

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master II académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Présenté par :

REBAA Mohamed
BENAISSA Abdelkader

Thème :

Potentiel antagoniste des PGPR et des extraits de *Citrullus colocynthis*
contre le nématode à galles, *Meloidogyne incognita*.

Soutenu publiquement le 04 juillet 2019

Jury:

Président :	M ^{lle} BAROUAGUI Soria	MAA	Université Ibn Khaldoun
Promotrice :	M ^{me} DAHLIA Fatima.	MAA	Université Ibn Khaldoun
Co-promoter:	M ^r RAHMOUNE Bilal.	MCB	Université Ibn Khaldoun
Examineur:	M ^{lle} BELMOKHTAR Rahma.	MAA	Université Ibn Khaldoun

Année universitaire 2018– 2019

Remerciements

*Avant tout, nous remercions **ALLAH** tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

Nous remercions nos parents pour leur soutien et leurs amours et leurs prières pour nous.

*Ce travail a été réalisé sous la direction de madame **Dahlia Fatima** et monsieur **Rahmoune Bilal**.*

Bien évidemment, nos sincères gratitudee et nos grands remerciements à nos encadreurs.

Nous les remercions de leurs gentillesse, de leurs disponibilités et leurs patiencee lors des discussione intensee et rationnellee qui nous ont permis de mener à bien ce travail. Pour tout cela, aussi pour leurs aidee, leurs confiancee, leurs dévouemente exemplairee et leurs conseil constructif, pour leurs humilitée, leurs générositée et leurs encouragemente, merci et mille merciee.

*Nous voudrions également remercier M^{eme} **Berouagui** et M^{eme} **Belmokhtar**, deux enseignantee de l'université de Tiaret, d'avoir accepté de présider le jury et d'examiner notre travail.*

*Nous remercions également les professeur : **Zaidat Sabri Ala Eddine**, **Bouzaa Saad** et **Djetti Tayeb**, enseignante à l'école nationale supérieure agronomique d'El Harrach, Alger, pour leur soutien et leurs plus grande efforte pour nous aider, merci du fond du cœur.*

Nous voudrions également remercier toue les enseignante qui nous ont enseigné et qui nous ont soutenu avec leur compétencee pour donner suite à notre étude.

Merci pour toue ceux qui ont participé à la réussite de ce travail.

*J'espère que ce travail est purement humble à **ALLAH** tout-puissant et utile pour lee génératione futuree et d'ajouter quelque chose dans le domaine de la recherche.*

Dédicace

Je dédie cet humble travail

À mes chers parents

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et l'amour éternel pour les sacrifices que vous avez déployés pour mon instruction et mon bien être dans les meilleures conditions, votre générosité et votre bonté ont toujours été un exemple pour moi. Trouvez en ce travail le fruit de votre dévouement et l'expression de ma gratitude et mon profond amour.

*À mes chers frères : **Taher, Djilali, Ahmed.***

*À ma chère Sœur **Hadjer,***

*À toute les familles **Rebaa et Zaher ;***

*À mon cher binôme **Abdelkader ;***

À tous mes chères amies ;

À tous mes amis de la promotion ;

À mes professeurs ;

À tous ceux qui m'ont aidé et soutenu.

Mr. REBAA Mohamed.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*Aux plus chers êtres de ma vie, **ma Mère** qui grâce à elle que je suis arrivée à ce stade. Elle n'a jamais cessé de m'encourager et de me motiver. Si je dois lui consacrer toute ma vie pour, je ne peux pas lui rendre ce qu'elle a fait pour moi, que **ALLAH** la garde et lui accorde une longue vie.*

À tous mes chères amies

À tous mes professeurs et mes camarades de la promotion de la spécialité de génétique moléculaire.

Pour ceux que j'aime et qui me connaissent.

Mr. BENAÏSSA Abdelkader.

Liste des abréviations

CAT : Catalase.

CM : Carré moyen.

DDL : Degrés de liberté.

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

F : Test *Fischer*.

ISR : Résistance Systémique Induite.

JA : Acide Jasmonique.

LOX : Lipoxygénase.

LPS : Lipopolysaccharides.

P : Probabilité.

PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria = Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes.

PO : Peroxydase.

PPO : Polyphénoloxydase.

RAS : Résistance Acquise Systémique.

SA : Acide Salicylique.

SCE : Somme des Carrés des Ecart.

SOD : Superoxyde Dismutase.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'un nématode à galle. A : Forme générale ; B : Forme juvénile au niveau du sol ; C : femelle au niveau des racines.....	5
Figure 2 : Cycle d'un nématode à galle	6
Figure 3 : Exemples de dégâts engendrés par les nématodes à galle sur racines.	9
Figure 4 : Représentation schématique de la transduction du signal de résistance systémique induite par un agent pathogène (SAR) et de la résistance systémique induite par une rhizobactérie chez des plantes.....	16
Figure 5 : La plante <i>Citrullus colocynthis</i>	18
Figure 6 : Les différentes parties du <i>Citrullus colocynthis</i>	20
Figure 7 : Carte de la distribution africaine du <i>Citrullus colocynthis</i>	21
Figure 8 : Différentes étapes d'isolement des PGPR	25
Figure 9 : Sélection des colonies des isolats des PGPR.....	25
Figure 10 : Test de coloration de Gram.....	27
Figure 11 : Caractérisation biochimique des PGPR.....	28
Figure 12 : Différentes étapes de préparation de l'extraction éthanolique.....	29
Figure 13 : Isolement des nématodes	30
Figure 14 : Observation microscopique de la <i>Meloidogyne incognita</i> (G x 40).....	31
Figure 15 : Dissout et ajout de l'extrait aux nématodes.....	31
Figure 16 : Traitement des nématodes par <i>Citrullus colocynthis</i>	32
Figure 17 : Traitement des nématodes par PGPR.	33
Figure 18 : Observation microscopique des bactéries isolées.....	34
Figure 19: Aspect morphologique des rhizobactéries sur milieu « King B » : (A) : Isolat P2 ; (B) : Isolat P1.	35
Figure 20: Croissance des bactéries isolées sur le milieu de culture Ashby.	35
Figure 21: Test catalase pour les souches bactériennes : P1 , P2.....	36
Figure 22 : Test amylase pour les souches bactériennes : (A) : P2 ,(B) : P1.	36
Figure 23: Test estérasiq ue et lipasiq ue pour les souches bactériennes : (A) : P1 ,(B) : P2. ...	37
Figure 24 : Moyenne de mortalité des nématodes en fonction des différentes doses et du temps.	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des <i>Meloidogyne spp</i>	4
Tableau 2 : Caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats.	34
Tableau 3 : Analyse de la variance de mortalité des nématodes par l'extrait éthanolique de Citrullus colosynthis.....	38

Table des matières

Remerciements	i
Dédicace	ii
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Table des matières	vii
Introduction	xi
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	3
1. Les nématodes.....	3
1.1. Généralités	3
1.2. Systématique.....	3
1.3. Morphologie, Biologie et cycle de développement	4
1.4. Maintien et déplacements des <i>Meloidogyne</i> dans les sols	7
1.5. Dégâts sur les cultures	8
1.6. Les méthodes de lutte contre les nématodes	10
1.6.1. Méthodes physiques	10
1.6.2. Méthodes culturales.....	10
1.6.3. Lutte chimique.....	11
1.6.4. Méthodes biologiques	11
2. Les PGPR.....	11
2.1. Généralités sur les PGPR.....	11
2.2. Utilisation des PGPR	13
2.3. Mode d'action des PGPR en lutte biologique	13
2.3.1. Interactions directes PGPR/Pathogène	13
2.3.2. Interactions PGPR/plante	14
2.4. Effet antagoniste des PGPR.....	15
2.4.1. Antibiose	15
2.4.2. Production d'enzymes lytiques	15
2.4.3. Résistance systémique induite (ISR).....	15
3. <i>Citrullus colocynthis</i>	17
3.1. Historique	17
3.2. Position systématique	17

3.3.	Caractéristiques botaniques	18
3.5.	Cycle de développement.....	22
3.6.	Exigences écologiques	22
3.6.1.	Climat	22
3.6.2.	Sols	22
3.7.	Composition et utilisation.....	22
Chapitre 02 : Matériel et méthodes		24
1.	Objectif	24
2.	Déroulement des expérimentations	24
3.	Matériel biologique	24
3.1.	Matériel bactérien	24
3.1.1.	Prélèvement des échantillons	24
3.1.2.	Isolement des PGPR.....	24
3.1.3.	Sélection des colonies bactériennes	25
3.1.4.	Identification et caractérisation des PGPR.....	26
3.2.	Matériel végétal	28
3.2.1.	Préparation des échantillons	28
3.2.2.	Préparation de l'extrait éthanolique	29
3.2.3.	Détermination du rendement d'extraction.....	29
3.3.	Nématodes utilisés	30
3.3.1.	Isolement des nématodes.....	30
3.3.2.	Culture des nématodes	30
4.	Evaluation in vitro de l'effet des PGPR et des extraits éthanoliques sur les nématodes à galles.....	31
4.1.	Test de l'extrait éthanolique	31
4.2.	Test des PGPR	32
5.	Analyses statistiques	32
Chapitre 03 : Résultats et discussions		34
1.	Résultats.....	34
1.1.	Caractérisation et Identification des PGPR	34
1.1.1.	Caractérisation culturelle et morphologique	34
1.1.2.	Caractérisation biochimique.....	35
1.2.	Traitement des nématodes par <i>Citrullus colosynthis</i>	37
1.2.1.	Rendement d'extraction	37
1.2.2.	Résultats de mortalité en fonction du temps et des doses de l'extrait	38

1.3. Traitement des nématodes par PGPR	39
2. Discussions	40
2.1. Isolement et identification des PGPR.....	40
2.2. Caractéristiques des PGPR qui favorisant la croissance des plantes.....	40
2.3. Traitement de nématodes par <i>Citrullus colosynthis</i>	42
2.4. Traitement de nématodes par PGPR.....	42
Conclusion.....	44
Références bibliographiques	45
Annexes	
Résumé	

Introduction générale

Introduction

Les cultures maraîchères représentent une composante indispensable dans les systèmes de culture des pays du bassin méditerranéen principalement en Algérie. Les statistiques de l'année 2014 établies par le ministère de l'agriculture font état d'une superficie globale de culture maraîchère de 403 027 ha et un rendement de 232 qx/ha.

La famille des cucurbitacées est communément appelée la famille des concombres, des gourdes ou des melons, principalement dans les régions les plus chaudes du monde. *Citrullus colosynthis* est important sur le plan biochimique et économique (Badifu et Ogunsua, 1991) et se trouve dans le nord de l'Afrique tropicale, dans les îles de l'Atlantique, en Australie, dans le nord-ouest de l'Inde et au Pakistan. Les différents extraits de *Citrullus colosynthis* ont montré une activité antibactérienne, antioxydante, piégeant les radicaux libres et larvicide. Les extraits éthanoliques et aqueux de feuilles ont montré une activité antidiabétique significative et une valeur thérapeutique soupçonnée contre les cellules cancéreuses du sein, alors que seul l'extrait de fruit a été rapporté contre *Meloidogyne incognita* (Muniasamy et al., 2010).

Les plantes, en générale, et les plantes cultivées, en particulier, sont sujettes à de nombreuses perturbations d'ordre biotiques (maladies, agents pathogènes, ... etc.) et abiotiques (variations environnementales, sécheresse, salinité, ... etc.) d'où la nécessité d'intervention des agriculteurs et / ou de chercheurs.

La gestion des maladies des plantes causées par des organismes parasites est devenue une tâche ardue pour les chercheurs en agriculture durable. Plus de 4000 organismes parasites ont été identifiés et peuvent être trouvés dans la plupart des biomes majeurs. Les organismes parasites des plantes absorbent l'eau et les autres éléments nutritifs contenus dans leurs plantes hôtes par les tissus vasculaires (Press et Phoenix, 2005).

Parmi les organismes parasitaires, Les nématodes phytoparasites attaquent presque toutes les cultures qui représentent l'approvisionnement alimentaire du monde (Sasser et Hartman, 1985) et sont responsables des pertes de rendement de la production alimentaire mondiale à hauteur de 14%, soit l'équivalent d'une perte économique de plus de 100 milliards de dollars par an (Bélaïr, 2005). Les nématodes à galles appartiennent au genre *Meloidogyne*. Ce genre comprend plus de 90 espèces qui sont responsables d'environ 5% des pertes globale de rendement de la production alimentaire. Les quatre espèces principales du genre *Meloidogyne*: *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* et

Meloidogyne hapla, sont les parasites les plus répandus dans le monde (Eisenback et Triantaphyllou, 1991). Les juvéniles du genre *Meloidogyne* infectent les racines, se nourrissent des photosynthétases et provoquent la formation de galles. Ils perturbent le système vasculaire de la plante dans lequel circulent l'eau, les éléments nutritifs et les photosynthétases.

Auparavant, divers nématicides chimiques de synthèse tels que les fumigants, les organophosphates et les carbamates ont été utilisés pour contrôler les nématodes. Les nématicides chimiques ont accru le potentiel agricole et économique en termes d'amélioration de la production d'aliments et de fibres. D'autre part, l'application de nématicides chimiques a eu de graves conséquences pour l'environnement et la santé humaine (Akhtar et al., 2009). Certains des nématicides chimiques ont commencé à cesser leur utilisation en raison de leur dangerosité pour les organismes non ciblés, des problèmes de santé publique et de la sécurité environnementale (Chen et al., 2006).

Par conséquent, la recherche d'une stratégie alternative non chimique et écologique est hautement souhaitable pour le contrôle des nématodes. Parmi différentes approches respectueuses de l'environnement, les souches de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria) peuvent jouer un rôle efficace dans la lutte biologique contre les nématodes ainsi que pour favoriser la croissance des plantes et accroître la croissance et le rendement des plantes. Les souches de rhizobactéries utilisent des acides aminés, du sucre et des composés organiques libérés par les racines des plantes pour leur croissance et leur énergie. Dans le mutualisme, les souches rhizobactériennes ont produit diverses substances favorisant la croissance des plantes et une activité de biocontrôle pour soutenir leur plante hôte (Karthik et al., 2017).

Vu l'intérêt du *Citrullus colocynthis* et sa richesse en éléments bioactifs naturels importants et vu l'efficacité des PGPR en tant qu'éléciteurs biotiques, il est important de savoir si les extraits des feuilles de *Citrullus colocynthis* et si l'utilisation des PGPR ont des effets positifs contre le *Meloidogyne incognita*.

C'est dans ce contexte que notre étude a été menée et qui vise à évaluer, l'efficacité de l'extrait de feuilles de la plante de *Citrullus colocynthis*, en tant que nématicide naturel riche en métabolite secondaire, et efficacité des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sur les nématodes cécidogène (*Meloidogyne incognita*).

Chapitre 01 :
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Nématodes

1.1. Généralités

Les nématodes se sont des pseudos coelomates, animaux vermiformes non segmentés, communément décrits comme filiformes, d'où le nom taxonomique *Nemata* du grecque (*Nemata* = fil) (Moens et Perry, 2006).

Les nématodes sont les métazoaires les plus abondants et les plus répandus sur terre, ils occupent presque tous les habitats. Leurs mouvements et leur activité dépend fortement de l'humidité du sol, de l'humidité relative et autres facteurs environnementaux qui affectent directement leur survie (Moens et Perry, 2006).

Les nématodes sont surtout connus comme des organismes parasites des plantes cultivées, et donc néfastes aux rendements des cultures vivrières (Djigal *et al.*, 2012), la plupart des nématodes libres sont des composants importants de l'écosystème du sol (fongivores, bactériophages, omnivores ou prédateurs) intervenants dans la décomposition de la matière organique, la transformation des nutriments et le transfert de l'énergie (Neher, 2001).

Les nématodes à galles (*Meloidogyne*) sont des nématodes endoparasites sédentaires obligatoires : ils effectuent tout leur cycle dans la racine, le seul stade libre dans le sol étant le juvénile de second stade (J2). Ils induisent des transformations racinaires importantes conduisant à la formation de galles typiques de l'infection au niveau des tissus conducteurs de la plante qui peut dépérir et mourir, d'où des pertes de rendement et de qualité (Blok *et al.*, 2008).

1.2. Systématique

La systématique des *Meloidogyne* que nous avons adopté est celle décrite par Reddy (1983).

Embranchement : Nematoda
Classe : Secernentea
Ordre : Tylenchida
Super famille : Heteroderoidae
Famille : Meloidogynidae
Sous famille : Meloidogyninae
Genre : *Meloidogyne*

1.3. Morphologie, Biologie et cycle de développement

Ver microscopique, *Meloidogyne spp.* est reconnaissable par les dégâts de galles causés sur les racines et les tubercules. Ses caractéristiques principales sont données dans le tableau 1 et dans la figure 1.

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES GENERALES DES MELOIDOGYNE SPP (DE GUIRAN, 1983).

Noms	<i>Meloidogyne spp.</i> ou nématodes à galles (anciennement anguillules)
Taille et description	Ver microscopique du sol mesurant 0,3 mm de long (dans le sol) à 0,7 mm (dans la racine). Stylet buccal perforateur.
Mode de reproduction	Sexuée ou asexuée (parthénogénèse)
Multiplication	Femelle pond 300 à 1 000 œufs/cycle Plusieurs cycles possibles/an = 300 à 200 000 œufs/an
Conservation	Sous forme d'œufs dans le sol, entre 5 et 30 cm de profondeur
Survie	Juvéniles au moins jusqu'à 15 j. suivant les conditions de milieu (pH, température, humidité sol, présence ou non de plantes...) Œufs > 1 an, sous certaines conditions
Dispersion	Par l'homme (chaussures, outils, machines) et par l'eau
Dégâts	Galles sur racines (indice de galles de 0 à 10). Flétrissement, dépérissement, voire mort des plants
Principaux hôtes	Légumes : asperge, aubergine, betterave potagère, carotte, céleris, chicorées, concombre, melon, potiron, courgette, épinard, haricots, laitue, oignon, poivron, tomate, pomme de terre, poireau... ; colza ; céréales ; arbres fruitiers ; cultures forales ; mais aussi adventices dont rumex, amarante, morelle...
Moyens de protection	Prophylaxie : nettoyage, désinfection des outils, non épandage de déchets ou de boues potentiellement contaminés... Protection physique : solarisation, désinfection vapeur, inondation du sol... Protection biologique : matière organique, bactéries, champignons, mycorhizes Protection chimique : pré et post-plantation, traitement semences, extrait de plantes... Protection culturale : rotation, plante-piège, engrais vert « nématocide », jachère noire, bio-fumigation, bio-désinfection anaérobie... Protection variétale : résistance, greffage...

