de l'arachide | 14 |

Introduction Générale

1 Introduction

Depuis longtemps les légumineuses sont considérées comme des espèces qui peuvent améliorer la terre sur laquelle elles sont cultivées. Ils peuvent prospérer dans des environnements dépourvus d'azote car ils ne nécessitent pas d'engrais (Leysen et Goffart, 1977, Duke, 1981). Les légumineuses sont une bonne source de protéines, de minéraux et de vitamines et peuvent être utilisés pour l'alimentation animale et la consommation humaine (Morsy et Tarrad., 2005), D'autre part, elles fixent l'azote dans l'air par un processus important en association avec les procaryotes (Solargo, 2001). D'un point de vue écologique, les procaryotes peuvent être divisés en deux catégories. : fixateurs symbiotiques et non-symbiotiques (Tena et Magallanes, 1985).

La fixation symbiotique est le principal moyen pour l'azote de pénétrer dans l'écosystème sol/plante (Newton et *al.*, 1983). Elle est médiée par des bactéries symbiotiques appartenant à la famille des Rhizobium (Ndoye, 1990), dans lesquelles la symbiose rhizobium/légumineuses est contrôlée par un échange de signaux moléculaires très spécifique entre deux partenaires. Le succès des rhizobiums à infecter les légumineuses et la formation des nodules dépend de facteurs environnementaux et de la survie de ces bactéries et de leur tolérance à divers stress : sécheresse, salinité, chaleur et nutriments (Berrada et *al.*, 2012).

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est l'une des oléagineux les plus cultivés dans le monde (Aune, 2007). Il est produit dans diverses zones agro-écologiques et contribue également à la fertilisation naturelle du sol, comme la plupart des légumineuses fixatrices d'azote (Nwokolo, 1996). Sa culture en Algérie se développe (Benmohamed et *al.*, 2004), où il est cultivé dans plusieurs wilayas comme : EL-Tarf, Skikda, Ghardaïa, El Oued et Sidi Bel-Abbes. Cependant, en raison de la faible production et des grands changements, la production nationale est toujours inférieure à la demande. En fait, le rendement moyen en 2015 était d'environ 25 quarks/ha, tandis que le rendement potentiel de l'arachide était de 60-70 quarks/ha (anonyme, 2016).

Selon Oerke (2006), 70 % des dommages des culture sont causés par des champignons. Ces agents pathogènes sont des micro-organismes ubiquistes qui affectent les plantes, sont les plus destructeurs et causent des dégâts considérables aux cultures (Javier et *al.* 2014, Thilagam et *al.* 2018). Cependant, les champignons phytopathogènes deviennent incontrôlables en raison de leur résistance aux fongicides chimiques, nocifs pour l'environnement (pollution des sols, déséquilibre écologique, etc.) et l'homme. La plupart de

ces fongicides dangereux interdits dans les pays développés sont encore utilisés dans les pays en développement du monde entier (UNEP, 2000 ; Venkateswara et *al.*, 2005) ; cela est dû à l'analphabétisme et au manque de sensibilisation des agriculteurs de ces pays (Venkateswara et *al.* 2005). Cependant, d'autres méthodes de contrôle doivent être adoptées, telles que des stratégies de contrôle biologique, des mesures de protection de l'environnement inoffensives pour les cultures et les humains, y compris une gestion optimale des champignons phytopathogènes et des mauvaises herbes qui atteignent un sol fertile sans parasites (UNEP, 2000). Par conséquent, des recherches sérieuses ont été menées pour déterminer ces méthodes de protection des plantes (Prapagdee et *al.* 2008), Pour cette raison, une idée intéressante pour lutter contre les agents pathogènes est d'utiliser des agents microbiens antagonistes, tels que les biopesticides, qui offrent un potentiel très prometteur et réalisable grâce à la diversité des agents microbiens (Laird et *al.*, 1990). De plus, ces antagonistes sont généralement efficaces en petites quantités et leur activité protectrice peut être produite par divers mécanismes, de sorte qu'une faible pression de sélection déclenchera rarement une résistance aux agents pathogènes (Fravel, 2005 ; Lee et *al.* 2006). Ils sont aussi reconnus pour avoir un effet bénéfique sur le développement des plantes résultant d'une activité antagoniste envers certains agents pathogènes par la production de substances antimicrobiennes (Whipps, 2001), en plus de leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes (El-Tarabily et Sivasithaparam., 2006),

Rhizobium est considéré comme un antagoniste très efficace des champignons phytopathogènes. Il a été rapporté qu'ils sont d'importants inhibiteurs de la croissance de champignons pathogènes, tels que : *Pythium*, *Phaseolus Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora* (Bardin et *al.*, 2004 ; Kumar et *al.*, 2006 ; Hemissi et *al.*, 2011 ; Ozgonen et Gurku, 2011). D'où l'intérêt d'étudier l'action des souches de Rhizobia sur la croissance et l'inhibition de certains champignons phytopathogènes.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antagoniste in-vitro des rhizobia isolés des nodules d'arachide poussant principalement dans la région de Ghardaïa et ouargla envers trois champignons à savoir *Cladosporium* sp. *Fusarium oxysporum*, *Aureobasidium* sp. isolés de la même région.

Ce mémoire est élaboré en trois chapitres : (i) Le premier chapitre consiste en une revue bibliographique traitant l'espèce étudiée l'arachide et ses maladies fongiques causées par les champignons phytopathogènes et l'interaction rhizobium-arachide. Les deux autres

Introduction

chapitres sont consacrés à la partie pratique et les résultats obtenus : (ii) le second chapitre est consacré à l'étude de l'antagonisme entre ces bactéries rhizobiennes et les souches des champignons in vitro, (iii) le troisième chapitre renferme la discussion des résultats obtenus.

Chapitre I : Revue bibliographique

1 Origine de l'arachide

Le centre d'origine du genre *Arachis* se situe très probablement dans la région centre-sud du Brésil (Gregory et *al.*, 1980). L'espèce cultivée, *A. hypogaea* L.

On dit que les arachides ont été domestiquées il y a plus de 3 500 ans. Au XVI^e siècle, les Portugais l'ont introduit du Brésil, d'Afrique, d'Inde et d'Extrême-Orient. Les Espagnols ont ensuite importé l'espèce de la côte ouest de l'Amérique du Sud vers le Pacifique occidental, l'Indonésie et la Chine. Puis les cacahuètes se sont déplacées d'Asie vers l'Afrique de l'Est. Au milieu du XVI^e siècle, il s'est répandu en Amérique du Nord et dans d'autres parties du monde. En Afrique, la fusion des matériaux du Brésil d'une part et des Philippines, de l'Inde et de la Chine d'autre part, ont fait du continent le troisième pôle de diversification originel, mais elle est plus récente que la période initiale de domestication.

Les cacahuètes appartiennent à la famille des légumineuses, la sous-famille des *Papilionidae*. Une famille contenant plus de 17 000 espèces, constituant ainsi le groupe de plantes supérieures le plus riche et le plus diversifié. Les plants d'arachide se caractérisent par la longueur de la tige principale et de la branche principale de 0,20 à 0,70 m, selon la variété et les conditions environnementales. Les branches sont toujours herbacées, vert clair, vert foncé ou plus ou moins violet. Ils ont des cornes en section transversale quand ils sont jeunes, et deviennent cylindriques avec l'âge ; avec le temps, la moelle centrale disparaît et les vieilles tiges se creusent. (Clavell et Gautro, 1997). (**Figure1**).



Figure 1 : Représentation d'une plante d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (Réf élc 1) : feuille composée de 4 folioles, 2 : fleur, 3 : hypanthe, 4 : gynophore, 5 : gousse, 6 : bec de la gousse, 7 : constriction ; 8 : tégument de la graine, 9 : graine anstégument, 10 : cotylédon portant l'hypocotyle, l'épicotyle et la radicule.

2 Systématique et taxonomie d'arachide

Les cacahuètes font partie de la famille du soja. La famille est divisée en trois sous-familles : la sous-famille Mimosa, la sous-famille Cactus et la sous-famille Papilio. C'est dans cette dernière sous-famille que l'on trouve la plupart des fèves cultivées de haute importance économique. La famille Papilio peut être subdivisée en 4 clades principaux (**Figure2**) (Wojciechowski et al., 2004)

- Les *Phaseoloides* comprenant le haricot, le niébé, le soja...
- Les *Galegoides* comprenant le pois, les lentilles, les fèves, le pois chiche et les espèces modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*...etc.
- Les *Genistoides* comprenant le lupin...
- Les *Dalbergioides* comprenant l'arachide...

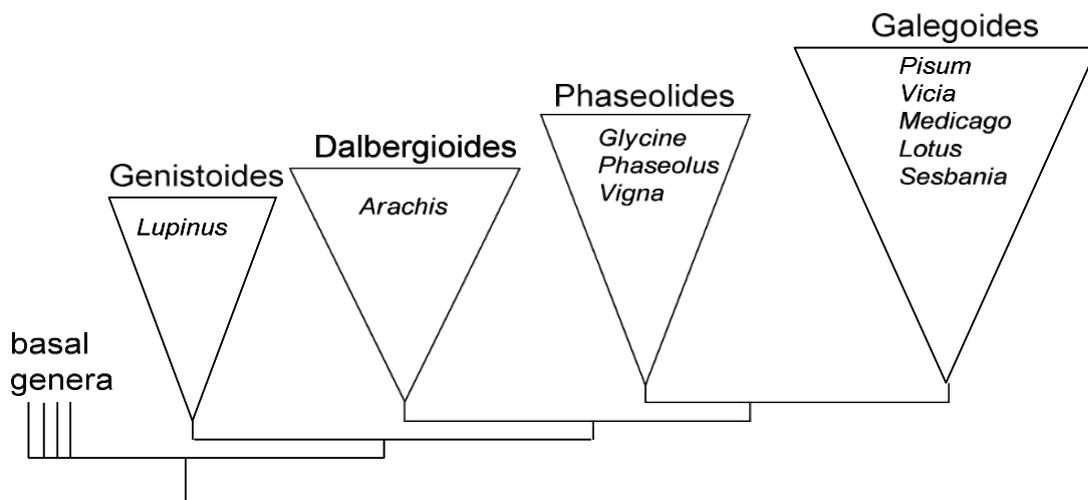


Figure2 : Arbre phylogénétique des *Papilionoideae* (Wojciechowski et al., 2004)

2.1 Stades de développement

L'arachide est une plante annuelle dont le cycle de développement varie de 90 à 125 jours en région tropicale. Trois grandes phases de développement peuvent être distinguées selon Boote (1982) :

- Germination - début floraison
- Floraison – fructification
- Fructification – maturation

2.2 Importance d'arachides

Le succès de la culture de l'arachide est principalement attribué à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, ce qui lui permet de fournir des rendements même modérés sur des sols pauvres avec une intervention minimale. Sa tolérance au froid lui permet de s'adapter à des climats relativement secs, et le développement souterrain de ses fruits le rend moins vulnérable aux agressions extérieures que les céréales (Annerose, 1990).

2.3 Utilisation, Importance nutritionnelle

L'arachide produite dans le monde est principalement transformée en huile, en farine et en dérivés qui entrent dans la composition de plusieurs produits alimentaires (confiserie, beurre de cacahuète, pâte d'arachide...). Durant la période 1996-2000, 49.2% de la production mondiale a servi à produire de l'huile et de la farine et 41.1% est entrée dans la composition de produits alimentaires (Revoredoet, 2002).

L'arachide est aussi utilisée pour l'alimentation animale. Par exemple, le tourteau qui résulte de l'extraction d'huile constitue un aliment riche en protéines pour le bétail. De même, dans la plupart des pays du Sahel, les fanes sont séchées après la récolte et apportées en foin pour l'alimentation animale. Elles constituent souvent l'un des principaux apports alimentaires pour les petits ruminants pendant la saison sèche. La montée des cours mondiaux du pétrole a provoqué une forte demande en énergies alternatives non-fossiles. La filière oléagineuse a été très tôt identifiée pour servir de biocarburant. Dans cette filière, l'huile d'arachide est de plus en plus présentée comme source potentielle pour la production de biocarburant. Cependant les coûts liés à sa production et la demande importante en huile alimentaire rendent l'huile d'arachide moins compétitive que les autres huiles d'origine végétale comme le soja par exemple. Pour pallier les problèmes de compétitivité de l'huile d'arachide, des recherches sont en cours à l'Université de Géorgie pour produire des variétés d'arachide à forte teneur en huile, impropres à la consommation humaine et à faible besoin en intrants. La variété « Georganic » qui semble répondre à tous ces critères est présentée comme l'avenir des biocarburants à base d'huile d'arachide (Réf élc)

2.4 La production mondiale

La production mondiale d'arachides (non décortiquées) s'est élevée à 37, 18 millions de tonnes en 2014 (Touil, 2017). Les principaux pays producteurs d'arachide sont indiqués dans le tableau 1.

| Pays | Production (Millions de tonnes) |
|----------------|---------------------------------|
| Monde | 37,18 |
| Chine | 16,6 |
| Inde | 5 |
| Etats unis | 2,97 |
| Nigeria | 1,55 |
| Indonésie | 1,15 |
| Argentine | 1,01 |
| Vietnam | 0,55 |
| Brésil | 0,26 |
| Afrique du sud | 0,12 |
| Nicaragua | 0,12 |

2.5 La production algérienne

En Algérie, la productivité reste faible. Le rendement moyen de l'arachide ne dépasse guère 25 qx/ha alors que chez quelques agriculteurs dits performants, les rendements peuvent dépasser 40 qx/ha et atteindre parfois les 60 qx/ha. Ce faible rendement de l'arachide peut être dû à la faible productivité des sols Algériens mais aussi à l'indisponibilité des semences de qualité ainsi que les pratiques culturales peu adaptées.

