

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri-Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et de Microbiologie

N° d'ordre : 141/TS/2012

N° de série : 03/MIC/2012

**Thèse**

Présentée pour l'obtention **Du Diplôme de Doctorat en Sciences**

**En Biochimie et Microbiologie Appliquées**

Présentée par

**Lamia AOUAR**

L'intitulé :

**Isolement et identification des actinomycètes  
antagonistes des microorganismes phytopathogènes**

**Soutenu le : 27 Novembre 2012**

**Devant le jury**

Président :	Mr. DEHIMAT Laid	Prof. Univ. Mentouri-Constantine
Rapporteur :	Mr. BOULAHROUF Abderrahmane	Prof. Univ. Mentouri-Constantine
Examineurs :	Mr. GUECHI Abdelhadi	Prof. Univ. Ferhat Abas-Sétif
	Mr. ARHAB Rabah	M.C. Univ. Larbi ben M'hidi-OEB
	Mr. BRANES Zidane	M.C. Univ. Badji Mokhtar-Annaba

**2012- 2013**

*"Il faut toujours viser la lune,  
car même en cas d'échec  
on atterrit au milieu des étoiles"*

**(Oscar wilde)**

*Je dédie affectueusement cette thèse*

*À mon défunt père*

*À ma mère*

*À ma sœur et mes frères*

*À toute ma famille*

*J'adresse à tous un grand merci pour tout.*

## **Remerciements**

*Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur Abderrahmane BOULAHROUF, pour m'avoir guidé et conseillé et pour ses précieux conseils qui m'ont été tout le temps fructueux. Monsieur BOULAHROUF, merci pour m'avoir supporté et m'avoir guidé pendant six ans vous méritez Professeur ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.*

*Également, j'adresse mes vifs remerciements à Monsieur, Ammar OUFFROUKH qui m'a accueilli dans son laboratoire de l'INRAA unité de recherche Constantine. Un simple mot de merci n'est pas suffisant pour vous exprimer ma gratitude.*

*C'est avec un grand plaisir que je témoigne ici toute ma reconnaissance au Professeur Carole BEAULIEU qui m'a ouvert son laboratoire au cours de mes séjours à Sherbrooke avec beaucoup d'hospitalité. Madame BEAULIEU, je vous remercie beaucoup pour votre contribution à ce travail qui était fructueux, et pour vos idées et vos remarques pertinentes que vous n'avez jamais hésité à me les donner avec un grand cœur généreux, vous méritez Professeur tout mon profond respect et toute ma reconnaissance.*

*Mes sincère remerciements sont adressés au Professeur DEHIMAT Laid de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*J'adresse mes remerciements aux : Professeur GUECHI Abdelhadi, Docteur ARHAB Rabah et Docteur BRANES Zidane qui ont accepté d'examiner et de juger mon travail.*

*Je remercie le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour le soutien financier dans le cadre d'une bourse résidentielle à l'étranger.*

*J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide, surtout à Fateh MEROUANE.*

## **Avant propos**

Les principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu :

### **Publication**

**Lamia Aouar, Sylvain Lerat, Ammar Ouffroukh, Abderrahmane Boulahrouf and Carole Beaulieu (2012).** Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* **34(2)**, 165-176. Doi :10.1080/07060661.2012.681396.

### **Communications**

- **Aouar L., Boulahrouf A. & Ouffroukh A.** Activité antifongique des actinomycètes rhizosphériques isolés de l'abricotier (*Prunus armeniaca*) et du pêcher (*Prunus persica*). Séminaire International sur la Valorisation des Ressources Naturelles des Zones Semi-Arides. *Oum-El-Bouaghi, 3-4 novembre 2008.*
- **Aouar L., Boulahrouf A. & Ouffroukh A.** Identification moléculaire des actinomycètes actifs vis-à-vis des champignons phytopathogènes. Séminaire Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire. *Constantine, 13-14, Octobre 2009.*
- **Aouar L., Boulahrouf A. & Ouffroukh A.** Isolement à partir de la rhizosphère des actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes 15èmes Journées Nationales de Microbiologie. *Béjaia, 15-16 Novembre 2009.*

# Table des matières

	<b>Pages</b>
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b>	<b>5</b>
<b>1. La rhizosphère</b>	<b>5</b>
1.1. Les exsudats racinaires	5
1.2. La microflore rhizosphérique	6
1.2. Les actinomycètes rhizosphériques	6
1.3. Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère	7
1.4.1. Commensalisme	7
1.4.2. Mutualisme	7
1.4.3. Antagonisme	7
1.4.4. Compétition	8
1.4.5. Hyperparasitisme	8
1.4. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	8
<b>2. Propriétés générales des actinomycètes</b>	<b>9</b>
2.1. Morphologie	9
2.2. Physiologie et écologie	11
2.3. La reproduction chez les actinomycètes	13
2.4. Classification des actinomycètes	15
2.4.1. La classe " <i>Actinobacteria</i> "	15
2.4.2. Clés d'identification des genres et des espèces de l'ordre <i>Actinomycetales</i>	17
2.5. Rôle des actinomycètes en biotechnologie	19
2.5.1. Amélioration de la qualité du sol agricole	19
2.5.2. Production d'antibiotiques	20
<b>3. Les maladies phytopathogènes</b>	<b>20</b>
3.1. Les grands groupes des champignons phytopathogènes	22
3.1.1. Les champignons à plasmode ( <i>Plasmodiophoromycota</i> )	22
3.1.2. Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux cœnocytiqes	22

3.1.3. Les Ascomycota et Deuteromycota	23
3.1.4. Les Basidiomycota	25
3.2. Principaux taxons des bactéries phytopathogènes	25
3.3. Gale commune	26
3.3.1. Agents pathogènes causant la gale commune	26
3.3.2. Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune	28
3.3.3. Thaxtomines et pouvoir pathogène de <i>Streptomyces scabies</i>	30
3.3.4. Biosynthèse des thaxtomines	31
3.3.5. Organisation des gènes liés à la virulence chez <i>Streptomyces scabies</i>	31
<b>4. La lutte biologique</b>	<b>34</b>
4.1. Définition	34
4.2. L'intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes	35
4.3. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique	37
4.3.1. Antibiose	37
4.3.2. Compétition	38
4.3.3. Parasitisme	38
4.3.4. Induction des systèmes de résistances de la plante hôte	39
4.3.5. Diminution de l'agressivité du pathogène	40
4.4. Les microorganismes de lutte biologique les plus utilisés	40
4.5. Les actinomycètes agents de lutte biologique	42
<b>Chapitre 1 : Isolement et caractérisation des champignons phytopathogènes</b>	
<b>Introduction</b>	<b>48</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>50</b>
<b>1. Prospection et échantillonnage</b>	<b>50</b>
1.1. Les grandes cultures	50
1.2. Les cultures maraîchères	50
<b>2. Pré-traitement et mise en culture des échantillons</b>	<b>52</b>
<b>3. Purification des isolats fongiques</b>	<b>52</b>
<b>4. Conservation des isolats</b>	<b>52</b>
<b>5. Caractérisation des isolats fongiques</b>	<b>53</b>
<b>Résultats</b>	<b>53</b>
Isolement et caractérisation des champignons phytopathogènes	53

<b>Discussion</b>	<b>59</b>
-------------------	-----------

## **Chapitre 2 : Isolement des actinomycètes et criblage des isolats antagonistes**

<b>Introduction</b>	<b>63</b>
---------------------	-----------

<b>Matériel et méthodes</b>	<b>64</b>
-----------------------------	-----------

<b>1. Isolement des actinomycètes rhizosphériques</b>	<b>64</b>
---	-----------

1.1. Échantillonnage	64
----------------------	----

1.2. Dilution et mise en culture	64
----------------------------------	----

1.3. Purification et conservation des souches	64
---	----

1.4. Préparation d'un stock de spores de souches d'actinomycètes	66
--	----

<b>2. Criblage d'actinomycètes antagonistes des champignons phytopathogènes</b>	<b>66</b>
---	-----------

<b>3. Étude statistique</b>	<b>67</b>
-----------------------------	-----------

<b>4. Spectre d'inhibition de la croissance d'espèces bactériennes et fongiques par les souches d'actinomycètes antagonistes sélectionnées</b>	<b>67</b>
--	-----------

<b>Résultats</b>	<b>68</b>
------------------	-----------

1. Isolement et purification des actinomycètes rhizosphériques	68
--	----

2. Criblage des isolats antagonistes	70
--------------------------------------	----

3. Activité antimicrobienne des isolats actinomycétales sélectionnés	73
--	----

<b>Discussion</b>	<b>73</b>
-------------------	-----------

## **Chapitre 3 : Identification polyphasique des isolats antagonistes sélectionnés**

<b>Introduction</b>	<b>78</b>
---------------------	-----------

<b>Matériel et méthodes</b>	<b>79</b>
-----------------------------	-----------

<b>1. Étude morphologique des six isolats antagonistes sélectionnés</b>	<b>79</b>
---	-----------

1.1. Aspect macroscopique	79
---------------------------	----

1.1.1. Détermination de la couleur du mycélium aérien	79
---	----

1.1.2. Détermination de la couleur du mycélium du substrat	79
--	----

1.1.3. Pigments diffusibles et pigments mélanoides	79
--	----

1.2. Aspect microscopique	80
---------------------------	----

1.2.1. Microscopie optique (technique des lamelles)	80
---	----

1.2.2. Microscopie électronique	80
---------------------------------	----

<b>2. Études physiologique et biochimique des six isolats antagonistes sélectionnés</b>	<b>81</b>
---	-----------

2.1. Préparation de l'inoculum lavé	81
2.2. Utilisation de sources de carbone	81
2.3. Utilisation de sources azotées	81
2.4. Les activités enzymatiques	82
2.5. Les activités de dégradation	82
2.6. Les caractéristiques environnementales	82
2.7. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques	82
2.8. La résistance aux antibiotiques	83
<b>3. Étude chimiotaxonomique</b>	<b>83</b>
a. Préparation des cellules	83
b. Détermination des acides aminés des cellules entières	84
c. Détermination des sucres des cellules entières	84
<b>4. Étude phylogénétique</b>	<b>85</b>
4.1. Extraction de l'ADN	85
4.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN	85
4.3. Détermination du % en GC	86
4.4. Amplification des séquences d'ADNr 16S par la paire d'amorces universelles	86
4.5. Électrophorèse sur gel d'agarose	88
4.6. Le séquençage	88
4.7. Analyse des séquences	90
4.8. Amplification du gène de l'ARNr 16S des souches affiliées au genre <i>Streptomyces</i> avec la paire d'amorces spécifique aux <i>Streptomyces</i>	90
<b>Résultats</b>	<b>92</b>
1. Identification des isolats antagonistes sélectionnés	92
1.1. Caractères morphologiques et cultureux	92
1.1.1. Aspect macroscopique	92
1.1.2. Pigments solubles et pigments mélanoides	94
1.2. Aspect microscopique	94
1.2.1. Technique des lamelles	94
1.2.2. Microscopie électronique	96
1.3. Caractères physiologiques et biochimiques	99
1.4. Caractères environnementaux	102
2. La chimiotaxonomie	107
3. Étude phylogénétique	107
3.1. Pureté et dosage de l'ADN génomique extrait	107