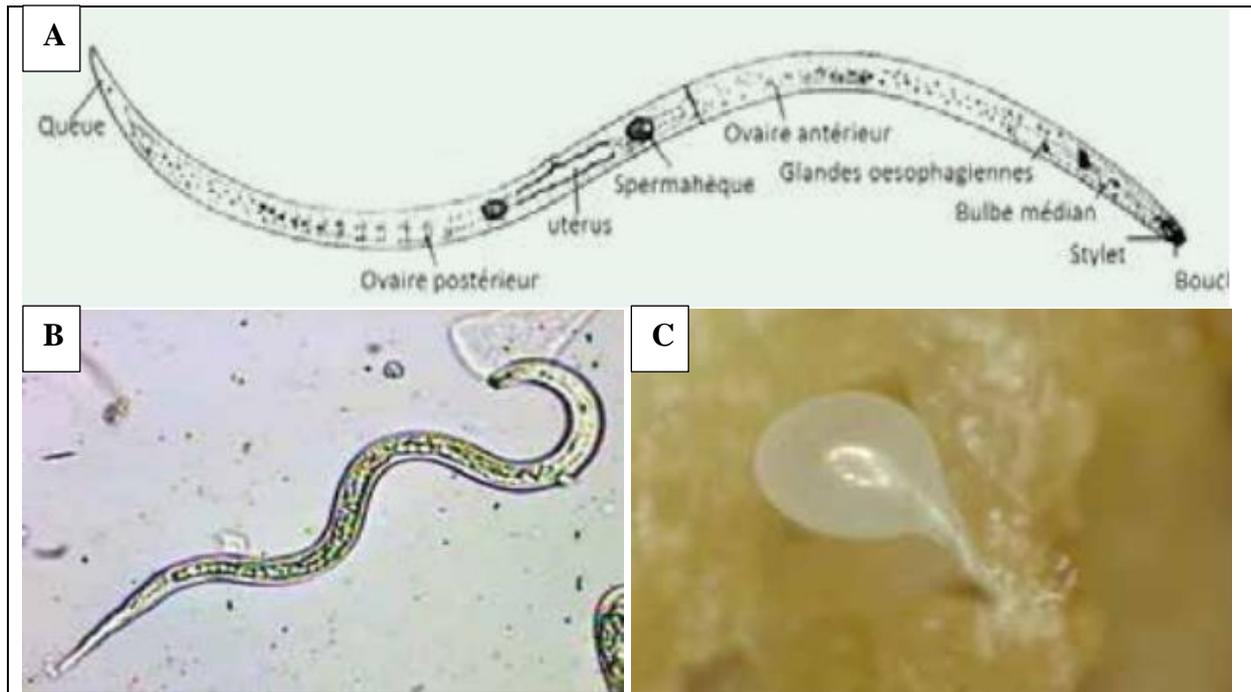


FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN NEMATODE A GALLES. A : FORME GENERALE ; B : FORME JUVENILE AU NIVEAU DU SOL ; C : FEMELLE AU NIVEAU DES RACINES (DE GUIRAN, 1983).

Le cycle de vie des nématodes à galles se déroule en deux phases (figure 2) : une phase exophyte dans le sol, de la ponte à la pénétration des J2 dans la racine, et une phase endophyte d'élaboration du site nourricier au niveau du cylindre central de la racine (où est véhiculée la sève) permettant l'établissement, le développement et la reproduction du nématode (Prot, 1975).

Dans l'œuf, le juvénile de stade J1 effectue sa première mue et éclot au stade J2. De forme allongée et filiforme, le juvénile J2 possède une cuticule fine mais résistante qui le recouvre, le protège et lui permet de se mouvoir plus facilement en présence d'un film d'eau. C'est la seule forme libre qui se dissémine dans le sol. Il pénètre préférentiellement dans la racine au niveau de la zone d'élongation apicale à l'aide de son stylet buccal perforateur et migre entre les cellules en direction de l'apex racinaire, puis entre dans le cylindre central de la racine (Wyss et *al.*, 1992). Une fois le cylindre central atteint, la larve induit grâce à ses sécrétions salivaires, la formation d'un site nourricier permanent constitué de cinq à sept cellules hypertrophiées, multi-nucléées et métaboliquement hyperactives (Jones, 1981). Ces « cellules géantes » fournissent les nutriments indispensables au nématode pour achever son cycle de développement sans qu'il n'ait plus à se déplacer (Wyss et *al.*, 1992). L'augmentation de volume des cellules jouxtant les cellules géantes conduit à la formation d'une galle typique de

l'infection par *Meloidogyne*. On peut observer des débuts de galles environ dix jours après pénétration dans les racines de tomate.

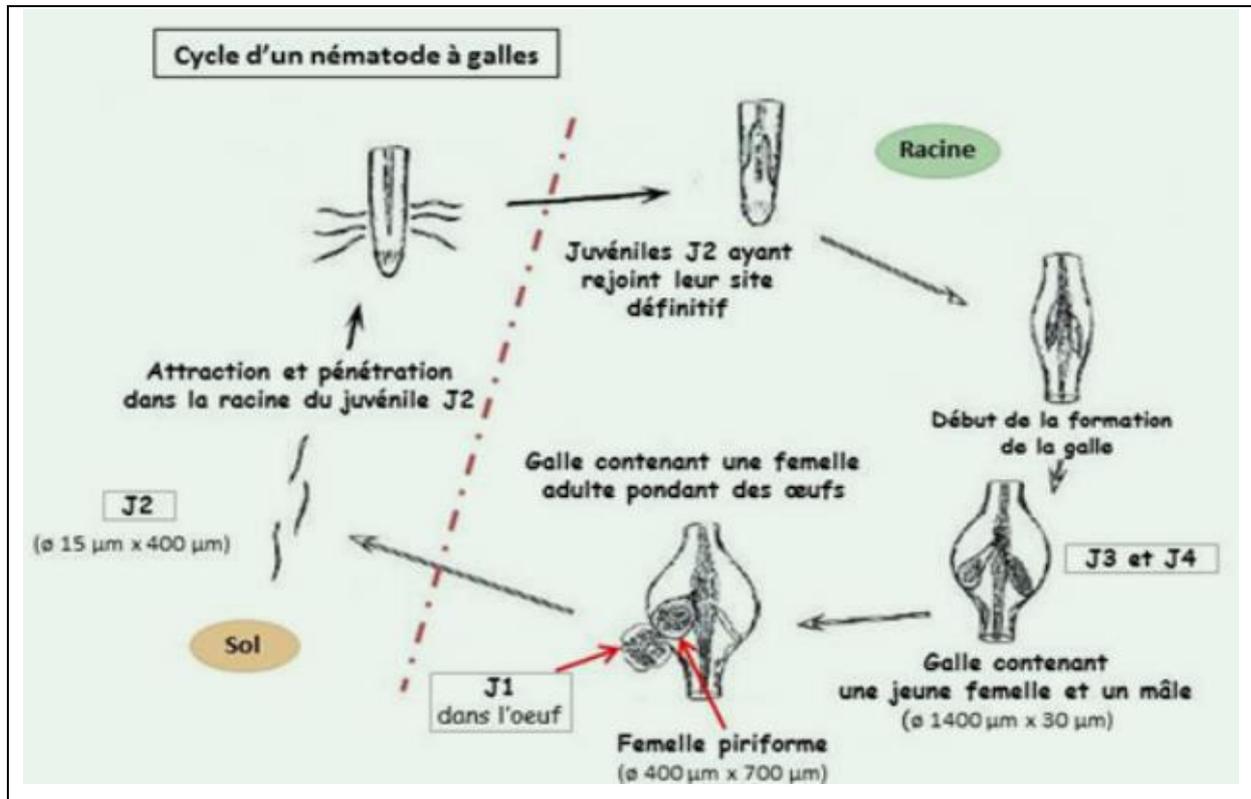


FIGURE 2 : CYCLE D'UN NEMATODE A GALLES (DE GUIRAN, 1983).

Contrairement aux femelles, les mâles ne se nourrissent pas, quittent les tissus de l'hôte, et ne vivent que quelques semaines (Taylor et Sasser, 1978). Les femelles sédentaires continuent à s'alimenter à partir des cellules géantes durant plusieurs semaines et pondent à l'extérieur de la racine de 300 à 1 000 œufs protégés dans une gangue mucilagineuse. Les femelles peuvent produire des œufs pendant deux à trois mois et vivre encore quelque temps après la production d'œufs. Puis elles meurent et les cellules géantes dégèrent (De Guiran, 1993).

Sous conditions favorables d'humidité et de températures, la plupart des œufs éclosent immédiatement et évoluent en larves. Lorsque les conditions sont peu favorables, ils peuvent passer sous une forme de résistance et survivre jusqu'à cinq ans dans le sol (Taylor & Sasser, 1978).

1.4. Maintien et déplacements des *Meloidogyne* dans les sols

La majorité des J2 est concentrée dans les 5-30 cm du sol et décroît avec la densité racinaire et la profondeur jusqu'à une distance d'un mètre environ, en fonction de la texture du sol, sa température, sa capacité de rétention d'eau et son aération (De Guiran, 1983).

La pénétration des J2 dans les racines est optimale lorsque la taille des particules du sol avoisine les 115 µm ce qui correspond à des sables fins (Reversat, 1986). Les J2 sont alors capables de bouger horizontalement et surtout verticalement. La migration décroît lorsque la teneur en argile dans le sol augmente, elle n'est plus possible lorsque le sol contient 30 % d'argile (Prot & Van Gundy, 1981). Les dégâts sur culture sont donc plus importants en sol sableux qu'argileux (Messiaen et *al.*, 1991). Ils sont également plus faibles dans les sols riches en matières organiques, ce qui serait dû à l'action d'antagonistes et/ou à la libération d'acides organiques toxiques pour les nématodes (De Guiran, 1993).

La température du sol est primordiale en dessous de 12 °C et au-dessus de 22 °C, les juvéniles se déplacent difficilement. Entre 0 et 5 °C, les juvéniles survivent pendant sept jours mais ne sont plus infectants, et meurent en vingt jours (Vrain et *al.*, 1978). À 27 °C, ils peuvent vivre quatre et cinq semaines sans se nourrir (Reversat, 1986). Entre 35 et 40 °C, ils ne peuvent plus infester les plantes (Demeure, 1978). À 45 °C, ils ne survivent pas plus de 4 h (Tsai, 2008) et la survie des œufs baisse également s'ils sont maintenus 3 h à 45 °C (Demeure, 1978). En conséquence, les contaminations sont limitées en hiver à Tiaret, d'autant plus que le cycle de développement des nématodes est ralenti par le froid. C'est le cas en culture hivernale de salades sous abri. En revanche, pendant cette période, les J2 se conservent relativement bien dans le sol. Dès le printemps et jusqu'en automne, avec le réchauffement du sol, les contaminations sont très importantes. Les J2 préfèrent des pH compris entre 4 et 6 (Davide, 1980), néanmoins ils restent actifs dans toute la gamme de pH et peuvent se maintenir jusqu'à pH 8.

L'humidité du sol a également un impact important sur les nématodes. En conditions sèches, les œufs sont soumis à un stress osmotique et cessent d'éclore, mais le développement à l'intérieur de l'œuf continue. L'éclosion n'a lieu que lorsque J1 atteint 70 % d'hydratation, mais peut être inhibée par manque d'oxygène dans les sols trop humides. Après éclosion, si le sol devient trop sec, les J2 meurent (Reversat, 1986) et on n'en détecte plus dans les 20 premiers centimètres après une saison sèche. L'optimum d'humidité pour leur pénétration dans la racine et leur développement serait un peu supérieur à la capacité au champ. Les J2 ne peuvent pénétrer les racines en milieu submergé (Demeure, 1978).

En l'absence de plantes hôtes et donc de nourriture, les J2 mobilisent l'ensemble de leurs réserves énergétiques puis finissent par mourir (De Guiran, 1993). Néanmoins, les populations de nématodes peuvent se maintenir en infectant les adventices hôtes qui se développent en interculture (amarante, morelle, chénopode...).

Néanmoins, malgré des conditions du milieu défavorables, les nématodes sont capables de s'adapter et de survivre via des états de quiescence et de résistance. Ces adaptations sont possibles à différents stades de développement. La substance gélatineuse qui enrobe les œufs, joue un rôle important dans la résistance des œufs à la déshydratation en ralentissant la perte d'eau (Mahmud, 2014). Le ralentissement du développement embryonnaire peut être spontané ou induit, et peut être levé après un certain temps et/ou par un stimulus autre qu'un retour à des conditions favorables (De Guiran, 1983). La dormance est levée lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables et les nématodes retrouvent une activité normale (McSorley, 2003). Ces phénomènes ont lieu principalement pendant le stade œuf ou pendant le stade juvénile à l'intérieur de l'œuf. Cette réduction d'activité et d'émergence des larves augmente leurs chances de survie (De Guiran, 1983).

1.5. Dégâts sur les cultures

Les dégâts de *Meloidogyne* sont d'autant plus importants que la population est plus élevée au moment de l'implantation de la culture. D'abord un ralentissement de la croissance des plantes est observé, puis un flétrissement, et des galles sur racines ou tubercules, ainsi que la déformation des légumes racines (figure 03). En cas d'infestation forte, les galles peuvent envahir tout le système racinaire, perturbant l'absorption hydrique et minérale de la plante, tandis que le chevelu disparaît. Il y a à une forte diminution des parties aériennes, visible souvent par foyers de flétrissement foliaire (taches plus claires dans un champ), et la récolte peut parfois être réduite à néant. Les dégâts sont néanmoins difficilement chiffrables en raison des nombreuses interactions liant les nématodes à galles à d'autres pathogènes fongiques ou bactériens (*Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, etc.) favorisés par les lésions induites par l'entrée des nématodes (Barker et Koenning, 1998).

L'estimation du niveau d'infestation nécessite l'observation des racines, bien qu'il soit difficilement quantifiable dans le cas d'une faible population de nématodes. À cela s'ajoute un seuil de nuisibilité propre à chaque culture et variable selon les températures, la région, l'année, les conditions de cultures, l'espèce de *Meloidogyne* et même la présence ou non d'autres parasites (Barker & Koenning, 1998).

Les cultures légumières se montrent particulièrement sensibles aux attaques de *Meloidogyne*, les pertes de rendements pouvant être 10 à 100 % selon les cultures (Bertrand, 2001). Les exploitations légumières du pourtour méditerranéen (Espagne, France, Italie, Grèce, Moyen-Orient, Afrique du Nord...) sont de plus en plus impactées du fait du retrait quasi-général du marché des nématicides chimiques, des températures élevées, et de la spécialisation des systèmes légumiers qui ont contribué à augmenter les problèmes de parasites telluriques.

Les dégâts sont principalement dus à une remontée des populations suite à l'arrêt de la désinfection des sols, mais aussi au retrait de certaines substances ayant une action secondaire sur les nématodes comme les carbamates ou les organophosphorés (Mugniéry, 2005), et au manque de diversification des espèces cultivées. C'est ainsi que la monoculture d'une espèce végétale déséquilibre l'activité biologique du sol et favorise la multiplication des *Meloidogyne* (De Guiran, 1998). Dans la mesure du possible, il est intéressant de connaître l'historique parcellaire avant l'implantation de nouvelles cultures.

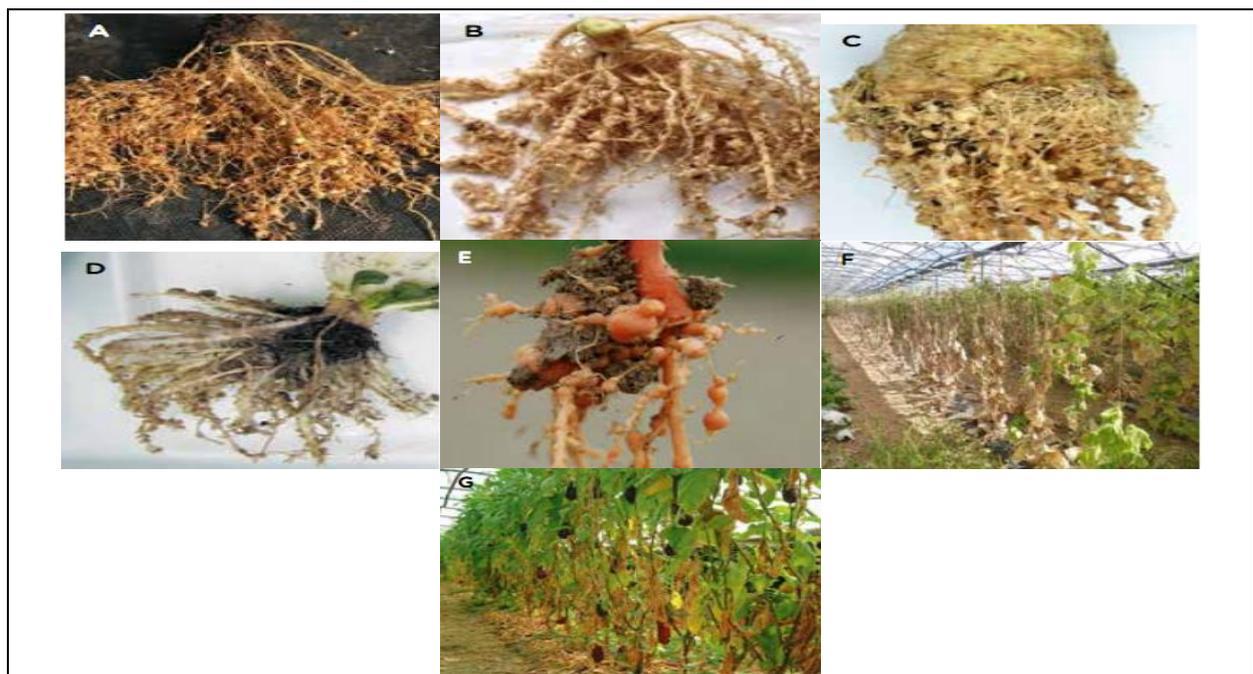


FIGURE 3 : EXEMPLES DE DEGATS ENGENDRES PAR LES NEMATODES A GALLES SUR RACINES.