Plusieurs facteurs de l'itinéraire technique de cette culture peuvent être à l'origine de la réalisation de rendements élevés. Dans cet itinéraire, on note principalement le respect de la rotation, les travaux de préparation du sol, le choix de la date de semis, l'utilisation de semences saines ou traitées, la fertilisation, la conduite de l'irrigation et les traitements phytosanitaires. (Touil, 2017).

2.6 Interaction Rhizobium-légumineuses

L'interaction entre les Rhizobia et les légumineuses est chez la majorité des légumineuses tempérées spécifique. Cela a permis d'établir une première classification basée sur la spécificité d'hôte.

Les légumineuses tropicales telles que l'arachide, en Afrique sub-saharienne, sont nodulées par le genre *Bradyrhizobia* sp (Zhang et *al.*, 1999).

La symbiose légumineuse-rhizobia est le résultat d'une interaction hautement complexe de reconnaissance entre les deux organismes. La bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé le nodule encore appelé nodosité, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Rosenberg, 1997)

2.7 Chimiotactisme et dialogue moléculaire

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (**Figure3**). La plante émet des molécules essentielles à la réalisation de chaque étape du processus de nodulation et de fixation. Les flavonoïdes constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression des gènes de régulation de la nodulation (Peters et Verma, 1990). Ces flavonoïdes et / ou les isoflavonoïdes libérés de la racine de l'hôte des légumineuses induisent la transcription de gènes de nodulation dans des rhizobiums compatibles, conduisant à la formation de molécules de lipochitooligosaccharides qui, à leur tour, signalent à la plante hôte de commencer la formation de nodules. Ainsi, une centaine de gènes de la légumineuse et du rhizobium sont impliqués (Graham et Vance, 2003).

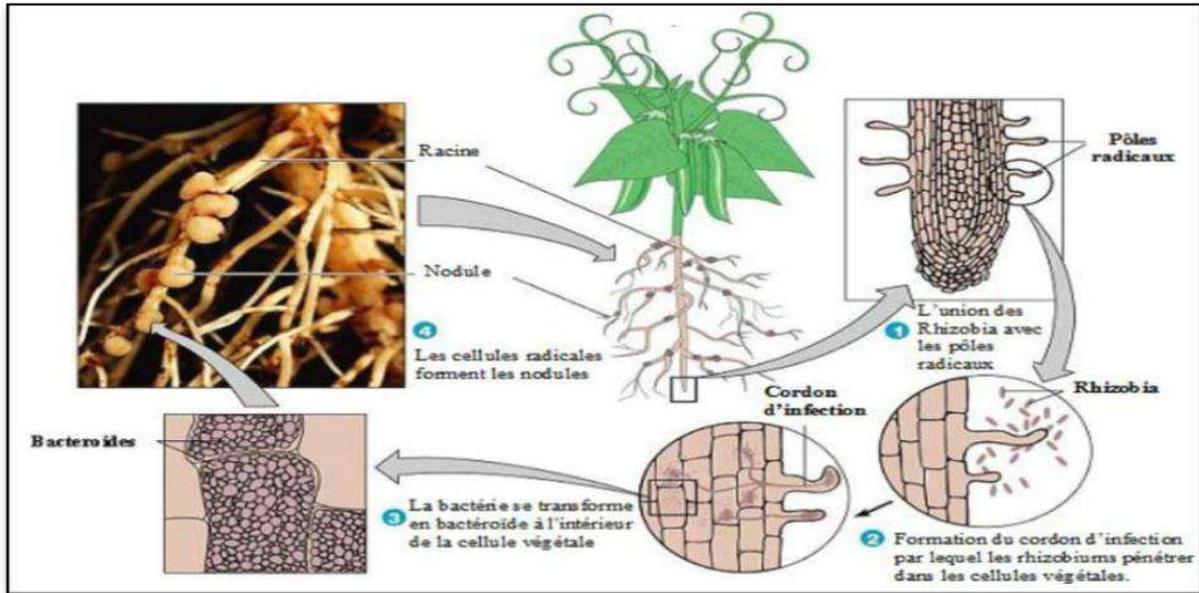


Figure3 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia légumineuse Réf élc 2

Pendant le processus de reconnaissance entre la légumineuse et le rhizobium, plusieurs facteurs biotiques et abiotiques peuvent altérer le processus d'infection et donc l'association symbiotique, mais aussi le processus de fixation d'azote.

En effet, l'association symbiotique est généralement très spécifique. Chaque espèce bactérienne possède un spectre d'hôte bien défini, souvent limité (**Figure4**).

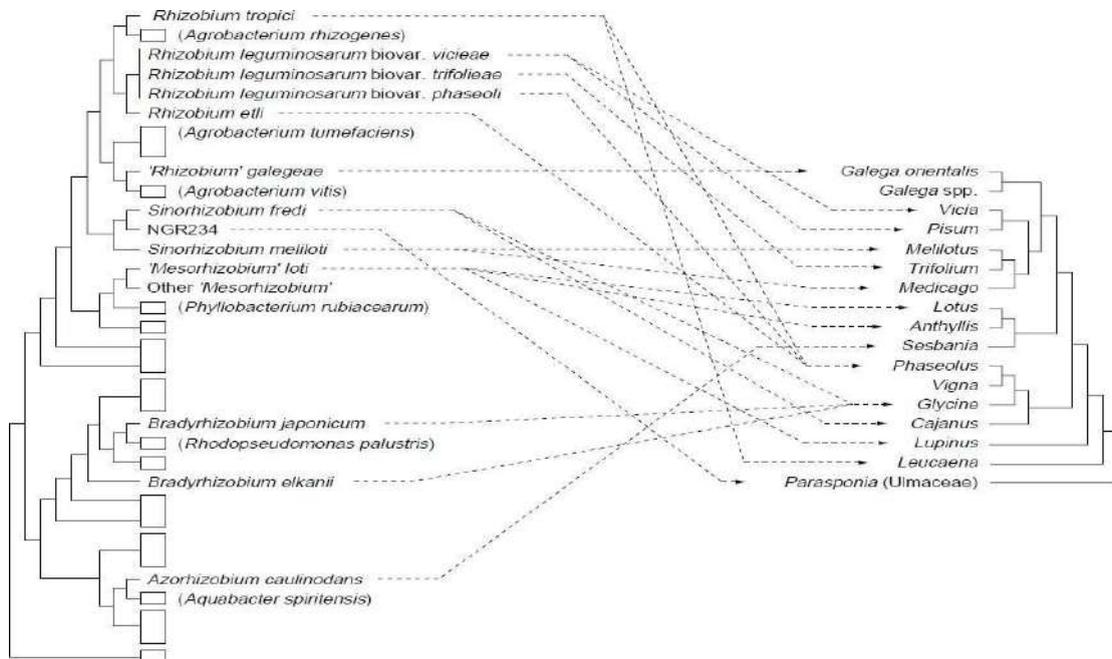


Figure4. Comparaison des phylogénies moléculaires bactériennes et des légumineuses.

La phylogénie bactérienne (à gauche) est basée sur les séquences génétiques de l'ARNr16S et montre trois groupes très distincts de bactéries impliquées dans la symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses et le *Parasponia* (Ulmaceae). Des bactéries symbiotiques sont représentées ; les lignées des bactéries non symbiotiques sont indiquées par des cases, avec un représentant indiqué entre par en thèses pour les lignées étroitement liées aux groupes symbiotiques. À droite, les relations phylogénétiques sont présentées pour certains genres de légumineuses nodulés par des bactéries présentes sur l'arbre bactérien. Les flèches relient les symbiotes bactériens à leurs hôtes. (Doyle, 1998).

2.8 Biochimie de la fixation biologique d'azote

A partir du moment où les nodules sont mis en place et efficaces, la fixation d'azote commence. Cette fixation biologique de l'azote est catalysée par une enzyme « la nitrogénase ». L'enzyme nitrogénase catalyse la rupture réductrice de la triple liaison de N₂ pour générer l'ammoniac NH₃ accompagnée d'une réduction des protons en H₂ et se fait selon la réaction suivante :



La nitrogénase (Figure 5) se compose de deux principaux composants protéiques (Rubio et Ludden, 2005), la dinitrogénase (protéine MoFe ou composant I) et la dinitrogénase réductase (protéine Fe ou composant II). Quand elles sont exposées à l'oxygène, les protéines de la nitrogénase sont dénaturées et ne peuvent fonctionner que dans un environnement anaérobie (Dighe et al., 2010). Cette sensibilité à l'oxygène représente l'une des propriétés les plus frappantes de la nitrogénase. La couleur rouge des nodules indique la présence de leghémoglobine, une protéine présente dans les nodules, qui sert de régulateur d'oxygène en le transportant vers les bactéroïdes. La régulation de l'apport d'O₂ protège la nitrogénase bactérienne de l'effet inhibiteur de l'oxygène. Cette régulation garantit donc l'efficacité du nodule à fixer l'azote atmosphérique.

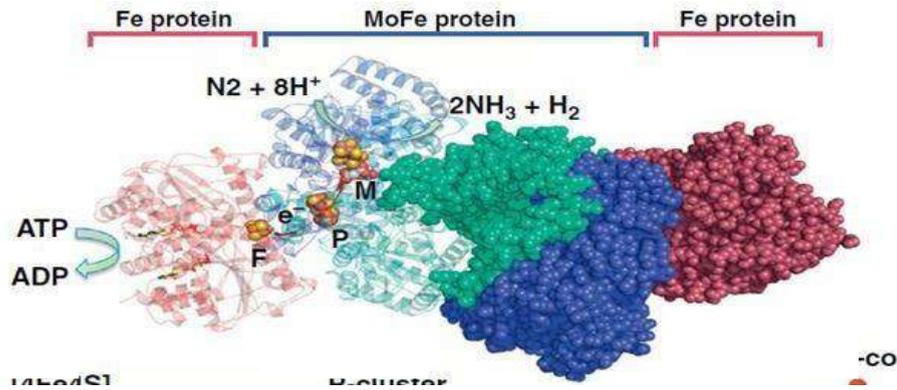


Figure 5. Structure du complexe enzymatique de la nitrogénase.

La figure montre les composants de la protéine MoFeFe, avec les trois métalclusters (F pour [4Fe4S], P pour le cluster P et M pour FeMo co). (Oldroyd et Dixon, 2014).

3 Le microsymbionte arachide

Le terme Rhizobium vient du grec Rhiza=racine et bios=vie et provient de la première appellation au XIXème siècle du premier genre bactérien vivant dans le sol et pouvant noduler les légumineuses. Les rhizobiums sont des bactéries de la famille des Rhizobiacées, ils sont Gram négatifs, non sporulant, et ils apparaissent en forme de bâtonnets mobiles (Figure 6). Ce sont des microorganismes aérobies de petite taille dont la température de croissance optimale est de 28°C et le pH optimal est de 6 à 7.



Figure 6. Nodule d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (Réf élc 3).

3.1 Taxonomie des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodosités radiculaires sur les plantes légumineuses. Ces symbiotes des légumineuses appartiennent à deux sous-classes phylogénétiques distinctes : les α et β -protéobactéries. Plus de 100 espèces regroupées en 13 genres : (i) 11 appartenant à la sous-classe α - Protéobactéries et comprenant les genres : *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* actuellement *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*,

Phyllobacterium, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Shinella*. (ii) Deux genres appartenant à la sous-classe β Proteobactéries, l'ordre des *Burkholderiales* dont *Burkholderia* et *Cupriavidus* anciennement *Ralstonia* (Zakhia et deLajudie, 2001 ; Rüberg et al., 2003 ; Velázquez et al., 2017) (**Tableau2**).