3.2. La détermination du contenu en GC% de l'ADN génomique	107
3.3. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S avec des amorces universelles	107
3.4. Amplification du gène de l'ARNr 16S des souches affiliées au genre <i>Streptomyces</i> avec des amorces spécifiques aux <i>Streptomyces</i>	116
<b>Discussion</b>	<b>122</b>
 <b>Chapitre 4 : Antagonisme <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> vis-à-vis <i>Streptomyces scabies</i> EF-35</b>	
<b>Introduction</b>	<b>131</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>132</b>
<b>1. Antagonisme <i>in vitro</i> contre <i>S. scabies</i> EF-35</b>	<b>132</b>
1.1. Méthode de strie verticale (croisement)	132
1.2. Technique des cylindres d'agar	132
1.3. Technique des puits	132
1.4. Technique des disques de diffusion	133
<b>2. Antagonisme <i>in planta</i> des actinomycètes sélectionnés contre <i>S. scabies</i></b>	<b>134</b>
2.1. Stérilisation et germination des radis	134
2.2. Pré-cultures d'actinomycètes antagonistes et de <i>Streptomyces scabies</i> EF-35	134
2.3. Montage des pochettes de croissance	134
2.4. Scan des pochettes et analyse des images par WinRhizo	135
2.5. Étude statistique	135
<b>3. Bioautographie des extraits actifs contre <i>S. scabies</i></b>	<b>136</b>
<b>4. Extraction et caractérisation préliminaire des molécules actives</b>	<b>137</b>
 <b>Résultats</b>	 <b>137</b>
1. Antagonisme <i>in vitro</i> des isolats contre <i>S. scabies</i> EF-35	137
2. Effet <i>in planta</i> des actinomycètes antagonistes sur la croissance des radis	139
3. Antagonisme <i>in planta</i> des actinomycètes sélectionnés contre <i>S. scabies</i> EF-35	142
4. Bioautographie des isolats actifs contre <i>Streptomyces scabies</i> et extraction des molécules actives	142
 <b>Discussion</b>	 <b>145</b>

<b>Chapitre 5 : Effet du surnageant de la souche antagoniste LacI sur la production de la thaxtomine A par <i>Streptomyces scabies</i> EF-35</b>	
<b>Introduction</b>	<b>149</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>151</b>
<b>1. Effet du surnageant de LacI sur l'expression du gène de la thaxtomine A (<i>nos</i>)</b>	<b>151</b>
1.1. La culture de la souche <i>S. scabies</i> EF-35	151
1.2. Extraction des ARN totaux	151
1.3. Électrophorèse des ARN extraits sur gel de formaldéhyde (FA gel)	152
1.4. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	152
1.5. Amplification des ADNc par PCR	153
1.6. Extraction de l'ADN génomique de la souche EF-35	155
1.7. Étude de l'expression du gène <i>nos</i> par la PCR quantitative en temps réel	155
1.8. Analyse des résultats	155
<b>2. Effet du surnageant de LacI sur la production de la thaxtomine A</b>	<b>155</b>
2.1. Production de la thaxtomine A	155
2.2. Extraction de la thaxtomine A	157
2.3. Quantification de la thaxtomine par HPLC	157
2.4. La courbe étalon de la thaxtomine A	157
<b>Résultats</b>	<b>157</b>
1. Extraction et dosage des ARN totaux	157
2. Électrophorèse des ARN extraits sur gel de formaldéhyde	159
3. Synthèse des ADNc et amplification par PCR	159
4. Étude de l'expression du gène <i>nos</i> par la PCR quantitative en temps réel	161
5. Extraction et quantification de la thaxtomine A	163
<b>Discussion</b>	<b>166</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>168</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>172</b>
<b>Annexes</b>	<b>202</b>
<b>Résumés</b>	<b>218</b>

## Liste des abréviations

Ba(OH) <sub>2</sub> :	hydroxyde de baryum
BaSO <sub>4</sub> :	sulfate de baryum
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
CaCl <sub>2</sub> :	chlorure de calcium
CaCO <sub>3</sub> :	carbonate de calcium
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :	nitrate de calcium
Ct:	cycle du seuil
CuSO <sub>4</sub> :	sulfate de cuivre
D.A.P:	acide 2,6-diaminopimélique
ddNTP :	didésoxynucléotides
DDT:	dithiothreitol
DEPC :	pyrocarbonate d'éthyl
DMSO:	diméthylsulfoxyde
dNTP:	désoxyribonucléotide
EDTA:	acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique
FeSO <sub>4</sub> :	sulfate de fer
HCl:	acide chlorhydrique
HgCl <sub>2</sub> :	chlorure de mercure
HPLC:	chromatographie liquide à haute performance
I.S.P:	International <i>Streptomyces</i> Project
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	phosphate dipotassique
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	phosphate monopotassique
KNO <sub>3</sub> :	nitrate de potassium
LSD:	différence minimale significative
MEGA:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgSO <sub>4</sub> :	sulfate de magnésium
MnCl <sub>2</sub> :	chlorure de manganèse

MOPS:	3-[N-morpholino] propanesulfonic acid
NaCl:	chlorure de sodium
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	sulfate d'ammonium
NH <sub>4</sub> Cl:	chlorure d'ammonium
NOS:	oxyde nitrique synthase
P/V:	poids par volume
PCR:	Polymerase Chain Reaction
Rf:	rapport frontal
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SET:	saline /EDTA/ Tris-HCl
SSC:	sodium saline citraté
TAE:	tris-acétate EDTA
TE:	tris/EDTA
T <sub>m</sub> :	température de fusion
Tris:	2-amino-2-hydroxyméthyl-1, 3-propanediol
V/V:	volume par volume
ZnSO <sub>4</sub> :	sulfate de zinc

## Liste des figures

	Pages
<b>Figure 1:</b> différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008).	10
<b>Figure 2:</b> les classes morphologiques de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivé en milieu liquide (Pamboukian <i>et al.</i> , 2002).	12
<b>Figure 3:</b> cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide (Hopwood <i>et al.</i> , 1985).	14
<b>Figure 4:</b> les symptômes de la gale commune de la pomme de terre: (A) superficielle; (B) surélevée; (C) profonde (Loria <i>et al.</i> , 1997).	27
<b>Figure 5:</b> les structures des thaxtomines majeures produites par les souches de <i>Streptomyces</i> pathogènes des plantes (Healy <i>et al.</i> , 2000).	29
<b>Figure 6:</b> la région toxicogénique de l'îlot de pathogénicité codant pour la biosynthèse de la thaxtomine A chez les <i>Streptomyces</i> pathogènes (Loria <i>et al.</i> , 2008).	33
<b>Figure 7:</b> les échantillons, (a) feuilles d'orge avec des taches helminthosporiennes; (b) plantules des pastèques flétris; (c) gousses de fèves avec les taches chocolat (tan spot).	51
<b>Figure 8:</b> aspect des colonies fongiques avant la purification, (a) feuilles de blé dur; (b) feuilles d'orge; (c) racines d'avoine.	54
<b>Figure 9:</b> observation microscopique de l'isolat <i>Bipolaris sorokiniana</i> .	56
<b>Figure 10:</b> observation de l'isolat <i>Drechslera teres</i> (a) aspect macroscopique; (b) aspect microscopique.	56
<b>Figure 11:</b> observation de l'isolat <i>F. oxysporum</i> (a) conidiophore; (b) les macroconidies; (c) microconidies; (d) chlamydospores.	58
<b>Figure 12:</b> observation des macroconidies de l'isolat <i>Microdochium nivale</i> .	58
<b>Figure 13:</b> observation de l'isolat <i>F. culmorum</i> , (a) aspect macroscopique; (b) sporodochies; (c) les chlamydospores.	58
<b>Figure 14:</b> observation de l'isolat <i>B. fabae</i> , (a) aspect macroscopique; (c) les sclérotés.	58
<b>Figure 15:</b> Effet antagoniste des isolats actinomycétales sur la croissance des	72

champignons phytopathogènes, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes (test LSD) (a) <i>F. culmorum</i> , (b) <i>M. nivale</i> , (c) <i>F. oxysporum</i> , (d) <i>D. teres</i> , (e) <i>V. dahliae</i> , (f) <i>B. sorokiniana</i> , (g) <i>B. fabae</i> .	
<b>Figure 16:</b> la courbe de dissociation des bases G et C de l'ADN génomique des six isolats.	87
<b>Figure 17:</b> aspect macroscopique des isolats sur milieux ISP <sub>2</sub> , (a) l'isolat Lac1; (b) l'isolat Lac3; (c) l'isolat Vic8; (d) l'isolat Pin10; (e) l'isolat Pru14 et (f) l'isolat Pru14.	95
<b>Figure 18:</b> morphologie microscopique des isolats actinomycétales (a) Lac1; (b) Lac3; (c) Vic8; (d) Pin10; (e) Pru14; (f) Pru16.	97
<b>Figure 19:</b> la morphologie des chaînes de spores : (a) <i>Streptomyces griseus</i> Lac1; (b) <i>Streptomyces rochei</i> Lac3; (c) <i>Streptomyces anulatus</i> Pru14; (d) <i>Streptomyces champavatii</i> Pru16; (e) <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> Vic8; (f) <i>Nocardioopsis alba</i> Pin10, après 21 jours de croissance, la barre représente 1 µm.	98
<b>Figure 20:</b> la sensibilité antimicrobienne des isolats Pin10, Lac1 et Lac3.	108
<b>Figure 21:</b> résultats de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S des six souches antagonistes. Marqueur moléculaire (canal 1 et canal 9); souche Lac1 (canal 2); souche Lac3 (canal 3); souche Vic8 (canal 4); souche Pru14 (canal 5); souche Pru16 (canal 6); souche Pin10 (canal 7); témoin (canal 8).	110
<b>Figure 22:</b> arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant les positions des souches antagonistes Lac1, Lac3, Vic8, Pru14, Pru16 et Pin10. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de <i>Bacillus subtilis</i> a été utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap.	113
<b>Figure 23:</b> l'ADN ribosomal 16S des souches antagonistes. Marqueur Moléculaire (canal 1); souche Lac1 (canal 2); souche Lac3 (canal 3); souche Pru14 (canal 4); souche Pru16 (canal 5).	117
<b>Figure 24:</b> arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant les positions des souches antagonistes Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de <i>Bacillus subtilis</i> a été utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap.	120
<b>Figure 25:</b> les graines de radis germinées sur milieu Agar-Eau.	135

<b>Figure 26</b> : technique d'antagonisme des stries croisées (a): Pru14; (b): Lac1; (c): Pru16.	138
<b>Figure 27</b> : technique des cylindres d'Agar (a): Lac1; (b): Pru14.	140
<b>Figure 28</b> : résultats d'antagonisme, (a): technique des puits; (b): technique des disques de diffusion Pru14; (c): technique des disques de diffusion Lac1.	140
<b>Figure 29</b> : effet des isolats antagonistes sur la croissance des radis.	141
<b>Figure 30</b> : effet des isolats sur la croissance des racines de radis inoculées par <i>S. scabies</i> (a): Lac1; (b): Pru14; (c): témoin positif; (d): Pin10.	143
<b>Figure 31</b> : bioautogramme de l'extrait de Lac1 contre <i>Streptomyces scabies</i> EF-35.	146
<b>Figure 32</b> : chromatogramme de la molécule active de l'isolat Lac1 et la chromomycine A <sub>3</sub>	146
<b>Figure 33</b> : courbe étalon de la thaxtomine A.	158
<b>Figure 34</b> : électrophorèse des ARN ribosomiaux de <i>S. scabies</i> EF-35 sur gel de formaldéhyde : marqueur moléculaire 10000 paires de bases (canal 1); ARN de 24 heures (canaux 1, 2,3); ARN de 48 heures (canaux 4, 5 et 6); ARN de 72 heures (canaux 7, 8 et 9).	160
<b>Figure 35</b> : les produits d'amplification des 09 échantillons, (A) du gène <i>nos</i> des ADNc; (B) du gène <i>gyr</i> des ADNc.	160
<b>Figure 36</b> : la courbe de dissociation des amplicons des gènes <i>nos</i> et <i>gyr</i> .	162
<b>Figure 37</b> : résultats de l'amplification par q RT-PCR.	162
<b>Figure 38</b> : taux d'expression du gène <i>nos</i> en présence du surnageant de Lac1.	164
<b>Figure 39</b> : chromatographie sur couche mince de l'extrait de la souche <i>S. scabies</i> EF-35.	164
<b>Figure 40</b> : chromatogramme d'HPLC (A): la thaxtomine A témoin; (B): l'extrait de la souche <i>S. scabies</i> EF-35.	164
<b>Figure 41</b> : spectre d'absorption caractéristique de la thaxtomine A.	165