A : Laitue, B : Melon, C : Céleri Rave, D : Blette, E : Carotte, F : Concombre, G : Aubergine

(Messiaen et *al.*, 1991).

1.6. Méthodes de lutte contre les nématodes

D'après Foury (1995), les moyens de lutte ont pour objectif soit d'agir directement sur les parasites et les ennemis présents dans le sol, soit de ralentir la ré-infestation, ou d'intervenir sur la plante hôte. Les méthodes proposées doivent :

- Détruire les ennemis au moins sur une profondeur de sol allant au-delà de la plus forte densité racinaire (profondeur variable avec l'espèce cultivée et le sol).
- Retarder la ré-infestation.
- Ne pas nuire aux organismes utiles.
- Ne pas présenter d'effets résiduels nocifs à la culture.
- Être fiable d'application facile et de coût modéré.

1.6.1. Méthodes physiques

1.6.1.1. Désinfection par la vapeur

La désinfection de la terre se fait par le traitement à la vapeur à 120°C (Bonnemaison, 1961). Mais cette méthode présente des limites et des inconvénients :

- a) Efficacité insuffisante voire échec dus à des causes variables ; la profondeur de désinfection est insuffisante ;
- b) Destruction d'antagonistes permettant une ré-infestation rapide ;
- c) Effets secondaires néfastes dus à la remontée du pH et de la salinité ;
- d) Divers déséquilibres de la microflore ;
- e) Mise en œuvre pas toujours facile ;
- f) Coût élevé.

1.6.1.2. Solarisation

La solarisation est une méthode douce pour le biotope, plus au moins discriminante selon le temps d'action, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, mais parfois insuffisamment efficace, car elle nécessite un climat très ensoleillé (Foury, 1995).

1.6.2. Méthodes culturales

1.6.2.1. Mesures sanitaires

Eviter le transport du sol avec les outils, les bottes, etc. afin de ne pas répandre les nématodes (Duval 1991).

1.6.2.2. Rotation

Selon Duval (1991), la rotation a souvent été conseillée comme moyen de réduire les populations de nématodes. Pour les cultures de tomate en champs, une rotation avec les céréales ou autres graminées, et les cultures en serre, une rotation avec des fèves serait appropriée contre

les nématodes. L'utilisation des plantes nématicides en rotation avec des cultures donne de bons résultats. Lung et *al.* (1997) ont utilisé le tagette comme plante nématicide, ils ont remarqué que le tagette réduisait la densité de population des nématodes de 95% après une période de culture de deux (02) mois.

1.6.3. Lutte chimique

Elle est essentiellement assurée par traitements du sol avec des fumigants (ou des précurseurs de fumigants), des produits organophosphorés et des carbamates très proches des insecticides. Les premiers (dibromoéthane, dichloropropène, dazomet, métam sodium, etc..) tuent les nématodes en se volatilisant dans le sol. Très coûteux, d'un emploi avant culture difficile. Les seconds (alidicarbe, carbofuran, oxamyl, etc.) moins coûteux et plus faciles d'emploi, inhibent la pénétration des nématodes dans les plantes hôtes. Ces produits sont surtout efficaces sur les nématodes en présence de leur plantes hôtes (Dalmaso et Missonnier, 1986).

1.6.4. Méthodes biologiques

Même si les nématodes phytoparasites, y compris leurs œufs, sont extrêmement bien protégés grâce à leur épaisse cuticule, ils sont dans des conditions naturelles, attaqués par beaucoup d'organismes ou de microorganismes du sol (Jatala, 1985). Certains de ces derniers sont prédateurs, d'autres sont parasites des nématodes.

Ce sont ces organismes, principalement des champignons et des bactéries, qui peuvent être utilisés en lutte biologique contre les nématodes (**Brown et al., 1985**). D'après **Caporalini et Mattel (1998)**, la lutte biologique contre les nématodes emploie des microorganismes en se basant sur un principe simple : « aider la nature ».

2. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

2.1. Généralités sur les PGPR

L'un des types de symbioses plantes/microorganismes est la symbiose associative qui est également une interaction à bénéfices réciproques entre les deux partenaires. Elle est habituellement considérée comme une interaction facultative, à large spectre d'hôte, et avec peu ou pas de différenciation des partenaires. L'exemple le mieux connu est celui des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes (Vacheron et *al.*, 2013). Lorsque des rhizobactéries contribuent à la croissance des plantes, elles sont appelées : PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et *al.*, 2004).

Le terme PGPR a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré, par Kloepper et Schroth, que des souches de *Pseudomonas* fluorescentes ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 500% par la production de

sidérophores ; chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (Garcia et al., 2003). Seulement 1 à 2% des bactéries favorisent la croissance des plantes dans la rhizosphère (Beneduzi et al., 2012).

Ces rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron et al., 2013). Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables, à des taux qui correspondent à ses besoins, et ce, aux différents stades de sa croissance. Les ions métalliques sont absorbés par les poils absorbants des racines, se marient au glucose qui remonte vers les organes aériens pour former de nouvelles cellules (Gagnon, 2015). Ces bactéries bénéfiques peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (Ngumbi et Kloepper, 2016).

De plus, les PGPR se trouvent dans des environnements hautement compétitifs. En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, comme : des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et des toxines de nature protéique communément connues sous le terme de bactériocines. Ces toxines sont capables de tuer les bactéries compétitives étroitement liées sans pour autant affecter la bactérie productrice (Beneduzi et al., 2012).

Les PGPR peut déclencher chez la plante un phénomène connue sous le nom d'induction de la résistance systémique qui se produit lorsque la plante active ses mécanismes de défense en réponse à une infection par un agent pathogène. Les plantes inoculées avec des PGPR peuvent également fournir une résistance systémique contre un large éventail de pathogènes végétaux. Les maladies d'origine fongique, bactérienne et virale et, dans certains cas, même les dommages causés par les insectes et les nématodes peuvent être réduits après l'application de PGPR. Il conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogène via la stimulation de mécanismes de défense systémique. Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « élicitrices » produites par le microorganisme bénéficiaire (Cherif, 2014).

2.2. Utilisation des PGPR

Dans les dernières décennies, l'utilisation des PGPR est devenue une alternative pour améliorer la production agricole. Ces bactéries peuvent coloniser les racines et exercer des effets bénéfiques, sur la croissance des plantes par différents mécanismes (Nelson, 2004). Ces rhizobactéries améliorent le développement des systèmes racinaires, l'augmentation de la capacité d'absorption de l'eau et les éléments nutritifs. Elles renforcent les capacités défensives des plantes contre les maladies (Van Loon et *al.*, 1998). Elles affectent positivement la levée des semences et améliorent le rendement des cultures.

La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. (Haas et Defago, 2005).

2.3. Mode d'action des PGPR en lutte biologique

Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un micro-organisme donné, en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles (Glick, 1995).

2.3.1. Interactions directes PGPR/Pathogène

2.3.1.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes et *al.*, 2004).

Une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Jofre et *al.*, 2004).

2.3.1.2. Compétition pour le fer et production de sidérophores

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le

Fe³⁺. En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Par exemple, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena et al., 2002).

2.3.1.3. Antibiose et parasitisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les *Pseudomonas*, par exemple, produisent des molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones qui sont impliquées dans le biocontrôle (Haas et Defago 2005). Ces PGPR montrent non seulement un large spectre de diversité dans le type mais également dans le nombre d'antibiotiques produits (McGowan et al., 2005). Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée (Whipps 2001).

2.3.2. Interactions PGPR/plante

2.3.2.1. Promotion de la croissance de l'hôte

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (légumes, pomme, citron, myrtille, mûre, abricot, framboise, betterave à sucre...) (Cakmakci et al., 2006). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N₂) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines, et en diminuant la toxicité des métaux lourds (Whipps, 2001).

2.3.2.2. Renforcement de la capacité défensive de l'hôte

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé « résistance systémique induite » (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon et *al.*, 1998).

2.4. Effet antagoniste des PGPR

2.4.1. Antibiose

Les antibiotiques sont des composés organiques de bas poids moléculaire produits par des microorganismes. Il joue un rôle important dans le contrôle biologique de plusieurs organismes nuisibles par le biais de la concurrence et du parasitisme (Raguchander et *al.*, 2011). L'antibiose est un phénomène important dans la suppression de la maladie par les *Pseudomonas* fluorescents. La plupart des rhizobactéries agissent contre les pathogènes en produisant des toxines, des sous-produits métaboliques et des enzymes. Cela aide à inhiber l'éclosion, le développement, la survie et la reproduction des nématodes (Siddiqui et Mahmood, 1999). L'ammoniac produit au moment de la décomposition des matières organiques azotées par les bactéries ammonifiantes est toxique pour les nématodes et contribue à la réduction des populations de nématodes.

2.4.2. Production d'enzymes lytiques

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme de la PGPR en produisant certaines enzymes telles que les chitinases, la peroxydase, la phénylalanine ammoniac lyase, la déshydrogénase, les lipases, la β -glucanase, les protéases, les phosphates, etc. qui inhibent l'éclosion des œufs de nématodes (Mena et Pimentel, 2002). En outre, ces bactéries ont été caractérisées pour leur oxydation au phénol et leur activité antifongique avec production d'enzymes hydrolytiques et de HCN (Insunza et *al.*, 2002).

2.4.3. Résistance systémique induite (ISR)

La résistance induite est la capacité de défense améliorée de la plante, qui est acquise après une stimulation appropriée contre les parasites et les maladies à large spectre. La réponse de défense accrue due à un agent inducteur après une infection par un agent pathogène est appelée résistance systémique induite (RSI) ou résistance acquise systémique (RAS) (Van-Loon, 2000) (Figure 04). Les RSI peuvent être induites par des rhizobactéries, alors que la résistance induite par d'autres agents pathogènes est appelée SAR. Cette résistance induite

fournit une protection non spécifique contre un large éventail d'agents pathogènes, à savoir les champignons, les bactéries, les nématodes, les virus et les insectes nuisibles (Beneduzi et al., 2012). La phénylalanine ammonia lyase (PAL), la polyphénoloxydase (PPO), la peroxydase (PO), la superoxyde dismutase (SOD), la lipoxygénase (LOX), la catalase (LOX) et la catalase (CAT) sont des enzymes de défense associées à la résistance systémique. Ces enzymes initient l'induction de la résistance en produisant de la phytoalexine et des composés phénoliques (Viswanathan et al., 2003).

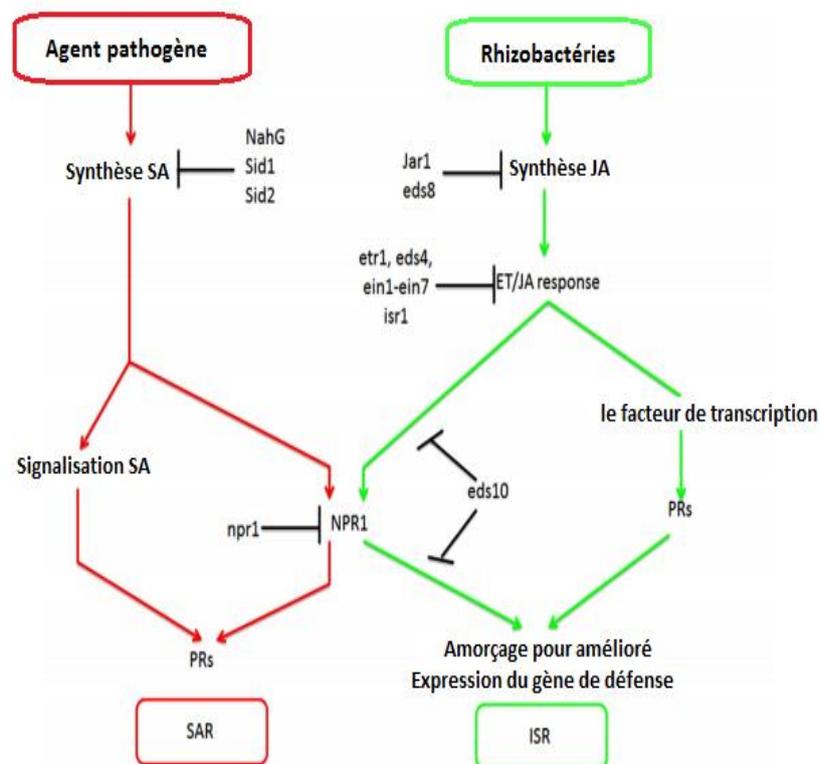


FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE RESISTANCE SYSTEMIQUE INDUITE PAR UN AGENT PATHOGENE (SAR) ET DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE INDUITE PAR UNE RHIZOBACTERIE CHEZ DES PLANTES (RAMAMOORTHY ET AL., 2001).

Plusieurs études ont démontré que les rhizobactéries réduisaient la gravité des nématodes en induisant une résistance systémique des plantes (Ramamoorthy et al., 2001). Cette résistance induite est obtenue par renforcement mécanique et physique de la paroi cellulaire par épaissement de la paroi cellulaire, dépôt de callose et accumulation de composés phénoliques ou par synthèse de plusieurs composés biochimiques régulés positivement dans la réaction de défense, à savoir protéines, PR, phytoalexine, lipopolysaccharides (LPS's), sidérophores, acide salicylique (SA), acide jasmonique (JA), PO, chitinase et autres métabolites secondaires (Siddiqui et Mahmood, 1999; Ramamoorthy et al., 2001).

3. *Citrullus colocynthis*

3.1. Historique

Le *Citrullus colocynthis* est un ancien purgatif, qui a été mentionné depuis 1500 ans av. J.C dans le papyrus Ebers (l'un des plus anciens traités médicaux rédigé au XVI^e siècle avant notre époque, pendant le règne d'Amenhotep I^{er}), dans la bible (II Kings 4 : 38-41) et dans les manuscrits du médecin, pharmacologue et botaniste grec *Pedanius Discoride*. Les médecins Egyptiens utilisaient cette plante comme un puissant purgatif. De sa part, un écrivain arabe, Mesue, a cité l'utilisation de deux préparations à base du *Citrullus colocynthis* nommées: *trochisi alhandal* et *electuairum majus hamech* dans la *Pharmacopoeae Augustana* de 1581 (Lloyd et Cincinnati, 1898).

Dans les années 1800, la plante a été inscrite dans chaque numéro de la pharmacopée américaine (US pharmacopeia). La toxicité de la plante a été également bien connue aux médecins médiévaux, qui ont constatés la présence d'ulcères hémorragiques dans les intestins suite à l'ingestion des graines de coloquinte (Lloyd et Cincinnati, 1898).

Le terme *Citrullus* est inventé pour la première fois par Forskal en l'an 1775. Le terme de coloquinte est issu du grec kolokunthis qui est le nom de la plante. Toutefois, Schrader fut le premier à pouvoir classer systématiquement ce genre. Cette classification a été par la suite adoptée par le 8^{ème} Congrès International de Botanique en 1954 pour être incluse dans la *Nomina Conservanda* (Fursa, 1972). Le genre *Citrullus* contient quatre espèces : *C. colocynthis*, *C. ecirrhosus*, *C. lanatus*, *C. fistulosus* et *C. naudinianus* (Gurudeeban, 2007).

3.2. Position systématique

Citrullus colocynthis (L.) Schrad. ou coloquinte est une plante vivace appartenant à la famille des *Cucurbitaceae*, sous famille des *Cucurbitoideae*, tribu des *Benincaseae*, sous tribu des *Benincasinae* (Robinson et Decker-Walters, 1997). Selon APG (1998), la position systématique du *Citrullus colocynthis* est la suivante :

- Super division :** Spermatophytæ (Plantes à graines)
- Division :** Magnoliophyta (Angiospermae) (Plantes à fleurs)
- Classe :** Magnolipsida (Dicotylédones)
- Sous classe :** Dialypétales
- Ordre :** Cucurbitales
- Famille :** Cucurbitaceae
- Genre :** *Citrullus*
- Espèce :** *colocynthis*

3.3. Caractéristiques botaniques

La coloquinte (Figure 05) est une plante herbacée, hispide mais à poiles non piquantes et annuelle (Khare, 2004).



Figure 5 : La plante *Citrullus colocynthis* (Khare, 2004).

Ses tiges (Figure 06 A) sont munies de vrilles, ramifiées, anguleuses, rudes, rampantes et étalées radialement pouvant atteindre plus de 5 m, desséchées après fructification (Yaniv et *al.*, 1999).

Ses feuilles (Figure 06 B) sont alternes, longues de 5 à 10 cm, avec un limbe découpé en 5 à 7 lobes séparés par des sinus larges, le lobe central est parfois ovale. Elles sont rugueuses, composées-palmées ou digitées avec absence de stipules. Elles sont ordinairement glanduleuses et fétides quand on les froisse (Spichiger et *al.*, 2004).

Ses fleurs (Figure 06 C) sont solitaires à la base des feuilles, de couleur jaune pâle et de sexes séparés sur la même plante (monoïque) apparaissant pendant la période de floraison, vers le mois d'avril-mai, à l'aisselle des feuilles. La corolle est de couleur jaune comporte cinq lobes. Ces fleurs sont gamopétales, monoïques ou dioïques, rarement polygames; 5 étamines soudées en 3 phalanges (2-2-1) ; anthères extrorsées à connectif flexueux, stylet court; 3 à 5 stigmates bilobés, ovaire infère primitivement triloculaire (Daniel, 2006).

