

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN

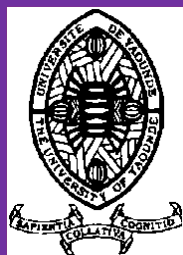
Paix-travail-patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE
DE LA VIE

FACULTÉ DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCE

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING
UNIT IN LIFE SCIENCE

FACULTY OF SCIENCE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**Activité antimicrobienne des extraits de
Streptomyces spp. vis-à-vis de *Xanthomonas*
phaseoli pathovar *manihotis* (agent responsable
de la bactériose vasculaire du manioc)**

Mémoire rédigé en vue d'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle

Par :

ZÉ ABADA Loïc

Matricule : 18J2530

Licence en Biosciences (Microbiologie)



Sous la direction de :

ESSIA NGANG Jean Justin

Professeur

Université de Yaoundé 1

NKOUDOU ZE Nardis

Chargé de cours

Université de Yaoundé 1

Année académique : 2023-2024

RÉPUBLIQUE DU CAMEROUN

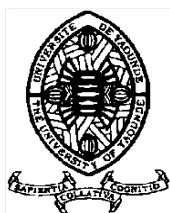
Paix-travail-patrie

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

**CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
DE LA VIE, SANTÉ ET ENVIRONNEMENT**

**UNITÉ DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCE
DE LA VIE**

FACULTÉ DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

**CENTER FOR RESEARCH AND TRAINING
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH
AND ENVIRONMENTAL SCIENCE**

**RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING
UNIT IN LIFE SCIENCE**

FACULTY OF SCIENCE

**LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY**

**Activité antimicrobienne des extraits de
Streptomyces spp. vis-à-vis de *Xanthomonas*
phaseoli pathovar *manihotis* (agent responsable
de la bactériose vasculaire du manioc)**

Mémoire rédigé en vue d'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle

Par :

ZÉ ABADA Loïc

Matricule : 18J2530

Licence en Biosciences (Microbiologie)

Sous la direction de :

ESSIA NGANG Jean Justin

Professeur

Université de Yaoundé 1

NKOUDOU ZE Nardis

Chargé de cours

Université de Yaoundé 1

Année académique : 2023-2024

DÉDICACE

À

Mes parents.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Seigneur Dieu pour toute la force et la détermination que nous avons eu pour la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements :

- ✚ À mes encadrants, Professeur ESSIA NGANG Jean Justin, et le Docteur NKOUDOU ZE Nardis pour l'accompagnement, les conseils, les motivations, et soutiens sur toutes les formes tout au long de ce travail ;
- ✚ Aux Professeurs SADO KAMDEM Sylvain Leroy, et TCHIKOUA Roger pour tous les conseils et orientations apportées à ce travail ;
- ✚ Au Docteur. ESSONO Damien Marie, pour l'accompagnement, et toute l'expérience pratique acquise sur les plants d'expériences en biologie végétale ;
- ✚ Aux Docteurs. NKOUE Abraham, et LAMYE Glory, pour toutes les évaluations et suggestions apportées sur ce travail ;
- ✚ À tous les enseignants du département de Microbiologie pour tous leurs enseignements tout au long de mon parcours ;
- ✚ À Monsieur. BEBINE BEIDI Olivier, Monsieur. GODWE Joël, Madame BELINGA ATANGANA Neicha pour les précédents travaux réalisés sur les *Streptomyces*, et pour le suivi sur la paillasse ;
- ✚ À tous les aînés du laboratoire de Microbiologie pour l'aide durant les manipulations, et les corrections apportées à ce document ;
- ✚ À mes compagnons de laboratoire de Microbiologie, Mlle ESSOMBA Henriette Angelica, Mademoiselle NKONGO ÉLALE Cheilby P., Mademoiselle Anne Christine TOLANE MBOMEKALE, Monsieur. FONGANG TAGNE Roucel, Monsieur MVOTO MEYONG Jean Jaques, et Monsieur DZOU FOUA Pascal, pour tous les bons et mauvais moments passés durant le déroulement de nos différents travaux, et pour toute l'aide que vous m'avez apportée.
- ✚ À tous mes camarades de la septième (7^{ième}) promotion de Microbiologie pour tous les moments passés ensemble.

SOMMAIRES

DÉDICACE.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
SOMMAIRES.....	III
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I.1. GÉNÉRALITÉ SUR LE MANIOC.....	3
I.1.1. Origine	3
I.1.3. Agronomie	4
I.1.4. Nutrition	5
I.1.5. Économie et transformation	5
I.1.6. Place du manioc au Cameroun.....	8
I.1.7. Problèmes liés à la production du manioc.....	8
I.1.7.1. Les adventices.....	8
I.1.7.2. Les ravageurs	9
I.1.7.3. Les maladies du manioc.....	9
I.2. LA BACTÉRIOSE VASCULAIRE DU MANIOC.....	11
I.2.1. Agent pathogène	11
I.2.1.1. Classification	11
I.2.1.2. Caractérisations	12
I.2.2. Manifestation de la maladie.....	13
I.2.3. Cycle de la maladie.....	14
I.2.4. Conséquences de la CBB sur la production du manioc	15

I.2.5. Gestion de la bactériose vasculaire du manioc	16
I.3. BIOCONTROLE DES PLANTES	17
I.3.1. Description	17
I.3.2. Mécanismes d'actions.....	17
I.4. GÉNÉRALITÉ SUR LES STREPTOMYCES	18
I.4.1. Classification et description	18
I.4.2. Morphologie des Streptomyces	18
I.4.3. Intérêt des Streptomyces.....	19
I.4.3.1. Streptomyces comme agent de biocontrôle des phytopathogènes	19
I.4.3.2. <i>Streptomyces</i> comme biofertilisant des plantes.....	21
I.4.3.2. Streptomyces dans le domaine médical.....	21
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
II.1. MATÉRIEL.....	22
II.1.1. Matériel biologique	22
II.1.2. Milieux de cultures et réactif	22
II.1. 3. Équipement électronique.....	22
II.2. MÉTHODE.....	22
II.2.1. Isolement et caractérisation de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> 23	
II.2.1.1. Échantillonnage	23
II. 2.1.2. Isolement	23
II.2.1.3. Caractérisation microscopique et biochimique des isolats de <i>Xpm</i>	24
II.2.1.3.1. Caractérisation microscopique.....	24
II.2.1.3.2. Caractérisation biochimique	24
II.2.2. Évaluation de l'activité antibactérienne in-vitro des isolats de <i>Streptomyces</i> spp. vis-à-vis de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	26
II.2.2.1. Revivification des isolats de Streptomyces.....	26
II.2.2.2. Criblage des isolats de Streptomyces antagonistes à <i>Xpm</i>	27
II.2.2.3. Production et extraction des composés antibactériens	28
II.2.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés bioactives anti- <i>Xpm</i>	29

II.2.3. Évaluation de l'aptitude des extraits de culture des isolats de <i>Streptomyces</i> à préserver l'état sanitaire des plants de manioc infectés par Xpm	30
II.2.3.1. Dispositif expérimental	30
II.2.3.2. Technique d'inoculation des plants et méthode de traitement des plants.....	31
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	33
III.1. RÉSULTATS	33
III.1.1. Caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des colonies de Xpm.....	33
III.1.2. Observation de l'activité antimicrobienne in-vitro des isolats de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	35
III.1.3. Activité antimicrobienne des extraits de cultures des isolats de <i>Streptomyces</i> les plus actifs.....	37
III.1.5. État sanitaire des plants après traitement.....	37
III.2. DISCUSSION	43
CONCLUSION.....	47
PERSPECTIVES.....	48
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXES.....	55

RÉSUMÉ

L'économie du Cameroun reste fortement dépendante de son secteur agricole, où le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) demeure l'un des piliers de la sécurité alimentaire du pays lié principalement à la racine tubéreuse. Malgré cette importance, la culture du manioc est sous la menace d'une maladie d'origine bactérienne causée par *Xanthomonas phaseoli* pathovar *manihotis* (*Xpm*), connue sous le nom de la bactériose vasculaire du manioc ou *cassava bacterial Blight* (CBB). La CBB peut conduire à la destruction de la totalité des plants de manioc provoquant ainsi la baisse des rendements de production et un manque à gagner chez les producteurs de manioc. D'où l'intérêt porté à la lutte contre cette bactérie dans la présente étude, dont l'objectif est d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits métaboliques de *Streptomyces* spp. vis-à-vis de *Xpm*. Pour y parvenir, *Xpm* a été isolé à partir des feuilles de manioc atteintes par la CBB, puis caractérisé. Elle a ensuite été confrontée à l'activité inhibitrice de quarante-trois (43) isolats de *Streptomyces* spp.. Les métabolites produits par les isolats de *Streptomyces* ayant présenté les meilleures activités ont été extraits au méthanol, puis testés à différentes concentrations sur *Xpm*. Les concentrations des extraits, supérieures ou égales aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues *in-vitro* ont ensuite été appliquées aux plants de manioc préalablement infectés avec *Xpm*, et l'évaluation de l'état sanitaire de ces plants a été réalisée pendant 14 jours. Il en ressort de cette étude que, sept (07) des quarante-trois (43) isolats testés ont présenté des activités antagonistes vis-à-vis de *Xpm* avec des diamètres d'inhibitions compris entre $13,50 \pm 2,12$ mm et $27,50 \pm 3,54$ mm. Les isolats Ker-2 et Bel-12 ont été retenus comme les isolats de *Streptomyces* les plus actifs avec des CMI respectives de 2 µg/ml et 32 µg/ml et une efficacité de préservation des plants de manioc infectés respectifs de 12 % et 76 % sur une période de 14 jours. L'extrait méthanolique de l'isolat Bel-12 apparait donc comme un agent de biocontrôle (BCA) de la CBB.

Mots clés : *Manihot esculenta* Crantz, Bactériose vasculaire ; *Streptomyces*, *Xanthomonas phaseoli* pathovar *manihotis*, Biocontrôle.

ABSTRACT

Cameroon's economy remains heavily dependent on its agricultural sector, where cassava (*Manihot esculenta* Crantz) remains one of the pillars of the country's food security, primarily linked to the tuberous root. Despite this importance, cassava cultivation is under threat from a bacterial disease caused by *Xanthomonas phaseoli* pathovar *manihotis* (*Xpm*), known as cassava vascular bacterial blight. (CBB). The CBB can lead to the destruction of all cassava plants, resulting in decreased production yields and a loss of income for cassava producers. Hence the interest in combating this bacterium in the present study, which aims to evaluate the antimicrobial activity of the metabolic extracts of *Streptomyces* spp. against *Xpm*. To achieve this, *Xpm* was isolated from cassava leaves affected by CBB, and then characterized. He was then subjected to the inhibitory activity of forty-three (43) isolates of *Streptomyces* spp. The metabolites produced by the isolates of *Streptomyces* that showed the best activities were extracted with methanol and then tested at different concentrations on *Xpm*. The concentrations of the extracts, equal to or greater than the minimum inhibitory concentrations (MIC) obtained in vitro, were then applied to cassava plants previously infected with *Xpm*, and the assessment of the health status of these plants was carried out over a period of 14 days. This study shows that seven (07) of the forty-three (43) tested isolates exhibited antagonistic activities against *Xpm*, with inhibition diameters ranging from 13.50 ± 2.12 mm to 27.50 ± 3.54 mm. The Ker-2 and Bel-12 isolates were selected as the most active *Streptomyces* isolates, with respective MICs of 2 µg/ml and 32 µg/ml, and a preservation effectiveness of infected cassava plants of 12% and 76% over a period of 14 days. The methanolic extract of the Bel-12 isolate thus appears as a biocontrol agent (BCA) for the CBB.

Keywords : *Manihot esculenta* Crantz, cassava bacterial blight, *Streptomyces*, *Xanthomonas phaseoli* pathovar *manihotis*, Biocontrol.

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

°C	Degré Celsius
ACB	Agent de Contrôle Biologique
ADN	Adénosine Dinucléotide
BCA	Biological control agent
BG-AS	Bactérie Gram Négatif Aérobie Strict
CBB	Cassava bacterial blight
D.O	Densité optique
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
IITA	Institut international d'agriculture tropicale
MBCA	Microbien biological control agent
Mm	Millimètre
ONPG	OrthonitrodiPhosphate β -Galactopyranoside
PFTE	Polytétrate fluoroéthylène
Ppm	Partie par million
pv.	Pathovar
spp.	<i>Species pluralis</i>
Xpm	<i>Xanthosomas phaseoli</i> pathovar <i>manihotis</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les parties de <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	4
Figure 2. Procédés de transformation des tubercules de manioc et produits dérivés.....	7
Figure 3. Les ravageurs du manioc	9
Figure 4. Les maladies du manioc.....	11
Figure 5. Manifestation de la CBB.....	14
Figure 6. Cycle de la CBB.....	15
Figure 7. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.....	19
Figure 8. Echantillons de feuilles de manioc infectées provenant de trois champs (A, B et C).....	23
Figure 9. Concentration des extraits au Rotavapor	28
Figure 10. Autoclave pour terre	31
Figure 11. Culture en pots des boutures manioc	31
Figure 12. Plants de manioc sains âgés de six (06) semaines	32
Figure 13. Méthode d'inoculation par <i>Xpm</i> et traitement des plants de manioc par les solutions antimicrobiennes	32
Figure 14. Colonies de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> sur TSA.....	33
Figure 15. Observation des halos d'inhibition obtenus par les isolats Ker-2 et Bel-12.....	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification systématique de <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	3
Tableau 2. Classification systématique de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	12
Tableau 3. Top 10 des bactéries phytopathogènes.....	16
Tableau 4. Composés sécrétés par <i>Streptomyces</i> spp. avec des activités antimicrobiennes sur les phytopathogènes	20
Tableau 5. Isolats de <i>Streptomyces</i>	26
Tableau 6. Caractéristiques macroscopique, microscopique et biochimique de <i>Xpm</i>	34
Tableau 7. Diamètres d'inhibitions des 07 isolats de <i>Streptomyces</i> bioactifs vis-à-vis de <i>Xpm</i>	35
Tableau 8. Aspect sanitaire des feuilles après traitements aux extraits de Bel-12 et Ker-2, au 2 ^{ième} et 14 ^{ième} jour après contamination à <i>Xpm</i>	39
Tableau 9. Dénombrement des feuilles après traitement aux extraits E _{MeOH} Bel-12 et E _{MeOH} Ker-2, 14 jours après contamination.....	42

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est l'aliment de base de plus de 800 millions de personnes dans le monde, avec plus de 500 millions de consommateurs en Afrique (Vernier et *al.*, 2018). Principale source de glucides (90 à 95 %), en plus des vitamines (vitamine C, Thiamine, riboflavine et niacine), la racine tubéreuse du manioc est à la base de l'alimentation des populations Camerounaises, où elle occupe avec ses produits dérivés, la première place de la production vivrière nationale, et 43% des parts du marché des racines et tubercules mis ensemble (Tricoche et *al.*, 2008). De plus, les feuilles de manioc, majoritairement consommables par les populations des zones rurales sont très riches en protéines (30% de la matière sèche) contenant notamment le de la lysine et de la leucine, mais pauvre en acide aminés soufré, dont la méthionine (FAO, 2013).

En dépit de son importance socio-économique, la culture du manioc est confrontée à plusieurs maladies qui affaiblissent ses rendements de production. Il s'agit entre autres, de l'anthracnose, la striure brune, la pourriture des racines par les champignons du sol, les cercosporioses, la mosaïque Africaine, et la bactériose vasculaire (Brama et *al.*, 2000, Msikita et *al.*, 2000, Mahungu et *al.*, 2014).

La bactériose vasculaire du manioc ou brûlure bactérienne du manioc (CBB pour *cassava bacterial blight*) est causée par *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), un bacille à Gram négatif, aérobic stricte (BG⁻AS) (Rache et *al.*, 2023). Les symptômes de la CBB se manifestent par un flétrissement des feuilles, suivi du dépérissement des tiges des plants, avec pour corolaire la baisse des rendements pouvant aller jusqu'à 100 % dans les cas les plus sévères (Affery et *al.*, 2018).