## Liste des tableaux

	Pages
<b>Tableau 1:</b> la classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (Garrity <i>et al.</i> , 2004).	16
<b>Tableau 2:</b> différents types de parois et leurs constituants majeurs chez les actinomycètes (Murray <i>et al.</i> , 1989).	18
<b>Tableau 3:</b> quelques antibiotiques produits par des actinomycètes non- <i>Streptomyces</i> (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b).	21
<b>Tableau 4:</b> quelque agents antagonistes commercialisés sous forme de produits biologiques utilisés dans le traitement de certaines maladies phytopathogènes (Sabaratnam et Traquair, 2002; Jijakli, 2003; Punja et Utkhede, 2003).	36
<b>Tableau 5:</b> agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes (Errakhi, 2008).	41
<b>Tableau 6:</b> le biocontrôle des maladies fongiques par les actinomycètes non- <i>Streptomyces</i> (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b).	43
<b>Tableau 7:</b> les antibiotiques produits par les actinomycètes utilisés en biocontrôle (Copping et Menn, 2000; Errakhi, 2008).	45 - 47
<b>Tableau 8:</b> les échantillons collectés, leurs sites de prélèvement et les symptômes des maladies évoquées.	51
<b>Tableau 9:</b> les champignons phytopathogènes isolés et leurs plantes hôtes.	60
<b>Tableau 10:</b> les sites et les plantes des sols rhizosphériques explorés.	65
<b>Tableau 11:</b> nombre d'isolats d'actinomycètes isolés des différents sols rhizosphériques.	69
<b>Tableau 12:</b> antagonisme des 72 isolats d'actinomycètes vis-à-vis des champignons phytopathogènes.	71
<b>Tableau 13:</b> activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cliniques.	74
<b>Tableau 14:</b> activité antimicrobienne vis-à-vis des champignons pathogènes.	74
<b>Tableau 15:</b> activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries phytopathogènes.	74

<b>Tableau 16:</b> activité antimicrobienne vis-à-vis des souches actinomycétales.	74
<b>Tableau 17:</b> spécificité et description des amorces universelles utilisées.	89
<b>Tableau 18:</b> la composition du milieu réactionnel de la PCR.	89
<b>Tableau 19:</b> les cycles d'amplification employés.	89
<b>Tableau 20:</b> paire d'amorces spécifiques aux Streptomycètes.	91
<b>Tableau 21:</b> aspect macroscopique des isolats antagonistes.	93
<b>Tableau 22:</b> aspect microscopique des souches actinomycétales purifiées.	95
<b>Tableau 23:</b> résultats de l'utilisation des sucres à 1%.	100
<b>Tableau 24:</b> résultats de l'utilisation de sources d'azote.	101
<b>Tableau 25:</b> résultats des activités enzymatiques.	103
<b>Tableau 26:</b> résultats des activités de dégradation.	103
<b>Tableau 27:</b> résultats de la croissance à différents températures et pHs.	104
<b>Tableau 28:</b> résultats de la croissance en présence d'inhibiteurs.	106
<b>Tableau 29:</b> résultats de la sensibilité aux antibiotiques.	106
<b>Tableau 30:</b> résultats des Tm et GC%.	108
<b>Tableau 31:</b> affiliation phylogénétique des six isolats antagonistes (amorces universelles).	111
<b>Tableau 32:</b> matrice de distances génétiques bactériennes calculées selon Kimura du programme MEGA 4 pour les six isolats.	115
<b>Tableau 33:</b> affiliation phylogénétique des quatre isolats <i>Streptomyces</i> .	118
<b>Tableau 34:</b> matrice de distances génétiques bactériennes calculées selon Kimura du programme MEGA 4 pour les quatre isolats <i>Streptomyces</i> .	121
<b>Tableau 35:</b> effet antagoniste des isolats actinomycétales sur la croissance des racines de radis inoculées par <i>S. scabies</i> EF-35.	144
<b>Tableau 36:</b> spécificité et description des amorces <i>nos</i> et <i>gyr</i> .	154
<b>Tableau 37:</b> la composition du milieu réactionnel de la q RT-PCR.	156

**Tableau 38:** les résultats du dosage des ARN.

158

**Tableau 39:** résultats de la q RT-PCR des gènes *nos* et *gyr*.

162

**Tableau 40:** résultats du dosage de la thaxtomine A produite par *S. scabies* EF-35.

165

L'inquiétude envers les maladies phytopathogènes devient de plus en plus grave du fait de l'extension des cultures intensives (**Seitz et al., 1982; Alderman et al., 1996**). Les pertes économiques sont énormes. D'après la F.A.O. (1999) les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale, 70% des dommages étant d'origine fongique.

La majorité des maladies de plantes sont causées par les champignons telluriques, largement distribués dans le sol, provoquant les pourritures de cultures aussi ils endommagent de nombreuses espèces d'arbres forestiers. À l'instar des autres pays, les maladies dues aux champignons telluriques sont rencontrées en Algérie. Entres autres les fusarioses qui affectent diverses cultures: des lentilles (**Belabid et al., 2004**), du pois chiche (**Bouregghda et Bouzned, 2009**) et le palmier dattier (**Sabaou et al., 1983**). Par ailleurs, l'helminthosporiose (**Bouzerzour, 1994**), les taches chocolat (**Bouznad, 2001**) et la verticilliose (**Bellahcene et al., 2005**) menacent les cultures en Algérie.

En plus des maladies fongiques, certaines bactéries sont recensées comme étant des agents pathogènes des plantes tels que *Erwinia* spp., *Agrobacterium tumefaciens* et *Streptomyces scabies* (**Messiaen, 1991**). Ce dernier affecte plusieurs cultures maraîchères (carottes, radis, betterave, etc) et c'est l'agent responsable de la gale commune de la pomme de terre (**Goyer et Beaulieu, 1997; Lehtonen et al., 2004**).

La gale commune de la pomme de terre est une maladie répandue dans le monde. L'Algérie (**Bencheikh et Setti, 2005**), le Canada (**Goyer et al., 1996**), les États Unis, l'Afrique du Sud, l'Australie (**Loria et al., 1997**) les pays de l'Europe de l'Est et de l'Ouest (**Locci, 1994b**) et le Japon (**Tashiro et al., 1990**) sont des pays touchés par cette maladie. Les tubercules affectés par la gale commune sont considérés de moindre qualité ou ne sont pas vendables ce qui cause des dommages économiques importants pour les pays producteurs de pommes de terre (**Loria et al., 1997; Tashiro et al., 1990**).

Les microorganismes pathogènes et surtout les champignons telluriques, sont difficiles à contrôler, parce qu'ils peuvent survivre dans le sol pour de longues périodes (**Tschen, 1985**). Pour lutter contre ces maladies, l'application illimitée de pesticides dans les sols peut entraîner la pollution de l'environnement et les eaux souterraines. En outre, l'efficacité des fongicides chimiques est souvent compromise par l'émergence de pathogènes résistants. En raison de l'aggravation des problèmes en matière de contrôle des maladies fongiques, une recherche sérieuse est nécessaire pour identifier des méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui sont moins dépendantes des produits chimiques et sont plus respectueux à l'environnement (**Prapagdee et al., 2008**).

La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuse, elle consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes. Parmi ces derniers les actinomycètes sont les meilleurs candidats à appliquer sous forme de cellules vivantes. Ils sont connus pour leur production de métabolites bioactifs. Leur capacité à coloniser la rhizosphère et les racines des plantes, à contrôler les microorganismes phytopathogènes et à former des spores adaptées pour la formulation de produits stables, sont des caractères important pour la réussite du biocontrôle (**Yuan et Crawford, 1995; Emmert et Handelsman, 1999; Xiao et al., 2002; Bressan, 2003**). Un certain nombre de produits de lutte biologique (herbicides, fongicides, bactéricides, pesticides) basés sur les actinomycètes ont déjà atteint le marché (**Doumbou et al., 2001; Fravel, 2005 Kim et Hwang 2007, Koch et Löffler, 2009**).

Les actinomycètes sont des bactéries Gram-positif, caractérisés par un génome à teneur élevée en GC%. La plupart des membres de ce groupe sont saprophytes et le sol est leur principal réservoir (**Khamna et al., 2009**) et sont abondants dans la rhizosphère (**Sardi, 1992**). Cet environnement est considéré comme une source riche pour l'isolement des agents de biocontrôle et des promoteurs de croissance des plantes (**Crawford et al., 1993; Jiménez-Esquilin et Roane, 2005; Yilmaz et al., 2008**). Ainsi, les actinobactéries rhizosphériques du Maroc (**Errakhi et al., 2009; Loqman et al., 2009**), de Thaïlande (**Khamna et al., 2009**), du Royaume-Uni (**Crawford et al., 1993**), d'Égypte (**El-Mehalawy et al., 2004**), de Turquie (**Orakci et al., 2010**), du Canada (**Valois et al., 1996**)

et des États-Unis (**Jiménez-Esquilin et Roane, 2005**) ont été identifiés comme de potentiels agents de lutte biologique contre les agents phytopathogènes des plantes.

*Streptomyces* est le plus important genre des actinomycètes, il héberge 588 noms d'espèces valides et publiés. Il comprend des bactéries filamenteuses, qui sont bien connus pour leur capacité à produire des antibiotiques et des enzymes lytiques (**Rugthaworn et al., 2007**). Le genre *Streptomyces* a été largement exploré pour le criblage des agents de lutte biologique contre des maladies de plantes (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b**), 75% de composés biologiquement actifs sont produits par ce genre. Le mode d'action de ces agents de lutte biologique sont divers et comprennent l'antibiose, la compétition nutritionnelle ou spatiale, l'hyperparasitisme et la lyse des agents pathogènes (**Doumbou et al., 2001; Rugthaworn et al., 2007**).

Le territoire algérien est caractérisé par un écosystème méditerranéen au Nord, saharien au Sud et une région intermédiaire semi-aride. Cette région est caractérisée par de faibles précipitations annuelles (environ 320 mm par an) et une altitude de 900 à 1200 m. les moyennes minimale et maximale de la température sont de +4 et 33 ° C, respectivement (**Chibane et al., 2010**). La recherche des actinobactéries producteurs de nouveaux antibiotiques en Algérie a été menée dans divers environnements tels que les lacs, les sebkhas et le sol Saharien (**Kitouni et al., 2005; Boughachiche et al., 2005; Sabaou et al., 1983; Boudemagh et al., 2005; Rheghioua et al., 2006**).

Plusieurs actinobactéries ont été isolés à partir du sol du Sahara Algérien. Certains d'entre eux appartiennent aux genres rares tels que *Actinomadura*, *Nanomuraea*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (**Badji et al., 2005; Badji et al., 2007, Zitouni et al., 2005, Hacène et al., 2000; Hacène et al., 1998**). Certaines de ces souches produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes. À titre d'exemple, une nouvelle espèce *Saccharothrix algeriensis* NRLL B-24137 a été caractérisée (**Zitouni et al., 2004b**) et il s'est avéré qu'elle produit un nouvel antibiotique : le dithiolyrrolone (**Chorin, 2009**). En outre, pour certaines souches de *Saccharothrix* sp. et *Streptosporangium* sp., il a été démontré qu'elles synthétisent de nouvelles molécules

d'antibiotiques à savoir la mutactimycin PR et l'angucyclinone r2 (**Zitouni et al., 2004a, Boudjella et al., 2010**).

La diversité des actinobactéries dans les écosystèmes semi-arides, n'a pas été largement explorée. Ainsi, peu d'information sur le potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés à partir d'échantillon du sol non rhizosphérique ont été reportés (**Kitouni et al., 2005, Boughachiche et al., 2005**).

À notre connaissance, aucune recherche n'a portée sur l'isolement des actinomycètes de la rhizosphère des sols semi-arides de l'Est Algérien et sur leur éventuelle activité contre des microorganismes phytopathogènes. Pour cela nous avons choisi cette région pour mener notre étude, qui s'articule autour de deux axes principaux le premier correspond en la sélection et l'identification d'actinomycètes antagonistes vis-à-vis de champignons phytopathogènes isolées localement. Le second correspond à l'étude du rôle des actinomycètes sélectionnés dans la lutte biologique contre une souche de *Streptomyces scabies* EF-35, agent de la gale commune. Cette étude a été menée sur les radis comme plante modèle.