Ses fruits sont sphériques, charnus, de 5 à 10 cm de diamètre. Ils ont une couleur verte panachée de jaune clair (Figure 06 D) qui devient complètement jaune (Figure 06 E) à maturité (de Septembre à Novembre). Ils sont revêtus d'une écorce mince autour d'une chaire (pulpe) légère, spongieuse, de couleur jaune orangé, très amère et toxique (Robinson et Decker-Walters, 1997).

Ses graines (Figure 06 F) sont ovoïdes et aplaties, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre. Leur nombre peut atteindre 200 à 300 graines par fruit (Sawaya et *al.*, 1988).

Ses racines (Figure 06 G) sont sous forme de rhizome tubéreux, charnue, épaisse et riche en eau (Spichiger et *al.*, 2004).

3.4.Répartition géographique

La coloquinte est adaptée aux régions tropicales et sub-tropicales, les régions désertiques arides et les régions tempérées (Timothy, 1993). Elle peut tolérer des températures annuelles situées entre 14.8 et 27.8 C° et des pH allant de 5 à 7.8 (Duke et *al.*, 2008). D'après Ozenda (1991), la coloquinte pousse dans tout le Sahara, au niveau des terrains sablonneux et sablo-argileux, des lits d'oued et des dépressions.

C'est une espèce résistante à la sécheresse, qui peut survivre dans les environnements arides en maintenant son contenu hydrique sans flétrissement des feuilles ou dessiccation, même dans des conditions de stress sévères (Dane et *al.*, 2007).



FIGURE 6 : LES DIFFERENTES PARTIES DU *CITRULLUS COLOCYNTHIS*.

A : tiges ; B : feuilles ; C : fleurs ; D : fruits à l'état frais ; E : fruits à l'état sec ; F : graines et G : racines (EL Fennouni, 1985).

Le *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader, a un habitat si étendu (figure 07), de l'Inde à l'Afrique tropicale, qui peut inclure la Méditerranée (Zohary et Hopf, 2000). C'est une espèce subspontanée originaire des régions désertiques sablonneuses d'Afrique, comme les autres espèces de *Citrullus*, notamment : le Maroc, la Tunisie, la Lybie, l'Egypt, le Soudan et l'Algérie (Ziyyat et *al.*, 1997).

La coloquinte est aussi répandue dans les régions sèches de l'Asie telles que : l'Iran, l'Iraq, la Jordanie, le Pakistan et surtout l'Inde (Sain et al., 2004). Elle est prévalente au Najd, au Hijaz et les régions de l'Arabie Saoudite (Ageel et al., 1987).

En Europe, elle est cultivée en France, en Grèce, en Italie, en Allemagne, au Chypre, en Espagne, en Australie et dans d'autres pays du sud de l'Europe pour des buts ornementaux (DeSmet et al., 1997).

En Algérie, le *Citrullus colocynthis* est rencontré au niveau de plusieurs régions depuis le nord jusqu'au sud (Meziane et al., 2012).

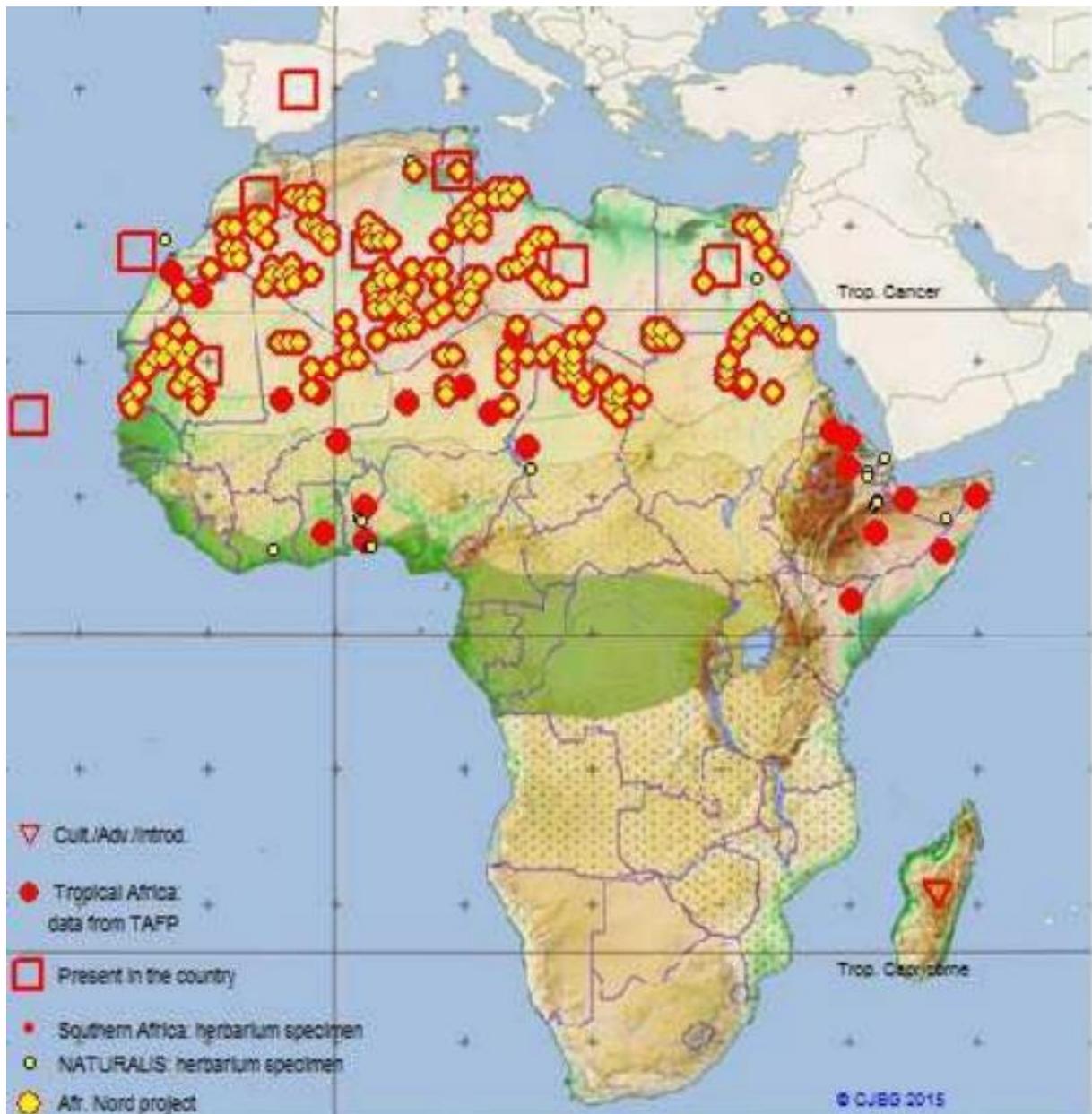


Figure 7 : Carte de la distribution africaine du *Citrullus colocynthis* (Stevens, 2001).

3.5.Cycle de développement

Citrullus colocynthis est observée toute la saison des pluies. Dans les parcelles régulièrement sarclées et où cette espèce n'est pas maintenue volontairement, elle est plus fréquente en début de cycle cultural (présente dans 25 % des parcelles) qu'en fin de cycle cultural (présente dans 15 % des parcelles) (Keraudren, 1967).

La germination a lieu après le labour. La floraison intervient en août, environ 5 semaines après la levée. La fructification débute en septembre et s'achève en début de saison sèche avec le dessèchement de la plante. Lorsque *Citrullus colocynthis* se développe sur des parcelles temporairement inondées, le cycle commence après le ressuyage du sol et se déroule pendant la saison sèche (Bourgeois, 1993).

3.6.Exigences écologiques

3.6.1. Climat

La coloquinte tolère des précipitations annuelles allant de 250 à 1 500 mm, une température annuelle de 14,8 à 27,8 ° C et un pH de 5,0 à 7,8. Plante hautement xérophytique, elle prospère là où la température moyenne annuelle est comprise entre 23 et 27 ° C et les précipitations annuelles comprises entre 25 et 37 cm. Elle tolère relativement la sécheresse et les sols pauvres et répond bien à l'irrigation et à la fertilisation (Chialir, 1973).

3.6.2. Sols

La coloquinte se trouve à l'état sauvage dans les régions chaudes, arides et sableuses, jusqu'à une altitude 1 500 m. Elle se nourrit de limon sableux, de sols sub-désertiques et de côtes sablonneuses (Debuigne, 1984).

3.7.Composition et utilisation

Divers composés chimiques actifs incluant : alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, carbohydrates, glycosides, acides gras et huiles ont été mis en évidence dans les différentes parties anatomiques du *C. colocynthis* (Jayaraman et al., 2009; Najafi et al., 2010; Salama, 2012). Les cucurbitacines semblent être les principaux composants des fruits du *Citrullus colocynthis*.

La plante contient d'autres composés tels que l'acide citrullique (Daniel, 2006). La pulpe des fruits contient une colocynthine glycoside ($C_{56}H_{34}O_{23}$ principe actif amer jusqu'à 14%) (Felter, 1922), une résine nommée colocynthéine, une pectine et une gomme. Les substances donnant la saveur extrêmement amère, sont la colocynthine et la colocynthéine (une substance cristalline). La colocynthine, sous l'influence d'une hydrolyse acide, produit une substance

amorphe, la colocynthéine. Les fruits immatures referment le p-hydroxy benzyl methyl ester (Hussain et al., 1992). Les graines renferment des albuminoïdes (6%) (Gurudeeban et al., 2010). Les racines contiennent l'hentriacontane (Hussain et al., 1992).

Les applications médicinales traditionnelles du *Citrullus colocynthis* ont inspiré de nombreuses enquêtes pharmacologiques. Plusieurs extraits et composés isolés de la plante ont été évalués pour leurs activités biologiques, en particulier leurs activités anticancéreuses, antimicrobiennes et antidiabétiques (Abdel-Hassan et al., 2000).

Le fruit du *Citrullus colocynthis* est largement utilisé par les herboristes pour le traitement du diabète en Iran (Huseini et al., 2009).

L'effet du *Citrullus colocynthis* sur la diminution du taux des lipides a été aussi démontré par Rahbar et Nabipour (2010).

Son activité antifongique contre des souches d'*Aspergillus*, des champignons plantes pathogènes a aussi été démontré par (Gacem et al., 2013).

L'extrait méthanolique a éprouvé un effet inhibiteur des réactions d'anaphylaxie cutanées. De son côté, le cucurbitacine E 2-O-beta-D-glucopyranoside, a montré une activité antiallergique intéressante (Yoshikawa et al., 2007).

Le *Citrullus colocynthis* est l'une des plantes utilisées dans la médecine populaire en raison de ses propriétés anti-inflammatoires (Marzouk et al., 2010).

Les extraits du *Citrullus colocynthis* sont riches en antioxydants (Sebbagh et al., 2009). Des études réalisées *in vitro* sur des extraits de fruits de la plante ont révélé son excellent potentiel antioxydant (Kumar et al., 2008).

Chapitre 02 :
Matériel et méthodes

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

1. Objectif

L'objectif de notre étude est l'évaluer de l'efficacité de l'extrait de feuilles de la plante de *Citrullus colocynthis*, en tant que nématicide naturel riche en métabolite secondaire, et de l'efficacité des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sur les nématodes cécidogène (*Meloidogyne incognita*).

2. Déroulement des expérimentations

Les essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes ont été réalisés aux laboratoires d'analyse du sol et de microbiologie de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun, Tiaret.

L'essai de l'évaluation *in vitro* des isolats PGPRs et des extraits de *Citrullus colocynthis* contre les nématodes à galles a été réalisé au laboratoire de biotechnologies végétales de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA, Ex INA) d'Alger.

3. Matériel biologique

3.1. Matériel bactérien

3.1.1. Prélèvement des échantillons

Des échantillons de sol ont été prélevés dans la rhizosphère du palmier dattier, de la Wilaya de Oued-Souf, durant le mois de février 2019.

Cette région a été choisie sur la base de sa vocation agricole et ces conditions pédoclimatique difficiles. La période de tallage a été choisi pour effectuer l'échantillonnage (cette période est caractérisée par l'augmentation de l'activité microbienne dans le sol).

3.1.2. Isolement des PGPR

L'isolement des bactéries a été effectué selon la méthode décrite par Kushwaha et *al.* (2013). 10 g du sol rhizosphérique a été mis dans des fioles stériles de 250 ml, (pour chaque échantillon) (Figure 08) auxquelles sont ajoutés 90 ml d'eau distillée stérile. Ensuite, les fioles ont été mises sous agitation rotative à 150 tpm (tours par minute) pendant 20 minutes.

Par la suite, une série de dilutions jusqu'au 10^{-7} a été réalisée pour chaque échantillon comme suit : dans un tube à essai stérile de 10 ml, 1 ml de la solution initiale a été prélevé et 09 ml d'eau distillée stérile ont été rajouté et l'ensemble a été placé sous agitation rotative pendant 2 minutes. De la même façon, des séries de dilutions ont été réalisées et l'opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'une dilution de 10^{-7} .

Par la suite, une aliquote (0,1 ml) de cette suspension a été étalée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture King B solide (pH=7.2) (King et *al.*, 1948) (Annexe 1). Ces boîtes de Pétri ont été incubées dans l'étuve pendant 72 heures à une température de 28°C pour observer les colonies de bactéries.



FIGURE 8 : DIFFERENTES ETAPES D'ISOLEMENT DES PGPR

3.1.3. Sélection des colonies bactériennes

Les colonies bactériennes typiques (ayant la même morphologie) ont été observées sur les boîtes de Pétri, après 72h de culture. Deux colonies bien isolées ont été sélectionnées (Figure 09), prélevées et ré-striées sur le milieu de culture King B, puis incubées de manière similaire que précédemment.

Les 02 souches sélectionnées ont été codées pour faciliter leurs utilisations ultérieures, ensuite, elles ont subi une série de multiplication (3 fois), afin d'assurer leurs puretés).

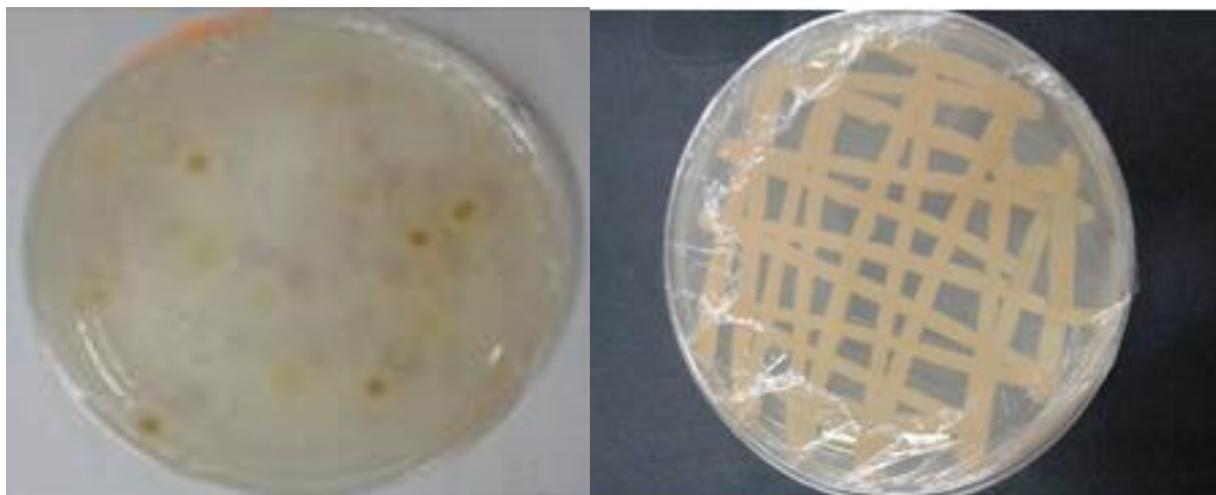


Figure 9 : Sélection des colonies des isolats des PGPR

3.1.4. Identification et caractérisation des PGPR

Les souches bactériennes isolées ont été étudiées sur la base de leurs caractéristiques culturelles, morphologiques et biochimiques, en suivant le manuel de Bactériologie Systématique de Bergey (Hoit et *al.*, 1989).

3.1.4.1. Caractéristiques culturelles

Tous les isolats ont été striés sur les boîtes de Pétri. Après 3 jours d'incubation, différentes caractéristiques des colonies telles que la forme des colonies (rondes, irrégulières...), la chromogénèse (couleur de la colonie) et la surface des colonies (lisse, rugueuse, sèche, ou dentelée) ont été observées à l'aide d'un microscope optique. L'odeur des colonies a été aussi notée.

3.1.4.2. Caractéristiques morphologiques

Les deux isolats bactériens ont été soumis à la coloration de Gram (Vincent, 1970), pour observer la forme de ces bactéries (figure 10).

Les bactéries Gram+ sont colorées en violet. Alors que, les bactéries Gram- sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi.

Un frottis bactérien a été réalisé par dépôts d'une goutte d'eau distillée sur une lame de verre, prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée et dissociation soigneuse de l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher.

La préparation a été fixée à la flamme, séchée soigneusement puis laissée refroidir. La lame a été immergée dans la solution de Cristal Violet pendant 1 min puis a été lavée avec l'eau. La lame a été, par la suite, immergée dans du Lugol pendant 1 min en agitant et puis elle a été lavée à nouveau avec de l'eau.

La préparation a été décolorée dans l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette et puis a été lavée avec de l'eau. A nouveau, la préparation a été colorée avec la solution de safranine diluée pendant 20 à 30 secondes, a été lavée avec l'eau et a été séchée à l'air. L'ensemble, recouvert d'une lamelle, a été observé sous microscope optique à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile.