Tableau2 : Classification des rhizobia (Noel,2009).

| Protéobactéries | | Espèces | | |
|-----------------|--|---------|---|--|
| Division | Genre | Nombre | Représentatives | Hôtesreprésentatives |
| Alpha | <i>Rhizobium</i> | 16 | <i>R.leguminosarum</i> <i>R.etli</i> <i>R.tropici</i> | <i>P. sativum</i> , <i>Trifolium</i> etc. <i>Phaseolus</i> , <i>Leucaena</i> |
| | <i>Bradrrhizobium</i> | 7 | <i>B.japonicum</i> <i>B.elkanii</i> | <i>Glycine</i> , <i>Vigna</i> <i>Glycine</i> |
| | <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>) | 11 | <i>S.eliloti</i> <i>S. fredii</i> | <i>Medicago</i> <i>Glycine</i> , <i>Vigna</i> |
| | <i>Azorhizobium</i> | 2 | <i>A.caulinodans</i> | <i>Sesbania</i> |
| | <i>Mesorhizobium</i> | 11 | <i>M.loti</i> | <i>Lotusspp.</i> |
| | <i>Allorhizobium</i> | 1 | <i>A. undicola</i> | <i>Neptunia</i> |
| | <i>Methylobacterim</i> | 1 | <i>M.Nodulans</i> | <i>Crotalaria Spp.</i> |
| | <i>Devosia</i> | 1 | <i>D.neptuniaie</i> | <i>Neptunia</i> |
| | <i>Ochrhobacterim</i> | 1 | <i>O.lupinus</i> | <i>Lupinus</i> |
| | <i>Phyllobacterim</i> | 1 | <i>P. lupinii</i> | <i>Trifolium</i> et <i>Lupinus</i> |
| Beta | <i>Burkholderia</i> | 5 | <i>B.phymatum</i> | <i>Mimosa</i> |
| | <i>Cupriavidus</i> (<i>Ralstonia</i>) | 2 | <i>C.taiwanensis</i> | <i>Mimosa</i> |

3.2 Utilisation des rhizobia dans la lutte biologique

Les Rhizobia sont des microorganismes qui ont la capacité à coloniser les surfaces des racines et à former des associations symbiotiques avec les plantes légumineuses (Ndoye, 1990). Non seulement ils jouent un rôle majeur dans la fixation biologique de l'azote, dans l'amélioration de la croissance des plantes mais également réduisent l'incidence des maladies dans diverses cultures (Gopalakrishnan et al., 2015). Les Rhizobia et leurs différents genres ont un potentiel important pour contrôler la croissance de nombreux champignons phytopathogènes (Chao,1990). L'activité antagoniste des Rhizobia est principalement attribuée à la production d'antibiotiques, d'enzymes mycolytiques et de sidérophores dans des conditions limitantes en fer (**Figure7**) ;(Ongena et al.,1999 ; Mishra et al., 2006). En plus de la compétition et l'induction de résistances systémiques liées à la défense des plantes (El badry et al., 2006).

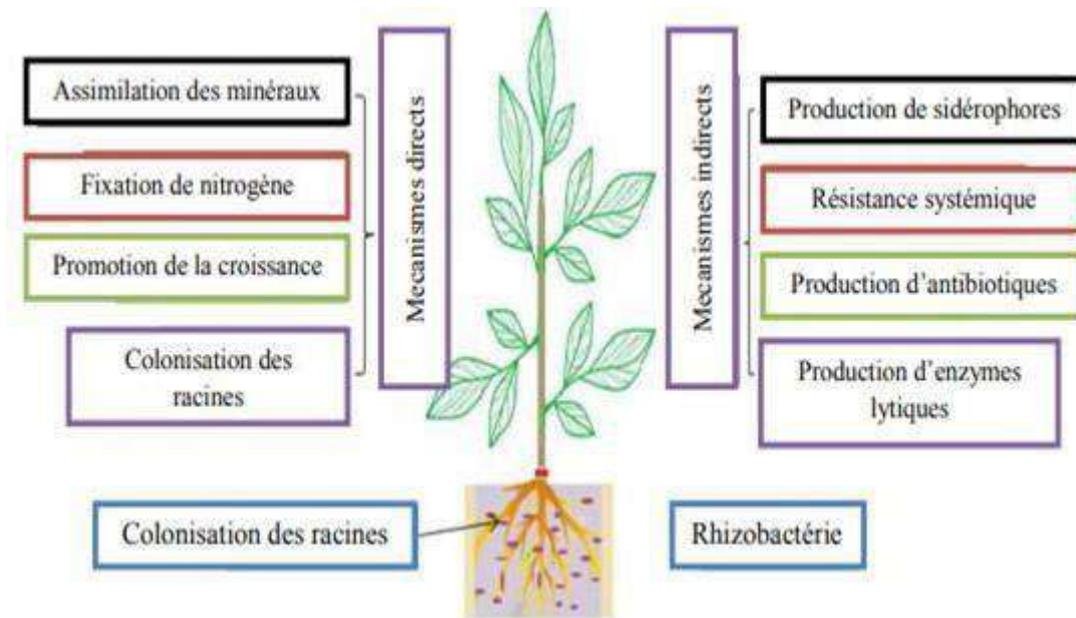


Figure 7. Représentation schématique des mécanismes action directe et indirecte employés par les RGPR (Ngomaet al.,2012).

4 Les champignons Phytopathogènes

4.1 Définition de la phytopathologie

La phytopathologie se définit comme étant l'étude des microorganismes et des facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, ainsi que l'étude des mécanismes par lesquels ces différents éléments agissent. Cette science s'intéresse en plus, aux méthodes de prévention et de contrôle des maladies. En général, les maladies causées par les insectes et les animaux supérieurs ne font pas partie de la phytopathologie (Knudsen et Dandurand, 2013).

4.2 Les grands groupes des champignons phytopathogènes

4.2.1 Les champignons à plasmode (Plasmodiophoromycota)

Ce sont des organismes dépourvus de paroi dans la majeure partie de leur cycle de développement. Leur thalle est constitué d'un plasmode. Ils sont des parasites d'organes souterrains chez lesquelles, ils provoquent souvent une hypertrophie ou une hyperplasie des tissus infectés. Trois genres présentent des effets pathogènes directs sur la plante : *Plasmodiophora sp*, *Polymyxa sp* et *Spongosporasp*. (Maalem et Sansri, 2014).

4.2.2 Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux coenocytiques

Ces espèces sont regroupées au sein de 3 phylums :

-Oomycota : Ce sont caractérisés par un thalle constitué d'une masse de filaments, ramifiés non cloisonnés. (Aouar, 2012)

-Chytridiomycota : Il constitue un phylum avec une classe unique, les Chytridiomycètes. Leur thalle est un mycélium ramifié et ils produisent des zoospores uni-flagellées. (Aouar, 2012)

-Zygomycota : Ce sont caractérisés par l'absence des zoospores, trois ordres présentent un intérêt agronomique : Mucorales, Entomophthorales et Glomales (Aouar, 2012)

4.2.2.1 Ascomycètes et les Deutéromycètes

-Les Ascomycètes : Ce sont des champignons à mycélium cloisonné dont les spores sexuées se forment sur des asques. Les principaux taxons appartenant à ce phylum sont : Archiascomycètes, Pyrénomycètes, Loculoascomycètes et Discomycètes (Aouar, 2012)

-Les Deutéromycètes : Encore appelés champignons imparfaits, sont caractérisés par un mycélium septé et par l'absence de reproduction sexuée. Les principaux genres phytopathogènes sont : *Moniliales*, *Sphaeropsidales* et *Mélanconiales* (Aouar, 2012).

4.2.2.2 Basidiomycètes

Ce sont des champignons caractérisés par la production de spores monocaryotiques, haploïdes, appelées basidiospores, à l'extérieur de sporocystes appelés basides. Sur le plan de la systématique, on distingue : les Urédinomyètes, les Ustilaginomyètes, les Hyménoomyètes (Aouar, 2012).

4.3 Les phytopathogènes

Les anomalies du phénotype par rapport à la norme attendu portent le nom de symptômes. La pathogenèse représente l'ensemble des processus inducteurs de la maladie qui aboutissent à l'expression des symptômes. Ces derniers comportent essentiellement des changements de couleurs, des altérations d'organes, des modifications anatomiques et des altérations du métabolisme. En effet, il est possible de distinguer les maladies phytopathogènes en deux grands types : les maladies parasitaires et non parasitaires (Semal et Lepoivre, 2003).

4.3.1 Les maladies non parasitaires

Elles résultent d'une inadéquation des conditions écologiques. Il peut s'agir de problèmes liés aux conditions climatiques, aux phénomènes de pollution ou à des problèmes nutritifs et la toxicité des pesticides (Lepoivre, 2003).

4.3.2 Les maladies parasitaires

Ce sont les maladies causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, protozoaires, etc.). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et ce sont contagieux (Paul et Impens, 2003)

4.4 Les maladies fongiques des Arachides

Les maladies fongiques de l'arachide (*Arachishypogaea*L.) ont fait l'objet d'une enquête effectuée dans différentes régions dans le monde. La liste des agents rencontrés au cours de l'enquête est dressée dans le **Tableau 3** (Resplandyet *al.*, 1954 ; Sougnabe et Foko, 2003).

Tableau3 : liste des maladies fongiques del'arachide

| Agents | Organeattaqué | Symptômes |
|--|------------------------------|--|
| <i>Pircciniaarachidis</i> | Feuilles,stipules, tiges | Rouille |
| <i>CercosporidiutnPersonarirt n</i> | Feuilles,tiges | Lésionsfoliaires |
| <i>Cercosporaarachidicola</i> | Feuilles,tiges | Lésionsfoliaires |
| <i>Leplosphaerulinacrassiaca e</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Phomaarachidicola</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Pesiuloliopsisarachidis</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Helminthosporiumsp</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Ascochytaarachidicola</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Allernariaarachidis</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Gloeosporiumsp.</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Cladosporiumsp.</i> | Feuilles | Lésionsfoliaires |
| <i>Sclerotiu tnrovsii</i> | Collets,tiges,feuille s | Réseaumycélien,flétrissement |
| <i>Aspergillusniger</i> | Collets | Flétrissement |
| <i>Borryodiplodiasp.</i> | Collet,basedetiges | Flétrissement |
| <i>Rhizoctoniasolani</i> | Feuilles,tiges | Réseaumycélien,taches, foliaires,flétrissement |
| <i>Aspergillusflavus</i> | Plantules | Fontedesemis |
| <i>Fusarium dimeru</i> (Sougnabe et Foko.2003) | Collet, lesracine stigelles | Lésions et des décolorationsfoliaires. |
| <i>Macrophominaphaseolina</i> (Sougnabeet Foko.2003) | Collet, lesracines, tigelles | Des lésions petites, rondes, brunes à noires |

Chapitre II Matériel et méthodes

1 Objectif

Le présent travail porte sur l'étude de l'antagonisme entre les champignons phytopathogènes et les bactéries nodulants l'arachides (*Arachis hypogaea* L.).

2 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est forme des souches phytopathogène er des rhizobia nodulant l'arachide (*arachishypogaeae* l.) provenant des agrosystèmes des régions de Ghardaïa et Ouargla.

3 Méthodologie

3.1 Provenance des bactéries

Les quatre isolats de rhizobium utilisés dans cette étude (HBA1/EP72/SP32/EP1S2) ont été récupérés à partir des nodules de l'arachide dans les régions de Ghardaïa et Ouargla, ces souches ont été fournis par Professeur Azib(Université de KASDI Merbah, Algérie).

3.1.1 Revivification des bactéries

Les souches isolées ont été examinées sur milieu YEM (**annexe1**) quant à leurs forme, couleur et l'aspect des colonies selon Ahmad et *al.* (1984).

Les souches sont revivifiées par un repiquage successif sur milieu YEM dans des boites de pétri à l'aide d'une anse de platine, et ensemencée, chaque souche bactérienne est repiquée avec trois répétitions, et incubée à 28°C pendant 72 h.

3.1.2 Caractérisation Morphologique et physiologique

La morphologie des colonies a été caractérisée sur YEMA selon Ahmad et *al.* (1984) sur la base de la couleur, forme et coloration de Gram. Bien que physiologique la caractérisation a été déterminée comme suit ; par, l'effet de Température et salinité, la résistance à antibiotiques,

3.1.3 Tolérance de température

La capacité des souches bactériennes à se développer à des températures élevées et basses a été contrôlée à 4, 37 et 50°C sur des plaques YEMA comme décrit par Maatallah et *al.* (2002), Hung et *al.* (2005). La plaque témoin a été incubée à 28°C.

3.1.4 Tolérance au sel

Pour la tolérance au sel, le milieu YEMA a été additionné de NaCl à 0,5, 1 et 2%, et des isolats en croissance ont été observés après 72 heures à 28°C. Alors que le contrôle YEMA contenait 0,1% de NaCl, [Sadowsky MJ, et al (1983)].

3.1.5 Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance intrinsèque a été déterminée sur YEMA contenant les antibiotiques suivants : ampicilline, pénicilline G et amoxicilline.

L'antibiotique a été ajouté aseptiquement à du YEMA medium stérile à une concentration de 100 µg.ml⁻¹, inoculé avec des bactéries et incubé pendant 3 jours à 28°C. Les plaques de contrôle ne contenaient aucun antibiotique Alexandre et al (2006).

3.2 Provenance des champignons

Les souches fongiques utilisées dans ce travail ont été obtenues à partir des graines fraîches de l'arachide juste après récolte (présentant des symptômes de maladies) cultivées dans la région de Ghardaïa. Trois espèces de champignons ont été identifiés à savoir : *Fusarium oxysporum* B2S1, *Cladosporium sp* B1S2, *Aureobasidium sp* B1ES3. Les isolats ont été identifiés selon leurs caractères morphologiques, microscopiques et macroscopiques selon Leslie et Summerell (2006), puis conservées.