Ainsi, autour de ces deux axes s'articulent les objectifs, à atteindre, suivants :

- l'isolement et la caractérisation des champignons phytopathogènes,
- l'isolement d'actinomycètes à partir de différents sols rhisosphériques,
- criblage des isolats d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes isolés et identifiés,
- identification polyphasique des isolats d'actinomycètes par l'étude de leurs caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires,
- test d'antagonisme *in vitro* et *in planta* des isolats contre *S. scabies* EF-35,
- et enfin, étude de l'effet du surnageant d'une souche représentative antagoniste sur la production de la thaxtomine A par *S. scabies* EF-35.

## 1- La rhizosphère

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (**Campbell et Greaves 1990; Westover et al. 1997**). Elle se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines, et elle est, généralement, divisée en deux parties:

- La rhizosphère au sens strict correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.
- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines (**Soufiane, 1998**).

### 1-1- Les exsudats racinaires

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire (**Lesuffleur et al., 2007**). Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire (**Whipps, 1990**).

Les exsudats représentent la partie la plus importante des substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale. C'est également celle la plus rapidement métabolisée par les microorganismes. Ils sont généralement composés de sucres, d'acides aminés, de facteurs de croissance, de vitamines, d'enzymes et d'acides organiques. Ils représentent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique) (**Soufiane, 1998**).

Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones (**Lebuhn et al. 1997**), des vitamines ou des molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments (**Soufiane, 1998**).

## 1-2- La microflore rhizosphérique

La composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante. La démonstration en a été apportée par les travaux de Neal en 1973 sur les blés de printemps. Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  par gramme de sol (**Davet, 1996**). La densité des champignons est estimée à  $10^6$  par gramme de sol. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^3$  par gramme de sol.

Les bactéries filamenteuses ou actinomycètes; peuvent atteindre  $10^7$  unités par gramme de sol. Elles manifestent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins, cet antagonisme résulte de la sécrétion de substances antibiotiques.

## 1- 3- Les actinomycètes rhizosphériques

Généralement il est admis que dans le sol relativement sec, humique et calcaireux les actinomycètes représentent la fraction dominante de la microflore avec des cellules viables de l'ordre de  $10^6$ /g sol (**Goodfellow et Williams, 1983**). Cependant dans les sols submergés, anaérobiques ou acides le nombre est relativement faible  $10^2$ /g sol sec. **Williams et Wellington (1982)** ont rapporté que parmi les actinomycètes la fréquence d'isolement des *Streptomyces* est de 95,3%, des *Nocardia* de 1,98%, des *Micromonospora* de 1,4%, des *Actinoplanes* de 0,20%, des *Microbispora* de 0,18%, des *Actinomadura* de 0,10%, des *Streptosporangium* de 0,10%, *Thermoactinomyces* 0,14%, *Thermomonospora* 0,22% et des *Pseudonocardia* de 0,06%.

Souvent, un nombre important d'actinomycètes est rencontré dans la rhizosphère que dans le sol environnant, il dépend de l'espèce et de l'âge de la plante (**Goodfellow et Williams, 1983**). L'effet rhizosphérique est exprimé par le ratio R : S (Rhizosphère : Sol). Par exemple, le maïs et la fève abritent de 10 à 18 fois plus d'actinomycètes dans leur rhizosphère par rapport au sol avoisinant (**Abraham et Herr, 1964**). Le R:S des plantes sahariennes varie de 16 à 50 (**Watson et Williams, 1974**). Le pourcentage des

actinomycètes producteurs d'antibiotiques est significativement plus élevé chez les isolats rhizosphériques, par comparaison avec ceux du sol avoisinant (**Basil et al., 2004**).

#### **1-4- Les interactions entre les microorganismes de la rhizosphère**

Au niveau de la rhizosphère qui est une zone riche en matière organique et où les populations microbiennes sont très abondantes. Les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et très intenses, ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (**Curl et Truelove, 1986**). Les interactions sont les suivantes :

##### **1-4-1- Commensalisme**

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc...) par un micro-organisme rendant ainsi un climat favorable pour le développement d'un autre. Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres (**Curl et Truelove, 1986**).

##### **1-4-2- Mutualisme**

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse aux microorganismes partenaires, exemple : de *Proteris vulgaris* qui a besoin de biotine, mais qui synthétise l'acide nicotinique requis par *Bacillus polymyxa* qui le transforme en biotine (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

##### **1-4-3- Antagonisme**

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte (**Curl et Truelove, 1986**). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

#### **1-4-4- Compétition**

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère. La fréquence élevée des *Fusarium* dans la rhizosphère serait due au pouvoir compétitif de ce champignon (Dommergues et Mangenot, 1970).

#### **1-4-5- Hyperparasitisme**

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme (Gagné, 1984).

#### **1-5-Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)**

Les rhizobactéries sont fortement stimulées par l'effet rhizosphérique. Elles activent la croissance des plantes, influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Dommergues et Mangenot 1970).

Les PGPR améliorent la croissance des plantes directement ou indirectement. La promotion indirecte se produit lorsque ces bactéries empêchent ou diminuent les effets nocifs des microorganismes phytopathogènes par colonisation et production d'antibiotiques. La promotion directe consiste à améliorer la croissance des plantes. Elle se fait soit en fournissant à la plante des phytohormones favorisant la croissance végétale ou de faciliter l'absorption de certains éléments nutritifs de l'environnement par production de sidérophores ou par fixation d'azote (Doubou *et al.*, 2001). Les modes d'action des PGPR sont : la production de phytohormones (Frankenberger et Arshad, 1991), la production de sidérophore (O'Sullivan et O'Gara, 1992; Loper et Henkels, 1999), la solubilisation du phosphate (Kloepper *et al.*, 1989), l'inhibition des microorganismes

pathogènes (**Antoun et al. 1980; Crawford et al., 1993**) et la détoxification du milieu (**Beauchamp, 1993**).

## **2- Propriétés générales des actinomycètes**

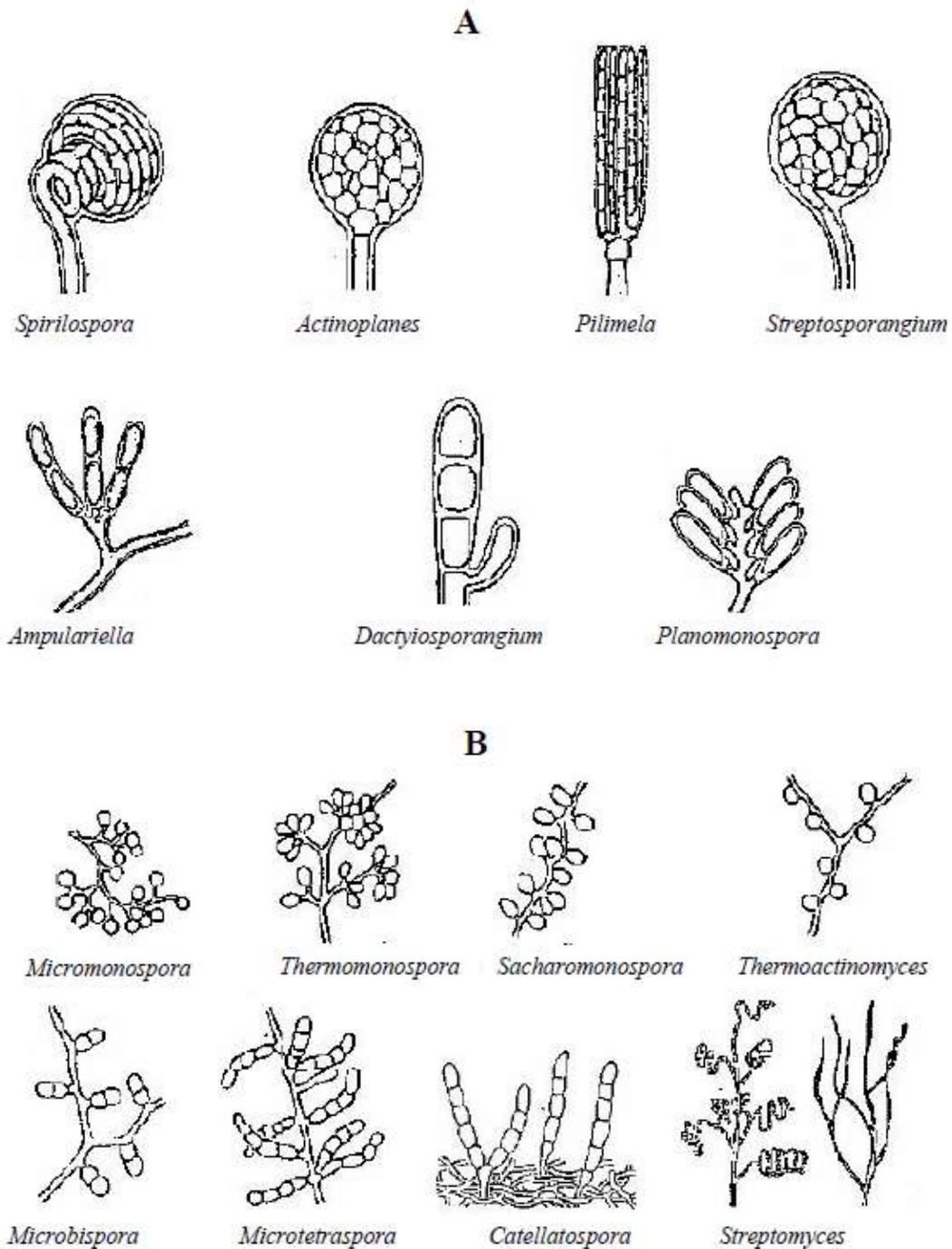
### **2-1- Morphologie**

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifié. Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**). Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

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

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges tel que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales (**Figure 1**). De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou



**Figure 1:** différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008).

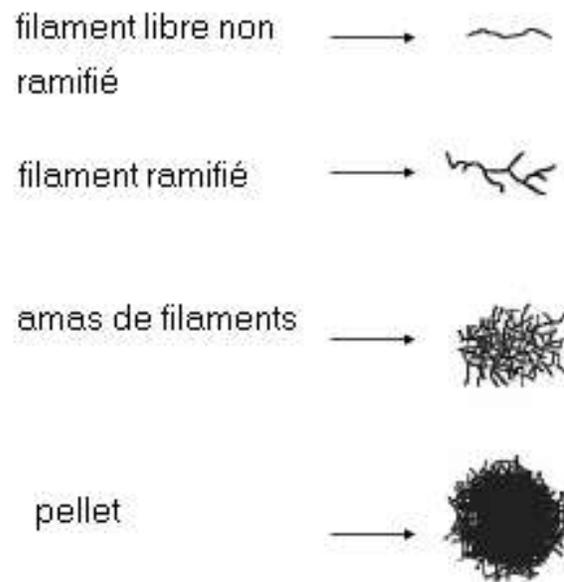
un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Holdfasts).

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**Keulen et al., 2003**). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former des pellets (**Figure 2**).

## 2-2- Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**). En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air (**Reponen et al., 1998**). Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Mincer et al., 2002; Zaitlin et al., 2003**). Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts (**Iacey, 1997; Song et al., 2001**). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi et al., 1992; Thirupl et al., 2001**).

En général, les actinomycètes sont des chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).