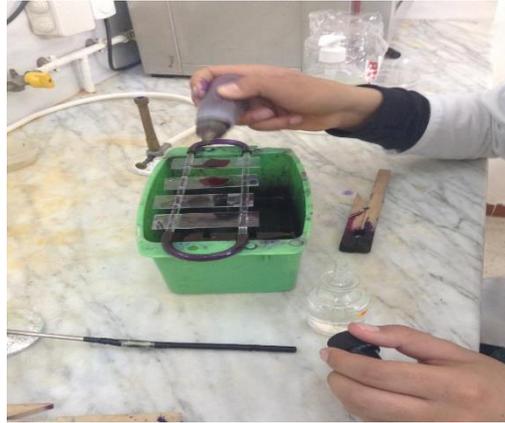


FIGURE 10 : TEST DE COLORATION DE GRAM

3.1.4.3. Caractéristiques biochimiques

➤ **Fixation de l'azote**

Afin de sélectionner les bactéries fixatrices d'azote, un test a été réalisé selon la méthode décrite par Rodge et *al.* (2016), les isolats ont été striés sur le milieu gélosé Ashby stérile (Annexe 01), sans mannitol (ne contient aucune source d'azote), et incubés dans l'étuve à 25 °C pendant 48 heures. La croissance des bactéries sur ce milieu de culture indique leurs capacités de fixer l'azote atmosphérique (figure 11A).

➤ **Test Catalase**

Les souches bactériennes ont été examinées pour leur activité catalase selon la méthode de MacFaddin (2000). Des cultures bactériennes fraîches ont été transférées sur une lame en verre, puis une quantité appropriée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% a été ajouté sur les lames. La formation de bulles d'aires en 10 secondes confirme que la souche à une activité catalase (figure 11B).

➤ **Test amylase**

La révélation de l'activité hydrolytique de l'amidon est mise en évidence par un test d'activité sur gélose à base d'amidon selon le protocole de Vinoth et *al.* (2009).

Le milieu de culture (Annexe 01) a été ensemencé, puis incubé à 30°C pendant 48 à 72 h. Ensuite, une solution de lugol, préalablement préparée (1 g d'idoine cristallin, 2 g de KI, 300 ml d'eau distillée), mélangée et laissée au repos puis filtrée, a été versée à la surface des boîtes ensemencées, quelques minutes après, l'excès a été éliminé et les boîtes ont été rincées à l'eau distillée (figure 11C).

➤ **Activité estérasique et lipasique**

La recherche de ces deux activités a été effectuée sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) (Annexe 01). Le Tween 80 (1%, v/v) a été ajouté pour révéler l'activité estérasique, tandis que, le Tween 20 a été utilisé pour mettre en évidence l'activité lipolytique. Le pH a été ajusté à 7,4 (Carrim *et al.*, 2006). Après ensemencement, les boîtes ont été incubées à 30C° pendant 48h (Figure 11D).

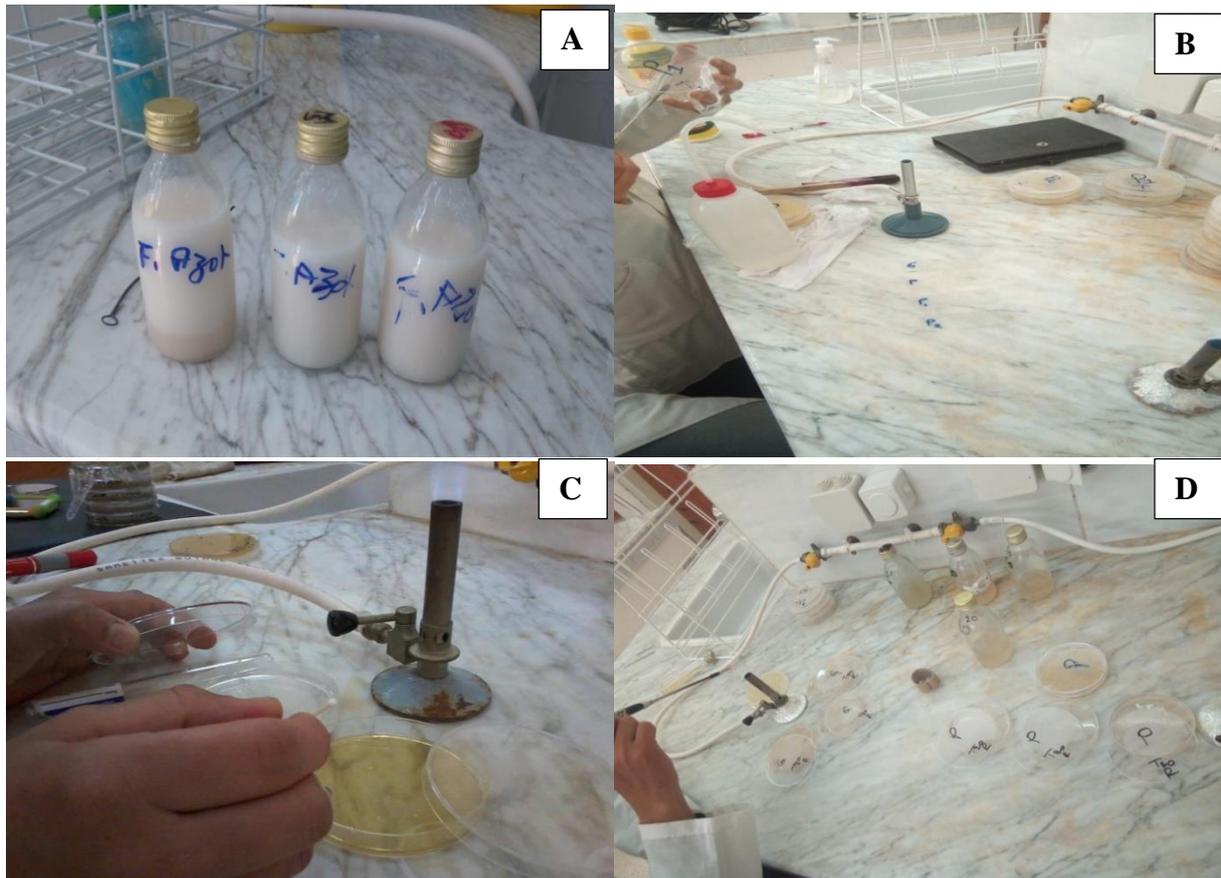


FIGURE 11 : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PGPR.

(A) : Test de fixation de l'azote ; (B) : Test catalase ; (C) : Test amylase ; (D) : Test de l'activité estérasique et lipasique.

3.2. Matériel végétal

3.2.1. Préparation des échantillons

Le matériel végétal utilisé dans notre essai est les feuilles de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sont originaires de la région de Reguan, wilaya d'Adrar, qui ont été débarrassées de toutes les impuretés, séchées au laboratoire à une température ambiante située entre 25°C et 27°C, à l'abri du soleil et de la lumière pendant une durée suffisante. Les feuilles sèches ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

3.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique

Afin de préserver la totalité des molécules et des pigments, le broyat des feuilles de *Citrullus colocynthis* a été conservé à température ambiante, à l'abri de la chaleur et de la lumière. La préparation de l'extrait éthanolique a été faite selon la méthode de macération décrite par Younssi et Zadeh (2002).

➤ Principe

Le principe de cette méthode consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide enfin d'en extraire les principes actifs, pour ce faire, le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide/ liquide, ensuite dissoudre le composé actif présente à l'intérieur et l'entraîner vers l'extérieur, l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté se fait par dialyse ou par diffusion (Younssi et Zadeh, 2002).

➤ Technique

10 g de broyat de feuilles coloquinte ont été macérés dans 100 millilitres d'éthanol dilué (70 ml éthanol et 30 ml eau distillée). Après une agitation de 24 h, à température ambiante (figure 12), une filtration sur papier filtre a été réalisée. Le filtrat obtenu a été débarrasser de son solvant (l'éthanol) par évaporation à 70°C en évaporateur rotatif. Le mélange obtenu a été versé dans un verre à montre et placé dans une étuve ventilée à 40°C pour l'obtention d'un résidu sec. Ce dernier, a été rempli dans des tubes secs, fermés hermétiquement et conservés à une température de 4°C et à l'abri de la lumière pour des éventuelles expérimentations.



FIGURE 12 : DIFFÉRENTES ETAPES DE PRÉPARATION DE L'EXTRACTION ETHANOLIQUE.

3.2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec (PS), a été calculé par la différence entre le poids de la boîte Pétri en verre contenant l'extrait et le poids la boîte de Pétri vide. Le rendement de l'extraction (R %) est le rapport entre le poids de l'extrait sec (PS) et le poids initial (PI), est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (PS/PI) \times 100$$

3.3. Nématodes utilisés

Le test d'efficacité du produit nématocide sont réalisés au laboratoire de nématologie à l'ENSA. Ils ont porté sur les larves (J2) et sur les œufs de *Meloidogyne spp.*

3.3.1. Isolement des nématodes

Les nématodes du genre *Meloidogyne* ont été isolés à partir des racines de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) et ont été identifiées sur la base de leur morphologie (Figure 13).



FIGURE 13 : ISOLEMENT DES NEMATODES

3.3.2. Culture des nématodes

Les œufs de *M. incognita* ont été extraits des racines de tomate à l'aide d'une solution de NaOCl (0,5%). Ils ont été obtenus par rinçage des suspensions d'œufs à l'eau stérile dans un tamis de 25 μm (Hussey et Barker, 1973). Les œufs ont été incubés pendant 3 à 5 jours dans milieu liquide (l'eau distillé stérile) à la température ambiante ($\approx 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Une observation microscopique est nécessaire pour s'assurer de la présence des nématodes dans la solution et pour évaluer leur concentration. Pour se faire, le protocole suivant a été utilisé :

Le contenu de la boîte de Pétri a été versé dans un bécher gradué auquel est ajouté de l'eau distillée jusqu'à un volume de 100 ml. A l'aide d'une pipette, la suspension a été homogénéisée la en soufflant à l'intérieur. 1 ml de cette suspension a été prélevé et mis dans un verre de montre. Sous une loupe binoculaire, le comptage des larves a été fait. Ce prélèvement a été répété 15 fois et la moyenne a été calculée (figure 14). Suite à cette opération, la concentration moyenne évaluée était de 50 larves de J2 pour chaque 1 ml d'eau distillée.



Figure 14 : Observation microscopique de la *Meloidogyne incognita* (G x 40).

4. Evaluation in vitro de l'effet des PGPR et des extraits éthanoliques sur les nématodes à galles

4.1. Test de l'extrait éthanolique

En premier lieu, 10 g de l'extrait éthanolique a été dissout dans une solution de DMSO (Diméthylsulfoxyde) (0.1 ml de DMSO dans 10 ml d'eau distillée) sous agitation.

Deux de boîtes de Pétri, contenant chacune 6 places fermées, contenant chacune 1 ml de la suspension des nématodes avec une concentration de 100 larves par ml, ont été préparées. Ce dispositif a été choisi pour faciliter l'observation de la mobilité des larves de *Meloidogyne spp.* Dans cette expérimentation, trois doses différentes de l'extrait des feuilles de la plante ont été utilisées en comparaison avec un bloc témoin contient 1ml de nématode (figure 15).



FIGURE 15 : DISSOUT ET AJOUT DE L'EXTRAIT AUX NEMATODES.

Trois doses ont été ajoutées aux nématodes, chaque dose contient 3 volumes (400 μ l, 200 μ l et 100 μ l respectivement). Ces traitements ont été répétés trois fois en temps de 4h, 8h et 12h. Le diagramme illustré dans la figure 16 résume le protocole utilisé (figure 16).

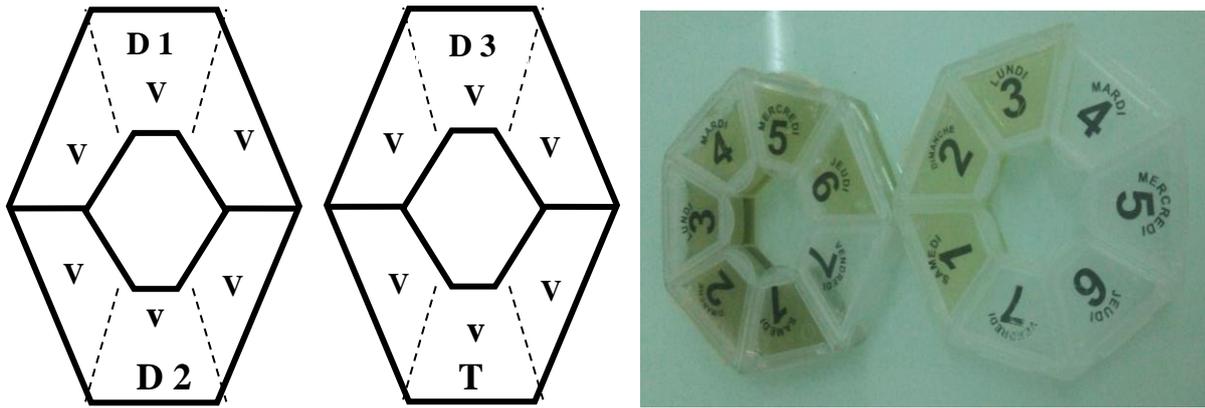


FIGURE 16 : TRAITEMENT DES NEMATODES PAR *CITRULLUS COLOSYNTHIS*.

D1 : 400 μ l, D2 : 200 μ l, D3 : 100 μ l, V : 1ml nématodes, T : témoin.

4.2. Test des PGPR

L'expérience a été menée pour les deux souches bactériennes par deux doses, avec 3 traitements, pour un total de 6 réplicas par expérience.

Comme la 1^{ère} expérience, dans chacune des places fermées des boîtes de Pétri, contenant 1ml de la suspension des nématodes avec une moyenne de 100 larves de *Meloidogyne spp*, deux doses différentes des solution PGPR ont été testées en comparaison avec un bloc témoin.

Les deux expériences ont été maintenues à la température ambiante.

Lors de la préparation du PGPR, un échantillon de bactérie P1ensemencé dans le milieu de culture King B a été prélevé et inséré dans un tube contenant l'eau distillée stérile qui a été fermé hermétiquement et mis dans un agitateur mécanique pendant un certain temps.

Après avoir bien mélangé, avec une micropipette, une dose de 1000 μ l a été prise pour D1 et a été placée sur les nématodes. Ensuite, une dose de 500 μ l pour le D2 a été prise et le même travail a été effectué (figure 18). Le même protocole a été suivi pour la souche bactérienne P2. Chaque protocole a été répété 3 fois et les résultats ont été observés après 48 heures au microscope.

5. Analyses statistiques

Les données présentées sont des valeurs moyennes. Les mesures ont été effectuées sur trois répétitions ($n = 3$) pour chaque traitement. Les données provenant des nématodes ont été soumis à une analyse factorielle de variance (ANOVA). Les différences entre les moyennes ont été comparées en utilisant les différences les moins significatives.



FIGURE 17 : TRAITEMENT DES NEMATODES PAR PGPR.

Chapitre 03 :
Résultats et discussions

Chapitre 03 : Résultats et discussions

1. Résultats

1.1. Caractérisation et Identification des PGPR

Cette partie du travail a porté sur la caractérisation culturelle, morphologique et biochimique des deux souches bactériennes rhizosphériques isolées à partir de la rhizosphère du palmier dattier, de la Wilaya de Oued-Souf. Ces souches ont été nommées : P1 et P2.

1.1.1. Caractérisation culturelle et morphologique

La caractérisation morphologique des bactéries se fait par des techniques standardisées. Les tests effectués sont basés sur les critères classiques ou traditionnels utilisés dans les schémas d'identification pratiqués dans la plupart des laboratoires de microbiologie (Denis et al., 2007). Des observations microscopiques ont été effectuées afin de distinguer entre les formes, les marges et les couleurs des deux souches isolées. Ces résultats sont résumés dans le tableau 02.

TABLEAU 2 : CARACTERISTIQUES CULTURELLES ET MORPHOLOGIQUES DES ISOLATS.

Isolats	Couleur	Marge	Odeur	Forme	Test de Gram
P1	Jaune	Lisse	Odorée	Coque	Positive +
P2	Marron	Lisse	Aucune	Coque	Positive +

A partir de ce tableau, on remarque pour les deux isolats bactériens, que la souche P1 a une odeur spécifique. Cependant, l'autre souche P2 n'est pas odorée.

Les résultats obtenus ont montré que les deux souches P1 et P2 ont une forme coque. En outre, après le test de Gram, les deux isolats P1 et P2 ont présenté un résultat positif (Gram +) (Figure 18).

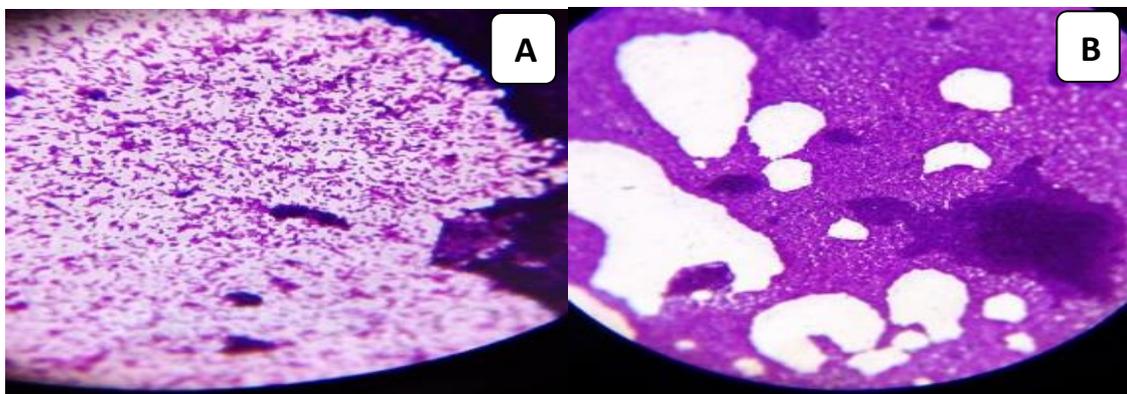


Figure 18 : Observation microscopique des bactéries isolées

(A) : Isolat P2, (B) : Isolat P1 ; (G : X100).

Par ailleurs, les isolats ont présenté, sur le milieu de culture King B, des colonies avec des surfaces lisses et irrégulières. Ainsi, la souche P1 avait une couleur jaunâtre (clair), par contre l'autre souche P2 a montré une couleur marron (figure 19).