3.2.1 Revivification des champignons

Les trois souches fongiques ont été revivifiées par un repiquage successif sur milieu PDA(Annexe2) à l'aide d'une anse de platine dans des boîtes de pétri à raison de trois répétitions par souche, puis incubées à 28°C jusqu'à l'apparition des colonies. La pureté est contrôlée par observation microscopique des cultures.

3.3 Tests d'antagonisme

In vitro Le test d'antagonisme a été effectué selon la technique décrite par Landa et al. (1997) et Idris et al. (2007) ; entre les microorganismes isolés : les rhizobia nodulant l'arachide et les champignons phytopathogènes.

L'effet antifongique des bactéries antagonistes est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance radiale du champignon réalisé comme décrit par Buyer et

al. (1989), sur le milieu YEM solide. Ce milieu mime relativement la composition minérale et organique de la rhizosphère, ce qui permet l'évaluation des capacités compétitives des souches de *Rhizobium*, envers les champignons phytopathogènes utilisés dans ce travail.

3.4 Potentialités antagonistes *in vitro* des isolats

3.4.1 Méthode de confrontation directe bactérie/champignons en boîte de Petri

L'évaluation du phénomène d'antagonisme est réalisée vis-à-vis du *Fusarium*

Oxysporum, *Aureobasidium sp* et *Cladosporium* contre les BNL de l'arachide. Les champignons comme les espèces bactériennes proviennent de pré cultures en boîtes de Petri. Selon la méthode de stries Un disque de champignon (*Fusarium. Oxysporum* ; *Aureobasidium. sp* ; *Cladosporium .sp*) de 8 mm de diamètre est prélevé puis déposé à l'aide d'une pipette paster stérile dans le centre d'une boîte de Petri contenant le milieu YEM(Figure8).

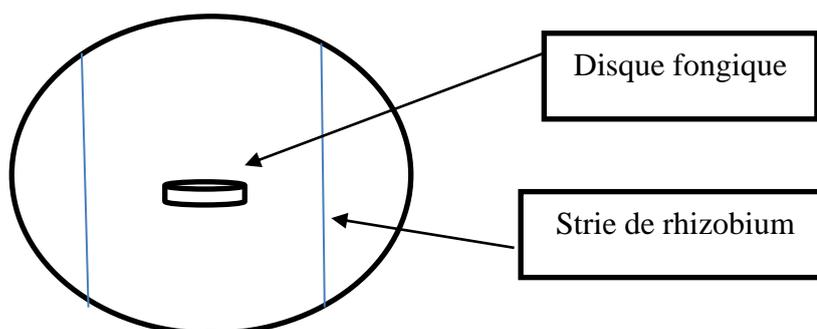


Figure 8. Représentation schématique de la méthode de strie utilisée pour les tests d'antagonisme.

A 2cm de la pastille du *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, une souche bactérienne estensemencée en trait. Chaque souche bactérienne est confrontée au *Fusarium oxysporum* et au *Cladosporium sp*. Et au *Aureobasidium sp.*, à raison de 3 répétitions.

Le témoin consiste en une boîte contenant une pastille du champignon de 8mm de diamètre et où l'inoculum bactérien est remplacé par de l'eau distillée stérile (Dennis et Webster, 1971 ; Wong et Baker, 1984 ; Weller et Cook, 1986 ; Inam-ul-Haq et al., 2003). L'incubation des boîtes est faite à 28°C pendant 10 jours pour *Fusarium. Oxysporum* pour *Cladosporium sp.* et pour *Aureobasidiumsp.*

3.4.2 Méthode de confrontation indirecte bactérie/champignons en boîte de Petri

Cette technique consiste à confronter indirectement la souche bactérienne avec le champignon phytopathogène et évaluer l'action antagoniste grâce à l'action des substances volatiles secrétées par la bactérie testée. Dans cette technique, nous avons utilisés une culture bactérienne liquide préparées dans des tubes a essais contenant milieu YEM(**Annexe1**) liquide inocules par une colonie bactérienne et incubées pendant 72 heures à 28°C sous agitation 200tr/min, un volume de 100µl de la culture bactérienne prélevé à l'aide d'une micropipette a été ensemence par étalement dans des boites de pétri contenant du milieu YEM.

Puis dans des conditions stériles son couvercle est remplacé par le fond d'une autre boîte contenant du milieu PDA (**Annexe2**), ensemencé par une pastille de 8 mm de diamètre du champignon ; les 2 fonds de boîtes superposés sont scellés avec du parafilm afin d'éviter toute déperdition de substances volatiles (Figure 9).

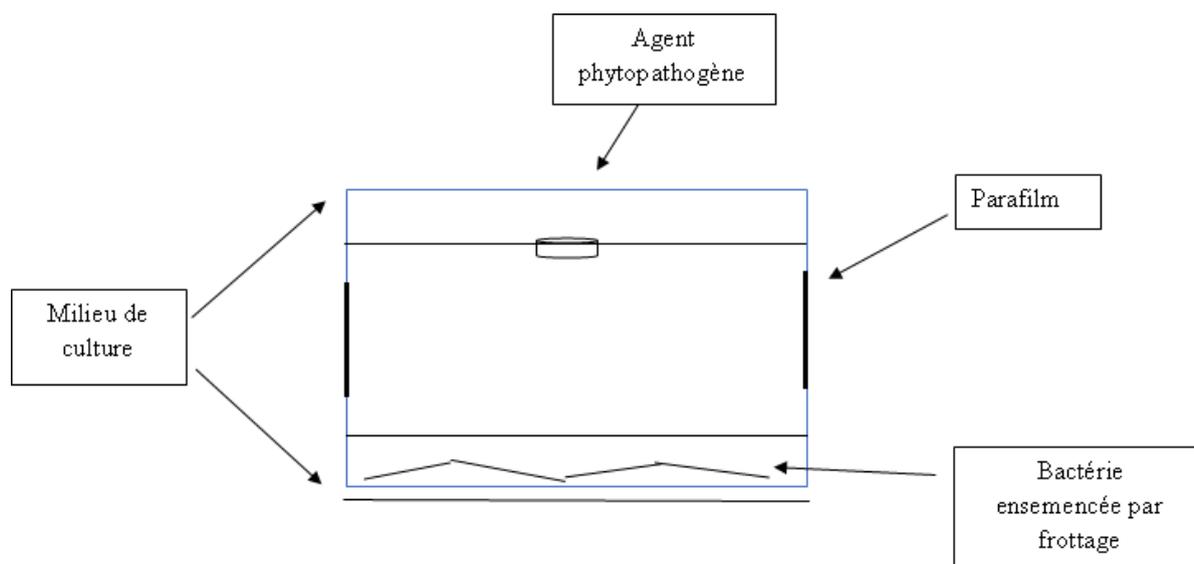


Figure 9. Méthode de confrontation indirecte sur milieu de culture par action des substances Volatiles entre les souches bactériennes et l'agent phytopathogène.

Dans la boîte servant de témoin, l'inoculum bactérien est remplacé par de l'eau distillée stérile (Fiddaman et Rossall, 1993 ; Montealegre et *al.*, 2003 ; Chaurasia et *al.*, 2005 ; Trivedi et *al.*, 2006). L'incubation est faite à 28°C pendant 10 jours. La lecture des résultats se fait comme décrit précédemment.

3.4.3 Lecture de la croissance des champignons

La lecture résultats consiste à mesurer la distance parcourue par les champignons dans la boîte à partir du disque Wanget *al.*,2002). L'évaluation du pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons a été calculé en utilisant la formule décrite par Whipps (1987) : où le pourcentage d'inhibition (%) = $(R-r / R) \times 100$.

r est le rayon de la colonie fongique en présence de la colonie bactérienne

R le rayon de la colonie fongique témoin.

3.4.4 Mise en évidence de sécrétion de substance inhibitrice

Selon les résultats obtenus de la confrontation direct et indirecte entre les champignons et les rhizobiums. Les boîtes sélectionnées pour ce teste sont celles marquées par la formation des zones d'inhibition, ces dernières sont mises dans un milieu dans le but d'étudier les types de réaction antagoniste soit, c'est dû à la production de substances inhibitrices ou bien c'est du seulement à une compétition nutritive.

Cette technique est réalisée par le prélèvement d'un disque de champignon provenant d'une culture fraîche de 7 jours déposer au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu YEM. Trois disques prélevés à partir les zones d'inhibition ont été déposés dans les trois côtes de la même boîte. Celles-ci sont ensuite incubées à 28 °C pendant 10 jours.



Photo 1. Mise en évidence de sécrétion de substance inhibitrice

3.4.5 Coloration et observation microscopique des champignons

L'étude macroscopique nous a permis de relever le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies. Alors que l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le résultat de la coloration des champignons.

Dans cette coloration nous avons utilisé le rouge congo et l'eau distillée :

Rouge congo : Colorant des parois des cellules (boucles, hyphes, cystides, basides) " révélateur des milieux acides : il devient alors tout noir. Il s'utilise comme colorant de routine : mise en évidence des gélifications (congophobie des hyphes gélifiées) (Lecomte, 2010).

L'eau distille : Premier milieu d'observation, et le seul capable de révéler tous les éléments constitutants (ils sont nettement mis en évidence par le contraste de phase, ou le DIC). Elle doit être préférée à l'eau du robinet, qui est souvent très calcaire et peut générer des précipités. (Lecomte, 2010).

Deux types de lames ont été préparées (avec coloration et sans coloration) sur les lames une goutte soit d'eau distillé soit le rouge congo ont été déposés (**voir annexe3**). À l'aide d'une anse de platine nous avons prélevé une partie des extrémités des colonies des champignons des trois types de confrontation direct, indirect et à partir des zones d'inhibition. Le fragment de champignon a été bien étalé et mélangé avec l'eau distillée et le colorant dans le cas de l'observation avec coloration, ce qui nous permet d'avoir une bonne observation sous le microscope.

Les lames préparées sont observées sous le microscope avec un grossissement x10 avec logiciel LAS EZ au niveau du laboratoire de la faculté de médecine de l'université KASDI Merbah, Ouargla.

Chapitre III Résultats et discussion

1 Résultats

1.1 Résultat de l'antagonisme par confrontation directe sur boîte de Petri

La confrontation directe de 4 souches de rhizobia nodulant l'arachide (*Arachis hypogaea* L) précédemment isolées et caractérisées avec trois espèces de champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* ; *Aureobasidium* sp ; *Cladosporium* sp.) sur milieu de culture YEM ; nous a permis de mettre en évidence l'aptitude des bactéries à inhiber jusqu'à 100% la croissance des pathogènes. Les résultats d'inhibition de la croissance des champignons sont indiqués dans le tableau suivant.

Parmi les 4 souches de rhizobia testées, l'inhibition des champignons est variable d'une souche à l'autre (**voir annexe 4**), la plus petite inhibition a été obtenue contre le champignon *Aureobasidium* avec 29.81% et la plus grande contre le *Cladosporium* avec 77.20% (**Figure 10**).

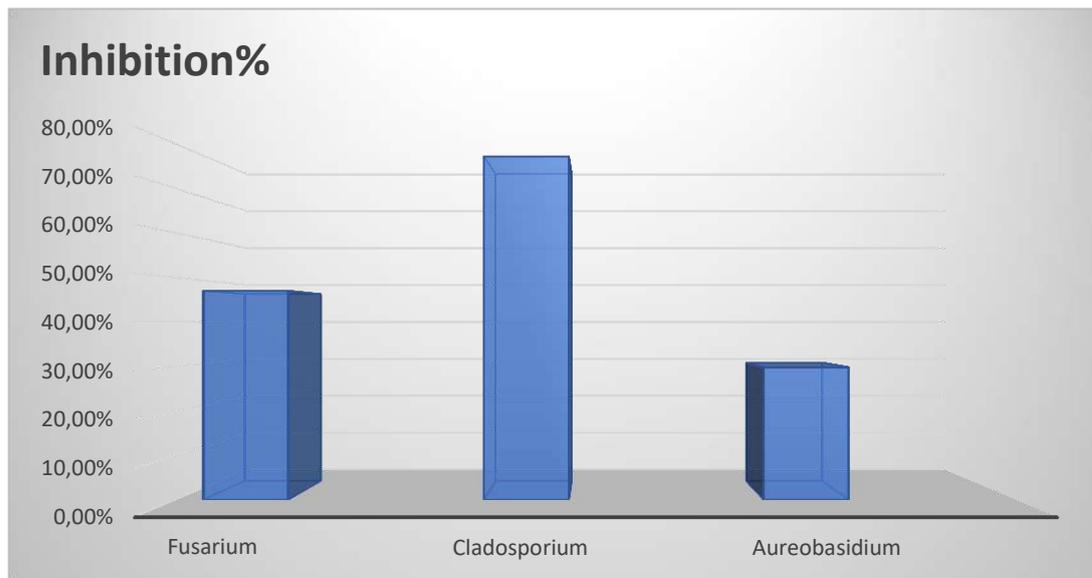


Figure 10. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons par confrontation directe

1.1.1 Action des rhizobia sur le *Fusarium Oxysporum*

Les pourcentages d'inhibition les plus élevés de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* sont obtenus avec les souches rhizobiennes B4 et B3 avec 67.82% et 100% respectivement (**Figure 11**). Les souches B2 et B1 présentent un pourcentage

d'inhibition faible d'environ 35% pour le *Fusarium oxysporum*(**Figure 11**). Ces souches rhizobiennes se sont révélées moins performantes que les d'autres souches.