Plusieurs méthodes sont mises en œuvre pour lutter contre cette maladie. Les plus efficaces en ce moment sont basées essentiellement sur la protection de la plante contre le pathogène, plus tôt que sur l'élimination de ce dernier. On distingue entre autres: le contrôle sanitaire utilisant principalement les composés chimiques; l'application des bonnes pratiques culturales (variation des cultures, élimination des débris) et l'utilisation des variétés résistantes ou tolérantes à la CBB (Perez, 2022). Ces méthodes ou moyens de lutte restent peu efficaces aux regards des dégâts causés par *Xpm*. Pourtant, l'utilisation d'un agent de contrôle biologique (BCA) est une approche susceptible de lutter plus efficacement contre le pathogène et diminuer la dépendance des agriculteurs des agents chimiques (pesticides), par ailleurs, sources de pollution.

Streptomyces qui est un genre du *phylum Actinobacteria*, représente l'une des plus grandes sources des composés bioactifs avec différentes bioactivités telles que les antibactériennes, les antifongiques, les antivirales, les immunosuppresseurs, les anticancéreuses, et des propriétés antioxydantes (Maleki et *al.*, 2013; Olanrewaju & Olubukola, 2019; Woan-Fei et *al.*, 2019). Par la richesse de leurs métabolites en composés antimicrobiens, les *Streptomyces* et leurs extraits apparaissent comme possible solution à la lutte biologique contre les pathogènes bactériens. Une question émerge de ce qui précède : La bactériose vasculaire du manioc peut-elle être contrôlée par l'utilisation d'extraits des bactéries du genre *Streptomyces* ?

C'est pour répondre à cette question, que nous avons entrepris ce travail dont l'objectif principal est d'évaluer l'effet antimicrobien des extraits de *Streptomyces* spp. vis à vis *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. De façon spécifique, il s'agit de :

- ✚ Isoler et caractériser *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), agent responsable de la Bactériose vasculaire;
- ✚ Évaluer l'activité *in-vitro*, de 43 isolats de *Streptomyces*, et des extraits des isolats les plus actifs vis-à-vis de *Xpm* ;
- ✚ Évaluer l'aptitude des extraits de *Streptomyces* à préserver l'état sanitaire des plants de manioc infectés par *Xpm*.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. GÉNÉRALITÉ SUR LE MANIOC

I.1.1. Origine

Le manioc, du nom scientifique *Manihot esculenta* Crantz est une plante-racine, originaire du versant sud du bassin Brésilien de l'Amazone, qui fournit l'alimentation à plus de 800 millions de personnes dans le monde (FAO, 2013).

Les conquêtes Espagnole et Portugaise entraînent l'arrivée du manioc sur les côtes occidentales de l'Afrique. Dès les années 1800, sa culture se propage le long de la côte Occidentale de l'Afrique, et en Asie du Sud. L'expansion de la culture du manioc a été considérable au cours du XX^{ème} siècle, qui l'a vu émerger comme une culture alimentaire de base de premier plan dans toute l'Afrique sub-saharienne ainsi qu'en Inde, en Indonésie et aux Philippines (FAO, 2013). C'est la plante vivrière la plus cultivée dans la zone tropicale humide et devient l'une des plantes les plus consommées dans de nombreuses régions (Kouakou et al., 2015).

I.1.2. Classification et description

Le genre *Manihot* appartient à l'embranchement des plantes Dicotylédones et à la famille des *Euphorbiaceae* (tableau 1), et regroupe plus de 200 espèces. La seule espèce cultivée de ce genre est *Manihot esculenta* Crantz, avec plusieurs synonymes : *M. Utilissima* Pohl, *M. Dulcis* Pax, *M. Melanobasis* Mueller, *M. Aipi* Pohl, *M. Flexuosa* Pax (Vernier et al, 2018). *Manihot esculenta* Crantz fait partie des 19 espèces du genre *Manihot* ayant des structures génomiques à $2n=36$ chromosomes, dont l'étude de la forme de ces derniers à l'hypothèse d'une origine polyploïde (Vernier et al., 2018)

Tableau 1. Classification systématique de *Manihot esculenta* Crantz (Kante, 2020)

Règne.....	<i>Plantae</i>
Embranchement.....	<i>Magnoliophyta</i>
Classe.....	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre.....	<i>Euphorbiales</i>
Famille.....	<i>Euphorbiaceae</i>
Genre.....	<i>Manihot</i>
Espèce.....	<i>Manihot esculenta</i> Crantz

Arbuste ligneux, vivace et ramifié pouvant atteindre jusqu'à 5 mètres de hauteur, le manioc produit de larges feuilles fortement lobées et spiralées de formes très variables. Au cours de leur développement, les arbrisseaux produisent plusieurs racines tubéreuses de réserve contenant jusqu'à 35 % d'amidon, pouvant atteindre jusqu'à 1 mètre de long, et peser collectivement jusqu'à 40 kg en matière charnue (Kouakou et *al.*, 2015). La tige est constituée d'une succession d'entre-nœuds disposés de manière linéaire ou en ligne brisée.

Les nœuds sont les points d'insertion des feuilles et abritent les bourgeons. La plante produit des fleurs régulières femelles et mâles aux dimensions réduites réunies en petites grappes. L'arbuste produit un fruit de forme de capsule non charnue (Kouakou et *al.*, 2015). Les pétioles ont une coloration verte, rouge ou bicolore. Les jeunes feuilles sont glabres ou pubescentes et de couleur verte, pourpre ou violette (Figure 1).

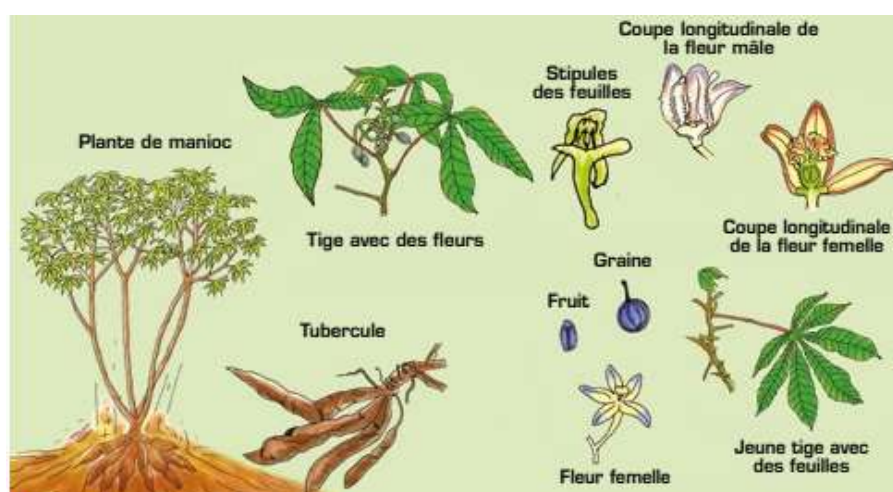


Figure 1: Les parties de *Manihot esculenta* Crantz (Kouakou et *al.*, 2015)

I.1.3. Agronomie

Le manioc se multiplie à partir des boutures de 20 à 30 cm âgées d'au moins 6 mois. Le semis des graines ne se fait qu'en station de recherche pour la création des nouveaux hybrides. La culture se fait en début de la saison des pluies et la bouture est orientée, soit verticalement, soit de manière oblique, soit à plat (Brama et *al.*, 2000), avec pour espacement de 1m sur 1m. Un bon site suppose un sol limoneux (sablo-argileux ou argilo-sablonneux), profond et bien drainé, une pluviométrie suffisante et un climat chaud et humide (Mahungu et *al.*, 2014). Il peut se contenter des terres relativement pauvres à condition qu'il n'y ait pas de stagnation d'eau.

Le développement du manioc est propice dans les régions tropicales et tempérées chaudes. À 0°C le manioc meurt ; vers 1 à 2°C ; seul le bois meurt tandis que les racines restent vivantes ; vers 8 °C, seules les branches meurent. Il faut pratiquement 25 à 30°C en moyenne durant la croissance du plant de manioc. Le manioc supporte des régimes de pluies très divers. En effet, il supporte aussi bien des manques d'eau prolongés que des pluies abondantes. Mais les meilleurs rendements sont obtenus avec une pluviométrie de 1000 à 2000 mm par an et bien répartie tout le long de l'année, avec trois mois de saison sèche. Au-delà de 2 000 mm de pluies, les racines pourrissent en terre (Brama et *al.*, 2000) .

I.1.4. Nutrition

Les feuilles et les racines tubéreuses du manioc sont consommables. La racine est un aliment très énergétique, fournissant 159 kcal de l'énergie alimentaire par 100 g de portion comestible. Comme la plupart des produits agricoles, l'eau constitue la majeure partie de la racine de manioc (60 à 70 % de la portion comestible, c'est-à-dire la chair de la racine épluchée). La matière sèche restante (30 à 40 % de la portion comestible) est majoritairement composée de glucides (90 à 95 %), de protéines (1 %), de lipides (0,3 %), de fibres (1 %) et d'éléments minéraux (0,9 %) (FAO, 2013). Dans de nombreux pays d'Afrique sub-saharienne, c'est la source la plus moins chère de calories, avec des quantités significatives en vitamine C, de thiamine, de riboflavine et de niacine (FAO, 2013) .

Les feuilles de manioc sont très riches en protéines (autour de 30 % par rapport à la matière sèche) ; elles contiennent notamment de la lysine et de la leucine, mais sont pauvres en acides aminés soufrés, dont la méthionine. Elles contiennent également des caroténoïdes (FAO, 2013).

I.1.5. Économie et transformation

Depuis l'année 2000, l'augmentation de la production du manioc est estimée à 100 millions de tonnes, animée par la demande Asiatique en manioc séché et l'amidon de manioc utilisé pour l'alimentation animale et comme matières premières industrielles. De plus, les marchés urbains Africains sont de plus en plus demandeurs de produits alimentaires à base de manioc (FAO, 2013) (Figure 2).

Du fait de ses rendements stables et élevés, même sur des sols marginaux et dans des conditions pluviométriques considérablement faibles, le manioc donne des avantages considérables en matière de sécurité alimentaire. Le coût des intrants agricoles tels que des engrais, des produits phytosanitaires et du matériel de reproduction (boutures) est négligeable (FAO, 2013).

Les unités industrielles en Afrique se tournent davantage vers la transformation du manioc pour des usages non alimentaires, suite à l'émergence des marchés pour l'amidon dans les industries textiles, de l'alcool à usages médicaux et des boissons alcoolisées (Vernier et *al.*, 2018). Dans le plan régional, c'est le premier aliment racine/tubercule produit à grande échelle en Afrique Central (Emmanuel, 2013).

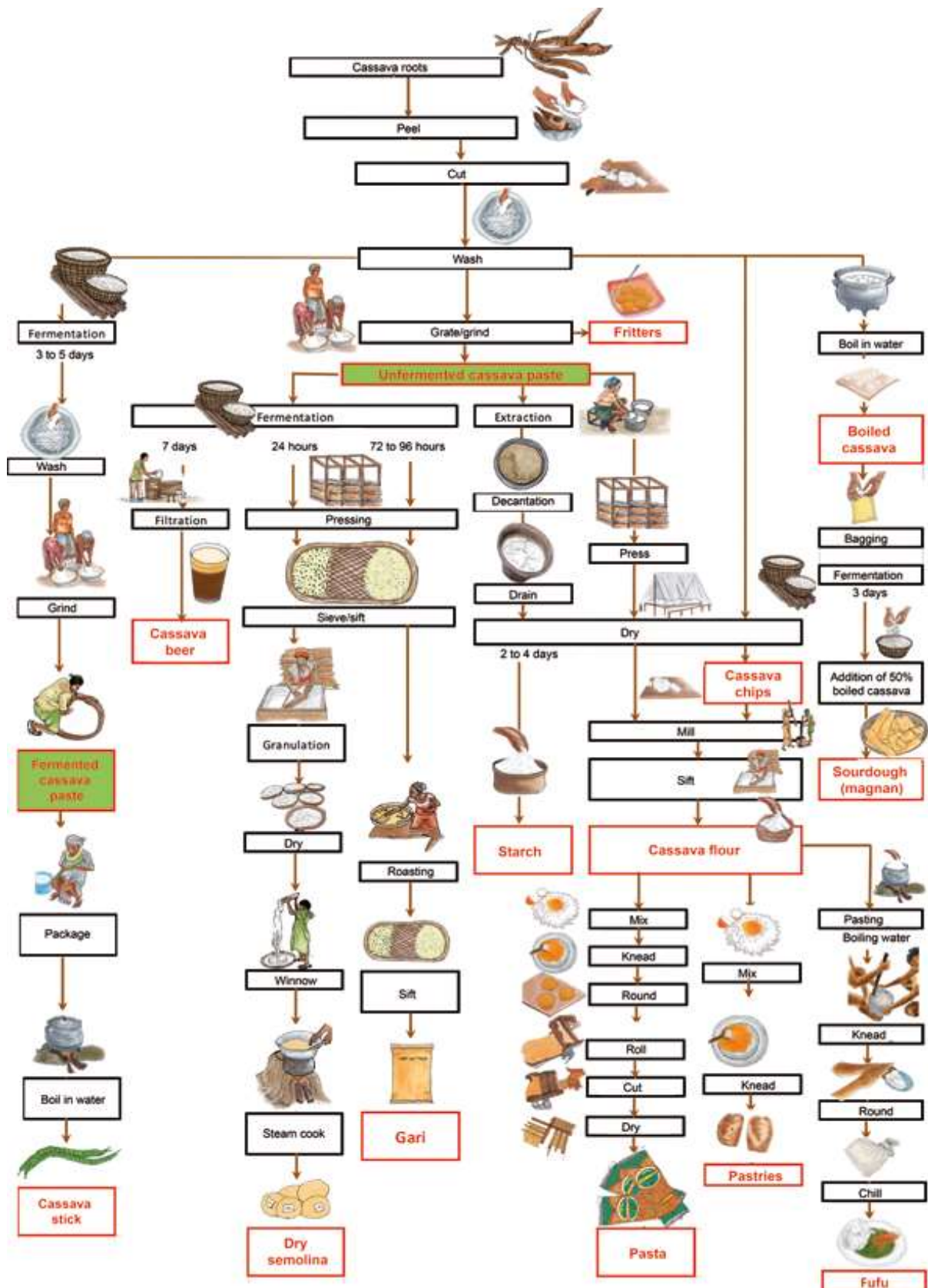


Figure 2. Procédés de transformation des tubercules de manioc et produits dérivés (Kouakou et *al.* 2015)

I.1.6. Place du manioc au Cameroun

Au Cameroun, la filière du manioc occupe une place importante dans l'alimentation de base, avec 20 % des superficies cultivables et près de 46 % de la production vivrière dans l'étendue nationale (Emmanuel, 2013). Cette plante est consommable par ses feuilles et ses racines tubéreuses. Sa racine est la première source de féculents dans toute la moitié Sud du pays. Le manioc et ses produits dérivés sont en première place, avec en valeur, 60 % des parts du marché des racines et tubercules : 40 % pour les produits transformés et 20 % pour la racine fraîche (Tricoche et *al.*, 2008 ; Emmanuel, 2013). On note aussi une exploitation dans l'industrie des liqueurs, notamment la production de l'éthanol (Dieudonné et *al.*, 2008).

Dans le domaine de l'exportation, le Cameroun approvisionne par l'intermédiaire des collecteurs, ses pays frontaliers (Gabon, Congo, Guinée Équatoriale) en racines tubéreuses et dérivés (gari, water fufu, bâtons de manioc ou bobolo) (Emmanuel, 2013). Le pays exporte à l'international vers l'Union Européenne (France, Belgique, Suisse), des dérivés du manioc tels que le waterfufu, le bâton de manioc, en provenance des localités telles que Ntui, Mbanguissa, Nkolgem et Ayos (Emmanuel, 2013).

I.1.7. Problèmes liés à la production du manioc

La culture du manioc est confrontée à plusieurs problèmes qui diminuent son rendement. Ces problèmes peuvent être d'origine végétale, animale ou microbienne. On distingue :

I.1.7.1. Les adventices

Les adventices engendrent de nombreuses pertes de rendement liées à la compétition livrée au manioc pour les éléments nutritifs, la luminosité et l'espace. Ils peuvent fournir un abri aux ravageurs, aux pathogènes, aux ennemis naturels d'insectes nuisibles ou infliger des dégâts physiques aux tiges du manioc et aux racines tubéreuses. Ces adventices sont classées en trois grandes catégories : les graminées (exemple : *Imperata cylindrica*), les laiches (exemple : *Mariscus alternifolius*) et les latifoliées (exemple : *Chromolaena odorata*) (Melifonwu et *al.*, 2000) .