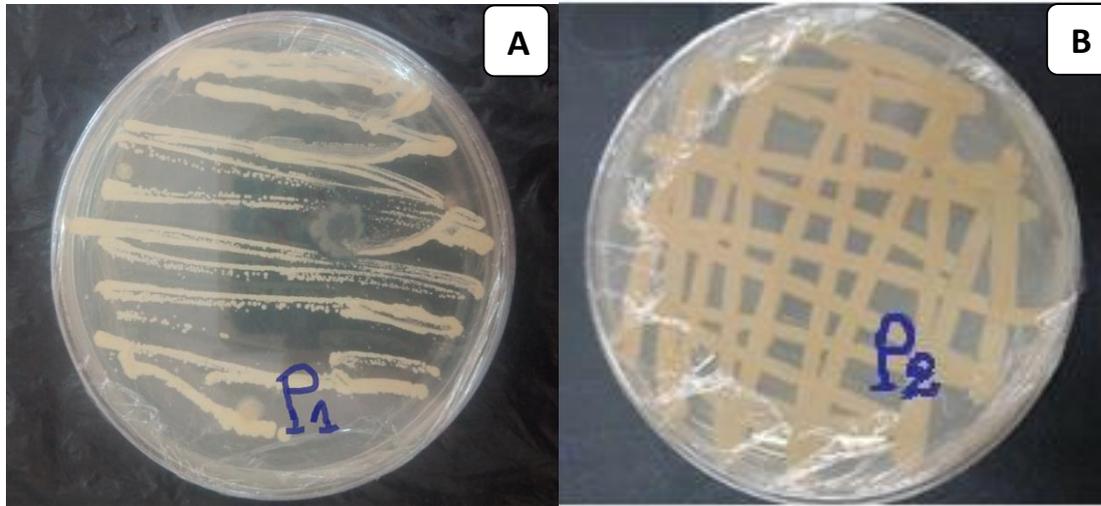


FIGURE 19: ASPECT MORPHOLOGIQUE DES RHIZOBACTERIES SUR MILIEU « KING B » : (A) : ISOLAT P2 ; (B) : ISOLAT P1.

1.1.2. Caractérisation biochimique

1.1.2.1. Fixation de l'azote

Les résultats obtenus ont montré que les isolats P1 et P2 ont pu croître sur le milieu de culture Ashby qui ne contient aucune source d'azote, ce qui montre la capacité de ces souches de fixer l'azote atmosphérique (figure 20).

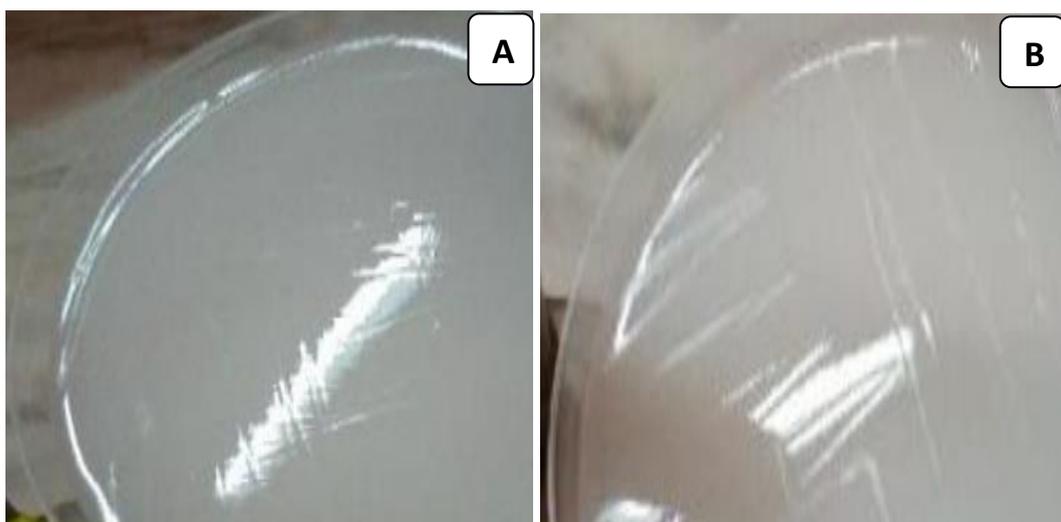


Figure 20: Croissance des bactéries isolées sur le milieu de culture Ashby.

(A) : la souche P1, (B) la souche P2

1.1.2.2. Test Catalase

Pour effectuer l'identification d'une bactérie il est préférable de connaître son type respiratoire. On trouve la catalase chez tous les organismes aérobies. C'est un cytochrome appartenant à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes.

Dans notre étude, toutes les souches bactériennes que nous avons analysées sont des catalases positives, dont la présence se traduit par le dégagement de bulles (Figure 21).

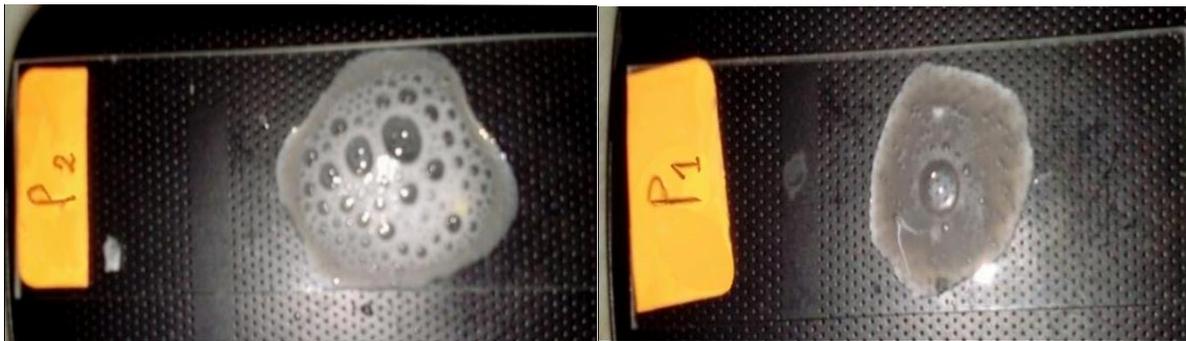


FIGURE 21: TEST CATALASE POUR LES SOUCHES BACTERIENNES : P1 , P2.

1.1.2.3. Test d'amylase

Après avoir placé les bactéries dans le milieu approprié pour détecter l'amylase, nous avons observé l'émergence d'une zone claire autour des disques dans les deux souches (figure 22), Cela prouve l'existence de l'activité de l'amylase (Vinoth et *al.*, 2009).

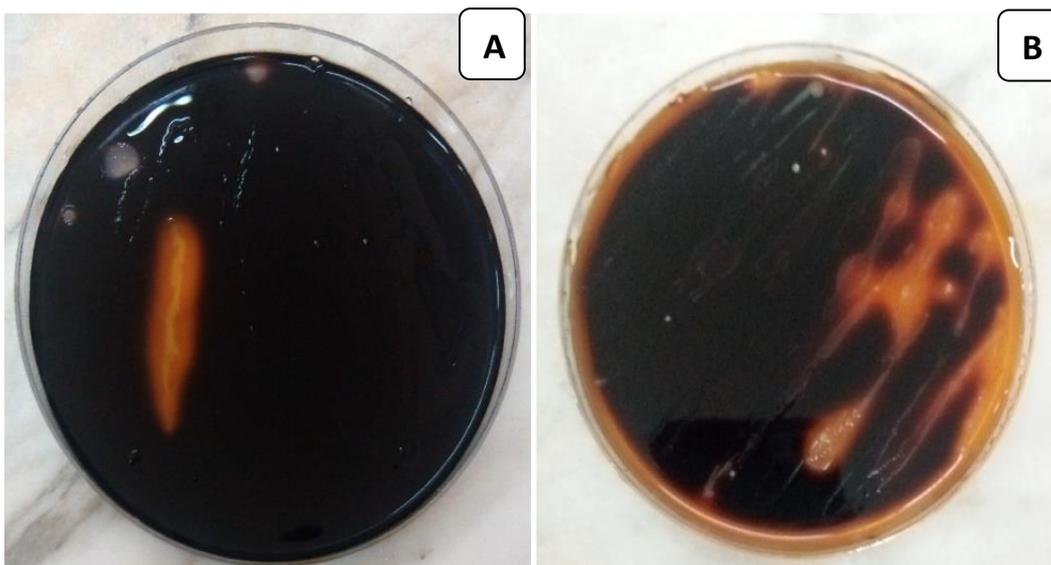


Figure 22 : Test amylase pour les souches bactériennes : (A) : P2 ,(B) : P1.

1.1.2.4. Test de l'activité estérasique et lipasique

Après avoir préparé un milieu approprié pour détecter l'activité enzymatique de l'estraz et de la lipase, nous y mettons les bactéries.

Nous avons remarqué la présence d'un halo clair autour des colonies. Cela prouve l'existence d'une activité des deux enzymes nommées ci-dessus (figure 23).

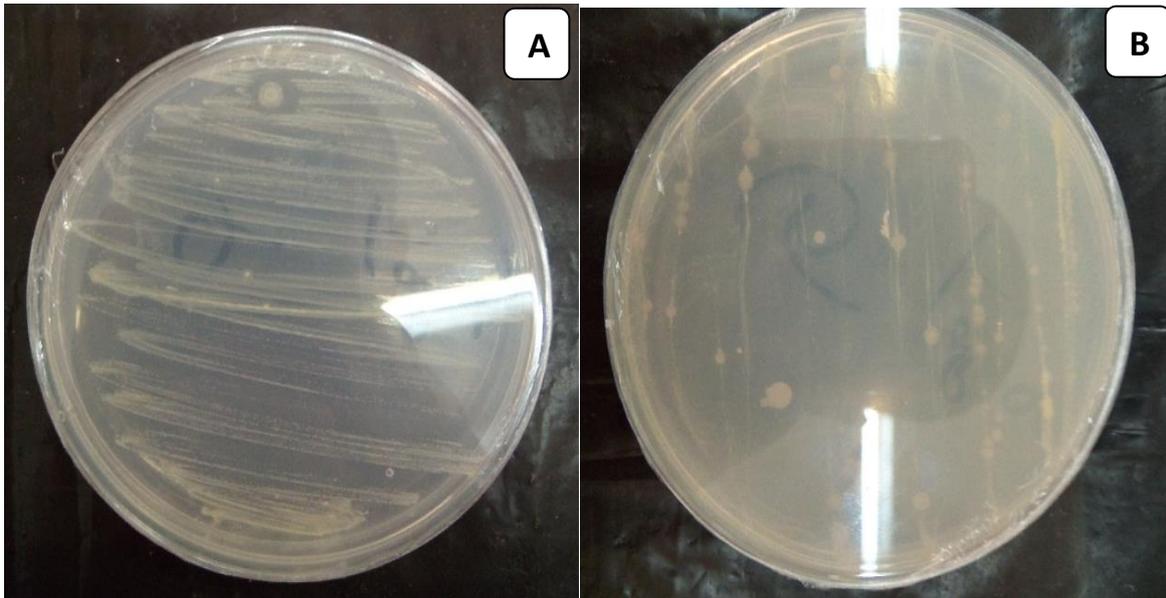


FIGURE 23: TEST ESTERASIQUE ET LIPASIQUE POUR LES SOUCHES BACTERIENNES : (A) : P1, (B) : P2.

D'après les résultats, les souches isolées à partir de la rhizosphère du palmier dattier sont coques à Gram positif. Par ailleurs toutes les souches identifiées sont catalase+. Ces caractères d'identification morphologiques avec les tests biochimiques ont permis l'orientation vers le genre *Staphylococcus* pour les deux isolats bactériens (P1 & P2) selon les tableaux d'identification (Marconi et al, 2000).

1.2. Traitement des nématodes par *Citrullus colosynthis*

1.2.1. Rendement d'extraction

Le rendement (l'extrait sec, obtenu après évaporation) a été déterminé par rapport à 10 g de la matière végétale (broyat ou feuilles sèches). Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids final (après évaporation) et le poids initial. Il était de 0,8617 g. et donc, en pourcentage, le rendement d'extraction pour les feuilles de *Citrullus colocynthis* était de 8,617 %.

1.2.2. Résultats de mortalité en fonction du temps et des doses de l'extrait

Les résultats des tests d'efficacité du *Citrullus colosynthis* sur la mortalité des larves sont présentés dans le tableau 03. Ces résultats montrent l'efficacité de l'activité nématocide de la combinaison de l'extrait éthanolique sur le taux de la mortalité des larves mobiles. Cette activité est proportionnelle à la concentration des doses est la période d'exposition avec une tolérance de $P < 0.0001$

TABLEAU 3 : ANALYSE DE LA VARIANCE DE MORTALITE DES NEMATODES PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE CITRULLUS COLOSYNTHIS

Sources de variation	ddl	SCE	CM	F	Pr > F
Extraits	5	25550,305	5110,061	14,5567	< 0,0001***
Résiduelle	30	10531,333	351,044		
Total	35	36081,638			

La présentation graphique par les courbes illustrée dans la figure 24 et le tableau 01 de l'annexe 02, montrent l'effet des doses sur la viabilité et la mobilité des larves de nématode de deuxième stade en fonction du temps. Pour but de bien évaluer l'efficacité de l'extrait de *Citrullus colosynthis* sur la mortalité des larves, nous avons effectué deux tests avec le même model expérimental en gardant les mêmes doses.

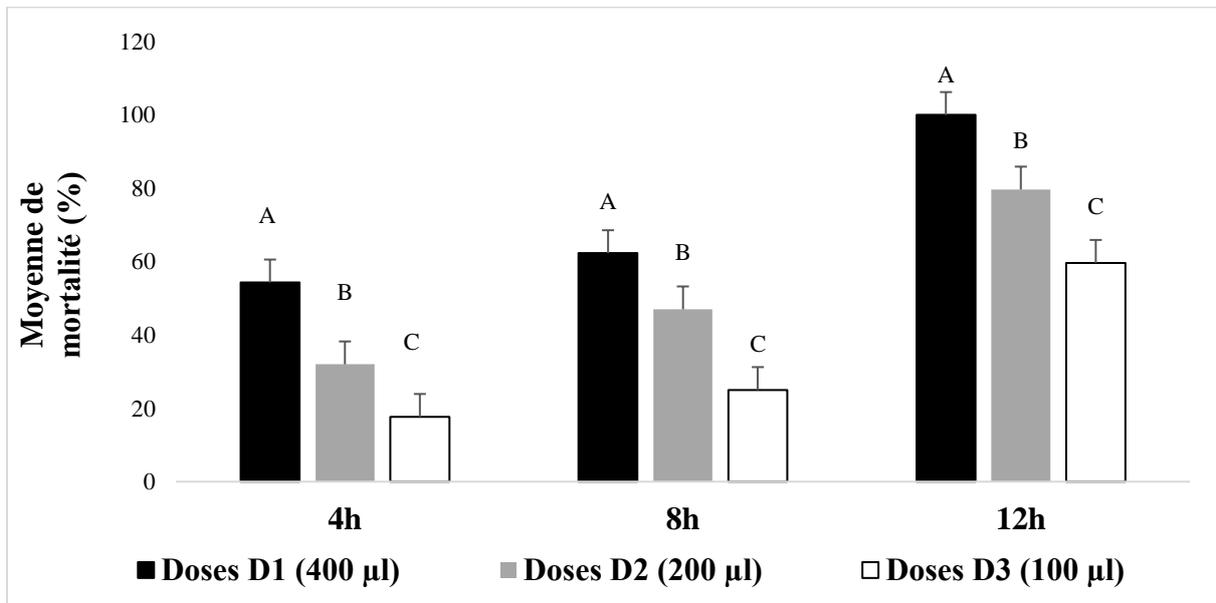


Figure 24 : Moyenne de mortalité des nématodes en fonction des différentes doses et du temps.

L'extrait éthanolique des feuilles de *Citrullus colosynthis* a enregistré un taux de mortalité croissant durant les 12 heures de traitement pour les trois doses. Le test de comparaison des moyennes LSD de Fisher (tableau 02, Annexe 02) a séparé trois groupes homogènes où chaque dose est classée dans un groupe.

Après quatre (04) heure d'exposition des larves à l'extrait éthanolique des feuilles de *Citrullus colosynthis*, la dose de 400 µl a donné une moyenne de mortalité de 54,33% suivie de la dose de 200 µl qui a donné le pourcentage de mortalité de 32% et en dernier lieu, la dose de 100 µl a enregistré une mortalité de 17,67%.

Après huit (08) heure de traitement, le taux de mortalité des larves de nématode de deuxième stade a augmenté pour les trois doses testées. Une moyenne de 62,33% de mortalité a été enregistré pour la dose de 400 µl suivie de la dose de 200 µl qui a enregistré une moyenne de 47% et puis de la dose de 100 µl où le pourcentage de mortalité des larves de nématode était de 25%.

Après douze heure (12h) d'exposition des larves à l'extrait éthanolique des feuilles de *Citrullus colosynthis*, le taux de mortalité des larves de nématode de deuxième stade a augmenté pour les trois doses testées pour atteindre les 100% pour la dose de 400 µl. Avec la dose de 200µl, le pourcentage de mortalité des larves de *Meloidogyne incognita* était de 79,67% et était de 59,67% de mortalité pour la dose 100µl.

D'après ces résultats, la dose de 400 µl était la plus efficace par rapport aux deux autres doses (200 µl et 100 µl). Par conséquent, plus la dose de l'extrait de *Citrullus colosynthis* est élevée et plus la durée de l'expérience est longue, plus le taux de mortalité des *Meloidogyne incognita* est élevé.

1.3.Traitement des nématodes par PGPR

Après 72 heure d'exposition des nématodes aux deux isolats de PGPR (P1 et P2), et après avoir placé les boites au microscope, aucune mortalité des larves de nématodes *Meloidogyne incognita* par PGPR n'a été observée.

Les traitements ont été préparés à nouveau, en augmentant le volume de traitement et les doses en quantité double et en laissant séjournés ensemble, les larves de nématodes *Meloidogyne incognita* et les solutions contenant les isolats des PGPR (P1 et P2) pendant 72 heures. L'observation au microscope, n'a révélé aucune mortalité des larves de nématodes *Meloidogyne incognita* par PGPR. Donc le résultat est négatif.