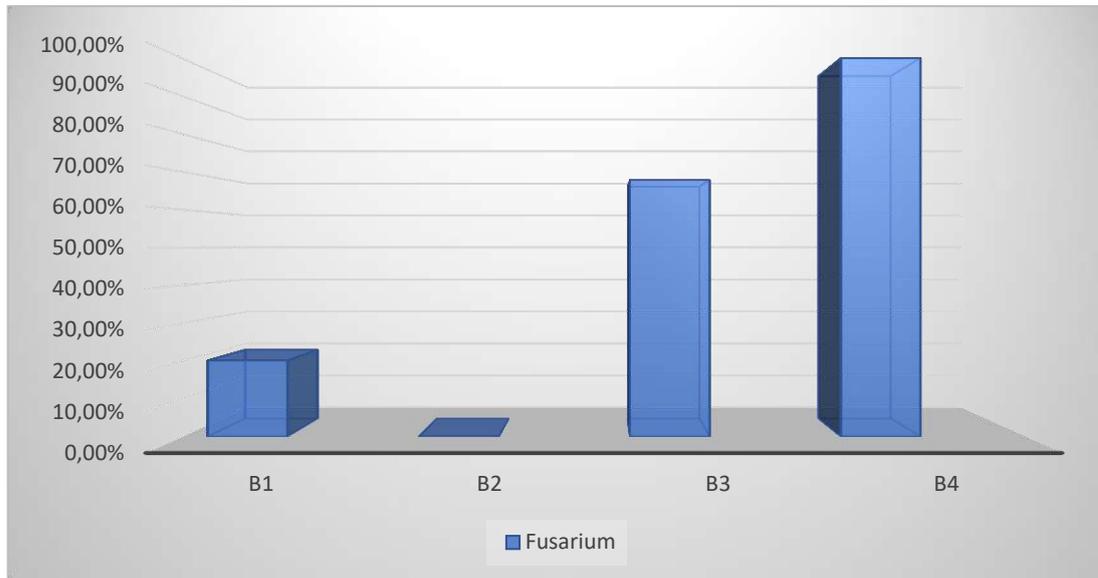


Figure 11. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum* confrontation directe.

1.1.2 Action des rhizobia sur *Cladosporium sp.*

L'action inhibitrice des souches bactériennes sur *Cladosporium sp.* Amontner que les 4 souchesprésentent des résultats élevés et proches (**Figure 12**). Lasouche B4 a montré un pourcentage d'inhibition de 72.82%, suivie par B2 avec 76.44%, B1 avec 78.26% etB3 avec 81.28% respectivement.

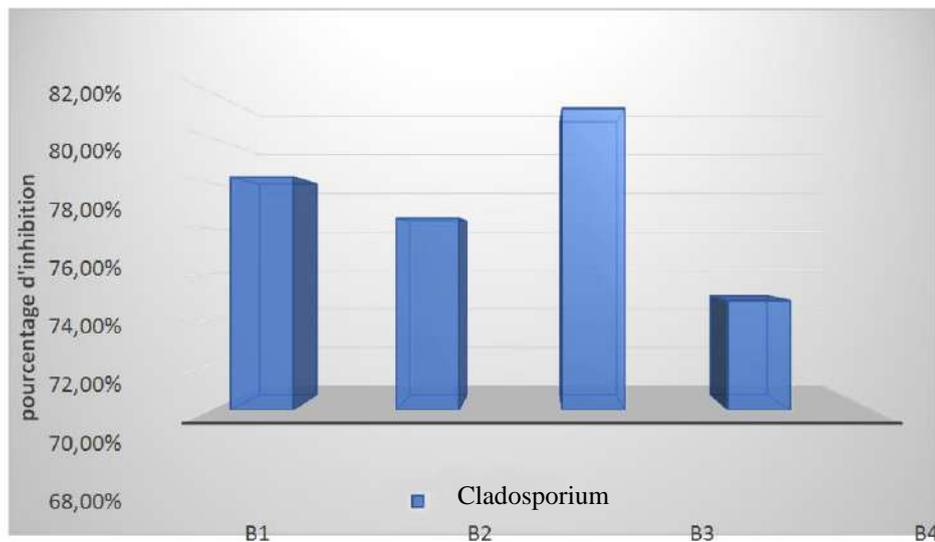


Figure 12. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de *Cladosporium sp* confrontation directe

1.1.3 Action des rhizobia sur *Aureobasidium* sp

Les 4 souches bactériennes testées ont une action inhibitrice de lacroissance sur *Aureobasidium* sp. Supérieure à 20%. Les pourcentages observés étaient de 25.28 % avec B3, 30.94% avec B1 et B2 et 32.07% avec B4 (**figure13**).

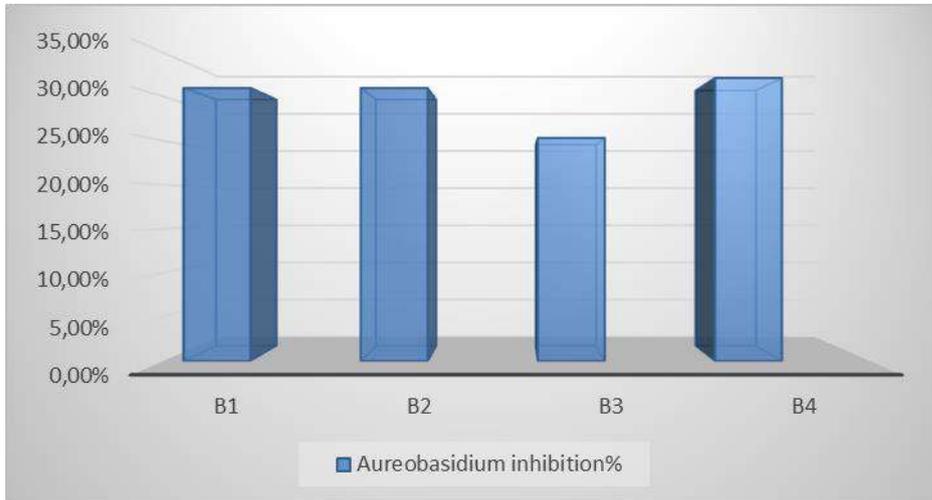


Figure 13. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance d'*Aureobasidium* sp. En confrontation directe

1.1.4 Résultats de confrontation indirecte bactérie/champignons dans des boîtes de Petri

A partir des résultats obtenus de la confrontation indirecte (**voir annexe 5**), les moyennes d'inhibition des souches bactériennes contre les trois champignons ont été très faibles avec des pourcentages qui varient entre 9% et 13.86% avec *Fusarium oxysporum* et *Cladosporium* sp. Respectivement. Cependant, aucune inhibition n'a été observée avec *Aureobasidium* sp. Les inhibitions obtenues étaient de 9.00 % avec B2 et de 13.86% avec B1(**figure 14**).

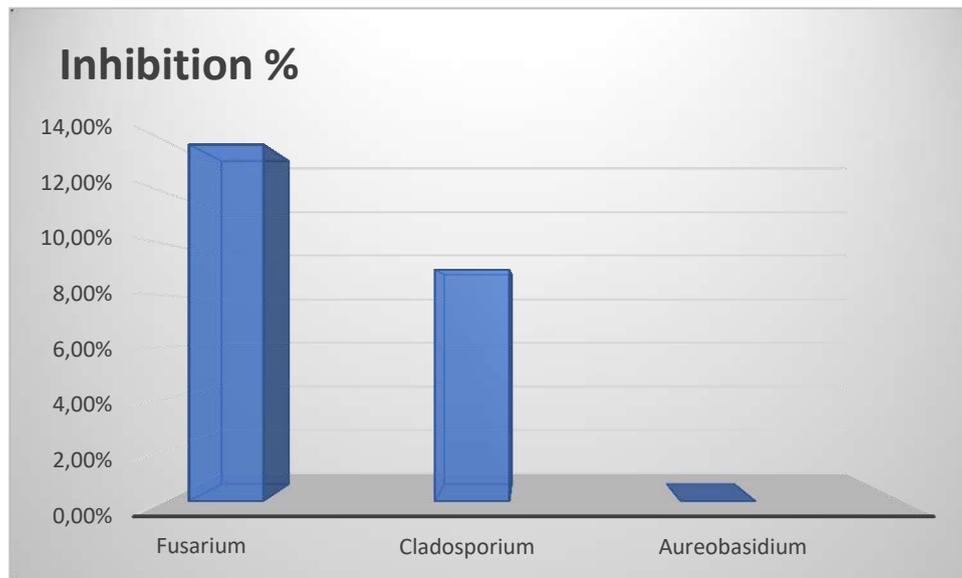


Figure 14. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons par confrontation indirecte

Les 4 souches ont montré un effet antagoniste variable en fonction des champignons testés contre le *Fusarium oxysporum*, il s'agit de : B1 avec 3,10%, B2 avec 25,19%, B3 avec 12,79%, B4 avec 14,34% (**Figure 15**) en les comparant au témoin. Le reste des champignons, les souches a montré une inhibition remarquable et parfois nulle.

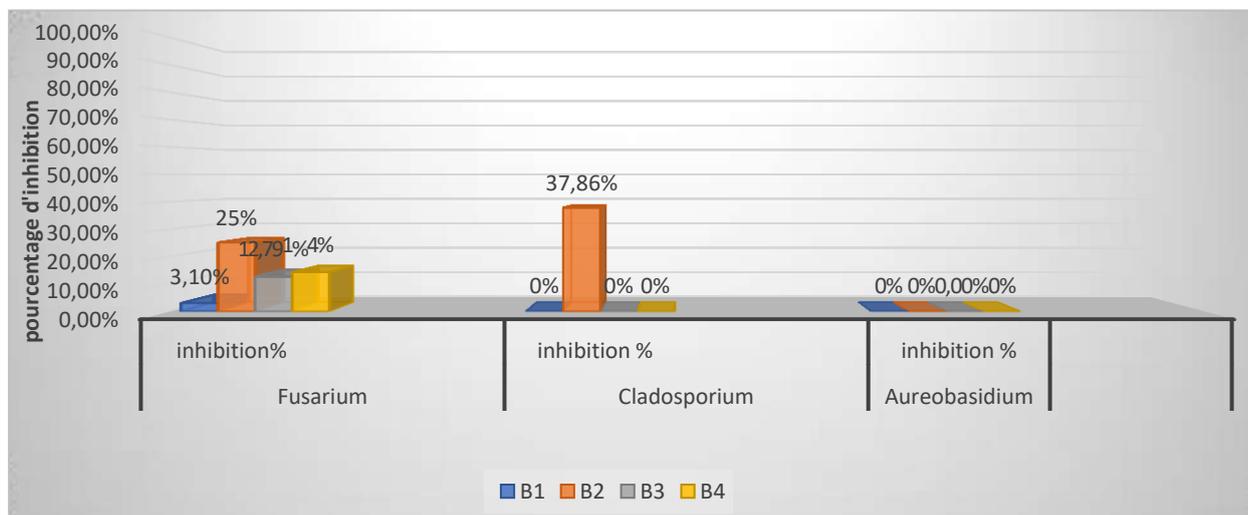


Figure 15. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons de confrontation indirecte, pour le *Cladosporium* nous avons eue une inhibition de 37% pour la souche B2, cependant aucune inhibition n'a été observée pour l'*Aureobasidium*.

1.2 Mise en évidence des substances inhibitrices sécrétées.

1.2.1 Confrontation directe à partir des zones d'inhibition obtenues.

La confrontation directe des champignons avec les zones d'inhibition, obtenues à partir du test précédent, a montré des résultats variables (voir annexe6). L'*Aureobasidium* sp. A été inhibé à 92%, suivie par *Fusarium oxysporum* avec 58.51% et *Cladosporium* sp. Avec 36.92% respectivement (figure 16).

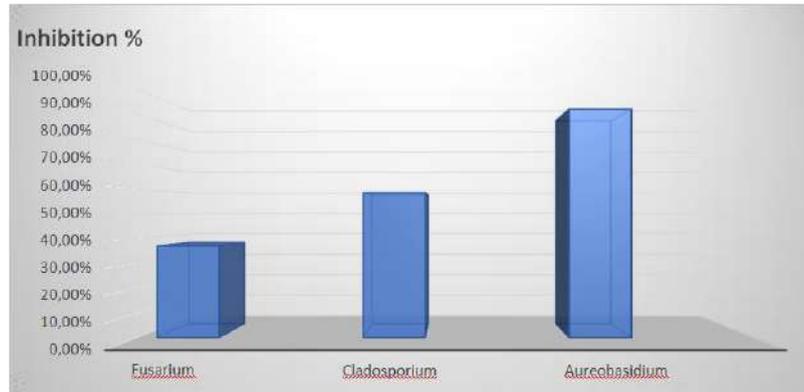


Figure 16. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons à partir les zones d'inhibition en confrontation directe.