I.1.7.2. Les ravageurs

Les racines et les tiges de manioc sont attaquées par les ravageurs et les plus courants sont :

- Les vertébrés : rats, agoutis.
- Les cochenilles : cochenille racinaire (figure 3.A), la cochenille blanche (*Phenacoccus manihotis*) (figure 3.B)
- L'acararien vert (*Mononychellus tanajoa*) (figure 3.D).
- Les termites, les criquets (*Zonocerus variegatus* et *Zonocerus elegans*) (figure 3.A) (Brama et al., 2000).

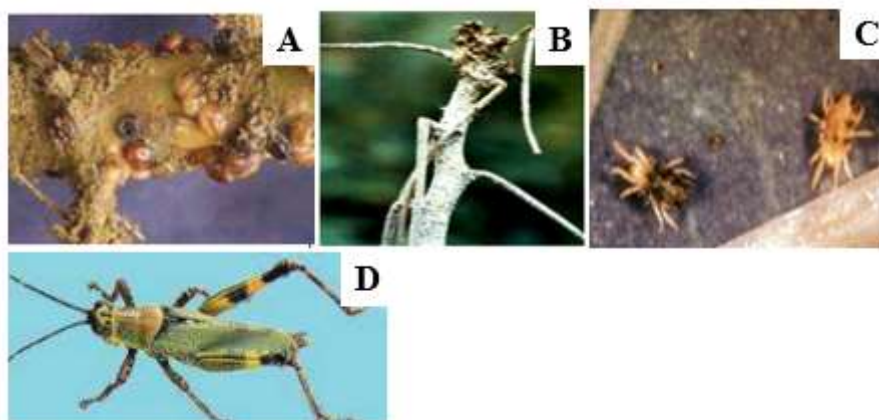


Figure 3. Les ravageurs du manioc
(A) Cochenille racinaire; (B) cochenille blanche des tiges; (C) Ascarien vert; (D) *Zonocerus variegatus* (Mahungu et al., 2014)

I.1.7.3. Les maladies du manioc

La plante de manioc fait face à de nombreuses maladies principalement d'ordre microbienne, regroupées en trois groupes (bactérie, champignons, virus).

🚩 **L'anthraxnose** : Elle est causée par un champignon nommé *Colletotrichum gloeosporioides* pv. *Manihotis*. La maladie se caractérise par la présence des chancres ovales, surtout sur les tiges et à la base des pétioles foliaires (figure 4.A). La maladie est propagée par les piqures du coréide (*Pseudotheraptus devastans*) (Msikita et al., 2000).

🚩 **La striure brune** : La maladie a pour pathogène un virus. Les symptômes sont plus observés dans la zone de production du manioc de l'Afrique de l'Est, et en diffusion dans les zones de l'Afrique Centrale. L'agent vecteur est la mouche blanche. Les symptômes s'observent au niveau des feuilles où la maladie se manifeste sous forme de taches jaune-vertes

sur les vieilles feuilles, plutôt que sur les jeunes feuilles (cas de la mosaïque du manioc) (figure 4.B). Les paternes de colorations dépendent de la variété et/ou de la souche virale (Mahungu et *al.*, 2014).

🚧 **Les cercosporioses :** Elles sont causées par des champignons. Ainsi, on peut observer des taches blanches causées par *Cercospora caribae*, et/ou des taches brunes (figure 4.C) causées par *Cercospora henningsii*. L'infection peut varier selon les contraintes environnementales (pluviométrie, acidification, cultivar) (Msikita et *al.*, 2000).

🚧 **Les pourritures racinaires :** la pourriture des racines tubéreuses est causée par plusieurs champignons résidents dans le sol, à l'exemple du Basidiomycetes *Phaeolus manihotis*. On peut observer l'apparition des champignons supérieurs à la surface (figure 4.D), entraînant la destruction totale des racines (Msikita et *al.*, 2000).

🚧 **La mosaïque africaine du manioc :** Elle est la plus grande maladie qui affecte le manioc, causée par un virus, avec pour principal vecteur l'aleurode *Bemisia tabaci* (figure 4.E). C'est une maladie systémique, le pathogène est localisé dans le système vasculaire des plants de manioc et peut se propager si les boutures des plantes malades sont utilisées (Msikita et *al.*, 2000). Les feuilles de manioc infectées se décolorent en vert clair, jaunes ou blanches, dépendant de la variété de manioc, la souche virale, et les conditions ambiantes du milieu. En cas de sévérité, les feuilles se raccourcissent et se déforment très rapidement chez les jeunes plants (Mahungu et *al.*, 2014)

🚧 **La bactériose vasculaire du manioc ou cassava bacterial blight (CBB):** C'est l'une des maladies les plus dévastatrices des plantes de manioc après la mosaïque Africaine (Kante, 2020). Elle est causée par une bactérie du genre *Xanthomonas* qui provoque le flétrissement des feuilles (figure 4.F).

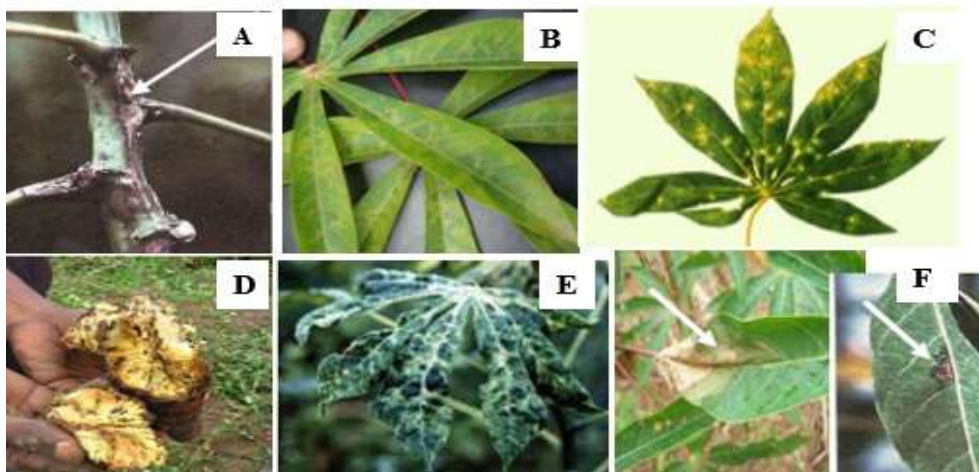


Figure 4. Les maladies du manioc

(A) L'anthracnose; (B) Striure brune ; (C) cercosporiose; (D) pourriture racinaires; (E) Mosaïque Africaine ; (F) Bactériose vasculaire (Mahungu et *al.*, 2014) .

I.2. LA BACTÉRIOSE VASCULAIRE DU MANIOC

La CBB est signalée pour la première fois au Brésil en 1912. Elle s'est répandue dans d'autres pays d'Amérique Latine, en Colombie en 1972, au Venezuela en 1974, Équateur en 1975. De 1985 à 1987, la maladie a été signalée à Trinidad (Kante, 2020).

En Afrique, le premier signal de la maladie et la détection du microorganisme pathogène s'est faite au Nigéria et au Niger en 1972 et s'est répandue dans plusieurs pays Sud Sahariens (Taylor et *al.*, 2017). Quelque temps plus tard, la maladie est signalée dans plusieurs pays en Afrique, dont au Cameroun (1975), Ghana (1975), Togo (1975), Bénin (1976), Côte d'Ivoire (1977), Congo (1977), Rwanda (1977), Burundi (1977), Kenya (1978), Tanzanie (1978), et au Burkina Faso (2015) (Kante, 2020).

En Asie, la CBB est signalée en Thaïlande et en Malaisie en 1976. Puis récemment en 2017, la maladie est signalée dans des Iles Salomon en Océanie en 2017 (Taylor et *al.*, 2017).

I.2.1. Agent pathogène

I.2.1.1. Classification

L'agent pathogène responsable de la bactériose vasculaire du manioc est une bactérie appartenant au genre *Xanthomonas*, du nom de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Constantin et *al.*, 2016 ; Ramirez et *al.*, 2020; Rache et *al.*, 2023). Cette bactérie décrite par plusieurs auteurs, est nommée pour la première fois en 1912 par Bondar comme *Bacillus manihotis* par, puis *Phytomonas manihotis* par Arthaud-Berthet et Bondar, et par la suite

comme *Xanthomonas manihotis* (Fanou et al., 2018). Plus tard, Berthet et Bondar reclassent le pathogène qui prend le nom de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Deux décennies après, sous la base des avancées sur la génétique, le pathogène de la CBB est nommé comme *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (Fanou et al., 2018). Dans les années récentes, par sa forte parenté avec le groupe *Xanthomonas phaseoli*, la bactérie responsable de la CBB est connue comme *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Constantin et al., 2016). Le tableau 2 représente la classification systématique du pathogène.

Tableau 2. Classification systématique de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Constantin et al., 2016)

Règne (ou domaine):.....	<i>Bacteria</i>
Embranchement (ou Phylum): BXII ...	<i>Proteobacteria</i>
Classe: III.....	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre : III.....	<i>Xanthomonadales</i>
Famille : I.....	<i>Xanthomonadaceae</i>
Genre :	<i>Xanthomonas</i>
Espèce :	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>

I.2.1.2. Caractérisations

Comme toutes les bactéries du genre *Xanthomonas*, *Xpm* est un bacille Gram-négatif, aérobic strict (BG⁻AS), à cillature polaire de type monotriche. La culture *in-vitro* montre que ces bactéries forme des colonies brillantes, circulaire, convexe, à surface lisse, et aspect visqueux (Zárate-Chaves et al., 2021). L'aspect mucoïde des colonies est dû à la sécrétion d'un polysaccharide caractéristique, dont le xanthane. Les colonies ont une pigmentation jaune, due à la diffusion de la xanthomonadine qui est spécifique au genre (AH-YOU, 2007).

Xpm ne sécrète pas de pigment lorsqu'elle est cultivée dans un milieu contenant des sucres, ce qui est exceptionnel pour le genre *Xanthomonas* qui présente généralement des colonies jaunes (Xanthomonadine diffusible) (Kante, 2020). Elle ne forme pas de spores, pousse de façon optimale entre 25 et 30° C. Son développement est favorisé par un pH compris entre 6,5 et 7,2 (Fanou et al., 2018). Les colonies du pathogène peuvent être identifiables sur milieu LPGa où elles présentent un aspect blanc ivoire (Abdulai & Larbi-Koranteng, 2019 ;

Zárate-Chaves et *al.*, 2021). Sur milieu Trypticase-soy-agar (TSA) (annexe 1), les espèces du genre *Xanthomonas* sont identifiables par des colonies plus ou moins intensément pigmentées en jaune ,ou jaune orangé (Xanthomonadine non diffusible) (Richard & Kiredjan, 1995).

Les tests biochimiques montrent que *Xanthomonas* peut dégrader plusieurs sucres, à l'exception du mannitol et la rhamnose les réactions à l' ONPG et l'esculine positives. une gélatinolyse variable, la nitrate-réductase ,l'oxydase, la dénitrification, les décarboxylases négatives au genre (Richard & Kiredjan, 1995).

I.2.2. Manifestation de la maladie

Le développement de la CBB est plus favorable en période d'humidité et de température élevées, respectivement supérieur à 80 % (Humidité relative) et supérieur à 23°C (Kante, 2020). Comme présentent plusieurs auteurs (Affery et *al.*, 2018 ; Fanou et *al.*, 2018 ; Zárate-Chaves et *al.*, 2021 ; Perez, 2022), la CBB débute par le pathogène qui infecte la cellule végétale via des plaies ouvertes ou des stomates. Puis la bactérie colonise le mésophylle, et les feuilles commencent à flétrir lentement jusqu'à se dessécher complètement et finir par tomber. Lorsque *Xpm* infecte une variété de manioc très sensible, la bactérie colonise le tissu vasculaire, bloque le flux de nutriment. Dans ce cas, on observe la sécrétion d'un exudat au niveau des pétioles et des jeunes tiges, et au dépérissement des tiges (figure 5). Le pathogène se propage via les matériaux agricoles, les boutures, le vent, l'eau de ruissellement et les insectes. En Afrique, le plus grand vecteur est un insecte puant connu sous le nom de *Zonocerus variegatus* abritant le pathogène dans ses larves.



Figure 5. Manifestation de la CBB

(A) Feuilles saines ; (B) lésions angulaires sur face supérieure d'une feuille ; (C1) face inférieure avec taches foliaires anguleuses ; (C2) lésion à l'apparence aqueuse ou huileuse ; (D) exsudation gommeuse sur tige ; (E1) flétrissement et dessèchement de feuilles du plant attaqué ; et (E2) défoliation complète et mort du plant [Assemblage par Kanté (2020)].

I.2.3. Cycle de la maladie

Le cycle de vie de la CBB est caractérisé par deux phases à savoir, :une phase parasitaire durant la saison des pluies, et une phase épiphyte ou phase de survie pendant la saison sèche (Daniel et *al.*, 1985) (Zárate-Chaves et *al.*, 2021).

La phase de survie : Les conditions de pluies et humidités très faibles sont défavorables au développement de la bactérie. Cette dernière va maintenir sa survie jusqu'à la saison des pluies plus importantes. Durant cette phase, on marque un arrêt de l'expression de la CBB avec une baisse importante de la population bactérienne. *Xmp* survivrait durant cette période au niveau des débris végétaux, à la surface du sol, des tiges, des feuilles mortes, fruits et semences de la plante hôte jusqu'à l'arrivée de la pluie. La phase de survie est nécessaire pour la mise en place de l'inoculum primaire, ce dernier engendrant l'inoculum secondaire pendant la saison des pluies (Zárate-Chaves et *al.*, 2021).

La phase parasitaire : Elle est marquée par le début de la saison des pluies avec multiplication de la population épiphyte de *Xpm* (Perez, 2022). Dès lors, les cellules bactériennes pénètrent dans les tissus des feuilles par des plaies épidermiques et par des ouvertures naturelles comme des stomates. Après environ une semaine, les premiers symptômes sont visibles sous forme de taches translucides imbibées sur la surface intérieure

des feuilles observées à contre-jour. Plus tard, les tâches deviennent vert-foncées et anguleuses limitées par des nervures, s'étendent et se rejoignent avec des tâches voisines en formant des grandes tâches brunes (Kante, 2020).

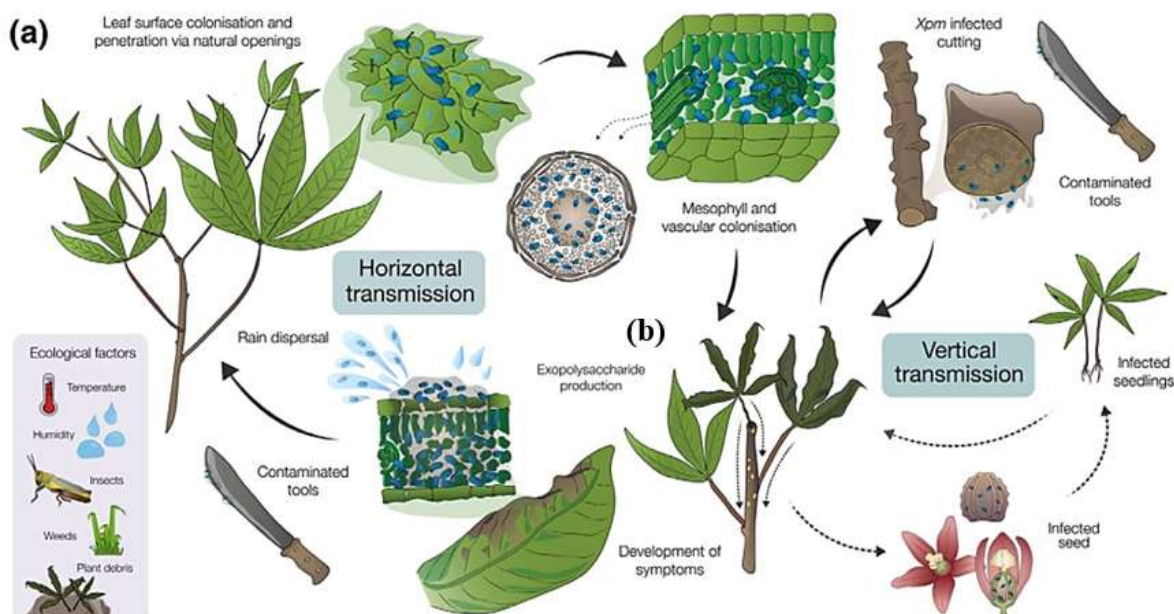


Figure 6. Cycle de la CBB
(a) zone de début d'infection, (b) manifestation de la maladie (Zárate-Chaves et *al.* 2021)

I.2.4. Conséquences de la CBB sur la production du manioc

La Bactériose vasculaire du manioc est provoquée par un pathogène classé sixième place parmi les pathogènes bactériens les plus nuisibles au monde s'attaquant aux végétaux (Mansfield et *al.*, 2012). Le tableau 3 regroupe les dix premiers pathogènes bactériens des plantes selon leur ordre d'importance.