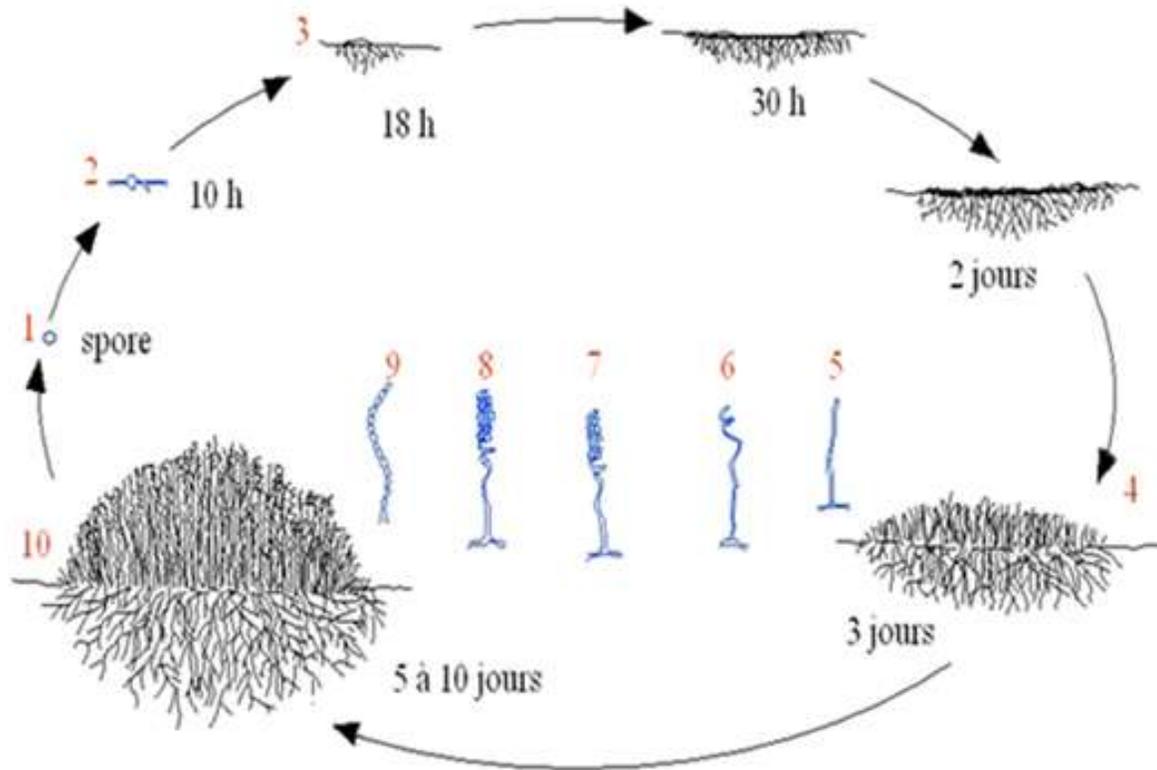
**Figure 2:** les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002).

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent a des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides (**Alexander, 1977**).

Ce groupe de bactéries joue un rôle significatif dans la dégradation de la cellulose et la lignine (**Kuster, 1978**). Parmi les genres appartenant à ce groupe, le genre *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires tels que l'acide indol-acétique (**Khamma et al., 2009**), les toxines, les pigments et les antibiotiques. D'ailleurs l'odeur caractéristique du sol humide provient des matériaux volatiles produits par ces microorganismes tels que la géosmine et les 2 méthyle isoborneol responsables de l'odeur de l'humus (**Wellington et al., 1987**).

### **2-3- La reproduction chez les actinomycètes (exemple type *Streptomyces* sp.)**

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes, mais un cycle biologique semblable à certains champignons (**Floyd et al., 1987; Sanglier et Trujillo, 1997**). Le cycle de développement des *Streptomyces* débute par la germination des spores, il comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*, puis le tube de germination croit et donne des hyphes non séptés et plurinuclées, ramifiés et ancrés dans le milieu solide appelés le mycélium primaire, de substrat ou végétatif. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien ou secondaire composé d'hyphes dressés sur le mycélium de substrat, leurs extrémités se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées comme le montre la **Figure 3 (Hopwood et al., 1985)**.



**Figure 3:** cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

## 2-4- Classification des actinomycètes

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al.*, 2004), Le **Phylum *Actinobacteria*** (bactéries à Gram positif et GC % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Celle-ci a été décrite par **Stackebrandt *et al.* (1997)**.

### 2-4-1- La classe "*Actinobacteria*"

**Stackebrandt *et al.* (1997)** ont proposé une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui repose uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80 % de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Sphaerobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955) (**Tableau 1**).

Les descriptions des espèces et des genres sont basées sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, a été vérifiée pendant ces 20 dernières années, et il s'est avéré qu'elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ ARNr 16S (**Stackebrandt *et al.*, 1997**).

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordre: *Actinomycineae*, *Micrococcinea*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Frankinea*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae* et *Glycomycineae* (**Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Stackebrandt et Schumann, 2000**).

**Tableau 1:** la classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004).

<b>Classe <i>Actinobacteria</i></b>				
S/Cl <i>Acidimicrobidae</i>	S/Cl <i>Rubrobacteridae</i>	S/Cl <i>Coriobacteridae</i>	S/Cl <i>Sphaerobacteridae</i>	S/Cl <i>Actinobacteridae</i>
S/Cl <i>Actinobacteridae</i>				
<i>Bifidobacteriales</i>		Ordre	<i>Actinomycetales</i>	
<i>Actinomycetales</i>				
S/O <i>Actinomycineae</i>	S/O <i>Micrococcineae</i>	S/O <i>Corynebacterineae</i>	S/O <i>Micromonosporinaeae</i>	S/O <i>Propionibacterineae</i>
Famille	Familles	Familles	Famille	Familles
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<i>Micromonosporiaceae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
S/O <i>Pseudonocardineae</i>	S/O <i>Streptomycineae</i>	S/O <i>Streptosporangineae</i>	S/O <i>Frankinea</i>	S/O <i>Glycomycineae</i>
Familles	Famille	Familles	Familles	Famille
<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnematcae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Themomonosporaceae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidotherrma ceae</i> <i>Kineosporiaceae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>

S/Cl: sous classe, S/O: sous ordre

## **2-4-2- Les clés d'identification des genres et des espèces de l'ordre *Actinomycetales***

### **2-4-2-1 Caractères morphologiques**

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, à l'abondance et à la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, et la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata.

### **2-4-2-2-Caractères chimiotauxonomiques**

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotauxonomie.

#### **- Acides aminés**

Les *Streptomyces* et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres *Actinomycetales*.

#### **- Glucides**

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora* (**Tableau 2**).

#### **- Acides gras**

Les acides gras les plus communs, chez les actinomycètes appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides

**Tableau 2:** différents types de parois et leurs constituants majeurs chez les actinomycètes (Murray *et al.*, 1989).

Type de paroi	Constituants pariétaux majeurs	Groupe/ Genre
I	L-DAP + glycine	<i>Arachnia, Pimelobacter, Nocardioides, Streptomyces</i>
II	Méso- DAP + glycine	<i>Actinoplanes, Actinomyces</i>
III	Méso- DAP	<i>Dermatophilus, Frankia, Maduromycetes, Geodematophilus, Thermonospora, Kitasatospria, Spirillosporia, Thermoactinomyces,</i>
IV	Méso- DAP + arabinose	<i>Micropolyspora, Nocardioformes</i>
V	Lysine + ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Présence variable de l'acide aspartique et du galactose	<i>Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Actinomyces, Arcanobacterium</i>
VII	Acide diaminobutyrique + glycine	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*.

### **2-2-4-3-Les acides nucléiques**

Les déterminations portent sur GC%, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN, sur le taux d'hybridation ADN – ADN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Au-delà de 70 % de similitude, deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**).

## **2-5- Rôle des actinomycètes en biotechnologie**

### **2-5-1-Amélioration de la qualité de sol agricole**

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole. En effet, ils contribuent à la fertilisation du sol. Ils contribuent aux processus de recyclage et de la biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux (**Goodfellow et al., 1984**). Les Actinomycètes ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement dégradables ou non, par les autres microorganismes, comme les polymères complexes: les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines avec plus de 200 espèces des angiospermes, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi et al., 1992; Thirupl et al., 2001; Pawlowski et Sirrenberg, 2003**).

Ces bactéries contribuent également au maintien d'une bonne structure du sol. En effet, leur structure filamenteuse ainsi que la production des polysaccharides permettent le maintien entre les particules du sol (**Kennedy, 1999**). Ils améliorent aussi l'infiltration de l'eau dans le sol et permettent ainsi une bonne aération du sol (**Mckenna et al., 2002**).

Outre la structure et la fertilité du sol, les actinomycètes augmentent le pouvoir suppressif du sol. **Mazzola (2002)** a montré qu'un sol riche en actinomycètes est suppressif aux maladies phytopathogènes qu'un sol pauvre de ces bactéries (**Errakhi, 2008**).

### **2-5-2- Production d'antibiotiques**

En effet les actinomycètes constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle (**Takahashi et Omura, 2003; Hayakawa et al., 2004**). Plus de 70% des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (**Gundliffe, 2006**). Les actinomycètes produisent un grand nombre d'antibiotiques de structures chimiques très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, macrolides, etc...) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (**Okami et Hotta, 1988**).

Le genre *Streptomyces* a été largement exploré pour la sélection des agents de biocontrôle (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b**) et 75% des antibiotiques sont produits par les membres de ce genre. Récemment, les chercheurs se sont focalisés à la recherche des actinomycètes rares (autres que *Streptomyces* sp.) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Ainsi, plusieurs antibiotiques antifongiques, produits par des actinomycètes non-*Streptomyces*, ont été purifiés (**Tableau 3**).

### **3- Les maladies phytopathogènes**

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

**Tableau 3:** quelques antibiotiques produits par des actinomycètes non-*Streptomyces* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b).

L'espèce productrice	L'antibiotique	Référence
<i>Actinoplanes</i> sp.	Xanthone	Cooper <i>et al.</i> (1992)
<i>A. brasiliensis</i>	A/672	Palleroni (1989)
<i>A. caeruleus</i>	Heptaene	Palleroni (1989)
<i>A. deccanensis</i>	Lipiarmycine	Palleroni (1989)
<i>A. ianthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>A. missouriensis</i>	5-azacytidine	Palleroni (1989)
<i>Actinomadura madurae</i>	Simaomicine	Maiese <i>et al.</i> (1990)
<i>Actinomadura hibisca</i>	Pradimicine FA-1	Sawada <i>et al.</i> (1990)
<i>Microbispora</i> sp.	SCH 31828	Patel <i>et al.</i> (1988)
<i>Microbispora</i> sp.	Glucosylquestiomycin	Igarashi <i>et al.</i> (1998)
<i>Micromonospora coerulea</i>	Glutarimide	BeomSeok <i>et al.</i> (1999)
<i>Microtetraspora</i> sp.	SCH 42282	Hegde <i>et al.</i> (1998)
<i>Spirillospora</i> sp.	HM17	Hacène <i>et al.</i> (1994)
<i>Spirillospora</i> sp.	H107	Hacène <i>et al.</i> (2000)
<i>Streptosporangium roseum</i>	AH7	Hacène <i>et al.</i> (1998)
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	HA-94	Paradkar <i>et al.</i> (1998)
<i>Saccharotrix</i> sp.	Mutactimycine PR	Zitouni <i>et al.</i> (2004a)
<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Dithiolopyrrolone	Chorine (2009)
<i>Streptosporangium</i> sp.	Angucyclinone r2	Boudjella <i>et al.</i> (2010)

- **Les maladies non parasitaires** : elles résultent d'une inadéquation des conditions écologiques. Il peut s'agir de problèmes liés aux conditions climatiques, aux phénomènes de pollution ou à des problèmes nutritifs et la toxicité des pesticides (**Paul et Impens, 2003**).
- **Les maladies parasitaires** : ce sont les maladies causées par l'action d'agents pathogènes (virus, phytoplasmes, bactéries, champignons, protozoaires, les phanérogames parasites, etc...). Ces parasites sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et sont contagieux, par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine. Les champignons sont responsables de près de la moitié des maladies connues à ce jour chez les plantes cultivées (**Lepoivre, 2003**).

### **3-1- Les grands groupes des champignons phytopathogènes**

**3-1-1- Les champignons à plasmode (*Plasmodiophoromycota*)** : sont des organismes fungiformes dépourvus de paroi dans la majeure partie de leur cycle de développement. Leur thalle est constitué d'un plasmode. Ils sont des parasites d'organes souterrains et de tiges de plantes terrestres chez lesquelles ils provoquent souvent une hypertrophie ou une hyperplasie des tissus infectés. Trois genres présentent des effets pathogènes directs sur la plante : *Plasmodiophora*, *Polymyxa* et *Spongospora*.