1.2.2 Confrontation indirecte à partir des zones d'inhibition obtenues

La figure ci-dessous (17) n'a montré aucune inhibition entre l'efficacité des zones d'inhibition et leur pouvoir d'antagonisme envers les champignons, sauf avec le champignon *Cladosporium* sp. Où l'inhibition est de 68.65 % (voir annexe7).

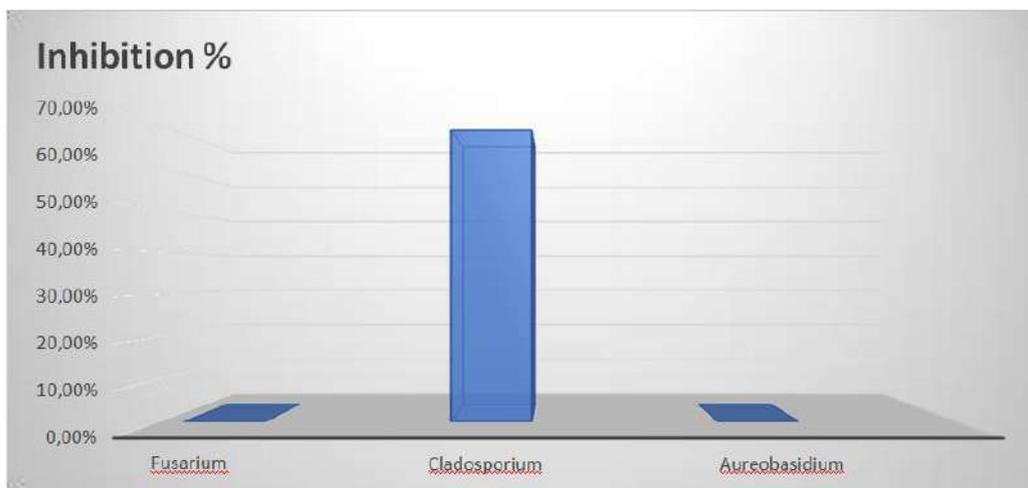


Figure 17. Histogramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance des champignons à partir les zones d'inhibition de confrontation indirecte

1.2.3 Résultats d'observation microscopique

Les observations microscopiques des hyphes de champignons confrontés vis-à-vis des rhizobia dans la zone de contact entre ces dernières et les champignons montre une lyse des hyphes observé pour le *Fusarium oxysporum* et le *Cladosporium sp*(photo1) en réponse au stress biologique provoqué par les rhizobia. Ce comportement des champignons (*Fusarium* et *Cladosporium*) dans le cas de la confrontation avec les disques des zones d'inhibition est probablement dû à la présence de molécule présentant une action lytique.

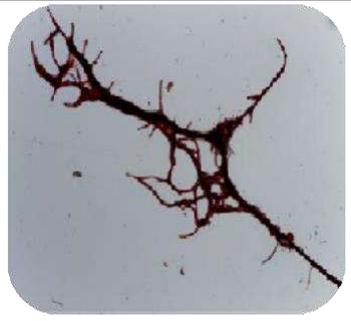
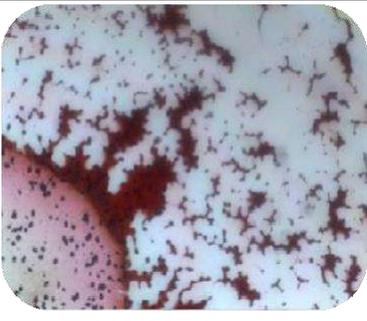
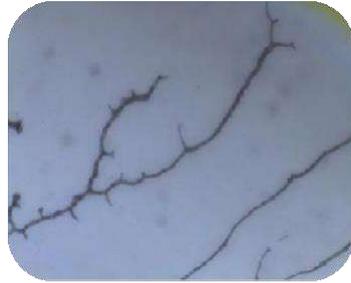
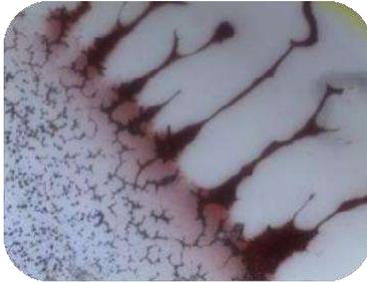
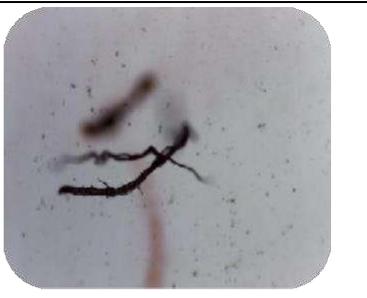
| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| A1 : Témoin <i>Fusarium</i> | A2 : <i>Fusarium</i> X B1 | A3 : <i>Fusarium</i>XB à partir les zones d'inhibition |
|  |  |  |
| B1 : Témoin <i>Cladosporium</i> | B2 : <i>Cladosporium</i> X B1 | B3 : <i>Cladosporium</i> X B1 a partir les zones dinhibition |
|  |  |  |
| C1 :Temoin <i>Aureobasidium</i> | C2 :<i>Aureobasidium</i>X B4 | C3 :<i>Aureobasium</i>X B4 a partir les zones d'inhibition |

Photo 2 : Observation microscopique des hyphes des champignons phytopathogènes dans la zone de confrontation avec les rhizobia (X100).

Ces résultats vont avec celui de Mannai et *al.* (2020), qui ont signalé une grande altération des hyphes du champignons phytopathogène dans les zones des contacts entre *Pythiummultimum* et *Burkholderiaglathei*, exprimée par la lyse du mycélium et la formation des cordes mycélienne malgré l'absence d'inhibition significative *in vitro*. Par ailleurs, aucune modification remarquable n'a été signalée pour l'*Aureobasidium* sp.

2 Discussion

Dans cette étude, l'intérêt s'est porté en premier lieu sur l'activité antagoniste des souches de rhizobia nodulant l'arachide et trois champignons phytopathogènes de la même plante à savoir : *Fusarium oxysporum* ; *Cladosporium* sp. *Aureobasidium* sp. Les résultats ont montré une grande variation entre les champignons testés. Deux essais ont été réalisés, l'un à partir de culture solide de rhizobiums dans la confrontation directe et l'autre à partir de culture liquide dans la confrontation indirecte. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à déterminer la production de métabolite secondaire dans le milieu par les rhizobia testées

Les rhizobia sont des bactéries connues pour leur aptitude à coloniser les racines des légumineuses et à créer une symbiose avec ces plantes. Cette symbiose est nécessaire pour la fixation d'azote atmosphérique à travers la formation de nodules. Or la fixation d'azote n'est pas la seule caractéristique des Rhizobia car elles ont aussi l'aptitude à stimuler la croissance des plantes et à réduire l'incidence des maladies sur les cultures. L'activité antagoniste des Rhizobia contre les pathogènes du sol est principalement liée à la production d'antibiotiques (Chandra et al., 2007), à l'acide cyanhydrique (Martínez-Viveros et al., 2010), à certaines enzymes mycolytiques (Sridevi et Mallaiah, 2008), aux siderophores, mais aussi à l'induction de la résistance systémique chez les plantes et l'amélioration de l'expression des gènes de défense chez la plante (Ramos et al., 1997). Dans la littérature, plusieurs espèces de rhizobiums ont été décrites comme des inhibiteurs naturels de certains agents pathogènes du sol. Parmi ces espèces, on peut citer ; *Rhizobium leguminosarum* décrit par Singh et al. (2010 ;Miloud 2018) contre *Fusarium oxysporum* chez le pois chiche, *Rhizobium japonicum* décrit par Al-Ani et al. (2012) contre *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium solani* chez le soja, ainsi que d'autres espèces de rhizobia non identifiées contre *Sclerotiumrolfsii*, *Cylindrocladium parasiticum*, *Pythium* sp. Etc. En réalisant un test d'antagonisme, Essalmani et Lahlou (2002) avaient montré que *Rhizobiumleguminosarum* possédait une action létale sur les conidies de *Fusarium oxysporum*.

Dans une étude *in vitro*, Izallalen (1997; Kanouni 2019) avait montré que le genre *Rhizobium* a une activité antagoniste à l'encontre de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* et *Alternaria*. Ces antagonistes (rhizobiums) manifestent des actions inhibitrices et des modes d'actions différents vis-à-vis de ces pathogènes, soit par la production des antibiotiques ou bien par une autre substance antifongique ou encore une compétition entre eux.

Après les résultats obtenus de l'antagonisme direct, montrent que pour les isolats les plus performants ont une zone d'inhibition grande aucun contact physique avec le pathogène n'a eu lieu, ce qui pourrai dû à présence de métabolites antifongiques produits par les bactéries (Montealegre et *al.*, 2003). La différence entre les pourcentages d'inhibition de nos souches suggère que le mode d'action et/ou le type de métabolite produit par les isolats peut varier, mais aussi que les bactéries sont taxonomiquement différentes (Williams et Asher, 1996).

Les métabolites sécrétés par la bactérie peuvent agir sur le champignon phytopathogène comme fongistatique, inhibiteur de la germination, fongicide ou en lisant le mycélium (Gloud, 1990). Selon Vining (1990), la production de ces métabolites secondaires s'effectue durant la phase stationnaire de la bactérie.

A partir des résultats de la confrontation indirecte, les pourcentages d'inhibition des souches bactériennes varient. Ceci montre que l'action des composés volatils sur la croissance des champignons est moins importante que lors des confrontations directes. D'ailleurs, ces résultats rejoignent ceux rapportés par Johnston (1967) avec *avenaceum* (Fr.) Sacco. D'autre par Antounet *al.* (1977), ont signalé que certaines substances volatiles produites par certaines rhizobia n'affectent pas la croissance radiale des champignons phytopathogènes, les réactions d'antagonismes observées seraient donc uniquement attribuables à la compétition nutritive.

Cependant, les composés volatils tels que l'ammoniac et le cyanure d'hydrogène (HCN) sont produits par un grand nombre de rhizobiacée set jouent un grand rôle dans le biocontrôle. Brimecombe et *al.* (2001) et Alabouvette et *al.* (1993) ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais à une combinaison de différents modes d'action.

Nos résultats concordent avec ceux de Siddiqui et *al.* (2000), qui ont prouvé que la réduction de la croissance fongique *in vitro* par certains rhizobiums et la formation des zones d'inhibitions sont le résultat de la libération des métabolites, par les bactéries dans le milieu de culture.

L'essai à partir de la culture liquide des rhizobia (confrontation indirect) a montré de faibles inhibitions par rapport à la confrontation directe. Les champignons se sont bien développés sur certaines boites. Ceci pourrait être dû à la faible concentration des bactéries. Dans ce sens, Al-Ani et *al.* (2012) ont montré que plus la concentration du filtrat de la souche

de *Rhizobium japonicum* est faible plus la croissance radiale du *Fusarium solani* et de *Macrophomina phaseolina* est grande et plus le pourcentage d'inhibition diminue. Dans le premier essai où les rhizobies ont été ensemencés à partir de culture solide, les 4 isolats de rhizobies ont montré des résultats reproductibles, dont l'espèce *Cladosporium* sp.

Concernant les tests de confrontation entre les disques de champignons et les disques prélevés des zones d'inhibition des confrontations directe et indirecte, les résultats obtenus ont été très variables d'une souche à une autre et d'un mode de confrontation à l'autre. Dans certaines boîtes l'inhibition a atteint 92% pour l'*Aureobasidium* sp. Dans le cas des disques de la confrontation directe et de 68.65% vis-à-vis du *Cladosporium* sp. À partir des disques prélevés des boîtes de la confrontation indirecte. Par ailleurs, aucune inhibition n'a été signalée dans certaines boîtes

Ces résultats sont en accord avec plusieurs d'autres études, qui ont montré que l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons *in vitro* par rhizobies était probablement due aux métabolites libérés par ces bactéries. Il a été démontré que les rhizobies examinés produisaient des protéases et lipopolysaccharides. Ces métabolites ont été impliqués dans l'inhibition des champignons phytopathogènes, comme pour le *Mesorhizobium loti* qui sécrète un sidérophore de type hydroxamate, la souche a montré un fort effet antagoniste contre *Sclerotinia sclerotiorum*, un pathogène de la pourriture blanche de *Brassica campestris*. La croissance de *Sclerotinia sclerotiorum* a été inhibée de 75% après une incubation prolongée. De plus, une diminution drastique (99%) de l'incidence de la pourriture blanche a été observée en raison de l'application de *Mesorhizobium loti* MP6 (Chandra *et al.*, 2007). Ainsi Deshwal *et al.*, (2003) ont remarqué une activité antagoniste des souches de *Bradyrhizobium* (Arachis) sp. Issues de l'arachide contre *Macrophomina phaseolina* par la sécrétion de sidérophores *in vitro*.