La propagation de la maladie entraîne une baisse de rendement de production des racines de tubéreuses, variant entre 12 et 100 %, respectivement dans les cas modérés et sévères (Botero et *al.*, 2020). Dans d'autres cas, on note la perte organoleptique de l'amidon (Affery et *al.*, 2018). L'impact du pathogène sur la plante dépend de la sensibilité de la variété de manioc, de la virulence des souches de *Xpm*, et des conditions environnementales (Fanou et *al.*, 2018).

Tableau 3. Top 10 des bactéries phytopathogènes (Mansfield et *al.*, 2012)

Rang	Bactéries phytopathogènes
1	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovars
2	<i>Ralstonia solanacearum</i>
3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
4	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
5	<i>Xanthomonas campestris</i> pathovars
6	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
7	<i>Erwinia amylovora</i>
8	<i>Xylella fastidiosa</i>
9	<i>Dickeya</i> (<i>dadantii</i> and <i>solani</i>)
10	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (and <i>P. atrosepticum</i>)

I.2.5. Gestion de la bactériose vasculaire du manioc

Pour lutter contre la CBB, plusieurs méthodes traditionnelles sont conseillées et différentes recherches ont été menées depuis la première découverte de l'agent pathogène. De façon générale, la lutte efficace repose sur trois cadres : les contrôles sanitaires, les pratiques culturales et l'utilisation des variétés de maniocs résistantes ou tolérantes à l'agent pathogène.

 **Les contrôles sanitaires :** Ce sont les mesures à grandes échelles pour limiter la propagation du pathogène. Ils consistent à l'entretien du matériel de travail par lavage à l'eau, savon, ou par stérilisation à l'alcool (Kante, 2020). On note aussi l'utilisation des pesticides phytosanitaires (Arthur Martin et *al.*, 2018), et les outils de détection du pathogène *Xpm* (Zárate-Chaves et *al.*, 2021).

 **Les pratiques culturales :** La gestion de la CBB dans les zones de production du manioc inclut l'élimination des débris des cultures précédentes par enfouissement (Fanou et *al.*, 2018), l'élimination des mauvaises herbes, le respect des saisons de cultures, la rotation des cultures et la pratique de la jachère. L'objectif de ces deux dernières pratiques est de réduire au maximum les sources d'inoculum au cours du temps. Toutes ces pratiques sont considérées comme méthodes efficaces pour réduire l'impact de la CBB durant les cycles de cultures successives (Zárate-Chaves et *al.*, 2021).

 **L'usage des variétés résistantes ou tolérantes :** Les recherches sur les cultivars de manioc résistants faces aux différentes souches de *Xpm*, sont les pistes les plus exploitées pour la prévention contre la CBB (Affery et *al.*, 2018 ; Ramirez et *al.*, 2020). Le déploiement réussi

d'une variété résistante à la CBB est conditionnée par trois principaux aspects : **a)** Les interactions du manioc avec les facteurs environnementaux qui affectent profondément la valeur adaptative et la résistance de certains cultivars ; **b)** La nécessité d'une co-sélection de caractères agronomiques présentant une valeur pour les agriculteurs et le marché local ; **c)** La résistance à la CBB est polygénique, héritée de manière additive, et ses bases moléculaires doivent être élucidées (Zárate-Chaves et *al.*, 2021).

I.3. BIOCONTROLE DES PLANTES

I.3.1. Description

La lutte biologique est une méthode de gestion des maladies d'une plante en inhibant l'agent pathogène cible, en améliorant l'immunité de la plante et/ou en modifiant l'environnement par les effets de micro-organismes bénéfiques, des composés ou systèmes de culture sains (He et *al.*, 2021). Entre les micro-organismes bénéfiques, on peut sélectionner les isolats avec une forte activité contre un pathogène cible, et pouvant être multipliés sur les milieux artificiels. Les acteurs du biocontrôle utilisent les agents de lutte biologique microbienne (MBCA) dans lesquels on retrouve les microorganismes vivants (Bactéries, champignons, mycovirus ou bactériophages). Ces germes sont utilisés comme produits phytosanitaires réalisés par les sociétés de biocontrôle, avec pour avantage de maintenir le système en place pendant une longue durée. Dans d'autres cas, des métabolites antimicrobiens synthétisés par les microorganismes sélectionnés sont inclus dans le produit, et on trouve certains produits ne contenant que des métabolites antimicrobiens sans cellules vivantes de l'antagoniste (He et *al.*, 2021).

I.3.2. Mécanismes d'actions

Les agents de lutte biologique (BCA) sont appliqués sur les plantes pour le contrôle biologique des agents pathogènes et agissent à travers une gamme de modes d'actions. Ces mécanismes impliquent plusieurs composés tels que les enzymes, les composés de signalisation, et autres métabolites interférant qui sont produits *in-situ* à faible concentration (Köhl et *al.*, 2019).

Selon les différents types de mécanismes, les BCA peuvent être classés en trois (03) types d'interactions :

✚ **L'antagonisme direct** : Il résulte de l'interaction physique entre les microorganismes, avec un degré élevé de sélectivité vis-à-vis de l'agent pathogène. Dans un tel schéma,

l'hyperparasitisme par des parasites obligatoires d'un phytopathogène est considéré comme le type d'antagonisme le plus direct (Köhl et *al.* 2019).

✚ **L'antagonisme indirect** : Ce type d'antagonisme résulte des activités qui n'impliquent pas la détection d'un agent pathogène par le/ou les BCA. Dans ce cas, on distingue les mécanismes tels que, la compétition et l'induction de la résistance de l'hôte. La stimulation des voies de défenses de l'hôte par les BCA non pathogènes constitue la forme d'antagonisme la plus indirecte. (Köhl et *al.* 2019).

✚ **L'antagonisme mixte** : on retrouve les substances antimicrobiennes (antibiotiques, enzymes lytiques) produites par d'autres microorganismes d'intérêt ou BCA. Les antibiotiques sont des substances qui peuvent, à faibles concentrations, inhiber ou empoisonner d'autres micro-organismes phytopathogènes (He et *al.*, 2021).

I.4. GÉNÉRALITÉ SUR LES *STREPTOMYCES*

I.4.1. Classification et description

Les *actinomycètes* représentent un pourcentage très important dans la communauté microbienne du sol, avec environ 45 % des métabolites bioactifs découverts (Laassami et *al.*, 2019) . Considérant le nombre et la variabilité d'espèces identifiées, *Streptomyces* représente l'une des plus grandes unités taxonomiques d'*Actinomyces* identifiées, avec 1 à 20 % des microorganismes des sols cultivables (Maleki et *al.*, 2013).

Ce sont les bactéries Gram-positives avec une forte teneur en Guanine + Cytosine dans leur ADN, dont plus de 70 % (Olanrewaju & Olubukola , 2019). Les espèces de *Streptomyces* sont connues pour leur capacité à produire une variété de composés tels que : Les Enzymes (Saoudi et *al.*, 2006) ; les antibactériens (Boughachiche et *al.*, 2012); les antifongiques (Woan-Fei et *al.*, 2019); les composés volatiles (Wilkins et Scholler, 2009) ;les antiviraux, les immunosuppresseurs, les anticancéreux, et leurs propriétés antioxydantes (Olanrewaju & Olubukola , 2019).

I.4.2. Morphologie des *Streptomyces*

La croissance de la colonie de *Streptomyces* devient visible à l'œil nu lorsqu'une spore germe et produit de longs filaments. Les filaments s'allongent par croissance apicale, se ramifient à plusieurs reprises produisant un mycélium, et pénètrent dans le milieu en présence d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui solubilisent les molécules organiques présentes

dans le milieu . L'utilisation des nutriments de la rhizosphère est efficace grâce aux filaments, ce qui permet la bonne colonisation du substrat, plus que par les organismes unicellulaires (Olanrewaju & Olubukola , 2019). Les interactions entre les cellules sont importantes pour gouverner la croissance multicellulaire et la différenciation cellulaire entre les colonies des *Streptomyces* . Lorsque la colonie vieillit et que les nutriments sont épuisés, les branches spécialisées se développent à partir de la surface de la colonie, ce qui se traduit par le mycélium aérien appelé « mycélium reproducteur » qui se développe verticalement dans l'air (Claessen et al., 2006) (figure 7).

Les images de croissance de *Streptomyces* sur milieu liquide montrent l'existence de deux types de filaments :

- Type pellet : Agregat de nombreux hyphes amalgamés avec les diamètres variant de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres (Ibrahimi, 2020)
- Type en hyphes dispersées : ce type se présente sous deux formes, dont en <<forme dispersée libre >> et en << forme compacte sous forme d'aggrafes >> (Ibrahimi, 2020).

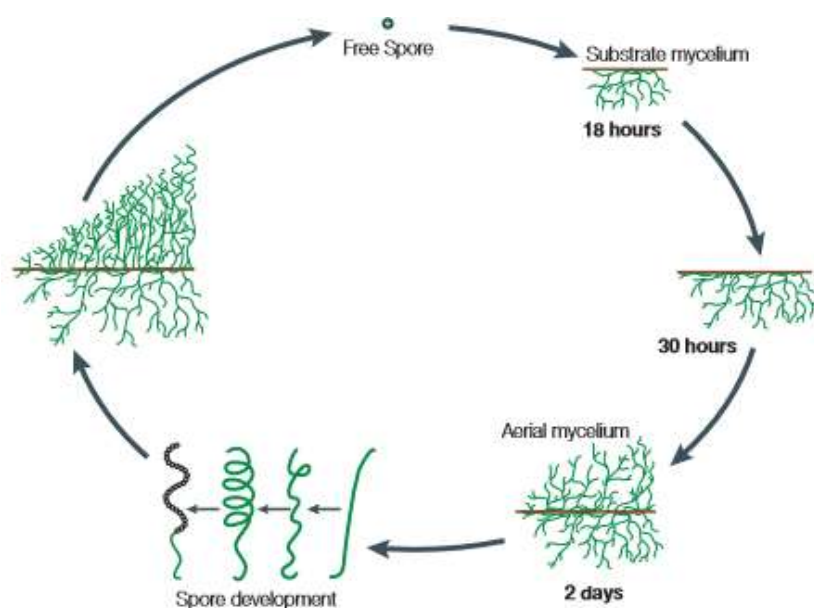


Figure 7. Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Angert, 2005)

I.4.3. Intérêt des *Streptomyces*

I.4.3.1. *Streptomyces* comme agent de biocontrôle des phytopathogènes

Les microorganismes phytopathogènes sont l'un des problèmes majeurs au développement de l'agriculture, avec 30 à 40 % des pertes agricoles (Pacios-Michelena et al. 2021). Les découvertes des produits naturels comme agent de lutte biologique (BCA) pour la

protection des plantes se sont multipliées, et les *Streptomyces* reconnus comme proactifs, sont un choix naturel facilement disponible pour trouver de nouvelles molécules pour lutter contre les agents pathogènes des plantes (Olanrewaju & Olubukola, 2019). Cette fonction découle de plusieurs caractéristiques : production de lipase , de cellulase, de la β -1,3-glucanase, synthèse de régulateurs de croissance des plantes, production de sidérophores, sécrétion d'antibiotiques, sécrétion de composés volatils, et concurrence pour les nutriments (Pacios-Michelena et al. 2021). Ces composés agissent contre les agents phytopathogènes en perturbant l'interaction cellulaire chez les bactéries, ou en dégradant la paroi cellulaire des champignons (Dias et al. 2017) Le tableau 4 regroupe quelques composés de *Streptomyces* spp. avec une activité antimicrobienne chez les phytopathogènes.

La principale capacité de lutte biologique de *Streptomyces* relève de sa forte capacité à produire des antibiotiques, des composés volatils et d'autre métabolites qui contribuent à son rôle d'antipathogènes (Woan-Fei et al., 2019).

Tableau 4. Composés sécrétés par *Streptomyces* spp. avec des activités antimicrobiennes sur les phytopathogènes

Metabolites	Types de métabolites	Pathogènes cible	Références
Ologomicine	Antibiotique	<i>Erwinia carotovora</i>	Doolotkeldieva et al., 2016
Cycle (l-Pro-l-Tyr); Cycle (d-Pro-l-Tyr)	Peptide cyclique	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Wattana-Amorn et al., 2016
Proteases	Enzyme	<i>Colletotrichum dematium</i>	Song et al., 2020
Pyrroles	Antibiotique	<i>Aspergillus</i> sp.	Jog et al., 2014
Blasticidin-S	Antibiotique	<i>Pyricularia oryzae</i>	Law et al., 2017
β -1,3-glucanases	Composé Volatile	<i>Colletotrichum</i> sp.	Wonglom et al., 2019
2-methyl-1-butanol	Composé Volatile	<i>Curvularia lunata</i>	Wonglom et al., 2019
Actinomycine -D	Antibiotique	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ling et al., 2023

I.4.3.2. *Streptomyces* comme biofertilisant des plantes

Faisant partir des microbes les plus abondants de la microflore, les *Streptomyces* sont efficaces dans la colonisation du système racinaire et des tissus internes des plantes hôtes (Sousa and Olivares, 2016). Ces fonctions sont d'une grande importance pour la plante, car les *Streptomyces* regroupent plusieurs actions :

- La synthèse des phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines) qui favorisent de façon directe la croissance des plantes ;
- La synthèse des sidérophores qui récupèrent le fer ferrique de l'environnement ;
- la fixation de l'azote et la suppression du stress chez les plantes par production de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) (Olanrewaju & Olubukola, 2019) .

I.4.3.2. *Streptomyces* dans le domaine médical

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont responsables d'environ plus de deux tiers des antibiotiques thérapeutiques commercialisés. De plus, on note également une grande production des analogues antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, antitumoraux, et les immunosuppresseurs (Alam et al., 2022). En fonction de leurs squelettes centraux, les composés bioactifs mis en jeu dans les mécanismes de biosynthèse chez *Streptomyces* sp. sont classés en plusieurs groupes : les polycétides, les peptides non ribosomiques, les peptides ribosomiques modifiés post traductionnellement, les aminosides et les terpènes (Newman et Cragg, 2020). *Streptomyces* sp. a déjà montré son efficacité vis-à-vis de nombreux microorganismes toxigènes, et antibiorésistants à l'homme en milieu hospitalier. On peut citer entre autres : *Streptomyces* sp. PAL111 contre *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* (Aouiche et al. 2012) ; *Streptomyces* Md14 contre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* ; *Streptomyces* sp. contre *Bacillus cereus* (Boughachiche et al.).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIEL

II.1.1. Matériel biologique

- ❖ Les isolats de *Streptomyces* provenant du laboratoire de microbiologie (Faculté des Sciences-Université de Yaoundé 1), dont 43 au total, ont été utilisés pour ce travail pour rechercher une activité antimicrobienne.
- ❖ Les feuilles de manioc symptomatiques à la bactériose vasculaire ont été utilisées pour l'isolement du pathogène *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*).
- ❖ Les boutures de manioc d'une variété de l'IITA (Institut internationale d'agriculture tropicale) ont été utilisées pour la production des jeunes plants de manioc utilisées pour réaliser les tests *in-situ*.