**3-1-2- Les champignons à thalle unicellulaire ou filamenteux cœnocytiques** : ces espèces sont regroupées au sein de 3 phylums :

**3-1-2-1- Oomycota** : sont caractérisés par un thalle constitué d'une masse de filaments ramifiés non cloisonnés. Ils produisent des zoospores biflagellées et sont responsables de :

- **fontes des semis**: sont provoquées par les espèces *Pythium* spp.
- **pourritures radiculaires** : par exemple sur la pomme de terre, ces pourritures sont induites par *Phytophthora infestans*.
- **mildious**: les *Peronosporaceae*, parasites obligatoires dont le mycélium se développe entre les cellules des tissus infectés et dans lesquelles il forme des suçoirs, sont responsables de divers mildious.

- **rouilles blanches:** ce sont des symptômes induits par les *Albuginaceae*, qui sont des parasites obligatoires.

**3-1-2-2- Chytridiomycota :** constitue un phylum avec une classe unique, les Chytridiomycètes. Leur thalle est un mycélium ramifié et produisent des zoospores uniflagellées. Deux genres (*Olpidium* et *Synchytrium*) réunissent des parasites de plantes supérieures qui peuvent également être des vecteurs de maladies virales.

**3-1-2-3- Zygomycota :** sont caractérisés par l'absence des zoospores, trois ordres présentent un intérêt agronomique : *Mucorales*, *Entomophthorales* et *Glomales*.

### **3-1-3- Les Ascomycota et les Deuteromycota**

**3-1-3-1- Les Ascomycètes :** ce sont des champignons à mycélium cloisonné dont les spores sexuées se forment sur des asques. Les principaux taxons appartenant à ce phylum sont : Archiascomycètes, Pyrénomycètes, Loluloascomycètes et Discomycètes.

**3-1-3-2- Les Deutéromycètes :** encore appelés champignons imparfaits, sont caractérisés par un mycélium sépté et par l'absence de reproduction sexuée. Les principaux genres phytopathogènes sont : *Moniliales*, *Sphaeropsidales* et *Mélanconiales*.

Les principaux agents pathogènes appartenant à ces deux groupes sont :

- **Les agents responsables de déformations d'organes :** ils appartiennent à l'ordre des *Taphrinales*, comportant un seul genre *Taphrina*. Ce sont des parasites de l'appareil aérien et des fruits de plantes supérieures provoquant des déformations, résultant d'hypertrophies et d'hyperplasies cellulaires (cloques de feuilles, balais de sorcière des rameaux et les pochettes des fruits).
- **Les agents des blancs ou oïdium :** l'oïdium ou les blancs représentent un groupe de maladies très répandues qui affectent pratiquement toutes les espèces végétales. Les champignons en cause sont réunis dans l'ordre des *Erysiphales*, sont des parasites obligatoires se développant essentiellement sur les feuilles les boutons et les fruits.

- **les agents maculicoles** : sont responsables des maladies du feuillage (l'apparition des taches sur les feuilles). Ils attaquent le feuillage des plantes annuelles ou pérennes, via des conidies produites sur des conidiophores libres (les genres *Cercospora*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Drechslera*, etc...), dans des acervules (les genres *Colletotrichum*, *Gloesporium*, etc...) ou dans des pycnides (les genres *Ascochyta*, *Septoria*, etc...).
- **Les agents de chancres** : notamment les espèces pathogènes des genres *Cytospora*, *Dothichiza*, *Hypoxylon* et *Nectria*, qui pénètrent habituellement par une blessure.
- **Les agents responsables d'attaques sur fruits** : les plus dommageables sont :
  - **L'ergot des graminées** : causé par *Claviceps purpurea*, le champignon se développe notamment sur l'épi du seigle.
  - **La tavelure** : est l'une des maladies extrêmement dommageables aux climats tempérés humides. Par exemple les tavelures du poirier et du pommier, causées respectivement par *Venturia pirina* et *Venturia inaequalis*. Ces champignons se développent sur les feuilles et les fruits en induisant, au site d'infection, la formation d'un strome subcuticulaire qui se développe en donnant naissance à une tache noire superficielle.
  - **Les pourritures de fruits** : sont fréquentes, parmi les agents fongiques provoquant de tels symptômes, certaines espèces, comme *Botrytis cinerea*, n'attaquent le fruit qu'à partir d'une base nutritive constituée d'un organe sénescant qu'ils colonisent.
  - **Les maladies vasculaires** : elles provoquent généralement un flétrissement des organes. Des coupes transversales dans les rameaux révèlent fréquemment des brunissements des vaisseaux. Des symptômes foliaires asymétriques sont souvent observés. Les principaux champignons responsables de ces maladies appartiennent aux genres *Verticillium* et *Fusarium*. On parle alors de verticilliose (ex : *Verticillium dahliae* causant la verticilliose de la tomate et du piment) et de fusariose vasculaire, par exemple *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Ce dernier induit la maladie du bayoud chez le palmier dattier.

**3-1-4-Les Basidiomycota** : sont des champignons caractérisés par la production de spores monocaryotiques, haploïdes, appelées basidiospores, à l'extérieur de sporocystes appelés basides. Sur le plan de la systématique, on distingue : les Urédinomyètes, les Ustilaginomyètes, les Hyménomycètes.

- **Les Urédinomyètes** : ce sont des champignons parasites responsables des rouilles. Ces rouilles ont généralement un cycle biologique complexe, alternant sur 2 hôtes distincts (rouilles dioïques).
- **Les Ustilaginomyètes** : regroupent un ensemble de champignons provoquant des maladies connues sous le nom de charbons ou caries, avec production de masses caractéristiques de téliospores noires dans les organes floraux ou sur les feuilles.
- **Les Hyménomycètes** : ce sont les *Basidiomycota* typiques caractérisés par des basides non cloisonnées disposées en hyménium dans un appareil fructifère appelé basidiocarpe. Quelques anamorphes d'Hyménomycètes sont caractérisés par l'absence de sporulation tel que *Rhizoctonia solani*.

Les principaux groupes de maladies causées par les *Basidiomycota* sont les caries et les charbons nus et couverts, caractérisés par la formation des téliospores (**Nasraoui et Lepoivre, 2003**).

### **3-2-Principaux taxons des bactéries phytopathogènes**

Au sein des bactéries à Gram-, les *Proteobacteria* renferment les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* dont l'espèce pathogène *A. tumefaciens* induit la prolifération des cellules de l'hôte. Les bactéries appartenant au genre *Burkholderia* sont responsables des symptômes de pourritures, des flétrissements et des nécroses. Les genres *Pseudomonas*, *Erwinia* et *Xanthomonas* sont responsables d'importantes maladies chez les plantes. Les *Erwinia* spp. occasionnent des pourritures molles.

Parmi les bactéries à Gram+ dont le GC est inférieur à 50 %, les bactéries pectinolytiques appartenant au genre *Clostridium* provoquent les symptômes des pourritures molles et humides de la pomme de terre. Les bactéries à Gram+ dont le GC est supérieur à 50% renferment des espèces telles que *Clavibacter michiganense* provoquant

la maladie de la nécrose de la pomme de terre et le flétrissement de la tomate. Ce groupe comprend aussi les Corynébactéries et les *Streptomyces*, entre autres l'espèce *S. scabies* l'agent de la gale commune de la pomme de terre (**Lepoivre, 2003**).

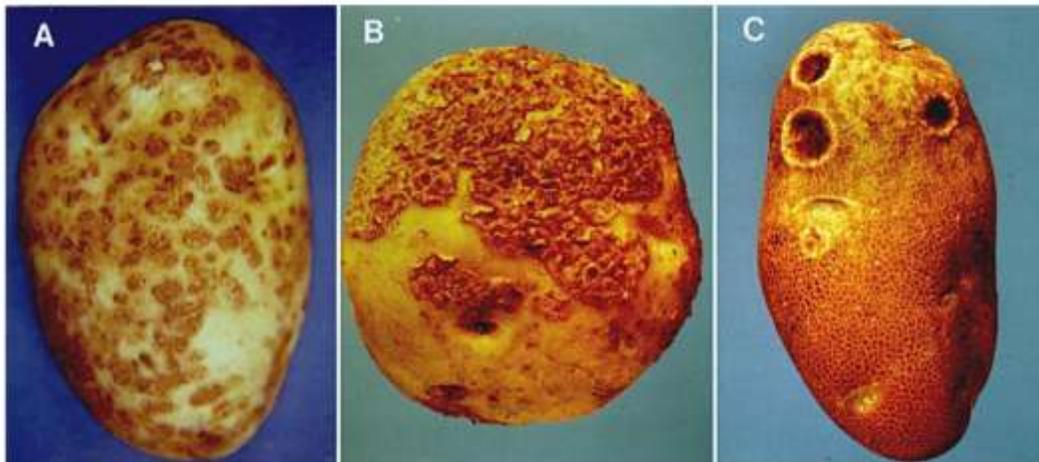
### **3-3- La gale commune**

Principalement trouvée sur les tubercules de pomme de terre, d'où son nom, la gale commune peut aussi se développer sur d'autres plantes (**Faucher et al., 1992; Goyer et Beaulieu, 1997**). Cette maladie caractérisée par des lésions brunâtres superficielles, surélevées ou profondes (**Figure 4**), se développant surtout sur les tubercules, les racines et les tiges souterraines, est causée par plusieurs microorganismes du sol dont le plus important est le *Streptomyces scabies* (**Güssow, 1914**).

En plus de la pomme de terre, la gale commune affecte aussi des cultures maraîchères à racines pivotantes ( **Goyer et al., 1996; Loria et al., 1997**). La carotte, la betterave, le panais et le radis en sont des exemples. Déjà en 1949, Hooker était le premier à annoncer que *S. scabies* pouvait être virulent sur une autre plante que la pomme de terre, en l'occurrence le radis.

#### **3-3-1- Agents pathogènes causant la gale commune**

Le premier agent causal de la gale commune de la pomme de terre et a été identifié et nommé *Oospora scabie* (**Thaxter, 1892**). Ce microorganisme se caractérisait par la présence de chaînes de spores grises et spiralées et la production d'un pigment brun-noir appelé mélanine. Quelques années plus tard, il a été renommé successivement *Actinomyces scabies* (**Güssow et al., 1914**) puis *Streptomyces scabies* (**Waksman et al., 1948**). Ainsi, une description plus exhaustive des principales caractéristiques physiologiques et morphologiques de plusieurs souches de *S. scabies* a été établie. En effet, plusieurs souches responsables de la gale commune ont été isolées dans des sols acides (**Bonde et McIntyre, 1968**). Ces souches nommées *Streptomyces acidiscabies* caractérisées par la formation de chaînes de spores droites de couleur blanche, l'absence de pigments mélanoides et leur



**Figure 4:** les symptômes de la gale commune de la pomme de terre: (A) superficielle; (B) surélevée; (C) profonde (Loria *et al.*, 1997).

habileté à utiliser, plusieurs sucres y compris le raffinose (**Lambert et Loria, 1989**).

### **3-3-2- Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune**

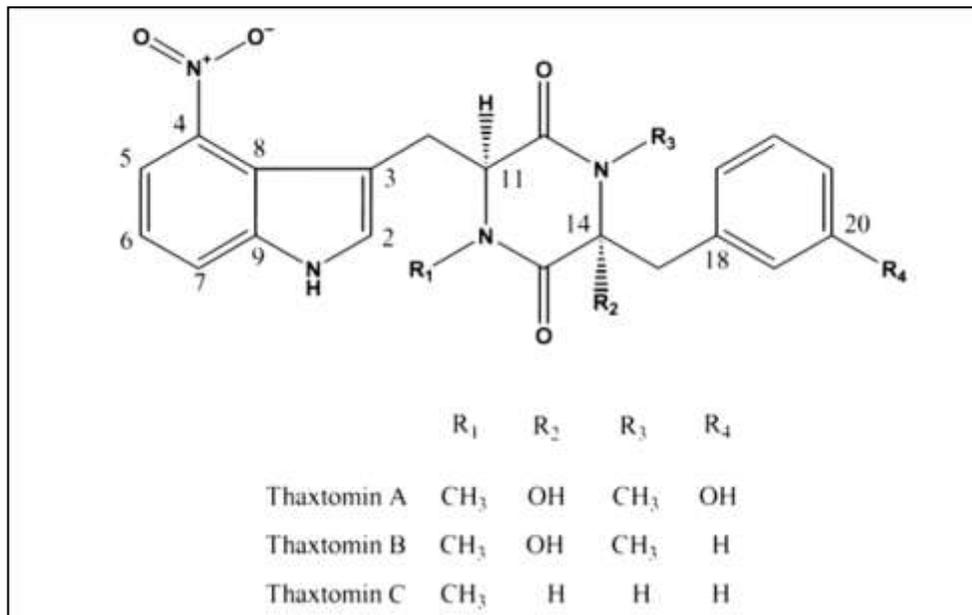
Les mécanismes de virulence associés aux streptomycètes pathogènes commencent à être éclaircis. Habituellement, une bactérie phytopathogène possède plusieurs mécanismes de virulence et la résultante de ces mécanismes lui confère son pouvoir pathogène. Les mécanismes de virulence permettant aux *Streptomyces* pathogènes d'induire des symptômes à la plante hôte, sont nombreux mais les plus communs sont la production de phytotoxines (les thaxtomines) et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (**Vachon, 1999**).