2. Discussions

2.1. Isolement et identification des PGPR

Afin d'étudier l'effet des deux isolats de PGPR sur les nématodes, il fallait tout d'abord les identifier. Dans cette étude, des méthodes classiques d'identification (morphologiques et biochimiques), ont été utilisées pour l'identification des deux souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère du palmier dattier dans la région d'Oued Souf. Les isolats ont été nommés : P1 et P2. Ces PGPR ont été identifiés et ils appartiennent au genre *Staphylococcus*, selon les catalogues d'identification.

Dans une étude réalisée par Singh *et al.* (2006), sur 72 souches isolées à partir de la rhizosphère du palmier dattier, les *Staphylococcus* représentent plus des 30% des isolats.

Staphylococcus est une bactérie à Gram positif, en forme de coque, non mobiles, est à catalase positive et aéro-anaérobies facultatives (Emilie, 2007). Elle est caractérisée par un grand potentiel de biofilm.

2.2. Caractéristiques des PGPR qui favorisent la croissance des plantes

L'azote (N) est considéré comme un élément principal pour la nutrition des plantes (Coruzzi et Bush, 2001). La teneur en azote est l'un des facteurs les plus importants qui affectent la croissance des cultures et détermine la qualité et la quantité des rendements des cultures (Amâncio et Stulen, 2004). L'atmosphère est la principale source d'azote, sous forme diatomique (N₂) (Sheppard et Wallander, 2004), il est rendu disponible pour les plantes par minéralisation liée à l'activité des bactéries (Mengel, 1982). En outre, certains PGPR facilitent la croissance et le développement des plantes par l'apport d'azote aux plantes par fixation d'azote atmosphérique (Figueiredo *et al.*, 2008).

La croissance des bactéries sur le milieu de culture «Ashby» dépend de leur aptitude à fixer l'azote. Dans notre étude, on a trouvé que les deux isolats ont fixé l'azote et ont pu se développer sur le milieu Ashby.

Plusieurs auteurs ont supposé que la majorité des bactéries rhizosphériques ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique ce qui augmente le rendement des cultures (Rodge *et al.*, 2016). La fixation d'azote par les bactéries pour les cultures légumineuses est bien connue et étudiée (Barea *et al.*, 2005 ; Esitken *et al.*, 2006). Les études montrent que la fixation d'azote se fait principalement par ; *Rhizobium* sp. ; *Staphylococcus* Sp. ; *Azotobacter* sp. ; *Bacillus* sp...etc. (Vogel *et al.*, 2016). De même, les PGPR peuvent aussi fixer l'azote atmosphérique

(N₂) pour d'autres cultures, les céréales (maïs, riz et blé) et les légumes (laitue et radis) (Antoun et Prévost 2005). Par la suite, il est devenu évident que ces rhizobactéries améliorent de manière significative la longueur des racines, le nombre de feuilles et la taille des fruits. Aussi, la capacité des PGPR de fixer l'azote dans le sol et d'améliorer les rendements des cultures pourrait remplacer l'utilisation d'engrais azotés (Vessey, 2003).

Les deux isolats ont montré des résultats positifs pour la production de catalase. L'activité de la catalase dans les souches bactériennes peut être potentiellement très avantageuse et les souches bactériennes montrant une activité catalase doivent être très résistantes aux stress environnementaux, mécaniques et chimiques (Singh et *al.*, 2006).

Pour les amylases, sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène, elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes. Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et *al.*, 2009). Dans cette étude, l'activité amyliasique est révélée chez les deux isolats, la synthèse de ces enzymes par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique et fournit les éléments nécessaires pour la croissance des plantes.

Dans leur étude sur *Staphylococcus* et *Bacillus*, Obi et Odibo (1984) ont révélé une production de quantités considérables en α -amylases. Selon Whipps (2001) et Siddiqui (2005), l'amylase produite par les *Staphylococcus* stimule la croissance et la santé des plantes.

Les estérases et les lipases ont été mises en évidence en 1901 chez des bactéries telles que *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* (Fickers et *al.*, 2008). L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé d'augmenter au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans différents domaines. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, les procédés de fabrication qui sont relativement simples comparés aux lipases d'origine animale, et d'autre part, elles montrent une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. (Sharma et *al.*, 2001). Dans ce travail, les deux isolats exhibent une activité de 100% lipolytique et estérique.

Cette activité biologique est surtout liée à leur effet sur les lipides de la membrane cellulaire où ils peuvent favoriser selon la concentration, la formation de pores irréversibles dans la double couche de phospholipides. Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un

grand nombre de champignons y compris *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, les bactéries et les oomycètes (Munimbazi et Bullerman, 1998).

2.3. Traitement de nématodes par *Citrullus colosynthis*

Les nématodes à galles constituent l'un des ravageurs d'importance économique pour la culture de *Citrullus colosynthis* (Van der Vossen et al., 2004). En l'absence d'une méthode de lutte adéquate contre les nématodes à galles, la culture de *Citrullus colosynthis* est hypothéquée (Affokpon et al., 2014). La présente étude constitue à notre connaissance la première évaluation d'agents de lutte biologique et d'extraits botaniques appliqués seuls, pour le contrôle des *Meloidogyne incognita*.

L'application de la poudre de feuilles de *Citrullus colosynthis* seule, une semaine avant le semis, a montré une réduction significative des populations de *Meloidogyne incognita*, comparativement aux parcelles traitées avec le nématicide Furadan et celles non traitées et l'effet des dérivés de *C. colosynthis* sur les *Meloidogyne incognita* a été antérieurement évalué sur d'autres cultures dont la courge, la tomate et la grande morelle (Affokpon et al., 2012). Il a été observé une diminution de 47% du nombre de masses d'œufs sur le système racinaire de la courge et de 51 et 81% les taux de reproduction des nématodes dans les parcelles de tomate et de grande morelle.

Plusieurs auteurs ont expliqué que l'effet nématicide des dérivés de *C. colosynthis* contre les *M. incognita* est dû à certains composés nématotoxiques, notamment azadirachtin et autres triterpénoides (Akhtar et Malik, 2000). Comparant l'effet de deux dérivés de *C. colosynthis* contre les nématodes sur la tomate, Affokpon et al. (2012) ont constaté que la *C. colosynthis* à un effet plus persistant.

Dans la présente étude, la persistance de l'effet de l'extrait a été aussi remarquée à travers la faible densité de populations des nématodes (après 12 h).

2.4. Traitement de nématodes par PGPR

Notre expérience a montré que les souches bactériennes genre *Staphylococcus* ne présentaient aucune interaction avec les nématodes, car ceux-ci restaient en vie et se déplaçaient au milieu et nous ne trouvions aucun décès, le nombre demeurait tel quel.

Il n'y a pas de travail, d'expérience ou d'article qui parle de l'effet du PGPR *Staphylococcus* sur le nématode de genre *Meloidogyne incognita*.

Par contre Il y a un effet sur la mort des nématodes par PGPR *Pseudomonas*, et ce dernier n'est pas seulement affecté sauf si elles sont très nombreuses (forte dose), auquel cas il devient léthargique et peut mourir, dans notre expérience, c'est la possibilité que cela se produise.

Le nématode ne paraît pas affecté par les bactéries, sauf si elles sont très nombreuses (forte dose), auquel il devient léthargique et peut mourir (Sayre et *al.*, 1991) Dans notre expérience, c'est la possibilité que cela se produise ou au fait que le nématode central affecte négativement les bactéries, ou que les bactéries utilisées n'ont aucun effet sur les nématodes genre *Meloidogyne incognita*

Conclusion

Conclusion

Malgré des siècles de développement technologique, les ravageurs des cultures continuent à causer de sérieux dommages à la production agricole à travers le monde entier. Une résolution certaine bien établie à ce problème consiste à faire appel à des ennemis naturels appelés également agents de lutte biologique afin de contrôler les attaques des ravageurs tout en gardant l'équilibre biologique et naturel de l'environnement. Parmi ces ravageurs, figurent les nématodes à galles du genre *Meloidogyne*. Ces bioagresseurs s'attaquent principalement aux cultures de solanacées, dont la tomate présente une plante hôte du premier rang. La difficulté de leur contrôle et leur élimination fait de ces anguillules un ravageur redoutable. Pour cette raison, plusieurs travaux sont réalisés par de nombreux chercheurs scientifiques pour but de trouver de meilleures solutions pour limiter les dégâts.

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne*, survivent dans le sol sous forme de larves de deuxième stade (j2), logées dans la coquille de l'œuf.

L'application des agents chimiques pour le contrôle de celles-ci n'a donc cessé d'augmenter. Par conséquent, l'augmentation de l'utilisation d'un certain nombre de pesticides a eu des effets négatifs sur la santé humaine et sur l'environnement.

Notre expérimentation avait pour objectif de proposer une alternative à l'utilisation de traitements chimiques polluante et onéreuse. Nous voulons mettre en évidence l'efficacité d'isolats bactériens PGPR (P1 et P2) sur les larves (j2) de *Meloidogyne*. Ces deux bactéries sont du genre *Staphylococcus*, ont été formulées pour des applications contre les nématodes à galles.

Les tests réalisés *in vitro* concernant l'efficacité de ces deux souches en fonction des concentrations et du temps d'exposition sur le taux de mortalité des larves a donné des résultats négatifs. Aucune mortalité n'a été observé. Ainsi, les souches étudiées n'ont aucune efficacité contre les nématodes genre *Meloidogyne incognita*.

Lorsque nous expérimentons avec les extraits éthanoliques des feuilles de la plante *Citrullus colosynthis*, en trois doses (400 µl, 200 µl et 100 µl), nous avons trouvé des résultats étonnants : l'efficacité de *Citrullus colosynthis* est très élevée. À différents moments (4h, 8h, 12h), l'efficacité observée a atteint 100% de mortalités.

Ceci est dû à la composition de la plante *Citrullus colosynthis*. Ceci est prometteur et motive les chercheurs à trouver des solutions pour remplacer les engrais chimiques qui constituent une menace pour la santé des sols, de l'homme, des animaux et des plantes, d'une manière qui est Inoffensif ou moins nocif.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A., Mohammed, S.T. (2000). The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* , 71, 325-30.
- Affokpon, A., Baimey, H.K., Achigan-Dako, E.G., Tossou, C., Lokossou, J.N. et Bokonon-Ganta, A.H. (2014). Improving productivity of *Citrullus lanatus* subsp. *mucosospermus* (Egusi Melon) through identification and use of local nematode resistant varieties. *Journal of Nematology*, 46(2):131-132.
- Affokpon, A., Coyne, D.L., Htay, C.C., Dossou Agbèdè, R., Lawouin, L. et Coosemans, J. (2011). Biocontrol potential of native Trichoderma isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3): 600-608.
- Affokpon, A., Dan, C.B.S., Houedjissi, M.E., Hekpazo, B.A. et Tossou, C. (2012). L'efficacité des dérivés de graines de neem contre les nématodes à galles en cultures maraîchères diffère en fonction du type de dérivé. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin* 72: 48-58.
- Ageel, A. M., Mossa, J. S., Tariq, M., Al-Yahia, M. A., Al-Said, M. (1987): Plants used in Saudi folk medicine. Riyadh: KACST, King Saudi University Press.
- Akhtar, M. et Malik, A., (2000). Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology* 74 : 35-47.
- Akhtar, Siddiqui, Z.A., Qureshi, A., M.S., 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Pseudomonas and Bacillus isolates on Pisum sativum. Arch. Phytopathol. Plant Protec., 12, 1154–1164.
- Amâncio, S, et Stulen, I. (2004). Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants. Kluwer Academic Publishers.
- Antoun, H, & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In PGPR: Biocontrol and biofertilization (pp. 1-38). Springer, Dordrecht.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). (1998): An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85: 531–553.
- Badifu, G.I.O. & Ogunsua, A.O. (1991). Chemical composition of kernels from some species of Cucurbitaceae grown in Nigeria. *Plants Food for Human Nutrition* 41, 35-44.

- Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 195-212). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Barker, K.R., Koenning, S.R., 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*. 36, 165–205.
- Bélaïr G (2005). Les nématodes, ces anguillules qui font sur les plantes... par la racine. *Phytoprotection*. 86: 65-69.
- Beneduzi, A. Ambrosini, A. & Passaglia, Luciane M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35(4 Suppl): 1044-1051.
- Bertrand C., 2001. Lutter contre les nématodes à galle en agriculture biologique. Fiche technique Grab/Itab : 4 p.
- Blok V.C., Jones J.T., Phillips M.S., Trudgill D.L., 2008. Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes : the conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 30 : 249-59.
- Bonnemaïson L., (1961) –Les ennemis des plantes cultivées et des forêts. Ed. A.C.T.A., Paris, Vol.1, 190p.
- Bourgeois Th., 1993. Les mauvaises herbes dans la rotation cotonnière au Nord-Cameroun (Afrique) - Amplitude d'habitat et degré d'infestation - Cycle de développement. *Thèse USTL Montpellier II*, Montpellier, France, 241p.
- Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. and Sahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38(6):1482-1487.
- Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Sussmuth, R.D., Borriss, R., (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology* 188, 4024–4036.
- Cherif, H. (2014). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides. Université Ferhat Abbas Sétif 1. 134P.
- Chialir. M, (1973). Contribution à la naissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne ; thèse de doctorat d'état en pharmacie.

- Coruzzi, G., & Bush, D. R. (2001). Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant physiology*, 125(1), 61-64.
- Dalmasso A., Missonnier J., (1986) – La lutte intégrée contre les nématodes des cultures: intérêt des variétés résistantes. *Rev. Phytoma*, n°378, pp. 13-16.
- Dane, F. Liu, J., Zhang, C. (2007): Phylogeography of the Bitter Apple, *Citrullus Colocynthis*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (2): 327–336.
- Daniel, D. (2006) : Médicinal plantes, Etats Unis, p111.
- Davide R.G., 1980. Influence of cultivar, age, soil texture, and pH on *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis* on banana. *Plant diseases* 64 : 571-573.
- De Guiran G., (1993). Protection des cultures maraîchères et fruitières face aux capacités d'adaptation des nématodes *Meloidogyne*. *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France* : 71-78.
- De Guiran G., (1998). Protection des cultures maraîchères. *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France* 71–79.
- De Guiran G., 1983. Nématodes, les ennemis invisibles. La Littorale S.A. (Ed.), France : 41 p.
- Debuigne, (1984). Larousse des plantes qui guérissent.
- Demeure Y., (1978). Les causes de la survie de certains nématodes phyto-parasites pendant la saison sèche dans le Sahel Sénégalais. Thèse de l'université Claude Bernard-Lyon I. Paris : ORSTOM : 113 p.
- Denis, F., Poly, M.C., Martin, C., Bingen, E. & Quentin, R. (2007). Bactériologie médicale, technique usuelles, Elsevier Masson (ed). pp : 14-20.
- DeSmet, P. A. G. M., Keller, K., Hänsel, R., Chandler, R. F. (1997). *Citrullus colocynthis*. In *Adverse Effects of Herbal Drugs*. Springer (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 29- 36.
- Dieter H., Imran A.S., Stephan H., (2004). Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*., Lausanne, Switzerland., 5646-5649.
- Djigal, D., Chabrier, C., Duyck, P.F., Achard, R., Ouénéhervé, P., Tixier, P., 2012. Cover crops alter the soil nematode food web in banana agroecosystems. *Soil Biol , Biochem.* 48 :142-150.
- Duke, J. A., Duke P. K. DuCellie J. L. (2008). *Duke's handbook of medicinal plants of the bible*. Taylor & Francis Group, CRC Press, 6000 Broken, USA.
- Duval J., (1991) – Les nématodes de la tomates. *Rev. Agro. Biol.* Vol. 1, n° 320, 7p.

- Eijkmann C. (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. Bakt.Parasitenkd. Infektionskr, 29: 841-848.
- Eisenback, J.D. & Triantaphyllou, H.H. (1991). Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races. In: Nickle, W.R. (Ed.). Manual of Agricultural Nematology, Marcel Dekker, Inc. New York, 191- 274 pp.
- El Fennouni, M. (1985). Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au Maroc. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V. Casablanca, Maroc.
- Emilie (2007). *Staphylococcus xylosus*: cartographie du génome et diversité génétique. Diss. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I/Edinburgh. pp. 1-3.
- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 110(4), 324-327.
- Farzaneh, D., Mohammad, R. (2006): The toxic effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on rat liver. *Iranian J. of Pharmacology and Therapeutics*, 5: 117-119.
- Fickers .P ; J. Destainand P Thonart. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques :principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.
- Figueiredo, V.B., Burity, H.A. Martinez, C.R. et Chanway, C.P. (2008). Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.*, 40:182–188.
- Foury C., (1995) – Lutte contre les parasites et ennemis d'origine tellurique vers une Stratégie plus intégrante? *Rev.Horti.*, n°356,pp.21-29.
- Fursa, T.B. (1972): Sistemati ke roda *Citrullus* Schrad. Bot. Z. 57(1): 31–41. Dans P. Nimmakayala, N. Islam-Faridi, Y.R. Tomason, F. Lutz, A. Levi, and U.K. Reddy. Chapter 5: *Citrullus*. Dans: C. Kole (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. pp 59-66.
- Gacem, M.A., Aminata, O.K., Gacemi, B. (2013). Evaluation of antifungal effect of organic extracts of Algerian *Citrullus colocynthis* seeds against four strains of *Aspergillus* isolate from wheat stored. *J. Med. Plants. Res.*, 7(12):727-733.
- Gagnon, Y. (2015). Le sol et les processus naturels de nutrition des plantes. Association Manger Santé Bio. [En ligne]. <http://www.mangersantebio.org/18623/le-sol-et-les-processus-naturels-de-nutrition-des-plantes> [consulte le 25-04-2019]

- Garcia-Varela M Ptrosyan P., Luz-Madrigal A., and al., (2003). *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.53, p.269-273.
- Glick BR (1995), The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109–117.
- Goeldi, E.A. (1887). Relatorio sobre a molestia do cafeeiro na provincia do Rio de Janeiro. *Apparently and advanced separate of Arch.*
- Gurudeeban, S., (2007). Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of mannar. *Inter. J. Curr. Res.*, 2: 078-081.
- Gurudeeban, S., Rajamanickam, E., Ramanathan, T., Satyavani, K. (2010). Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of mannar. *Inter. J. Curr. Res.*, 2: 078-081.
- Haas D. and Defago G., (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat rev microbiol.* 3(4):307-319.
- Huseini, H.F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M., Larijani, B. (2009). The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 23(8): 1186- 9.
- Hussain, A., Virmani, O. P., Popli, S. P., Misra, L. N., Gupta, M. M., Srivastava, G. N. Abraham, Z. and Singh, A. K. (1992). *Dictionary of Indian Medicinal Plants*. CIMAP, Lucknow, India; 546p.
- Hussey, R., Barker, K., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report* 57, 1025–1028.
- Insunza, V., Alstrom, S., Eriksson, K.B., (2002). Root bacteria from nematocidal plants and their biocontrol potential against trichodorid nematodes in potato. *Plant Soil* 241, 271–278.
- Jatala P (1985), Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24, 453–489.
- Javed, N., Gowen, S.R., Haq, M.I., Abdullah, K. & Shahina, F. (2007). Systematic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. *Crop Protection* 26, 911-916.
- Jayaraman, R., Shivakumar, A., Anitha, T., Joshi, V.D., Palei, N.N. (2009). Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *ROM. J. Biol. Plant. Biol.*, 54(2): 127-134.

- Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G. (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231(2):267-275.
- Jones M., 1981. The development and function of plant cells modified by endoparasitic nematodes: 225-279. In: Plant Parasitic Nematodes, B.M. Zuckerman and R.A. Rhode (eds). Academic Press, New York.
- Karthik, C., SriRamkumar, V., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K., Arulselvia, P.I., (2017). Biosorption and biotransformation of Cr(VI) by novel *Cellulosimicrobium funkei* strain AR6. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 70, 282–290.
- Keraudren M., (1967). Flore du Cameroun. 6 - Cucurbitacées. *MESRES éd.*, Yaoundé, Cameroun, 192.
- Khare, C. P. (2004). Indian medicinal plants. Springer; New York, USA, ISBN:978-0-387-70637- 5: 152.
- Kloepper, J.W.,Ryu, C.M. & Zhang, S.A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology* 94(11):1259-1266.
- Kumar, S., Kumar, D., Manjusha, Saroha K., Singh N., Vashishta B. (2009). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica*, 58:215-221.
- Lloyd, J. U., Cincinnati, O., (1898). *Citrullus colocynthis*, botanical description, habitat and cultivation. Reprinted from the Western Druggist, Chicago. pp: 1-11.
- Lung G., Farid A., et Schmidr U., (1997) – Biological control of nematodes with the enemy plant *Tagetes sp.* *Rev. Nematol.*, Vol.66, n° 3, p. 200.
- Mahmud MR, (2014). The importance of the gelatinous matrix for the survival of eggs of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. Thesis of Master of Science in Nematology, Ghent University.
- Marconi, E., Sorrentino, E., Mastrocola, E et Coppola, R (2000). Rapid detection of diamino-pimelic acid in lactic acid bacteria by microwave cell wall hydrolysis. *J. Agric. Chem.* 48: 3348-3351.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Fenin, N., Bouraoui, A., Aouni, M. (2010). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology*, 128: 15–19.
- McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J.L., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. and Salmond, G.P.C. (2005).

- Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* 55(2):526-545.
- McSorley R., (2003). Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida entomologist* 86 : 138-142.
- Mena, J., Pimentel, E., (2002). Mechanism of action of *Corynebacterium pauronetabolum* strain C-924 on nematodes. *Nematology* 4, 287.
- Mengel (1982), Principles of plant nutrition, 3ème édition, International Potash Institute Bern, 665 p.
- Messiaen C., Blancard D., Rouxel F., & Lafon R., (1991). Les maladies des plantes maraîchères. Editions Inra. Paris, France : 552 p.
- Messiaen C., Blancard D., Rouxel F., & Lafon R., (1991). Les maladies des plantes maraîchères. Editions Inra. Paris, France : 552.
- Meziane, R. K., Khemmar, L., Amamou, F., Yazit, M., Didi, A., Chabane-Sari, D. (2012). Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis* oil in the offspring of obese rats. *Annals of Biological Research*, 3(5): 2486-2490.
- Moens, M. and Perry, R. (2006). Plant Nématologie. CAB international, Wallingford. 447 pp.
- Mugniéry D., 2005. Les nématicides et la lutte chimique contre les nématodes. In Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Regnault-Roger C., Fabres G., Philogène B.J.R. éd. Lavoisier, pp 115-135
- Muniasamy, S., Pavaraj, M. & Rajan, M.K. (2010). Efficacy of the fruit extract of *Citrullus colocynthis* (L.) on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting *Vigna unguiculata* (L.). *Journal of Biopesticides* 3, 309-312.
- Munimbazi, C. et LB. Bullerman (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84:959-969.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Najafi, S., Sanadgol, N., Nejad, B.S., Beiragi, M.A., Sanadgol, E. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants Res.*, 4 (22): 2321-2325.
- Nataragan, N., Cork, A., Boomathi, N., Pandi, R., Velavan, S. & Dhaskshanamoorthy, G. (2006). Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control of tomato root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 25, 1210-1213.

- Neher D. A., (2001). Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology*, 33, pp 161-168. *Processionnaire du cèdre*.
- Nelson L. M., (2004). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) : Prospects for new inoculants. *Crop Management*, <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria> .Paris : 172p. potential use as biological control agents, *Phytoprotection* 71:19-27.
- Ngumbi, E., Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105 (2016): 109-125.
- Obi S.K.C. and Odibo F.J.C. (1984). Partial Purification and Characterization of a Thermostable Actinomycete 3-Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 571-575.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I. & Spiegel, Y. (2000). New strategies for the control of plant parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56, 983-988.
- Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P. (2002). Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals*. 15(1):1-13.
- Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara. 2^{ème} édition. Ed. C.N.R.S. Paris. 662.
- Parmar, N, Dadarwal, K. R. (1999). Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 36-44.
- Press, M.C., Phoenix, G.K., (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist* 166, 737-751.
- Prot J.C. Van Gundy S.D., (1981). Effect of soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles. *Journal of nematology* 13 : 213-219.
- Prot J.C., 1975. Recherches concernant le déplacement des juvéniles de *Meloidogyne spp.* vers les racines. *Cah ORSTOM sér Biol* 10 : 251-262.
- Raguchander, T., Saravanakumar, D., Balasurramanian, P., 2011. Molecular approaches to improvement of biocontrol agents of plant diseases. *J. Biol. Cont.* 25, 71–84.
- Rahbar, A.R. Nabipour, I. (2010). The hypolipidemic effect of *Citrullus colocynthis* on patients with hyperlipidemia. *Pak J Biol Sci*, 13(24): 1202-1207.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2001. Induction by systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20, 1–11.
- Reddy P., 1983- *Plant Nematology*. Ed. Agri. Publ. Acad., India, 287p.

- Reversat G., 1986. Recherche sur la survie et le métabolisme énergétique des stades infestants chez *Heterodora oryzae*, *Meloidogyne javanica* et *Hirschimanniella spinicaudata*, nématodes phytoparasites de la zone intertropicale. Thèse Sci. Nat., Université Pierre et Marie Curie, ORSTOM : 278 p.
- Reyes. M.E.Q, Rohrbach.K.G and Paull. R.E (2004). Microbial antagonists control. postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33, 193–203 Books (Author and Editor).
- Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S. (1997). *Cucurbits*. CABI, Wallingford, Oxfordshire.
- Rodge, Seema P., et al. (2016) "Isolation and Characterization of PGPR from Roots of *Ficus religiosa* growing on Concrete Walls and its Effect on Plant Growth in Drought Condition." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 5.9 : 583-593.
- Sain, R.S., Joshi, P., Sharma, S.N. (2004): Etude cytomorphologique dans le genre *Citrullus* (cucurbitacées). Inde.
- Salama, H.M. (2012): Alkaloids and flavonoids from the air dried aerial parts of *Citrullus colocynthis*. *J. Med. Plants Res.*, 6: 5150–5155.
- Sasser, Hartman K.M. and, J.N. (1985) Identification of *Meloidogyne* species by differential host test and perineal pattern morphology, pp. 69-77.
- Sawaya, W.N., Dagher, N.J., Khalil, J.K. (1988). *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 285-288.
- Sayre R . M . , WERGIN W . P . , STURHAND., 1991. Comparison of the fine structure of *Pasteuria sp.* from *Heterodera glycines* with a related bacterium parasitizing *Heterodera goettingiana*. *Nematologica*, 36, 390.
- Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M.F., Rouch, C., Sari, D.C., Magnan, C. (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sun flower and Olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes and Metabolism*, 35:178-184.
- Sharma H.C., Sharma K.K., Seetharama N.N. et Ortiz R. (2001). Genetic transformations of crop plants: risk and opportunities for the rural poor. *Curr Sci*. 80: 1495-1508.
- Sheppard L.J., Wallander H. (2004). Atmospheric Nitrogen-Pollutant or Fertiliser?. In Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants (pp. 65-98).
- Siddiqui ZA. (2005). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrôle and biofertilization*. Springer, Pays-Bas, p.111-142.
- Siddiqui, Z.A., Mahmood, I.,(1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresour. Technol.*, 69,167–179.

- Singh, B.R., Musarrat, J., Usmani, S., Zaidi, S. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bio inoculant for concurrent plant growth promoting and nickel accumulation in *Braassica Juncea*. *Chemosphere* 64, 991-997.
- Spichiger, R. E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmoned, D. (2004). *Botanique systématique des plantes à fleur*. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH Lausanne.
- Stevens, P.F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website (APweb). www.mobot.org/MOBOT/research/A_Pweb/ (accessed 12 July 2019).
- Taylor A.L. & Sasser J.M., (1978). *Biology, identification and control of root-knot nematodes*. North Carolina State Univ Graphics : 110 p.
- Timothy, J. N. (1993). New opportunities in the cucurbitaceae. In: Jarala J. Simon J. E. (eds.), *New corps*. Wiley, New York. pp: 538-546.
- Tsai, B.Y., (2008). Effect of temperature on the survival of *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathology* 17 : 203–208.
- Vacheron, J., Desbrosses, G & Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356): 1-19.
- Van Der Vossen, H.A.M., Denton, O.A. et El Tahir, I.M. (2004). *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai. (Internet). Record from Protabase. (<http://database.prota.org/search.htm>). Consulté le 10 Octobre 2018.
- Van Loon L.C., Bakker P. and Pieterse C. M. J., (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Van-Loon, L.C., (2000). Systemic induced resistance. In: Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., vanLoon, L.C. (Eds.), *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer, Dordrecht, pp. 521–574.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Vidyalakshmi R., Paranthaman R. et Indhumathi J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus spp.* *Indian Institute of Crop Processing Technology.*, 89-90.
- Vinoth R.S., Kanikkai R.A., Babu V.A., Manoj G.T., Naman H.S., Johnson A.J., Infant S.B. et Sathiyaseelan K. (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* 1: 8-13.
- Viswanathan, R., Rajitha, R., Ramesh Sundar, A., Ramamoorthy, V., (2003). Isolation and identification of endophytic bacterial strains from sugarcane stalks and their In vitro antagonism against the red rot pathogen. *Sugarcane* 5, 2529.

- Vogel, C., Müller, D. B., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual review of genetics*, 50, 211-234.
- Vrain T.C., Barker K.R., Holtzman G.I., (1978). Influence of low temperature on rate of development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* larva. *Journal of Nematology* 10 : 166–171
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Wyss U., Grundler F., Munch A., (1992). The parasitic behaviour of 2nd-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38 : 98-111.
- Yaniv, Z., Shabelsky, E., Schafferman, D. (1999). Colocynth: Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. *Journal of Janich(ed) Perspectives on new crops and new uses. J. Janick* (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA. pp: 257-p261.
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Kobayashi, H., Nakamura, A., Matsuhira, K., Nakamura, S., Matsuda, H. (2007). Bioactive saponins and glycosides. XXVII. Structures of new cucurbitane- type triterpene glycosides and antiallergic constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55: 428-434.
- Younesi H.M., Zadah H., (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Corcus sativas* L. stigma and petrol extracts in mice. *BMC pharmacology*, 2(7) :1-8.
- Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H, Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58: 45-54.
- Zohary, D. Hopf, M. (2000). Domestication of Plants in the Old World. Oxford University Press, Oxford, UK.

Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture**Composition du milieu King B en (g/l) pH =7,2**

Peptone (Difco).....	20 g
Glycérol (prolabo)	15 ml
K ₂ HPO ₄ (sigma)	1,5 g
MgSO ₄ (sigma)	1,15 g
Agar (sigma)	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Composition du milieu Ashby sans azote en (g/l)

Mannitol	20 g
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	0,20 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	0,200 g
Chlorure de sodium (NaCl)	0,200 g
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄).....	0,10 g
Carbonate de calcium (CaCO ₃)	5 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Composition de milieu pour le test d'amylase (Gélose à base d'amidon contenant en g/l)

KNO ₃	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
FeCl ₃	0,001g
Amidon soluble	10 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

Solution de Lugol

1 g d'idoine cristallin,
2 g de KI,
300 ml d'eau distillée

Composition de milieu pour l'activité estérasique et lipasique

Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl 2H ₂ O	0,1 g
Agar	18 g
Tween 80 (1%, v/v).	
Tween 20 (1%, v/v).	

Annexe 02 : Statistiques de traitement des nématodes par l'extrait éthanolique de *Citrullus colosynthis*

Tableau 01 : Moyennes de mortalité des nématodes.

t ₁	Dose	400 µl	200 µl	100 µl	t ₂	400 µl	200 µl	100 µl	t ₃	400 µl	200 µl	100 µl
	Control	0	0	0		0	0	0		0	0	0
4h		48	36	15	8h	61	54	21	12h	100	80	54
		52	29	18		59	42	24		100	77	61
		63	31	20		67	45	30		100	82	64
Moyennes		54,33	32	17,67		62,33	47	25		100	79,67	59,67

Tableau 02 : Test de comparaison des moyennes (Fischer, LSD).

Doses	Moyennes estimées	Ecart types	Groupes homogènes		
D1	72,2222	6,2454	A		
D2	52,8889	6,2454	A	B	
D3	34,1111	6,2454		B	C
Control	0	10,8173			C

Résumé

Les nématodes à galles (*Meloidogyne spp.*) sont l'un des organismes nuisibles les plus répandus limitant la productivité agricole mondiale ; et leur maîtrise à l'avenir dépendra dans une large mesure du développement continu de variétés résistantes ainsi que de pratiques de gestion prudentes reposant moins sur les plantes des stratégies intégrées pour lutter contre les agents pathogènes. Jusqu'à présent, les nématicides systémiques conventionnels étaient facilement utilisés par les travailleurs précédents dans plusieurs cultures pour la gestion du nématode cécidogène. Cependant, des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine limitent l'utilisation de tels nématicides.

Par conséquent, dans la présente étude, l'effet de deux souches de PGPR sur les nématodes a été testé et aucun effet n'a été démontré sur les nématodes.

La propriété biopesticide de l'extrait de feuille de *Citrullus colocynthis* sur le nématode genre *Meloidogyne incognita* a été mise en œuvre, les résultats ont montré que la plante de *Citrullus colocynthis* jouent un rôle très efficace dans la mortalité des nématodes et pourraient constituer la meilleure alternative aux pesticides chimiques.

Les mots clés : nématodes, *Meloidogyne incognita*, *Citrullus colocynthis*, extrait éthanolique, mortalités.

Abstract

Root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) are one of the most prevalent pests limiting global agricultural productivity and their control in the future will depend to a large extent on the continued development of resistant varieties and prudent management practices. less on planting integrated strategies for controlling pathogens. Until now, conventional systemic nematicides have been readily used by previous workers in several crops for the management of the root-knot nematode. However, adverse effects on the environment and human health limit the use of such nematicides.

Therefore, in this investigation the effect of two strains of PGPR on nematodes was tested and no effects were demonstrated on nematodes.

The biopesticide property of the leaf extract of *Citrullus colocynthis* on the genus *Meloidogyne incognita* nematode was implemented, the results showed that *Citrullus colocynthis* plant play a very effective role in nematode mortality and could be the best alternative to chemical pesticides.

Key words: nematodes, *Meloidogyne incognita*, *Citrullus colocynthis*, ethanolic extract, mortalities.

ملخص

تعتبر النيوماتودا ذات العقد الجذرية (*Meloidogyne spp.*) واحدة من أكثر الآفات انتشاراً التي تحد من الإنتاجية الزراعية العالمية وسيعتمد التحكم فيها في المستقبل إلى حد كبير على التطوير المستمر للأنواع المقاومة والمارسات الزراعية الحكيمة. أقل على زرع استراتيجيات متكاملة للسيطرة على مسببات الأمراض. حتى الآن ، تم استخدام المبيدات الفطرية الجهازية التقليدية بسهولة من قبل العمال السابقين في العديد من المحاصيل لإبادة النيوماتودا ذات العقد الجذرية. ومع ذلك ، فإن الآثار الضارة على البيئة وصحة الإنسان تحد من استخدام هذه المبيدات. لذلك ، في هذا العمل تم اختبار تأثير سلالتين من PGPR على الديدان الخيطية والتي لم تظهر أي آثار على هذه الأخيرة.

أظهرت النتائج أن خاصية المبيد الحيوي لمستخلص أوراق *Citrullus colocynthis* على النيوماتودا من جنس *Meloidogyne incognita* قد تم نجحت في قتل الديدان الخيطية، وأظهرت النتائج أن نبات *Citrullus colocynthis* تلعب دوراً فعالاً للغاية في وفيات النيوماتودا ويمكن أن تكون البديل الأفضل إلى المبيدات الكيميائية.

الكلمات المفتاحية: النيوماتودا ، *Meloidogyne incognita* ، *Citrullus colocynthis* ، المستخلص الطبيعي، الوفيات.