II.1.2. Milieux de cultures et réactif

Les milieux de cultures importants pour ce travail sont :

- ❖ La Trypticase-Soy-Agar (TSA) additionnée à la Céfalexine et au Fluconazole pour l'isolement de *Xpm*.
- ❖ Le Kuster-Amidon pour la production des composés bioactifs.
- ❖ La gélose Mueller Hilton pour les tests antimicrobiens *in-vitro*.

Pour les tests biochimiques, les Galeries Api 20E seront utilisées.

II.1.3. Équipement électronique

- ❖ Un Rotavapor a été utilisé pour concentrer les substances bioactives ;
- ❖ Une étuve pour sécher les substances bioactives ;
- ❖ Le spectrophotomètre pour évaluer la concentration microbienne ;
- ❖ Un stérilisateur de sol ;
- ❖ un microscope photonique pour examen microscopique ;

II.2. MÉTHODE

L'ensemble de ce travail a été réalisé suivant trois phases, à savoir :

- 📁 L'isolement et la caractérisation de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) ;
- 📁 L'évaluation de l'activité antibactérienne *in-vitro* des isolats de *Streptomyces*, et des extraits des isolats les plus actifs vis-à-vis de *Xpm* ;

🌈 L'évaluation *in-situ* de l'activité inhibitrice des extraits de *Streptomyces* spp. anti-*Xpm*.

II.2.1. Isolement et caractérisation de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

II.2.1.1. Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans 3 champs différents dans l'arrondissement de Soa (latitude 3.986078, longitude 11.6096662_Soa, Centre, Cameroun). Dans chaque champ, des plants de manioc avec des feuilles de manioc symptomatiques de la bactériose vasculaire du manioc (CBB) ont été choisis au hasard (figure 8). Le prélèvement des feuilles infectées s'est fait en coupant la feuille au niveau de sa connexion avec le pétiole à l'aide des ciseaux désinfectés à de l'alcool éthylique à 70 % (v/v). Les échantillons de feuilles de manioc infectées ont ensuite été transportés jusqu'au laboratoire via des sacs plastiques Zip stériles.



Figure 8. Echantillons de feuilles de manioc infectées provenant de trois champs (A, B et C)

II. 2.1.2. Isolement

La technique d'isolement qui a été utilisée est celle d'Affery et *al.* (2018). Ainsi, pour chaque échantillon, les feuilles ont été découpées en petits fragments d'environ 1 cm², en prélevant uniquement les zones nécrosées. Dix grammes (10 g) de ces fragments ont été pesés, et désinfectés en les immergeant dans une solution d'alcool éthylique (70°) pendant 10 secondes, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (de marque « la Croix ») pendant 10 secondes, suivis immédiatement de 3 rinçages successifs de 2 minutes à l'eau physiologique stérile. Après désinfection, les fragments ont été broyés à l'aide d'un sachet Stomacher stérile contenant 90 ml d'eau physiologique stérile. Le

broyat a été laissé à température ambiante pendant 5 minutes, puis 1 ml du surnageant a été prélevé et une série de cinq (05) dilutions décimales a été réalisée. 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur milieu TSA (Trypticase-Soy Agar) additionné d'un antibiotique (Céfalexine à 40 mg/l), et d'un antifongique (Fluconazole à 5000 mg/l). Les boîtes de Pétri inoculées ont ensuite été incubées à 27°C pendant 48 heures.

Après incubation, les caractères d'ordre qualitatifs comme décrit par Zárata-Cheves et *al.* (2021) ont été utilisés pour caractériser les colonies de *Xpm* sur milieu TSA.

II.2.1.3. Caractérisation microscopique et biochimique des isolats de *Xpm*

II.2.1.3.1. Caractérisation microscopique

Les tests microscopiques ont consisté à rechercher le type de Gram. Cette méthode repose sur la structure et la composition de la paroi bactérienne. Les lipides assez forts chez les Gram négatifs que chez les Gram positifs sont extraits par l'action de l'alcool, entraînant ensuite une augmentation de la perméabilité et l'extraction du complexe violet de gentiane-iode, ceci lui permettant de prendre la couleur de la safranine (fushine). De plus, ce test permet de connaître la forme de la bactérie, et donne les informations précieuses sur le mode de regroupement (Naimi, 2018).

II.2.1.3.2. Caractérisation biochimique

Les tests biochimiques suivants ont été réalisés :

Recherche enzymatique :

- La catalase : La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène, observable par un dégagement instantané des bulles d'air. C'est un test communément utilisé pour l'identification de la bactérie Gram+ (Naimi, 2018).
- TDA : L'une des Enzymes utilisées en identification bactérienne, le tryptophane-désaminase (TDA) catalyse la réaction de la désamination du tryptophane en acide indole-pyruvique et ammoniac. L'addition de chlorure de fer III (FeCl₃) réagit avec l'acide indole-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron (Naimi, 2018).
- L'ornithine-décarboxylase (ODC), la lysine-décarboxylase (LDC) et l'arginine-déhydrolase (ADH) : La possession de ces enzymes est un caractère souvent étudié en identification des bacilles Gram-. Les milieux

contiennent le glucose, un indicateur coloré (généralement le BCPL) et ne renferment qu'un seul acide aminé, celui dont on veut étudier l'utilisation. Le changement de couleur après incubation indique la synthèse de l'enzyme recherchée par *Xpm* (Naimi, 2018).

- ONPG (Orthonitrodiphosphate β -galactopiranoside) : L'utilisation du lactose nécessite un couple d'enzymes, dont l'une est la β -galactosidase. Dans ce test, un leurre moléculaire appelé ONPG prendra une couleur jaune en présence de cette enzyme. L'ONPG est un analogue du lactose que l'enzyme peut briser pour produire un produit final de couleur jaune, l'O-nitrophénol (Naimi, 2018).
- Uréase : l'hydrolyse l'urée en ammoniac et carbonate d'ammonium aboutit à l'alcalinisation du milieu, qui est décelable par changement de couleur du milieu dû à la présence d'un indicateur coloré (Naimi, 2018).

Dégradation des glucides :

- Le glucose, l'amygdaline, l'arabinose, le mannitol, l'inositol, le sorbitol l'arabinose, le saccharose : La détermination de l'oxydation-fermentation, et la possibilité que d'autres sucres soient assimilés comme seule source de carbone sont importantes à des fins taxonomiques. Les bactéries assimilent le sucre test, en produisant de l'acide et fréquemment du CO₂. L'acidification du milieu a été détectable par changement de couleur du milieu en présence d'un indicateur coloré dans le milieu (Naimi, 2018).

 **Trisodium citrate** : Le test d'utilisation du citrate a été effectué pour déterminer la capacité de *Xpm* à utiliser le citrate comme seule source de carbone pour son métabolisme, avec alcalisation du milieu résultant de l'augmentation du PH. Le résultat est observable par virage de l'indicateur coloré (Chauhan & Jindal, 2020) .

 **L'hydroxyde de potassium 3 %** : Elle repose sur la désorganisation de la membrane plasmique, par absence d'une paroi, suivie de la libération du matériel génétique. Une goutte d'hydroxyde de potassium à 3 % a été placée sur une lame de verre propre, et mélangée avec une boucle d'inoculum d'une jeune culture bactérienne (*Xpm*) de 24 heures. L'ensemble a été homogénéisé et la formation des fils visqueux a été observée. Lorsque la boucle de fil est soulevée, la formation de brins de matière visqueuse classe la bactérie comme Gram négatif (Muhammad et al., 2020).

II.2.2. Évaluation de l'activité antibactérienne *in-vitro* des isolats de *Streptomyces* spp. vis-à-vis de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

II.2.2.1. Revivification des isolats de *Streptomyces*

Le tableau 5 représente les 43 isolats qui ont été utilisés. Chaque isolat conservé dans un Eppendorf a été revivifié par ensemencement dans le bouillon peptone glucosé salé pendant 5 jours, puis repiqué plusieurs fois sur le milieu gélosé Kuster-amidon à l'aide d'une anse de platine jusqu'à obtention des isolats pures.

Tableau 5. Isolats de *Streptomyces*

Macroscopique			Macroscopique	
Isolats	Couleur du Mycélium	Couleur du pigment	Gram	Forme
Ker-I	Gris	Aucune	+	Bâtonnet
Ker-E	Gris opaque	Rouge	+	Filamenteuse
Ker-T3	Gris	Marron	+	Filamenteuse
Ker-T2	Gris	Marron	+	Filamenteuse
Ker-26	Gris opaque	Blanc	+	Filamenteuse
Ker-24	Marron	Aucune	+	Bâtonnet
Ker-20	Gris	Aucune	+	Bâtonnet
Ker-19	Marron	Rose-rouge	+	Filamenteuse
Ker-18	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-16	Gris	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-T1	Gris	Beigne	+	Filamenteuse
Ker-B'	Beigne	Jaune	+	Filamenteuse
Ker-A	Vert	Verte	+	Filamenteuse
Ker-14	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-13	Marron	Aucune	+	Bâtonnet
Ker-4	Beigne	Jaune	+	Filamenteuse
Ker-2	Gris opaque	Or-sombre	+	Filamenteuse
Ker-1	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-J	Gris	Aucune	+	Filamenteuse
Ker-15	Rouge saumon	Rouge saumon	+	Filamenteuse
Bel-4	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-5	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-7	Blanc-gris	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-8	Marron	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-14	Marron	Blanc	+	Filamenteuse
Bel-15	Gris	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-16	Blanc-laiteux	Orange	+	Filamenteuse
Bel-2	Rose	Rose	+	Filamenteuse
Bel-20	Gris	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-22	Beigne	Beigne	+	Filamenteuse
Bel-28	Beigne	Marron	+	Filamenteuse
Bel-46	Blanc	Marron	+	Filamenteuse

Macroscopique			Macroscopique	
Isolats	Couleur du Mycélium	Couleur du pigment	Gram	Forme
Bel-47	Beigne	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-12	Rose-orangé	Orange	+	Filamenteuse
Bel-31	Marron	Orange	+	Filamenteuse
Bel-33	Rose	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-17	Beigne	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-18	Blanc-laiteux	Aucune	+	Filamenteuse
Bel-21	Marron	Blanc	+	Filamenteuse
Bel-6	Gris	Vert	+	Filamenteuse
Bel-9	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
" ZR2 "	Blanc	Aucune	+	Filamenteuse
" ZR1 "	Jaune-claire	Jaune	+	Filamenteuse

II.2.2.2. Criblage des isolats de *Streptomyces* antagonistes à *Xpm*

L'évaluation de l'activité anti-*Xpm* a été réalisée par la technique de diffusion des cylindres d'agar comme décrite par (Balouiri et *al.*, 2015), dont le principe consiste à réaliser une culture de la souche d'intérêt sur son milieu de culture approprié par des stries serrées à la surface de la gélose. Au cours de leur croissance, les cellules microbiennes sécrètent des composés bioactifs qui diffusent dans le milieu gélifié. Après incubation, un cylindre de gélose est coupé de manière aseptique avec un emporte-pièce stérile et déposé sur la surface d'une autre gélose préalablement ensemencée par le microorganisme test. Les composés du cylindre diffusent et laissent apparaître des zones d'inhibition observables après incubation si le microorganisme est sensible. Pour y parvenir, les cylindres d'agar de 8 mm de diamètre ont été découpés, à l'aide d'un emporte-pièce, à partir des cultures des isolats *Streptomyces* âgés de 7 jours sur milieu Kuster-amidon. Puis, ces cylindres ont été déposés à la surface de la gélose Muller-Hilton, préalablement ensemencé par écouvillonnage par une suspension de *Xpm* de concentration égale à $6,0 \times 10^6$ UFC/ml. Cette concentration a été évaluée au spectrophotomètre (estimé à l'aide du standard de Mac Farland) à une longueur d'onde de 600 nanomètres (nm), donnant une densité optique (D.O) de 0.001.

Les boîtes de Pétri ont été conservées à +4°C pendant 3 heures pour laisser diffuser les substances antimicrobiennes, puis incubées à 27°C pendant 48 heures. La lecture des

résultats après 48 heures a consisté à observer et mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

II.2.2.3. Production et extraction des composés antibactériens

La production des composés bioactifs sur milieu solide a été réalisée selon la méthode de (Boughachiche et *al.*, 2012). Pour chaque isolat considéré, 10 boîtes de gélose Kuster-amidon ont été ensemencées et incubées pendant 7 jours. Après ce temps, les géloses ont été fragmentées, pesées, et introduites dans des bocaux contenant chacun 300 ml de méthanol (à raison de 190 g de gélose pour 300 ml de solvant). Le mélange a été homogénéisé vigoureusement et conservé pendant 3 jours. Après ce temps, le mélange obtenu a été filtré à l'aide du papier Wattman de porosité 1, et la concentration du filtrat a été faite au Rotavapor à 51°C jusqu'à évaporation totale du solvant (figure 9). Le concentré obtenu a été séché à l'étuve à 37°C pendant 5 jours pour faire évaporer complètement le solvant d'extraction et l'eau. La masse de chaque extrait a été pesé, et le rendement calculé en faisant le rapport entre la masse en extrait obtenue, et la masse de la gélose avant extraction suivant la formule ci-dessous :

$$\eta = \frac{m_f}{m_i} \times 100$$

- η : Rendement d'extraction (en pourcentage)
- m_f : Masse de l'extrait sec (en gramme)
- m_i : Masse de la gélose avant l'extraction (en gramme)



Figure 9. Concentration des extraits au Rotavapor

II.2.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés bioactives anti-*Xpm*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est un terme quantitatif utilisé pour désigner l'efficacité de tout produit (naturel ou synthétique) contre différents organismes testés, y compris les bactéries et les champignons. Elle est définie comme la concentration la plus faible, ou la dilution maximale d'un produit qui inhibe la croissance visible d'un microorganisme (Chauhan & Jindal, 2020).

La CMI des extraits méthanoliques des *Streptomyces* a été déterminée en utilisant la technique de la macro dilution en milieu liquide selon la méthode de (Chauhan & Jindal, 2020). Applicable à l'analyse des extraits, des fractions et des agents antimicrobiens, elle est basée sur le fait que, lorsqu'un ensemble de tubes avec différentes concentrations d'un composé particulier est inoculé avec la population recommandée d'un organisme d'essai spécifique, le composé présente la différenciation dans l'inhibition de l'organisme. La plus faible concentration montrant l'inhibition, par conséquent, est considérée comme la CMI du composé testé contre l'organisme test.

Ainsi, pour chaque extrait obtenu dans la section précédente, une solution mère à une concentration de 4096 µg/ml a été préparée (0,4096 % en extrait sec) en utilisant de l'eau stérile comme solvant, puis stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre à seringue « Minisart » en membrane PTFE (Polytétrafluoroéthylène) de porosité égale à 0,2 µm de diamètre. Treize (13) tubes, notés de T1 à T13, ont reçus chacun 1ml d'eau peptonée stérile. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, 1 ml de la solution mère d'extrait a été introduit dans le tube T1. Des dilutions successives en séries de facteurs 2 ont été faites jusqu'au tube T12, en maintenant le volume final à 2 ml, de façon à obtenir douze (12) concentrations allant de 2048 µg/ml à 1 µg/ml, respectivement des tubes T1 à T12. Puis, à l'aide d'une micropipette, un volume de 30 µl de la suspension de *Xpm* de 24 h, et de concentration égale à $6,0 \times 10^6$ UFC/ml (évaluée au spectrophotomètre à 600 nm de longueur d'onde, de densité optique correspond à 0,001), a été introduit dans chacun des 12 tubes. Le tube T13 a reçu uniquement 30 µl d'inoculum, et 1 ml d'eau distillée stérile en lieu et place de l'extrait considéré. Les 12 premiers tubes (T1 à T12) sont les « tubes expérimentaux », et le tube T13 est le « témoin de croissance ou tube contrôle ». Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

La détermination de la CMI a été effectuée par observation visuelle de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés.

II.2.3. Évaluation de l'aptitude des extraits de culture des isolats de *Streptomyces* à préserver l'état sanitaire des plants de manioc infectés par *Xpm*

II.2.3.1. Dispositif expérimental

L'expérimentation a été réalisée dans le jardin expérimental de l'université de Yaoundé 1 (Département de microbiologie), sur une période de trois Mois (allant de Novembre à Janvier). Une seule variété de manioc (développée par l'IITA) échantillonnée dans l'enceinte du campus a été utilisée pour le test. Les boutures de manioc ont été prélevées sur les plants sains à l'aide des gros ciseaux en métal désinfecté à l'eau de javel (2,4 % de Chlore actif), et découpées en fragments de 15 cm. Ces fragments ont été désinfectés en les immergeant dans de l'eau de javel (0,1 % de chlore actif) pendant une minute. Après ce temps, ces boutures ont été rincées abondamment à l'eau de robinet.