#### **3-3-2-1- Les phytotoxines**

Des phytotoxines accumulées dans des lésions de pommes de terre infectées par *S. scabies* ont été isolées pour la première fois par **King et al. (1989)**. En 1992, ces derniers ont caractérisé la structure chimique de deux composés phytotoxiques nommés thaxtomines A et B (**Figure 5**). Le composé majeur était la thaxtomine A, ensuite, d'autres thaxtomines ont été caractérisées. Parmi ces thaxtomines, certaines seraient des intermédiaires dans la voie de synthèse de la thaxtomine A et d'autres seraient des produits de son oxydation. La thaxtomine A sécrétée en grande abondance, semble être un facteur de virulence très important dans le pouvoir pathogène de la bactérie (**King et al., 1996**).

#### **3-3-2-1- Les enzymes hydrolytiques**

Le rôle des enzymes hydrolytiques dans le mécanisme de virulence des *Streptomyces* phytopathogènes a été étudié. **Hale et al. (1992)** ont rapporté que l'infection causée par *S. scabies* résulte en une dégradation de la subérine et ce au niveau de la lésion sur le tubercule de la pomme de terre. La subérine est un polymère composé de longues chaînes de polyesters d'acides gras et de composés phénoliques liés aux chaînes lipidiques par des liens esters et éthers. La plante produit cette couche de subérine pour créer une barrière contre les pertes d'eau et contre les infections des agents pathogènes (**Vachon, 1999**).



**Figure 5:** les structures des thaxtomines majeures produites par les souches de *Streptomyces* pathogènes des plantes (Healy *et al.*, 2000).

Une enzyme extracellulaire sécrétée par *Streptomyces scabies* FL1, a été isolée et caractérisée, cette enzyme dégrade la subérine et l'on peut supposer que du coup elle faciliterait la pénétration de la bactérie phytopathogène à travers cette barrière physique (**Hale et al., 1992**). D'autres souches pathogènes de *S. scabies* et de *S. acidiscabies* sont capables de sécréter une estérase hydrolysant la subérine (**Fett et al., 1994; Beauséjour et al., 1999**).

Le rôle de l'estérase dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* pourrait donc être double. Cette enzyme facilite l'entrée de l'agent pathogène dans les tissus végétaux et/ou permet, suite à son action sur la subérine, la libération de composés agissant comme inducteurs des gènes de biosynthèse de la thaxtomine A. D'autres enzymes extracellulaires pouvant dégrader les tissus végétaux produits par *S. scabies* et *S. caviscabies* ont été rapportées telles que les pectinases, les cellulases, les lipases et les protéases (**Paradis et al., 1994; Vachon, 1999**).

### **3-3-3- Thaxtomines et pouvoir pathogène de *Streptomyces scabies***

Les thaxtomines sont aussi produites par *Streptomyces scabies* *in vitro*. C'est **Fellows (1929)**, qui a commencé les spéculations au sujet de l'implication des phytotoxines dans le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Cependant, ce n'est qu'en 1989 qu'il a été démontré que les phytotoxines nommées thaxtomines, molécules de faibles poids moléculaire, jouent un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* (**King et al., 1989**). Par la suite, ces derniers ont démontré que le composé majeur produit par *S. scabies*, le 4-nitroindol-3yl avec un cycle 2,5-dioxopipérazine correspond à la thaxtomine A (**King et al., 1992**).

Les thaxtomines A et B sont des dérivés de deux acides aminés N-méthylés : l'hydroxyphénylalanine et le 4-nitrotryptophane pour la thaxtomine B et l'hydroxy-n-tyrosine et le 4-nitrotryptophane pour la thaxtomine A (**King et al., 1992**). Le pouvoir pathogène de plusieurs souches de *S. scabies* est corrélé avec leur capacité à produire la thaxtomine A. Par ailleurs, des études ont montré que des mutants de *S. scabies* altérés

dans leur capacité à produire la thaxtomine A, perdent leur pouvoir pathogène (**King et al., 1991; Goyer et al., 1998**).

#### **3-3-4- Biosynthèse des thaxtomines**

La thaxtomine A est produite *in vitro* dans des milieux de cultures contenant des extraits de végétaux comme le gruau, le son d'avoine ou les pelures de pomme de terre (**Babcock et al., 1993; Goyer et al., 1998**). La présence de subérine dans un milieu minimal suffit à induire la production de thaxtomine A par le *S. scabies* (**Beausejour et Beaulieu, 2004**). La production de thaxtomine A est variable entre les différentes souches de *S. scabies* et entre les différentes espèces de streptomycètes phytopathogènes ce qui pourrait expliquer la différence de virulence observée entre les souches phytopathogènes. Malgré l'importance de la thaxtomine A dans la pathogenèse, la voie de biosynthèse de la toxine n'est pas encore totalement élucidée.

La structure chimique de la thaxtomine A suggère que sa biosynthèse résulte probablement de la condensation de deux acides aminés méthylés, la phénylalanine et le N-méthyl-4-nitrotryptophane (**King, 1991**). Il a été démontré que le tryptophane, la phénylalanine et la méthionine étaient les précurseurs de la synthèse de la thaxtomine A. Certains aspects génétiques de la biosynthèse des thaxtomines ont été élucidés grâce au clonage des gènes *txtAB* qui codent pour deux peptides synthétases impliqués dans la production des thaxtomines A et B (**Healy et al., 2000**).

#### **3-3-5- Organisation des gènes liés à la virulence chez *Streptomyces scabies***

La preuve de l'existence d'un îlot de pathogénicité (PAI) a été confirmée chez *S. turgidiscabies* (**Kers et al., 2005**). Puis il s'est avéré que les parties de la PAI sont conservées et sont présentes chez tous les *Streptomyces* pathogènes (**Kers et al., 2005; Wanner, 2006**).

Chez les *Streptomyces* pathogènes, les gènes associés à la production de toxines sont regroupées dans deux sections. La première section de l'îlot de pathogénicité, que nous appellerons "région toxicogénique" comprend des gènes impliqués dans la

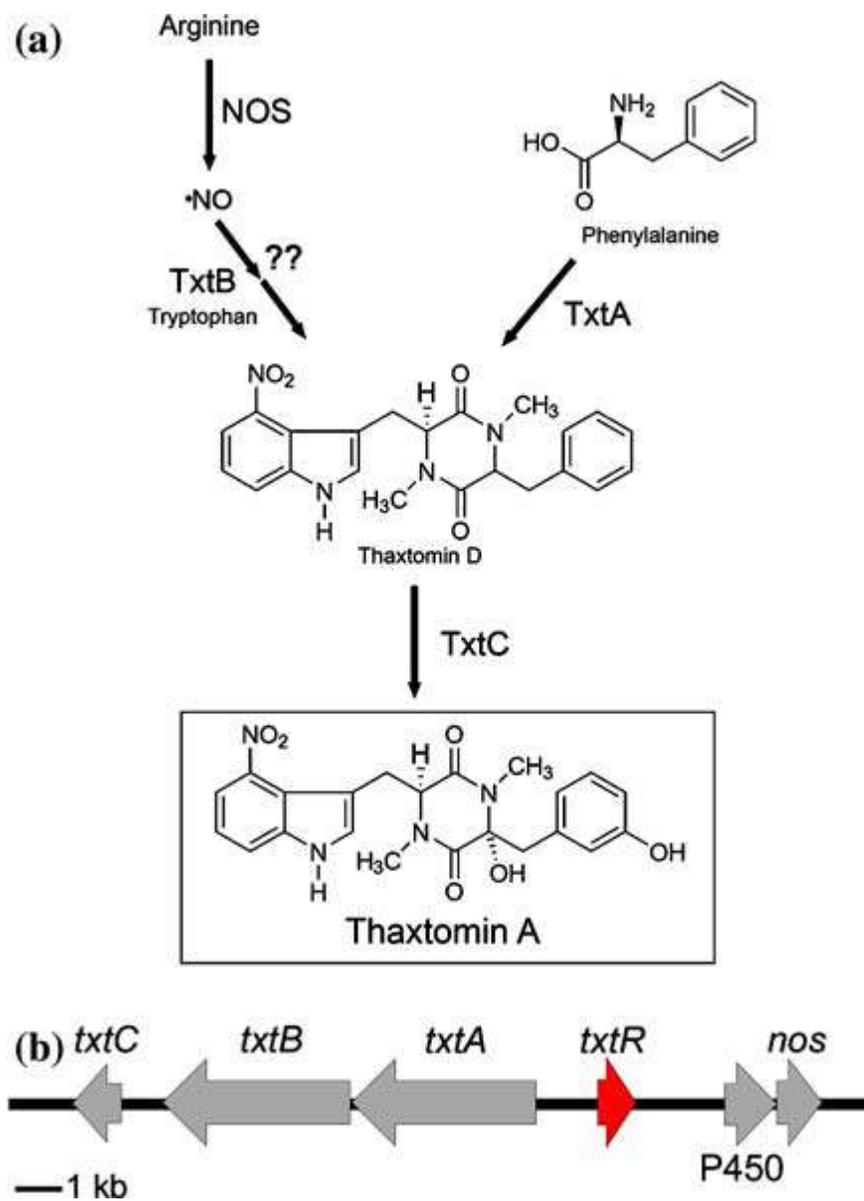
biosynthèse de la thaxtomine A (coordonnées estimées *c.* 3596–3653 kb; G + C content of 68%), ces gènes sont *txtAB*, *txtC*, *nos* et *TxtR* (**Lerat et al., 2009b**).

Les gènes *txtAB* codent pour un peptide synthétase non ribosomal (cyclisation du dipeptide) (**Healy et al., 2000**). Le gène *txtC* code pour une cytochrome P450 monooxygénase, qui assure l'hydroxylation du dipeptide cyclique (**Healy et al., 2002**). Cependant le gène *nos* est responsable de la nitration du fragment tryptophane grâce à une oxyde nitrique synthétase, qui est essentiel pour la toxicité de la thaxtomine (**Kers et al., 2004**). Le gène *TxtR* assure la régulation de la liaison cellobiose protéine (**Joshi et al., 2007**) (**Figure 6**).

Une représentation schématique de l'organisation de ces gènes chez *S. scabies* a été fournie par **Joshi et al. (2007)**. cette région comporte aussi un cadre de lecture ouvert (ORFs) codant pour une protéine séparée du gène *nos* seulement par 2634 pb. Il est apparemment le seul élément génétique mobile associée à cette région.

Le second segment de la PAI, que nous appellerons "la région de la colonisation", renferme beaucoup plus des gènes (coordonnées estimées *c.* : 8471-8581 pb; G + C est de 68,5%). Cette région chromosomique comprend des gènes tels que *necl* et *TomA* qui ne sont pas essentiels à la pathogénicité, mais jouent un rôle important dans la virulence. Il semble que *necl* et *tomA* sont impliqués dans le processus de l'infection par la suppression des défenses de la plante (**Joshi et al., 2007**).

Dans cette région, il existe quatre fragments de lecture ouverte (ORFs) codant pour des estérases. Il s'est avéré que certaines estérases extracellulaires ont un rôle dans la dégradation de la subérine (**Beauséjour et al., 1999**), cette dernière agit comme une barrière physique contre les invasions microbiennes (**Lerat et al., 2009b**).