Conclusion

Le travail présenté dans ce mémoire visait l'étude d'une stratégie de lutte biologique envers les souches de champignons phytopathogènes précédemment isolés à partir de l'arachide, par l'exploitation de l'effet bénéfique de certaines souches rhizobiennes provenant de la même plante afin de déterminer leurs rôles bio protecteur envers les champignons.

A cet effet, 4 souches de rhizobia de l'arachide cultivée dans la région de Ghardaïa et Ouargla ont été testés sur 3 souches de champignons phytopathogènes : *Aureobasidium* sp. *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium* sp.

Le test de confrontation directe nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antagoniste des souches de rhizobia vis-à-vis des trois souches fongiques phytopathogènes. En effet, la suppression des espèces fongiques est variable d'une souche à une autre. Les pourcentages d'inhibition de la croissance fongique obtenues sont évalués à 100% pour le *Fusarium oxysporum*, 81.28% pour *Cladosporium* sp., 32.07% pour *Aureobasidium* sp. A partir la confrontation directe. Par ailleurs, les pourcentages de la confrontation indirecte montrent une très faible inhibition évaluée à 13.86% pour *Fusarium oxysporum*, 9% pour *Cladosporium* sp. Aucune inhibition n'a été observée pour l'*Aureobasidium* sp.

Au terme de cette étude, Les mécanismes d'action impliqués dans l'antagonisme observés sont variés. En effet, les essais in vitro ont démontré que certaines souches ont une activité antifongique envers certaines souches fongique, d'où l'intérêt d'identifier les molécules impliquées dans cette activité antifongique. L'exploitation de nos résultats dans de prochains travaux de recherches s'avère d'un très grand intérêt., tout d'abord par l'identification moléculaire des bactéries et l'extraction et l'identification des substances antifongique sécrétées par les rhizobia afin de déterminer avec exactitude ces molécules inhibitrices.

Référence bibliographique

- Ahmad MH, RafiqueUddin M, Mclaughlin W. 1984.** Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiol Lett*; 24:197-203
- Alabouvette. C. Lemanceau, P, Steinberg, C. 1993.** Recent advances in the biological control of Fusarium wilts. *Pest. Sci.*, 37, pp.365-373.
- Al-Ani RA. Adhab MA, Mahdi MH, Abood HM.2012.**Rhizobium japonicum as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by Fusarium solani and Macrophominaphaseolina. *Plant Prot Sci.*; 48(4): 149- 155.
- Al-ani, R.A. Adhab, M.A, Mahdi, M.H. et Abood, H.M. 2012.** Rhizobium japonicum as a Biocontrol Agent of Soybean Root Rot Disease Caused by Fusarium solani and Macrophominaphaseolina. *Plant Prot. Sci.* 48 (4): 149-155.
- Alexandre A. Laranjo,M, Oliveira S. 2006.**Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *MicrobEcol*; 51:128-136.
- Annerose D. J, M., 1990 :** Recherche sur les mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse. Application au cas de l'arachide (*Avachis hypogea*) cultivée au Sénégal. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, Université Paris VII p 11.)
- Antoun.H. Bordeleaul.L. M, Gagnon.C. et R. A. Lachance., 1978 :** Effet du dextrose et de l'extrait de levure sur l'interaction entre deux espèces de Rhizobium et quelques champignons. *Phytoprotèction* 5 9, 558-562.
- Aouar.L. 2012.** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Université Mentouri-Constantine, 22-25p
- Boote. K.J, 1982.** Growth stages o fpeanut (*Arachis hypogaea* L.). *PeanutSci.*, 9, 35-40.
- Brimecombe. M.J., De Liej, F.A, Lynch, J.M. 2001.** The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. Ed. *The Rhizosphere*. Marcel Dekker, New York, pp.95-140.
- Buyer J. S, Sikora L. J. and Chaney R. L. 1989.** A new growth medium for the study of siderophore-mediated interactions. *Biol. fert. Soils* 8, 97- 10 1.

Chandra S. Choure K, Dubey RC, Maheshwari DK. 2007. Rhizosphere competent Mesorhizobium loti MP6 induces root hair curling, inhibits Sclerotinia sclerotiorum and enhances growth of Indian mustard (Brassica campestris). Braz J Microbiol.; 38: 128–130.

Chandra S. Choure K, Dubey RC, Maheshwari DK.2007.Rhizosphere competent Mesorhizobium loti MP6 induces root hair curling, inhibits Sclerotinia sclerotiorum and enhances growth of Indian mustard (Brassica campestris). Braz J Microbiol; 38: 128–130.

Chao WL. Antagonistic.1990 activity of Rhizobium spp. against beneficial and plant pathogenic fungi.Lett Appl Microbiol; 10: 213-215.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic Bacillus subtilis strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiological Research, 160, pp. 75-81.

Clavel D, Gautreau J, 1997: L'arachide. In l'amélioration des plantestropicales. Eds. Charrier A, Jacquort M, Hamon S, Nicolas D, 61-82

Clavel, D.2004. Amélioration variétale de l'arachide (Arachis hypogaea L.) pour l'adaptation à la sécheresse. Proposition d'une approche intégrée pour la sélection., thèse de doctorat, UNIVERSITE PARIS XII-VAL DE MARNE.

De Meyer, S.E, Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T. et Willems, A. 2011. Genetic Diversity of Rhizobia Associated with Indigenous Legumes in Different Regions of Flanders (Belgium). Soil Biol. Biochem. 43 (12): 2384-2396.

Dennis, C. Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. III. Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc., 57, pp.363–369.

Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K. 2003; Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi.Ind J Exp Biol. a; 41: 1160-1164.

Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K.Rhizobia. 2003. as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi.Ind J Exp Biola; 41: 1160-1164.

Dighe, N.S., Shukla, D., Kalkotwar, R.S., Laware, R.B., Bhawar, S.B. et Gaikwad, R.W. 2010. Nitrogenase Enzyme: A Review. Der Pharmacia Sinica 1 (2): 77-84.

- Doyle, J.J. 1998.** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci.* 3 (12): 473- 478. Doyle,
- Elbadry M, Taha RM, Eldougdoug KA, Gamal-EldinH. 2006** Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *J Plant Dis Protect*; 113(6):247-251.
- Essalmani H, Lahlou H. 2002.** In vitro antagonistic activity of some microorganisms towards *Fusarium oxysporum* f.sp.lentis. *Cryptogamie-Mycol.*; 23: 221-234.
- Fiddaman, P.J., Rossall, S. 1993.** The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, pp.119–126.
- G. R. Knudsen, L. Dandurand. 2013.** *Phytopathologie : l'étude de la Santé des Plantes.* Université d'Idaho, 4-5p.
- Gloud, W.D. 1990.** Biological control of plant root diseases by bacteria. In: Nakas, J.P., Hagedorn, C. *Biotechnology of plant-microbe interactions.* Ed. McGraw-Hill, New York, USA, pp.287-317.
- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Kumar R, VarshneyCL, Gowda L, Krishnamurthy L. 2015.** Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities *Biotech.*; 5: 355-377.
- Graham, P.H. et Vance, C.P. (2003).** Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* 131 (3): 872- 877.
- Gregory, W.C., Krapovickas, A., et Gregory, M.P., 1980.** Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: *Advances in Legume Sciences*, Summerfield, R.J. et Bunting, A.H. (Ed.), Royal Botanical
- Hung M, Bhagwath AA, Shen FT, Devasya RP, Young CC.2005.** Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia.*;49: 577-584
- Idris EES, Iglesias D, Talon M, Borriss R. 2007.** Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* sFZB42. *Mol Plant Microbe Interact.*;20:619-626.
- Inam-ul-Haq, M., Javed, N., Ahmad, R., Rehman, A. 2003.** Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2(1), pp.65-74

Johnston, H. W., 1967: Potential of the Rhizobium-Fusarium interactions on the incidence of alfalfa root rot. Ph.D. Thesis, University of Rhodes Island.

Kanouni L, 2019. Inhibition des champignons phytopathogènes par Rhizobium.thse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1.p55

Landa BB, Hervas A, Bethiol W, Jimenez- Diaz RM. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* ;25 :305-318.

Lecomte M.2010.AIDE – MEMOIRE du « petit chimiste mycophile »
<http://www.amfb.eu/Publications/2010/aidememoire.pdf>.

Lepoivre P. (2003). Les bactéries phytopathogènes, In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional Publishing;385

Maalem A, Sansri D.2014. Activité anti-phytopathogène de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas* spp fluorescents. Mémoire de Master. UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA,

Maatallah J, Berraho, Sanjuan J, Lluch C.2002.Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* ;22 :321–329.

Mannai, S., Jabnoun-Khiareddine, H., Nasraoui, B., &Daami-Remadi, M.2020. Rhizoctonia root rot of pepper (*Capsicum annum*): comparative pathogenicity of causal agent and biocontrol attempt using fungal and bacterial agents. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 9(2), 431-439.

Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. et Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. SoilSci. Plant Nutr.* 10 : 293-319

Miloud Y.2018. Etude du potentiel bénéfique des souches de Rhizobium pour *Medicago truncatula*: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose.thèse de doctorat. L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE.p146.

- Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S. 2006.** Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol.* 2006; 52: 383-389.
- Montealegre, 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 *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2), pp.115-127.
- Montealegre, 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 *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2), pp.115-127.
- Ndoye I.1990.** Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de doctorat. Université des sciences et techniques de Lille ; 170p.
- NgomaL, Babalola OO, Ahmad F.2012.** Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scie Res Ess.* 2012; 7(47): 4003-4013.
- Noel K.D., 2009:** Bacteria Rhizobia. *Encyclopedia of microbiology*, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA, 3, 877-893.
- Oldroyd, G.E.D. et Dixon, R.2014.** Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 19-24.
- Ongena M, Daayf F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornélis P, Koedam N, Bélanger RR. 1999.** Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads; predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* ;48 : 66-76.
- Paul R. and Impens P. 2003.** Les maladies non parasitaires. In: *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Peters, N.K. et Verma, D.P.S. 1990.** Phenolic compounds as regulators of gene expression in *Plant Microbe Interactions*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3 (1): 48.
- Ramos, T., Bellaj, M.E., Idrissi-Tourane, A.E., Daayf, F. et Hadrami, I.E. 1997.** Les Phénolamides des Rachis de Palmes, Composants de la Réaction de Défense du Palmier Dattier vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, Agent Causal du Bayoud. *J. Phytopathol.* 145 : 487-493.

Resplandy, R., Cheveaugeon, J., Delassus, M. et Luc, M., 1954 : Première liste annotée de champignons parasites de plantes cultivées en Côte d'Ivoire. Annales des Epiphyties 1: 1-61. Rioux.

Revoredo, C.L., And S. Fletcher. 2002. World peanut market: an overview of the past 30 years. Georgia Agricultural Experiment Stations, College of Agricultural and Environmental Sciences, the University of Georgia.

Rosenberg C., 1997 : Signaux symbiotiques chez les rhizobiums. In Assimilation de l'azote chez les plantes : Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Ed. INRA, Paris, 149-162.

Rüberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Pühler A, Weidner S, Becker A. 2003 Construction and validation of a Sinorhizobium meliloti whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. J Biotechnol.; 106: 25-56.

Rubio, L.M. et Ludden, P.W. 2005. Maturation of Nitrogenase: A Biochemical Puzzle. J. Bacteriol. 187 (2): 405-414.

Sadowsky MJ, Keyser HH, Bohlool BB. 1983. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. Int J Syst Bacteriol. ;33 : 716-722.

Semal J. and Lepoivre P. 2003. Les maladies des plantes : concepts généraux. In: Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Siddiqui, I.A., Ehteham-ul-Haque S., Zaki M.J. and Ghaffar A., 2000: Effect of urea on the efficiency of Bradyrhizobium sp., and Trichoderma harzianum in the control of root infecting fungi in mung bean and sunflower. Sarhad J. Agric., 16(4) : 403-406. Simpfendorfer

Sougnabe S P, Foko J .2003 Contribution à la connaissance de la spermo flore fongique parasite de l'arachide dans le bassin de Mayo-Kebbi au Tchad, 6 p. ffhal-00142983ff.

Sridevi, M. et Mallaiah, K. 2008. Factors effecting chitinase activity of Rhizobium sp. from Sesbaniasaban. Biologia 63 : 307-312

Touil W ,2017. Effets comparés des champignons mycorrhiziens arbusculaires et des Rhizobia isolés d'un sol algérien avec ceux du commerce, sur le rendement de l'arachide Arachis hypogaea (L.). Thèse de doctorat, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA,

Référence bibliographique

Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S. 2006. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*, doi: 10.1016-j. micres.2006.06.007.

Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E. Current. 2017. Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. *Microbes for Legume Improvement*. 2017; 1-43.

Vining, L.C. 1990. Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, pp.395-427.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B, Thomashaw, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, pp.309-348.

Whipps JM. 1987. Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.*; 107: 127-142.

Williams, G.E., Asher, M.J.C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Prot.*, 15, pp.479-486.

Wojciechowski, M.F., M. Lavin, And M.J. Sanderson. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91: 1846.

Wong, P.T.W., Baker, R. 1984. Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus* patch by fluorescent pseudomonads from *Fusarium* suppressive soil. *Soil Biol. Biochem.*, 16, pp.397-403.