Sur une surface d'environ 10 m², un plan d'expérience adaptatif de cinq blocs et cinq répétitions a été mis en place, à partir des pots contenant du sol, préalablement stérilisé à l'autoclave à 121°C, pendant 15 minutes (figure10). La mise en culture des boutures dans des pots a consisté à faire des piqûres verticales, à raison de deux boutures par pots, et en laissant deux nœuds végétatifs en surface (figure 11).



Figure 10. Autoclave pour terre



Figure 11. Culture en pots des boutures manioc

II.2.3.2. Technique d'inoculation des plants et méthode de traitement des plants

L'expérience a été réalisée sur des plants sains âgés de six semaines (figure 12). Pour chaque cas d'extrait testé, 25 plants au total ont été sélectionnés, et regroupés en 5 lots (L1, L2, L3, L4 et L5) de 5 plants. Cinq feuilles pour chaque plant (partant du bas vers l'apex) ont été utilisées, dont 25 feuilles par lots.

Les lots L1, L2 et L3 ont été contaminés, par *Xpm* suivant la méthode par infiltration comme décrite par (Arthur et *al.*, 2018). Un inoculum de *Xpm* a été préparé à partir d'une jeune culture de 48h, et calibré au spectrophotomètre pour une concentration de $6,0 \times 10^6$ UFC/ml (longueur d'onde de 600 nm, densité optique de 0,001). L'inoculation a été faite, à l'aide d'une seringue de 10 ml sans aiguille, par infiltration directe d'un millilitre de la suspension sur la face inférieure de la feuille, de part et d'autre de la nervure centrale pour faciliter l'infiltration de la bactérie à travers les stomates (figure 13.A). Le lot L4, a été inoculé uniquement avec l'extrait de *Streptomyces* de concentration égale à $1 \times \text{CMI}$. Le lot L5 (témoin négatif) a reçu, en lieu et place de *Xpm*, de l'eau physiologique stérile.

Le traitement des plants contaminés a été réalisé sur le lot L1 pour une concentration en extrait égale à $1 \times \text{CMI}$, et sur le lot L2 (lots tests) pour une concentration en extrait égale à $2 \times \text{CMI}$ (lots tests). Ce traitement a été réalisé environ 5 minutes après contamination volontaire à *Xpm*, par une pulvérisation abondante des solutions en extrait

sur les feuilles et les tiges des plants, à l'aide d'un mini pulvérisateur (figure 13.B). Le lot L3 (témoin positif) quant à lui n'a pas été traité avec l'extrait. Un arrosage permanent de deux fois par jour (matin et soir) au niveau du sol, a été effectué durant le temps d'expérimentation pour maintenir une humidité élevée.

Les paramètres sanitaires ont été évalués par observation visuelle, la progression de la maladie après 2 jours, et après 14 jours après contamination, par dénombrement des feuilles nécrotiques.



Figure 12. Plants de manioc sains âgés de six (06) semaines



Figure 13. Méthode d'inoculation par *Xpm* et traitement des plants de manioc par les solutions antimicrobiennes
(A): inoculation sur des feuilles par infiltration ; (B) : traitement des plants par pulvérisation

CHAPITRE III :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. RÉSULTATS

III.1.1. Caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques des colonies de *Xpm*

Le tableau 6 présente les caractéristiques macroscopiques, microscopiques et biochimiques de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*). Il en ressort de ce tableau que :

- Sur le plan macroscopique, les colonies de *Xpm* sur TSA sont de couleur Jaune-orangée, brillantes, surfaces lisses, convexes, à aspect visqueux, à contours réguliers, et de diamètres variants entre 1 et 2 mm (Figure 14).
- Sur le plan microscopique, les cellules observées étaient des bâtonnets droits, isolées, et sont Gram négatif.
- Les tests biochimiques ont révélé que, à l'exception du mannitol, *Xpm* dégrade plusieurs glucides parmi lesquels, le glucose, l'amygdaline, l'arabinose, le saccharose, l'inositol, sorbitol, le rhamnose, le saccharose, le mélibiose, et l'amygdaline. Cette bactérie est également capable de synthétiser plusieurs enzymes telles que l'arginine-déshydrogénase, l'ornithine-décarboxylase, la tryptophane-désaminase, uréase, catalase, et la β -galactosidase. Elle ne possède pas la lysine-décarboxylase. Le KOH (3 %) induit la libération du matériel génétique, et le citrate n'est pas utilisé.

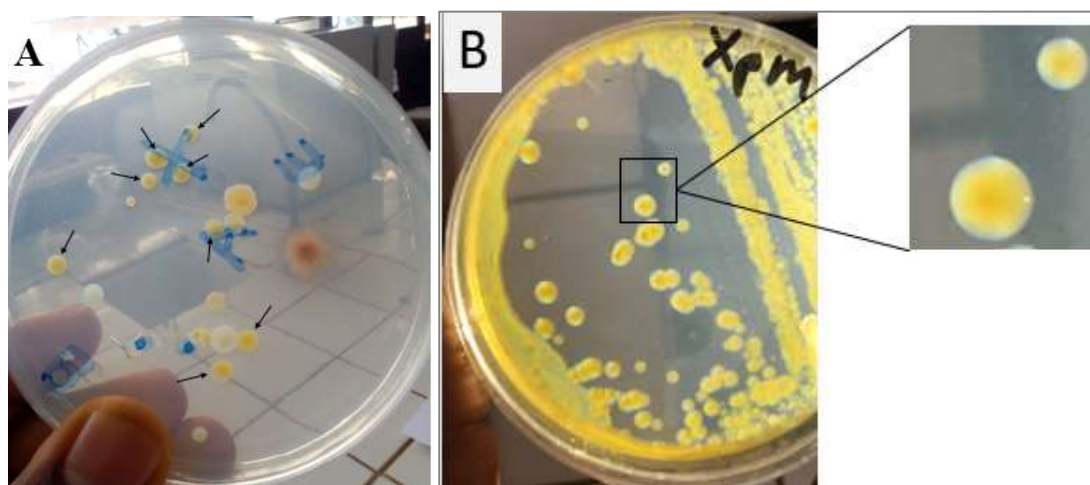


Figure 14. Colonies de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* sur TSA
(A) : Boîte de criblages (dilution 10^{-4}) avec les colonies de *Xpm* en bouts des flèches noires, (B) : Colonies pures de *Xpm*

Tableau 6. Caractéristiques macroscopique, microscopique et biochimique de *Xpm*

Types de caractérisations		Observations / réactions	
Macroscopique		Colonies Jaunes citrines sur gélose nutritive, jaunes orangées sur TSA, et blanc ivoire sur gélose nutritive additionnée au glucose, de forme circulaires, convexes, bords réguliers, surfaces lisses, brillante, translucides et mucoïdes.	
Microscopique	Coloration de Gram	Gram négatif	
	Forme des cellules	Bâtonnets courts et droits	
	Regroupement et mobilité	Bâtonnets isolés, immobiles	
Biochimique	Dégradation des glucides	Glucose	+
		Amygdaline	+
		Arabinose	+
		Mannitol	-
		Arabinose	+
		Saccharose	+
		Inositol	+
		Sorbitol	+
	Recherche des Enzymes	Arginine Déshydrogénase	+
		Lysine Décarboxylase	-
		Ornithine Décarboxylase	-
		Tryptophane Désaminase	+
		Arginine Déshydrogénase	+
		Catalase	+
		Uréase	+
	Autres	ONPG	+
		Trisodium citrate	-
		KOH (3%)	+

+ réaction positive ; - réaction négative ; ONPG : OrthoNitroPhényl-β-D-Galactopyranoside ; KOH : Hydroxyde de potassium.

III.1.2. Observation de l'activité antimicrobienne *in-vitro* des isolats de *Streptomyces* vis-à-vis de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Les résultats de l'évaluation *in-vitro* de l'activité antimicrobienne des isolats de *Streptomyces* ont montré que, sur les 43 isolats de *Streptomyces* testés, sept (07) ont présenté une activité inhibitrice (tableau 7). La figure 15 montre les différents diamètres d'inhibition de ces sept isolats sur boîtes de Pétri.

De ces sept isolats de *Streptomyces*, les diamètres d'inhibition les plus importants ont été obtenus avec les isolats Ker-2 et Bel-12. Ce qui nous a conduits à retenir ces deux isolats pour la suite de notre travail.

Tableau 7. Diamètres d'inhibitions des 07 isolats de *Streptomyces* bioactifs vis-à-vis de *Xpm*

Code des Isolats	Diamètres d'inhibitions moyens (en mm)
Ker-I	16,50 ± 2,12 ^{ab}
Ker-19	13,50 ± 2,12 ^a
Ker-A	14,50 ± 6,36 ^{ab}
Ker-2	23,00 ± 2,83 ^{bc}
Bel-47	15,50 ± 3,54 ^{ab}
Bel-46	13,50 ± 3,54 ^a
Bel-12	27,50 ± 3,54 ^c

mm : millimètre ; a, b, c : indices de significativité

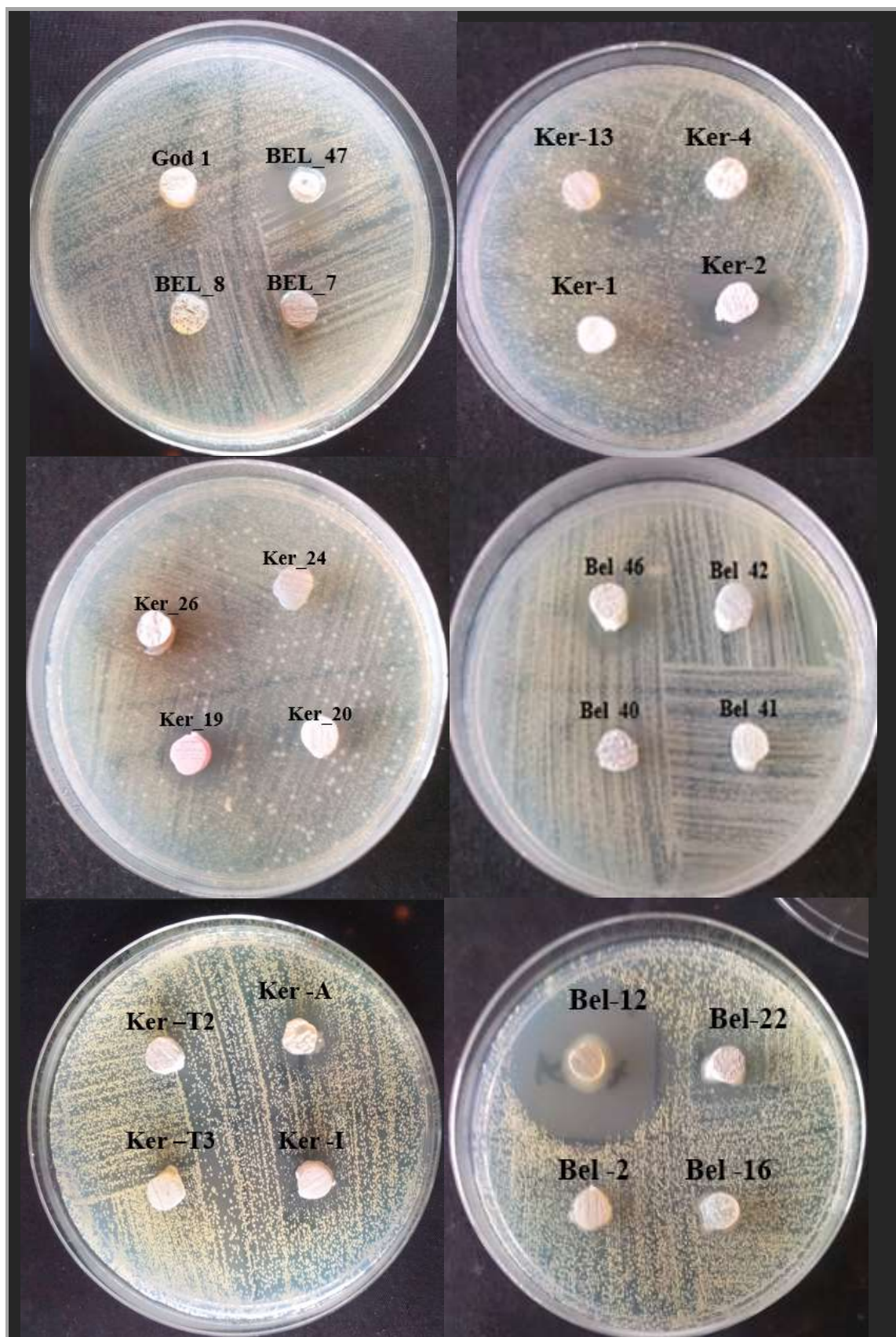


Figure 15. Observation des halos d'inhibition obtenus par les isolats Ker-2 et Bel-12

III.1.3. Activité antimicrobienne des extraits de cultures des isolats de *Streptomyces* les plus actifs

À l'issue de l'extraction, les extraits obtenus étaient de nature solide, poudreux, de couleur Jaune-dorée pour E_{MeOH}Ker-2 et jaune- partiellement orangée pour E_{MeOH}Bel-12. Les rendements d'extraction étaient de 1,34 pour Bel-12 et 1,41 pour Ker-2.

En effet, partant des extraits au méthanol, de concentration initiale 2048 µg/mL dilué 12 fois avec les dilutions de raison 2, seule la dernière dilution de l'extrait de culture de Ker-2 de concentration 1 µg/mL a montré une croissance microbienne, soit une CMI de 2 µg/mL pour cet extrait. Par contre, l'extrait de culture de Bel-12 a montré une croissance à partir de la 8^{ième} dilution dont la concentration était de 16 µg/ mL, soit une CMI de 32 µg/mL.

Malgré cette différence d'activité antimicrobienne, nous avons poursuivi les travaux *in-situ* avec les extraits de ces deux isolats afin de vérifier leur efficacité sur les plants de manioc volontairement infectés.

III.1.5. État sanitaire des plants après traitement

Le tableau 8 présente l'état sanitaire des plants soumis à différents traitements. Cet état est mis en évidence sur des feuilles observées au 2^{ième} et au 14^{ième} jour après traitements, et à partir des concentrations en extraits égales à 1×CMI.

Les témoins négatifs (T⁻), c'est-à-dire les plants inoculés à l'eau stérile, ont présenté uniquement des tâches dues à la pression (p) de la seringue, sans symptôme de brunissement jusqu'au quatorzième jour de l'expérimentation. Les plants pulvérisés avec chacun des extraits E_{MeOH}Bel-12 ou E_{MeOH}Ker-2 n'ont pas montré de dommages sur les feuilles de manioc, en utilisant les mêmes concentrations que celles testées pour les traitements. Pour les témoins positifs à *Xpm* (T⁺*Xpm*), les feuilles ont présenté des signes de brunissement (b) au 2^{ième} jour après contamination sous forme d'auréoles aux niveaux des zones de pressions, avec une extension rapide des tâches nécrotiques (n) observables au 14^{ième} jour.

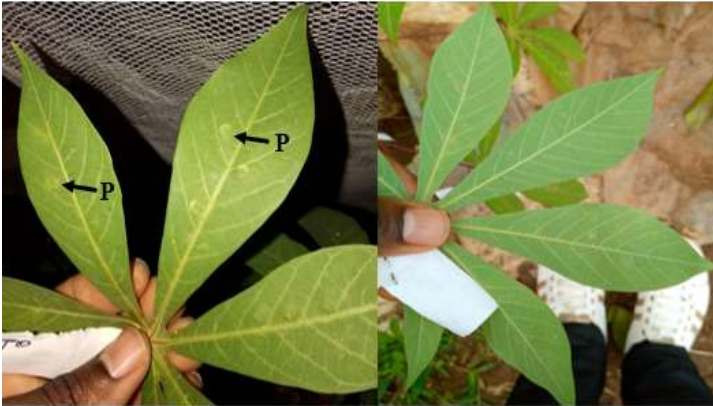
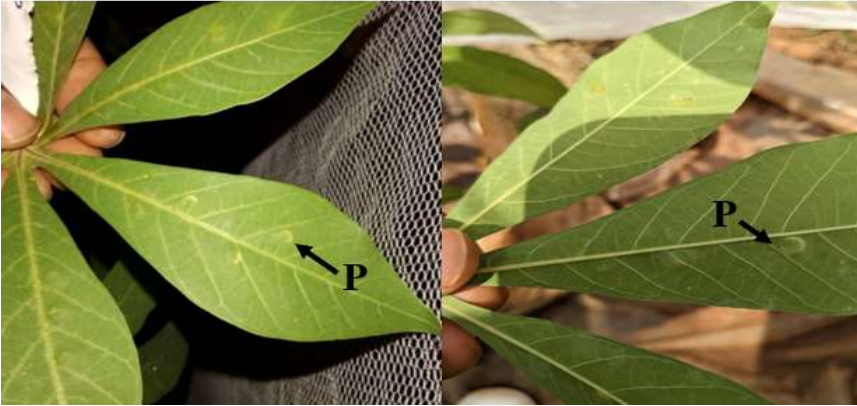
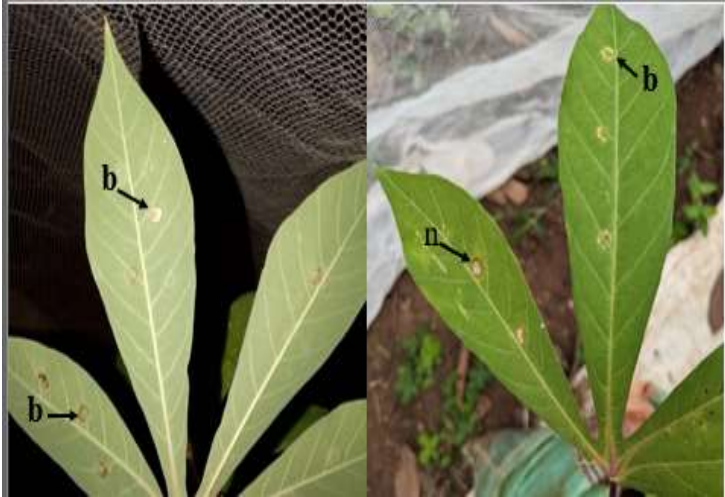
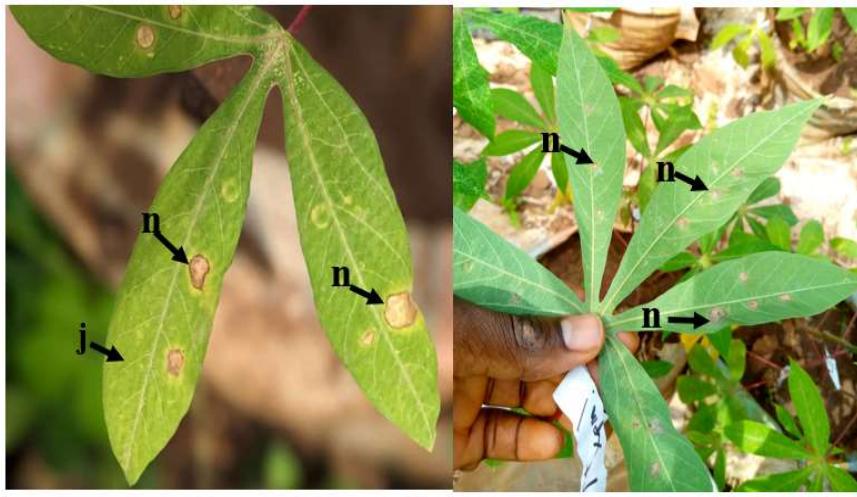
Les plants contaminés, puis traités avec l'extrait E_{MeOH}Bel-12, à des concentrations équivalentes à la CMI (32 µg/mL) ou deux fois supérieures à la CMI (64 µg/mL) 1×CMI n'ont pas présenté de feuilles avec des signes de brunissement au 2^{ième} jour, ou des feuilles

nécrotiques au 14^{ième} jour. Ces feuilles sont restées saines durant la durée de l'expérimentation, avec de légers jaunissement "J" observés au niveau des zones inoculées.

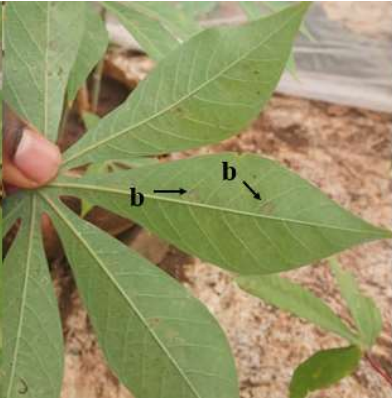
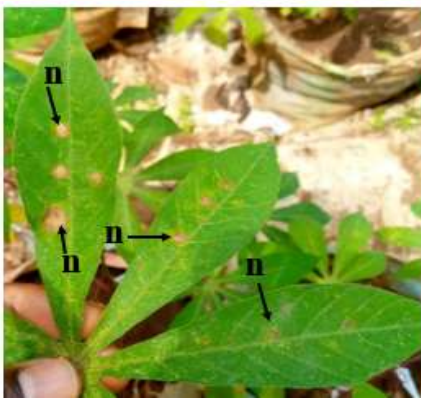
Les plants traités avec l'extrait E_{MeOH}Ker-2 après contamination à 1×CMI ont présenté des résultats comparables à ceux du témoin positif à *Xpm* (T⁺ *Xpm*) à savoir, la présence d'un brunissement au 2^{ième} jour, avec une évolution des nécroses observée au 14^{ième} jour, montrant ainsi leur limite de l'application de cet extrait *in-vivo* de cet extrait à des concentrations testées.

Afin de mieux apprécier l'efficacité de ces deux extraits à préserver l'état sanitaire des plants de manioc, un dénombrement des feuilles soumises aux différents traitements a été réalisé au quatorzième jour. Les résultats de ce décompte des feuilles selon leur état sanitaire (tableau 9), montrent des taux d'efficacité sanitaire de 12 % et 76 % respectivement pour les extraits E_{MeOH}Ker-2 et E_{MeOH}Bel-12.

Tableau 8. Aspect sanitaire des feuilles après traitements aux extraits de Bel-12 et Ker-2, au 2^{ième} et 14^{ième} jour après contamination à *Xpm*

Traitements	Temps après contamination volontaire			
	2 Jours		14 jours	
T-				
T+ <i>Xpm</i>				

Traitements	Temps après contamination volontaire	
	2 Jours	14 jours
E_{MeOH}Bel-12 (1×CMI)		
Xpm + E_{MeOH}Bel-12 (1×CMI)		

Traitements	Temps après contamination volontaire			
	2 Jours		14 jours	
E_{MeOH}Ker-2 (1×CMI)				
<i>Xpm</i> + E_{MeOH}Ker-2 (1×CMI)				

Xpm : *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.
E_{MeOH}Bel-12 : Extrait méthanolique de Bel-12 *.
E_{MeOH}Ker-2 : Extrait méthanolique de Ker-2 *.
n : nécrose
b : brunissement

P : zone de pression de la seringue
T⁻ : Témoin négatif (inoculation à l'eau distillée).
T⁺*Xpm* : Témoin positif à *Xpm*
Xpm+E_{MeOH}Bel-12 : Traitement à E_{MeOH}Bel-12 après contamination par *Xpm*.
Xpm+E_{MeOH}Ker-2 : Traitement à E_{MeOH}Ker-2 après contamination par *Xpm*.

Tableau 9. Dénombrement des feuilles après traitement aux extraits E_{MeOH}Bel-12 et E_{MeOH}Ker-2, 14 jours après contamination

	Traitements	Nombre de feuilles			Efficacités sanitaires (%)
		Total	Nécrosées	Saines	
Témoins	T ⁻	25	0	25	/
	T ⁺ (<i>Xpm</i>)	25	25	0	/
Bel-12	E _{MeOH} Bel-12	25	0	25	/
	<i>Xpm</i> + E _{MeOH} Bel-12	25	0	25	76%
Ker-2	E _{MeOH} Ker-2	25	0	25	/
	<i>Xpm</i> + E _{MeOH} Ker-2	25	22	3	12%

Xpm : *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* ; T⁻ : Témoin négatif (inoculation à l'eau distillée) ; T⁺*Xpm* : Témoin positif à *Xpm* ; *Xpm* + E_{MeOH}Bel-12 : Traitement à E_{MeOH}Bel-12 après contamination par *Xpm* ; *Xpm* + E_{MeOH}Ker-2 : Traitement à E_{MeOH}Ker-2 après contamination par *Xpm*.

III.2. DISCUSSION

La bactériose vasculaire du manioc, avec pour pathogène *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), est l'une des maladies les plus répandues, et les plus graves parmi les maladies du manioc (FAO, 2013). Diverses recherches sont mises à jour pour réduire l'impact causé par ce microorganisme sur les plants de manioc. Les microorganismes, par une croissance continue, et ubiquiste, le genre *Streptomyces*. constituent un réservoir important, et quasi-inépuisable des composés bioactifs, parmi lesquels les substances aux activités antibactériennes (Aouiche et *al.*, 2012) .

Dans le cadre d'un biocontrôle contre *Xpm*, les isolats bactériens obtenus à partir des feuilles de manioc symptomatiques à la bactériose vasculaire du manioc (CBB) ont présentés sur TSA, des colonies de couleur jaune-orangée. Cette coloration jaune-orangée sur TSA a déjà été observée par Richard & Kiredjan (1995), caractérisant le genre *Xanthomonas*. Les colonies révélaient également un aspect arrondi, convexe, surface lisse, brillant et visqueux. Ces observations morphologiques sont similaires à celles de plusieurs auteurs (Affery et *al.*, 2018 ; Kante, 2020 ; Zárata-Chaves et *al.*, 2021). L'aspect visqueux des colonies est dû à la synthèse du Xanthane, un exopolysaccharide spécifique au genre, et également responsable de la sévérité des symptômes provoqués par *Xpm* sur les plants de manioc (Affery et *al.*, 2018). Le repiquage des colonies isolées sur gélose nutritive glucosée et sur gélose nutritive sans glucose présente les colonies blanc-ivoire et jaune-citrine respectivement. Cette variation de couleur des colonies est une fonction spéciale des bactéries du genre *Xanthomonas*, liée à la synthèse d'un pigment jaune (la Xanthomonadine). Les travaux de Kante (2020) et Zárata-Chaves et *al.* (2021) montrent que la présence du glucose dans le milieu d'isolement inhibe la voie de synthèse de la Xanthomonadine par *Xpm*. Les tests biochimiques ont montré que *Xpm* isolé dégrade plusieurs glucides, à l'exception du mannitol. L'ONPG est positif. Ce même résultat avait déjà été observé par Richard & Kiredjan (1995) sur le genre *Xanthomonas*.

La recherche d'une activité inhibitrice de quarante-trois (43) isolats de *Streptomyces* par la méthode des cylindres d'agar a montré que 16,27 % des isolats ont été actifs contre *Xpm*, avec des halos d'inhibitions variant entre $13,50 \pm 2,12$ mm et $27,50 \pm 3,54$ mm.

Le résultat de ce test montre que les molécules bioactives impliquées dans le mécanisme d'inhibition de *Xpm* seraient constitutivement synthétisées par le *Streptomyces* correspondant et solubles dans le milieu gélosé. Les différences des diamètres d'inhibition peuvent être attribuées aux conditions spécifiques de l'habitat des *Streptomyces* telles que les interactions physiques avec d'autres microorganismes, et les interactions chimiques avec les molécules solubles dans le sol. Ces facteurs influenceraient de manière significative l'expression du métabolisme secondaire des *Streptomyces* antagonistes par formation des phénotypes inhibiteurs, avec des intensités d'expression différentes des clusters de gènes impliqués (Galet, 2014).

De plus, la production de composés antimicrobiens par les isolats de *Streptomyces* contribue à leurs activités inhibitrices contre différents agents pathogènes, certains isolats présentant de puissants effets inhibiteurs contre des bactéries et des champignons spécifiques (Galet, 2014). Les meilleures activités antimicrobiennes des isolats testés dans le cadre de ce travail sont celles de Ker-2 et Bel-12 avec les diamètres d'inhibition moyens étaient de $23,00 \pm 2,83$ et $27,50 \pm 3,54$ mm respectivement.

Les rendements d'extraction étaient de 1,34 % pour $E_{MeOH}Ker-2$ et 1,41% pour $E_{MeOH}Bel-12$. Les CMI ont montré des valeurs égales à 2 µg/ml et 32 µg/ml, respectivement pour $E_{MeOH}Ker-2$ et $E_{MeOH}Bel-12$. Ces résultats montrent que ces extraits renferment des molécules bioactives comportant des groupements polaires, et dirigées contre *Xpm*. En effet, le méthanol est l'un des solvants polaires majoritairement utilisé pour l'extraction des composés bioactifs des *Streptomyces* avec des activités antibactériennes significatives sur les bacilles gram négatifs (Zhang et al., 2013 ; Ling et al., 2020). La différence d'activité inhibitrice entre ces deux extraits méthanoliques serait liée à leurs différentes compositions chimiques, et dont un fractionnement biochimique aurait certainement participé à leur révélation.

In-situ, le témoin positif à *Xpm* a montré les taches de brunissements sur les feuilles de manioc au 2^{ème} jour après contamination, avec 100 % de feuilles nécrosées après 14 jours, ce qui montre une sensibilité des plants de manioc utilisé vis-à-vis de la souche de *Xpm* isolée. Kante (2020) a classé les groupes de plantes comme sensibles à la bactériose vasculaire du manioc (CBB), en cas d'un pourcentage de feuilles nécrosées situé entre 44 et 100 %. Pourtant, la variété de manioc utilisée dans notre étude est l'une des variétés développées par l'IITA (Institut international d'agriculture tropicale) et décrite comme variété résistante à la CBB.

Ces observations confirment les travaux d’Affery et *al.* (2018) qui ont montré que la tolérance d’une variété de manioc par rapport à la CBB varie en fonction de la souche considérée et la concentration en microbienne à l’infection. Zárata-Chaves et *al.* (2021) ont rapporté que ces brûlures foliaires sont causées par la synthèse de l’acide 3-méthylthiopropionique, suite à l’expression des gènes de virulence et la multiplication de *Xpm* au sein de la cellule hôte.

Le traitement des feuilles avec les extraits méthanoliques E_{MeOH}Ker-2 de Ker-2 et E_{MeOH}Bel-12 de Bel-12, montrent des résultats avec des taux d’efficacité différents. En effet, le traitement des feuilles avec l’extrait E_{MeOH}Bel-12 inhibe la manifestation de la bactériose avec une efficacité de 72 %, tant dis que l’extrait E_{MeOH}Ker-2 ne présente qu’une efficacité de 12%. La faible efficacité *in-situ*, de l’extrait E_{MeOH}Ker-2 pourrait être liée à l’instabilité des molécules bioactives face aux contraintes environnementales (variation de température, rayonnement solaire), favorisant ainsi la prolifération de *Xpm* et par conséquent la manifestation de la CBB.

L’absence de nécroses sur les feuilles traitées avec E_{MeOH}Bel-12 montre que les molécules antibactériennes contenues dans cet extrait sont relativement stables face aux contraintes environnementales. Cet extrait agit par antibiose, soit en inhibant la multiplication du pathogène au sein de la cellule hôte, soit en éliminant totalement la concentration bactérienne de l’inoculum. Ce résultat est similaire à celui du test *in-situ* de Ling et *al.* (2020) qui ont montré une efficacité de l’actinomycine D de *Streptomyces* sp. dans le biocontrôle de *Ralstonia solanacearum*. Bien que l’extrait E_{MeOH}Ker-2 présente une CMI plus faible par rapport à l’extrait E_{MeOH}Bel-12, ce dernier renfermerait des biomolécules polaires différentes de celles de l’extrait E_{MeOH}Ker-2, capables de résister à certaines conditions naturelles de cultures du manioc. Cette différence d’activité *in-situ* par rapport au test *in-vitro* de l’extrait E_{MeOH}Ker-2 montre que l’effet inhibiteur présenté par les extraits microbiens dans les expériences de laboratoire ne sont pas toujours l’image de l’antagonisme dans les expériences en champs ou en serre (Woan-Fei et *al.*, 2017).