Zakhia F, De Lajudie P. Taxonomy of rhizobia. Agronomie. 2001; 21: 569-576.

Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X. and Dong X., 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96 :6523– 6528.

Référence électronique 1 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Arachide> (05/6/2017)

Référence électronique 2 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Rhizobium> (05/6/2017)

(http://southeastfarmpress.com/mag/farming_peanut_biodiesel_promising).

Annexe

Annexe

Annexe 1:

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

| YEM (Yeast Extract-Mannitol, Vincent, 1970) | |
|---|----------------|
| Les composants | Quantité (g/l) |
| PDA | 39.0 g |
| Eau distiller | 1.0 litre |

Annexe 2:

Milieu YEM (Yeast Extrait Mannitol Agar)

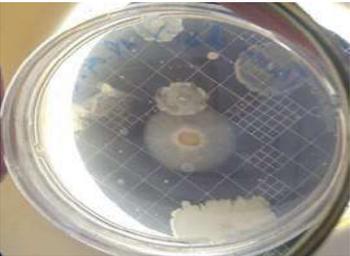
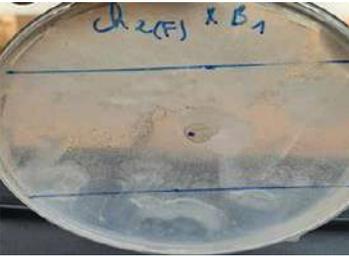
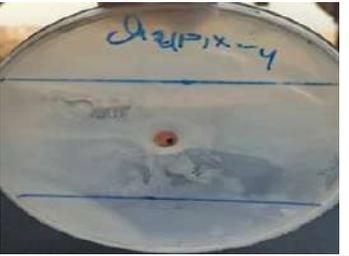
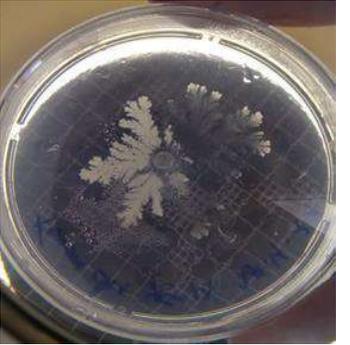
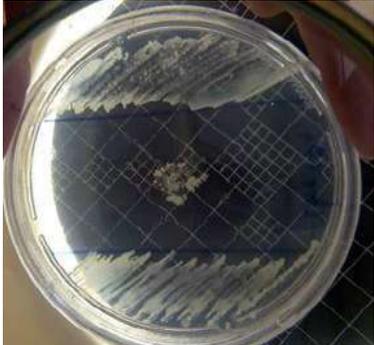
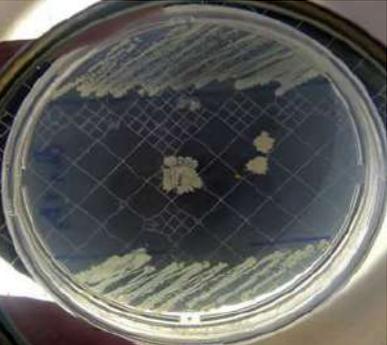
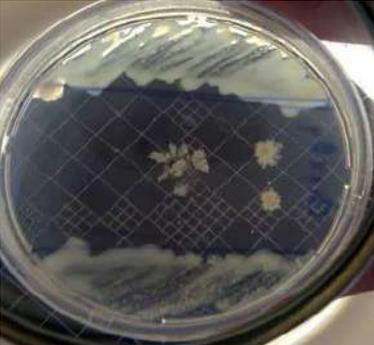
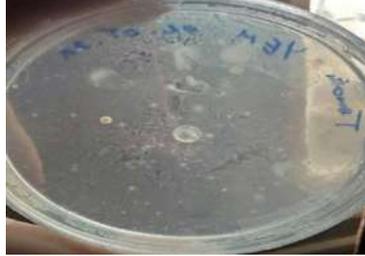
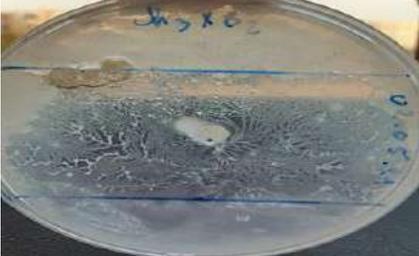
| YEM (Yeast Extract-Mannitol, Vincent, 1970) | |
|---|----------------|
| Les composants | Quantité (g/l) |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 |
| MgSO ₄ , 7 H ₂ O | 0.2 |
| MgSO ₄ , 7 H ₂ O | 0.1 |
| Extrait de levure | 0.6 |
| Mannitol | 10 |

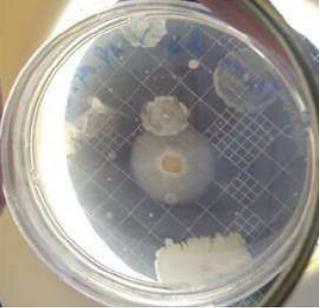
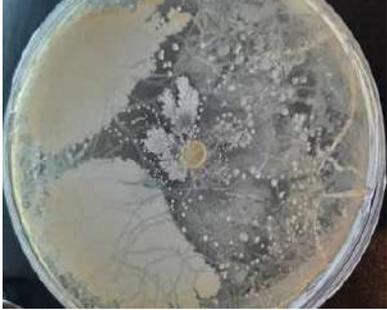
Annexe 3 :



Photo 1. Les deux types de coloration dans les lames préparées

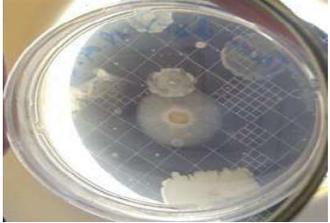
Annexe 4 : Photo 2. La confrontation directe sur les boîtes des pétri

| Témoin | Rhizobium /Champignon | | | |
|--|---|--|---|---|
|  |  |  |  |  |
| Témoin Fusarium | HBA1/Fusarium Oxysporum | EP72/Fusarium Oxysporum | SP32/Fusarium Oxysporum | EP1S2/Fusarium Oxysporum |
|  |  |  |  |  |
| Témoin Cladosporium | HBA1/Cladosporium | EP72/Cladosporium | SP32/Cladosporium | EP1S2/Cladosporium |
|  |  |  |  |  |
| Témoin Aureobasidium | HBA1/Aureobasidium | EP72/Aureobasidium | SP32/Aureobasidium | EP1S2/Aureobasidium |

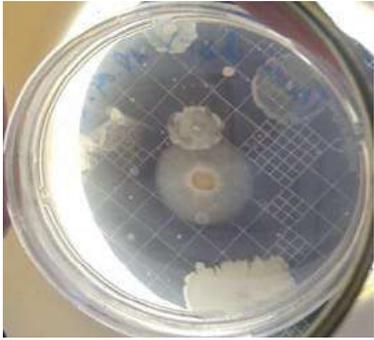
| Témoin | Rhizobium /Champignon | | | |
|---|--|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| Témoin <i>Fusarium</i> | HBA1/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | EP72/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | SP32/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | EP1S2/ <i>Fusarium Oxysporum</i> |
|  |  |  |  |  |
| Témoin <i>Cladosporium</i> | HBA1/ <i>Cladosporium</i> | EP72/ <i>Cladosporium</i> | SP32/ <i>Cladosporium</i> | EP1S2/ <i>Cladosporium</i> |
|  |  |  |  |  |
| Témoin <i>Aureobasidium</i> | HBA1/ <i>Aureobasidium</i> | EP72/ <i>Aureobasidium</i> | SP32/ <i>Aureobasidium</i> | EP1S2/ <i>Aureobasidium</i> |

Annex 5 : Photo 3 : la confrontation indirecte sur les boîtes de pétri

Annexe 6 : Photo 4 : Confrontation directe à partir des zones d'inhibition obtenues

| Témoin | Rhizobium /Champignon | | | |
|--|---|--|---|---|
|  |  |  |  |  |
| Témoin Fusarium | HBA1/Fusarium Oxysporum | EP72/Fusarium Oxysporum | SP32/Fusarium Oxysporum | EP1S2/Fusarium Oxysporum |
|  |  |  |  |  |
| Témoin Cladosporium | HBA1/Cladosporium | EP72/ Cladosporium | SP32/ Cladosporium | EP1S2/ Cladosporium |
|  |  |  | | |
| Témoin <i>Aureobasidium</i> | HBA1/ <i>Aureobasidium</i> | EP72/ <i>Aureobasidium</i> | | |

Annexe 7 : Photo 5 : Confrontation à partir des zones d'inhibition obtenues

| Témoin | Rhizobium | | | |
|---|--|--|---|---|
|  |  |  |  |  |
| Témoin <i>Fusarium</i> | HBA1/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | EP72/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | SP32/ <i>Fusarium Oxysporum</i> | EP1S2/ <i>Fusarium Oxysporum</i> |
|  |  | | | |
| Témoin <i>Cladosporium</i> | EP72/ <i>Cladosporium</i> | | | |

Interaction entre les rhizobia nodulant l'arachide (*arachis hypogaea* L.) et quelque champignons phytopathogène

Résumé :

Cette étude a été réalisée pour évaluer l'effet antagoniste de 4 souches de Rhizobia isolées à partir des nodosités de l'arachide obtenue de la région de Ghardaïa et Ouargla envers trois souches des champignons *Fusarium oxysporium*, *Cladosporium* sp, *Aureobasidium* sp, isolés à partir des plantes infectées. Les souches ont été revivifiées puis confrontés directement et indirectement aux souches antagonistes de Rhizobia à une température de 28° C sur milieu YEM. Les résultats obtenus après 10 jours d'incubation, ont montrés que les Rhizobiums inhibent la croissance mycélienne. Les pourcentages d'inhibition varient entre 20 et 100 %. Le *Fusarium oxysporium* a été inhibé par 46.99% des rhizobia, *Cladosporium* sp. Par 77%, et l'*Aureobasidium* sp. Par 29.81%.

Ainsi, nous avons remarques la présence de plusieurs mécanismes d'inhibitions impliqués par les rhizobia vis-à-vis des champignons testés qui affectent fortement la croissance des champignons phytopathogènes, à savoir ; la compétition nutritionnelle, la sécrétion des substances inhibitrices diffus dans le milieu de culture et la production des composés volatils.

Mots clé : antagonisme ; rhizobia ; champignons phytopathogènes ; arachide ; inoculation.

Intera between rhizobia nodulating peanuts (*arachis hypogaea* L.) and some phytopathogenic Fungi

Summary This study was carried out to evaluate the antagonistic effect of 4 strains of Rhizobia isolated from nodules of peanuts obtained from the region of Ghardaïa and Ouargla against three strains of the fungi *Fusarium oxysporium*, *Cladosporium* sp, *Aureobasidium* sp, isolated from infected plants. The strains were revived and then directly and indirectly confronted with the antagonist strains of Rhizobia at a temperature of 28 ° C. on YEM medium. The results obtained after 10 days of incubation showed that Rhizobia inhibit mycelial growth. The percentages of inhibition vary between 20 and 100%. *Fusarium oxysporium* was inhibited by 46.99% of Rhizobia, *Cladosporium* sp. By 77%, and *Aureobasidium* sp. By 29.81%.

Thus, we noticed the presence of several inhibitory mechanisms involved by rhizobia vis-à-vis the tested fungi which strongly affect the growth of phytopathogenic fungi, namely; nutritional competition, the secretion of inhibitory substances diffuses into the culture medium and the production of volatile compounds.

Keywords: antagonism; rhizobia; phytopathogenic fungi, peanuts; inoculation.

تفاعل بين ريزوبيا الفول السوداني. (*arachis. hypogaea* L.) وبعض الفطريات المتسببه في امراض النبات
ملخص اجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير المضاد لأربع سلالات من rhizobia معزولة من عقيدات الفول السوداني التي تم الحصول عليها من منطقته غرداية وورقلة ضد ثلاث سلالات من الفطريات *Fusarium oxysporium* و *Cladosporium* sp و *aureobasidium* si المعزولة من النباتات المصابة. تم أحياء السلالات صم مواجهتها بشكل مباشر وغير مباشر مع السلالات المناهضة ل rhizobia عند درجة حراره 28 درجة مئوية على وسط YEM. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد 10 أيام من الحضانه ان rhizobia تثبط نمو الفطريات. تتراوح نسب التثبيط بين 20 و 100%. تم تثبيط *fusarium oxysporium* بنسبه 46.99% من الجنور *Cladosporium* sp بنسبه 77% و *aureobasidium* sp بنسبه 29.81% وهكذا ، لاحظنا وجود العديد من الآليات المثبطه التي تشارك فيها ريزوبيا مقابل الفطريات المختبره والتي تؤثر بشده علي نمو الفطريات الممرضه النبات ، وهي : المنافسه الغذائيه ، ينتشر افراز المواد المثبطه في وسط الاستزراع وانتاج مركبات متطايره .
الكلمات المفتاحيه : العداء، ريزوبيا، الفطريات، الممرضه للنبات، والفول السوداني، التحصين