L’activité antagoniste *in-situ* de E_{MeOH}Bel-12 montre une possible exploitation de cet extrait comme solution innovante pour lutter contre la CBB en tant qu’agent de biocontrôle (BCA). L’étude de la stabilité de cet extrait reste importante afin d’estimer la durée d’activité sur les plants de manioc vis-à-vis des facteurs externes et de prévenir les réinfections à *Xpm*.

L'activité antibactérienne que présentent ces extraits, en particulier E_{MeOH}Bel-12 se voit intéressante au vu des différentes méthodes étudiées pour éradiquer *Xpm* et de réduire son impact sur les plants de manioc.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de cette étude, dont l'objectif général était d'évaluer l'effet antimicrobien de *Streptomyces* spp. vis-à-vis de *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis* (*Xpm*) à travers les tests *in-vitro* et *in-situ* des isolats de *Streptomyces*, il en découle que :

- ✓ *Xpm* peut être isolé des plants de manioc atteints par la bactériose vasculaire du manioc. À cet effet, un isolat présentant les différentes caractéristiques de cette espèce a pu être isolé.
- ✓ Sur les quarante-trois (43) isolats de *Streptomyces* testés, deux isolats de *Streptomyces* ont montré une activité antimicrobienne anti-*Xpm* importante avec des diamètres des halos d'inhibition moyens de $23,00 \pm 2,83$ et $27,50 \pm 3,54$ mm, respectivement pour Ker-2 et Bel-12 ; et les extraits méthanoliques $E_{MeOH}Ker-2$ et $E_{MeOH}Bel-12$ révèlent des valeurs de CMI égales à 2 µg/ml et 32 µg/ml respectivement.
- ✓ *In-situ*, les extraits $E_{MeOH}Ker-2$ de Ker-2 et $E_{MeOH}Bel-12$ de Bel-12 présentent des efficacités de 12 % et 76 %, respectivement.

PERSPECTIVES

À l'issue de ces résultats, des perspectives sont envisageables afin d'améliorer ce travail. Il s'agit entre autres de :

- ✚ Faire une identification génétique des isolats de *Streptomyces* Ker-2 et Bel-12 ayant fait l'objet de notre travail.
- ✚ Révéler les familles biochimiques des composés antibactériens des extraits de Bel-12 et Ker-2 par fractionnement, et à étudier leur stabilité.
- ✚ Tester les concentrations de ker-2 aux mêmes concentrations que celles de Bel-12.
- ✚ Tester les deux extraits pendant un cycle complet (saison) de production du manioc.

RÉFÉRENCES

- Abdulai, M., & Larbi-Koranteng, S. (2019).** Scanning electron microscopy of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight disease. *Journal of Global Biosciences*. 8, 6508- 6518.
- Affery, A. M., Abo, K., N'Guessan, A. C., Bolou, B. B. A., Tuo, S., Wonni, I., Bomisso, E. L., Kone, M., & Kone, E. D. (2018).** Caractérisation moléculaire et sélection de variétés de manioc résistantes contre. *Agronomie Africaine*. 30, 261- 269.
- AH-YOU, N. (2007).** Taxonomie et classification en pathovar des *Xanthomonas* associés aux *Anacardiaceae* par une approche polyphasique. Thèse. Université de la Réunion. CIRAD. 140 p.
- Alam K., Jinfang H., Qing O., Md. Mahmudul I., Hongluan S. , Youming Z., Ruijuan L., Aiying L., Lin Z. , Guoqing F., Islam S. (2022).** Le séquençage complet du génome et l'exploration in silico du génome révèlent le potentiel métabolique prometteur de la souche *Streptomyces* CS7. *Frontiers in Microbiology*. p. 1- 19.
- Angert, E., R. (2005).** Alternatives to Binary Fission in Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 214- 24.
- Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2012).** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. Antimicrobial activity of a Saharan *Streptomyces* spp. PAL111 strain against various clinical and toxinogenic microorganisms resistant to antibiotics. *Journal of Medical Mycology*, 22, 42- 51.
- Arthur Martin, A., Kouabenan, A., Aya Carine, N., Issa, W., Edson Lézin, B., Konan Didier, K., Seydou, T., Bi Bolou Antoine, B., Mongomaké, K., & Daouda, K. (2018).** Diversité pathogénique des souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Côte d'Ivoire, sensibilité des variétés de manioc et approche de lutte. *Journal of Applied Biosciences*. 130, 13187- 13198.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Koraichi Ibensouda, S. (2015).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6, 71- 79.
- Botero, D., Monk, J., Rodríguez Cubillos, M. J., Rodríguez Cubillos, A., Restrepo, M., Bernal-Galeano, V., Reyes, A., González Barrios, A., Palsson, B., Restrepo, S., & Bernal, A. (2020).** Genome-Scale Metabolic Model of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* : An Approach to Elucidate Pathogenicity at the Metabolic Level. *Frontiers in Genetics*. 11, 1- 837.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., & Boulahrouf, A. (2012).** Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Annales de biologie clinique*. 70, 169-174.

- Brama James, John Y., Ambe T., Norbert M., Alfred D., Rasqa S., Joseph K. (2000).** Comment démarrer un champ de manioc. *International Institute of Tropical Agriculture*. p. 1-24.
- Chauhan, A., & Jindal, T. (2020).** Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis. *Springer*. p. 1-1487.
- Claessen, Jong D., W., Dijkhuizen L., Wösten H., A., B. (2006).** “Regulation of *Streptomyces* Development: Reach for the Sky” *Trends in Microbiology* 14, 313-19.
- Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., & Cottyn, B. (2016).** Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology*. 65, 792-806.
- Daniel, J.-F., Boher, B., N'Dongo, P., & Makoundou, L. (1985).** Étude des modes de survie de l'agent causal de la bactériose vasculaire du manioc, *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. *Agronomie*. 5, 339-346.
- Dias, M. P., Bastos, M. S., Xavier, V. B., Cassel, E., Astarita, L. V., and Santarém, E. R. (2017).** Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 118, 479- 493.
- Dieudonné, N., Cécile, O., & Émile, K. (2008).** Optimisation de la production d'éthanol par les techniques d'hydrolyse de l'amidon de manioc et la fermentation de la levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal of the Cameroun Academy of Sciences*. 8, 3-10.
- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., and Suleymankisi, A. (2016).** Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. by *Streptomyces* species. *Journal of Advances in Microbiology*. 6, 104-114.
- Emmanuel, T. L. (2013).** Amélioration de la commercialisation et de transformation du manioc au Cameroun : Contraintes et perspectives de la chaîne de valeur. *Rebuilding West Africa's Food Potential*. p. 505-535.
- Fanou, A. A., Zinsou, V. A., & Wydra, K. (2018).** Cassava Bacterial Blight : A Devastating Disease of Cassava. *InTechOpen journals*. p. 13- 36.
- FAO (Éd.). (2013).** Produire plus avec moins : Le manioc guide pour une intensification durable de la production. *Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture*. p. 1-129.
- Feng Yating, Zhang, Y., Shah, O., U., Luo K., Chen Y. (2023).** Isolation and Identification of Endophytic Bacteria Bacillus sp. ME9 That Exhibits Biocontrol Activity against *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis*. *Biology*. 12, 1-23.

- Galet Justine (2018).** Vers la compréhension des dialogues microbiens dans les écosystèmes du sol : étude de l'interaction entre *Streptomyces* et *Pseudomonas*. Thèse. Université de Lauraire. *HAL open science*. P 1-136.
- He, D.-C., He, M.-H., Amalin, D. M., Liu, W., Alvindia, D. G., & Zhan, J. (2021).** Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathogens agents*. 10, 1-1311.
- Ibrahimi M. (2020).** Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine. Thèse. Université de Poitiers; Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc. *HAL open science*. p. 1-165.
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G., and Rajkumar, S. (2014).** Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 160, 778-788.
- Kante M. (2020).** Diversité des populations de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* au Mali et recherche de sources de résistance durables chez le manioc. Thèse. Université Montpellier; Université de Bamako ; Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée. *HAL open science*. p. 1-275.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019).** Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*. 10, 1- 845.
- Kouakou, J., Nanga N., S., Plagne, I., C., Mazalo P., A., Edoh O., K. (2015).** Production et transformation du manioc. *Programme-Agronomique*. p. 1-39.
- Laassami A., Merrouche R., Tata S., Bouras N., Mokrane S., Meklat A. (2019).** Activité antibactérienne d'une nouvelle souche Md14 de *Streptomyces* isolée à partir d'un sol algérien. *International Journal of Biological and Agricultural Research*. 2, 1- 9.
- Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G. (2017).** The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology*. 8, 3.
- Ling , L., Han, X. , Li, X. , Zhang X., Wang, H., Zhang, L., Cao P., Wu, Y., Wang , X., Zhao, J., Xiang, W. (2020).** A *Streptomyces* sp. NEAU-HV9: Isolation, Identification, and Potential as a Biocontrol Agent against *Ralstonia solanacearum* of Tomato Plants. *Microorganisms*. 8, 1-15.
- Mahungu, N. M., Hangy, K. W. T., & Bidiaka, S. M. (2014).** Multiplication de matériel de plantation de manioc et gestion des maladies et ravageurs. *Institut International d'Agriculture Tropicale*. p. 1-43.
- Maleki, H., Dehnad, A., Hanifian, S., & Khani, S. (2013).** Isolement et identification moléculaire de *Streptomyces* spp. Avec une activité antibactérienne du nord-ouest de l'Iran. *Bioimpacts*. 3, 129- 134.

- Mansfield J., stephane G., Shimpei M., Vitaly C., Malinee S., Pamela R., Max D., Valérie V., Steven V., B., Marcos a., M., Ian T., George S., Gary D., F. (2012).** Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 13, 614-629
- Melifonwu, A., James, B., Aïhou, K., Weise, S., Awah, E., & Gbaguidi, B. (2000).** Lutte contre les adventices dans les champs de manioc. *International Institut of Tropical*. p. 1-27.
- Msikita, W., James, B., Nnodu, E., Legg, J., Wydra, K., & Ogbe, F. (2000).** Lutte contre les maladies du manioc. *International Institut of Tropical*. p. 1-27.
- Muhammad Yusril, H., Yunus, M., Abdul, M. J. (2020).** Identifikasi Plant Growth Promoting Rhizobacteria pada Rizosfer Bambu Duri dengan Gram KOH 3%. *Agrotechnology Research Journal*. 4, 41- 46.
- Naimi Mostefa (2018).** Techniques de contrôle microbiologiques. Centre Universitaire Nour Bachir - El-Bayadh. *ResearchGate*. p. 1- 51.
- Newman, D., J., and Cragg, G., M. (2020).** Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal. National Production*. 83, 770- 803.
- Olanrewaju, O. S., & Olubukola O., O. (2019).** *Streptomyces* : implications et interactions dans la promotion de la croissance des plantes. *Applied Microbial Biotechnology*. 3, 1179-1188.
- Pacios-Michelena S., Cristobal N., A. G., Olga B., A., Raul R., Mónica C., Roberto A., V., Juan A., A., V., 1., Mayela G., Ovea S., Anna I. (2021).** Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 5, 13.
- Perez G., D., A. (2022).** Facteurs socioculturels impliqués dans la dissémination de la bactériose vasculaire du manioc dans les Caraïbes Colombiennes. Thèse. Université de Montpellier. *HAL open science*. p. 1- 196.
- Rache, L., Blondin, L., Diaz Tatis, P., Flores, C., Camargo, A., Kante, M., Wonni, I., López, C., Szurek, B., Dupas, S., Pruvost, O., Koebnik, R., Restrepo, S., Bernal, A., & Vernière, C. (2023).** A minisatellite-based MLVA for deciphering the global epidemiology of the bacterial cassava pathogen *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. *Public Library Of Science One*. 18, 1-16.
- Ramirez, E., Dereeper, A., Bernal, A., Szurek, B., & López, C. (2020).** Resistance and susceptibility to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in cassava: A transcriptomic comparison (or two sides of the same coin). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 112, 1-6.

- Richard, C., & Kiredjan, M. (1995).** Méthode de laboratoire pour l'identification des bacilles a gram négatif aérobies stricts (*Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella*). Institut Pasteur. 2, 1-332.
- Saoudi B., Kirane D., Taibi Z., Ladjama A. (2006).** Recherche d'enzymes pectinolytiques chez cinq souches de *Streptomyces* isolées d'un sol saharien (biskra). *Université Badji-Mokhtar-Annaba*. 15, 31.
- Song, L., Jiang, N., Wei, S., Lan, Z., and Pan, L. (2020).** Isolation, screening, and identification of actinomycetes with antifungal and enzyme activity assays against *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*. *Mycobiology* 48, 37- 43.
- Sousa, J. A. de J., and Olivares, F. L. (2016).** Plant growth promotion by *Streptomyces*: Ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technology in Agriculture*. 3, 24.
- Taylor, R. K., Griffin, R. L., Jones, L. M., Pease, B., Tsatsia, F., Fanai, C., Macfarlane, B., Dale, C. J., & Davis, R. I. (2017).** First record of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Solomon Islands. *Australasian Plant Disease Notes*. 12, 1-4.
- Tricoche, B., David-Benz, H., & Song, J.-E. (2008).** L'organisation de la filière manioc au Cameroun : Des modes de coordination pour régir les incertitudes de marché. *HAL open science*. p. 1-13.
- Vernier, P., N'Zué, B., & Zakhia-Rozis, N. (2018).** Le manioc, entre culture alimentaire et filière agro-industrielle. *Agricultures tropicales en poche. Éditions Quæ, Centre Technique de l'Agriculture (CTA), Presses agronomiques de Gembloux*. p. 1-208.
- Wattana-Amorn, P., Charoenwongsa, W., Williams, C., Crump, M. P., and Apichaisataienchote, B. (2016).** Antibacterial activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. *National Production Research*. 30, 1980-1983.
- Wilkins K., and Charlotte Scholler C. (2009).** Volatile organic metabolites from selected *Streptomyces* strains. *The Society for Actinomycetes Japan*. 23, 27-33.
- Woan-Fei Law, J., Chan, K.-G., Mehmood Khan, T., Ab Mutalib, N.-S., Goh, B.-H., & Lee, L.-H. (2019).** Diversité de *Streptomyces* spp. De la forêt de mangrove du Sarawak (Malaisie) et criblage de leurs activités antioxydantes et cytotoxiques. *Springer Nature*. 9, 1-16.
- Woan-Fei Law, J., Ser, H.-L., & Lee, L.-H. (2017).** The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Journal Frontiers in Microbiology*. 8, 1-12.
- Wonglom, P., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S., Matsui, K., and Sunpapao, A. (2019).** *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential microorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia lunata*. *Biology Control*. 138, 104046.

Zárate-Chaves, C. A., Gómez de la Cruz, D., Verdier, V., López, C. E., Bernal, A., & Szurek, B. (2021). Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. *Molecular Plant Pathology*. 22, 1520-1537.

ANNEXES

Composition des milieux de cultures

Kuster amidon

Amidon	5 g	Verser 23,3g de poudre dans 900 ml d'eau distillée, et ajouter 1mL d'Oligoéléments. Ajuster le pH si nécessaire. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.
Peptone	0,3 g	
K ₂ HPO ₄	2 g	
KNO ₃	2 g	
Chlorure de sodium	2 g	
Oligo-éléments	1 ml	
Agar	18 g	
pH	7,00	

Oligo-éléments

Sulfate de magnésium	5 g	Verser 8 g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée.
Carbonate de calcium	2 g	Porter à ébullition jusqu'à dissolution totale.
Sulfite de fer	1 g	Conserver la solution à l'abri de la lumière.

TSA (Trypto-Caséine-Soja)

Peptone de caséine	15 g	Verser 40 g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.
Peptone de soja	5 g	
Chlorure de sodium	5 g	
Agar	15 g	
pH	7,3	

Gélose nutritive

Peptone	10 g	Verser 35 g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.
Extrait de viande	5 g	
Chlorure de sodium	5 g	
Agar	15 g	
pH	7	

Gélose Mueller-Hilton

Macération de viande de bœuf	300 ml	Verser 35 g de milieu déshydraté dans 1000 ml d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.
Hydrolysate de caséine	17.5 g	
Amidon	1,5 g	
Agar	10 g	