**Figure 6:** la région toxicogénique de l'îlot de pathogénicité codant pour la biosynthèse de la thaxtomine A chez les *Streptomyces* pathogènes (Loria *et al.*, 2008).

## 4- La lutte biologique

### 4-1- Définition

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle l'appellation "lutte biologique" a été proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre un organisme vivant. En 1919, Smith a défini la lutte biologique comme l'utilisation des ennemis naturels pour le contrôle des maladies phytopathogènes (**Driesche et Bellous, 1996**). L'étude de Sanford En 1926, sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *S. scabies* matérialise ce concept en observant que des microorganismes saprophytes pouvaient entraîner une diminution de l'intensité de ce pathogène du sol. Quelques années plus tard, Weindling a démontré que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol. En 1964, De Bach a donné une nouvelle définition à la lutte biologique : « c'est l'action des parasites, prédateurs ou pathogènes dans le maintien de la densité de la population des microorganismes à un niveau inférieur de celle observée en leur absence (**Toussaint, 1996**).

La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. Dans ce travail, c'est cette définition que nous utiliserons. Une autre définition plus large de la lutte biologique est parfois utilisée :

"Toute action mettant en jeu des organismes modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite" (**Corbaz, 1990**).

Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agro-écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) (**Altieri, 1999; Nautiyal et al., 2000**).

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides

donnent de bons résultats à court terme mais à long terme, leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger. Par contre, la lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990; Toussaint, 1996).

#### 4-2- L'intérêt de la lutte biologique dans le contrôle des maladies phytopathogènes

En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes, la lutte biologique présente un rôle important dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Emmert et Handelsman (1999) affirment que la lutte biologique peut être aussi efficace dans le contrôle des maladies phytopathogènes que l'utilisation des fongicides chimiques. Singh *et al.* (2003) ont montré que *Pseudomonas fluorescens* peut réduire de 78% la maladie de la pourriture du collet de la plante de piment rouge causé par *Sclerotium rolfsii*. Également, Mao *et al.* (1998) ont pu réduire dans le champ les maladies de la tomate due aux *S. rolfsii*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* par l'utilisation de deux agents biologiques *Gliocladium vireus* et *Burkholderia cepacia*.

La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme. L'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à ce que la lutte biologique devient plus durable que les produits chimiques (Cook, 1993; Benbrook *et al.*, 1996). Actuellement, plusieurs produits de lutte biologique sont commercialisés et utilisés dans le monde (Fravel, 2005; Errakhi, 2008) (Tableau 4).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003).

**Tableau 4:** quelque agents antagonistes commercialisés sous forme de produits biologiques utilisés dans le traitement de certaines maladies phytopathogènes (**Sabaratnam et Traquair, 2002; Jijakli, 2003; Punja et Utkhede, 2003**).

<b>Produit</b>	<b>Microorganismes</b>	<b>Maladies traitées</b>	<b>Distributeur</b>
AQ 10	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Mildious	Ecogen, USA
Binab T	<i>Trichoderma</i> spp.	Pourriture des racines, fusariose	Bio innovation AB, nouvelle zélande, USA
Biofox C Fusaclean	<i>Fusarium oxysporum</i> (non pathogène)	Fusariose	S.I.A.P.A., USA
Bio-fungus	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pourriture des racines, fusariose	De Ceuster, USA, UE, Nouvelle Zélande
Intercept	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pourriture des racines	Soil Technologies, USA
PSSOL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Pourriture des racines	Natural Plant Protection, France
Contans KONI	<i>Coniothyrium minitans</i>	Pourriture des racines	Prophyta Biologischer, Hongrie, Allemagne
Polyversum	<i>Pythium oligandrum</i>	Pourriture des racines	Biopreparaty, Tchéquie
Primastop (Prestop Mix)	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Pourriture des racines, fusariose	Kemira Agro, Finlande
Root Shield, Plant Shield, T-22 Planter	<i>Trichoderma harzianum</i> - T22	Pourriture des racines	Bioworks, USA, UE, Nouvelle zélande
Soil Gard	<i>Gliocladium virens</i> GL-21	Pourriture des racines	Therma Trrilogy, USA
Sporodex	<i>Pseudozyma flocculoza</i>	mildious	Plant products, Canada
Trieco	<i>Trichoderma viride</i>	Pourriture des racines, fusariose	Ecosens Laboratories, Inde
GBO3, MbI 600	<i>Bacillus subtilis</i>	Fonte des semis	Horiculture, USA
Mycostop	<i>Streptomyces griseovoidis</i>	Fusariose, fonte des semis	Kemira Agro Oy, Helsinki, Finlande

Ce paramètre correspond à la compétence rhizosphérique (**Whipps, 2001**). Cette dernière réside dans l'adaptation de l'agent antagoniste aux conditions biotiques et abiotiques du sol. L'agent aussi doit être doté d'une capacité à coloniser les racines de la plante hôte (**Nautiyal, 2000; Whipps, 2001**). En plus de cette compétence, l'agent de biocontrôle doit disposer de divers mécanismes de lutte biologique lui permettant d'inhiber le développement de l'agent phytopathogène et de réduire ainsi l'incidence de la maladie qu'il provoque (**Errakhi, 2008**).

#### **4-3- Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique**

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (**Jijakli, 2003**).

##### **4-3-1- Antibiose**

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (**Jijakli, 2003**). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (**Corbaz, 1990**). Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène. La fonte des semis du coton due à *Pythium ultimum* peut être combattue par un enrobage des semences avec la souche de *P. fluorescens* Pf 5. Cette souche produit un antibiotique, la polyulutérine. La fonte des semis est ainsi réduite de façon significative aussi bien par l'utilisation de ce *Pseudomonas* comme agent d'enrobage que par l'utilisation de l'antibiotique purifié (**Howell et Stipanovic, 1980**).

#### 4-3-2- Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (**Jijakli, 2003**).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène au niveau des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certaines bactéries produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Les sidérophores de ces microorganismes captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance. Ce mécanisme est souvent attribué aux agents antagonistes de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (**Corbaz, 1990**). Des sidérophores produits par *P. fluorescens* formeraient un complexe avec les métaux du sol et les rendraient non disponibles pour les autres microorganismes de son environnement dont le *Pythium ultimum*, causant la fonte des semis (**Howell et Stipanovic, 1980**).

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (**Benítez et al., 2004**). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (**Benítez et al., 2004; Compant et al., 2005**).

#### 4-3-3- Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (**Helluy et Holmes, 2005**). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (**Corbaz, 1990**). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des

glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. **Valueva et Mosolor (2004)** ont montré que les enzymes utilisées par les antagonistes ont souvent une activité en mélange ou en synergie avec les antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus* sp. peuvent être perforées dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes vampyrellides. Cette dégradation entraîne une diminution de la population des agents pathogènes. Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (**El-Tarabily et al., 1997; Sabaou et al., 1998; Errakhi, 2008**).

#### **4-3-4- Induction des systèmes de résistance de la plante hôte**

Des microorganismes de lutte biologique sont capables de déclencher une résistance systémique induite (ISR) chez la plante hôte, ce qui peut rendre l'hôte plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes (**Jijakli, 2003**). L'induction des systèmes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par **Kempe et Sequira (1983)**. Ces derniers ont remarqué que des pré-traitements par des bactéries ont protégé des tubercules de pomme de terre des infections de *Pseudomonas solanacearum*.

Le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs. Ces derniers sont des substances mettant en branle les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique (**Agrios, 1988; Toussaint, 1996**). Par exemple, *Trichoderma harzianum* T-203 induit des changements structuraux et chimiques des parois cellulaires des plantes ce qui augmente leur résistance aux infections par les phytopathogènes (**Brimmer et Boland, 2003**).

#### **4-3-5- Diminution de l'agressivité du pathogène**

Un agent de biocontrôle peut également agir en affectant les facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène. L'intensité de symptômes de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de l'haricot est réduite en présence de la souche *Trichoderma* T39. La réduction du développement du parasite ne s'observant qu'au cours du second jour d'incubation. Ce retard s'expliquerait par une production réduite par le pathogène des enzymes dégradant la pectine (**Jijakli, 2003**).

#### **4-4- Les microorganismes de lutte biologique les plus utilisés**

Plusieurs microorganismes ont été utilisés dans le contrôle des maladies phytopathogènes (**Errakhi, 2008**) (**Tableau 5**). Parmi les champignons les plus utilisés, nous pouvons citer *Trichoderma* spp. Ce dernier a été utilisé comme agents de lutte biologique contre un large spectre de pathogènes aussi bien telluriques que foliaire. Ils agissent par différents mécanismes comme la production des enzymes lytiques (chitinases, bêta-1-3 -glucanase et bêta-1-4-glucanase), la production d'antibiotiques, la compétition spatiale et nutritionnelle (**Elad et al., 1999**), l'induction des systèmes de résistance des plantes (**Brimner et Boland, 2003**) et l'inactivation des enzymes de l'agent pathogènes (**Elad et al., 1999**). Une souche de *Trichoderma* spp. s'est avéré active contre de nombreux phytopathogènes à savoir : *Pythium ultimum* (**Mukherjee et al., 2008**), *Botrytis cinerea* (**Mukherjee et al., 2008**) et *Rhizoctonia solani* (**Mazzola, 2002**). Certaines bactéries à Gram-positif sont employées comme agent de lutte biologique. Elles contrôlent plusieurs maladies phytopathogènes. Parmi ces bactéries, les souches de *Bacillus subtilis* et les actinomycètes sont les plus étudiés.

La plupart des espèces actinomycètes vivent dans le sol, qui est leur réservoir principal. Ils peuvent agir par différents mécanismes d'action (**Emmert et Handelsman, 1999**). L'action antagoniste de ce groupe bactérien dans la lutte biologique a été démontrée contre *Fusarium oxysporum* f sp. *albedenis* (**Sabaou et al., 1998**), *Alternaria* sp. (**Khamna et al., 2009**) *Phytophthora* sp. (**Xiao et al., 2002**), *Pythium ultimum* (**Mahadevan et Crawford, 1997**), *Colletotrichum lindemuthianum* (**Tu, 1988**)

**Tableau 5:** agents de la lutte biologique utilisés pour la lutte contre des agents phytopathogènes (Errakhi, 2008).

Agent de biocontrôle	Agents phytopathogènes cibles	Mécanisme (s) d'action
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Roselliniana</i> spp.	Parasitisme
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Parasitisme
<i>Pseudomonas</i> spp. DF-41 et PA-2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp. Di-944	<i>Rhizoctonia solani</i>	Antibiose
<i>Streptomyces</i> sp. 93	<i>Pythium</i> , <i>aphanomyces</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> et <i>Fusarium</i> spp.	Antibiose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> et <i>Puccinia arachidis</i>	Antibiose Compétition
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> PonSSII	<i>Streptomyces scabies</i>	Antibiose Compétition
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , <i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> et <i>Erwinia amylovora</i>	Antibiose Compétition
<i>Trichoderma</i> spp.	Plusieurs champignons phytopathogènes	Parasitisme Antibiose Compétition
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Antibiose

*Verticillium dahliae* (Berg *et al.*, 2000) et *Rhizoctonia solani* (Trejo-estrada *et al.*, 1998). *Pseudomonas fluorescens*, bactérie à Gram-négatif, est aussi un agent de biocontrôle efficace contre différents phytopathogènes (Thomashow *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 2002).

#### **4-5- Les actinomycètes agents de lutte biologique**

Les actinomycètes présentent un important potentiel d'agents contre des maladies phytopathogènes. En effet, ces dernières décennies, plusieurs études se sont intéressées aux rôles que pourrait jouer les actinomycètes dans la suppression des phytopathogènes. Le premier produit de lutte biologique commercialisé à base d'actinomycètes a été fabriqué à partir de *Streptomyces griseoviridis* pour contrôler les agents phytopathogènes comme le *Botrytis* et le *Fusarium* (Copping et Mens, 2000; Errakhi, 2008).

Les actinomycètes sont des bactéries saprophytes capables de dégrader la matière organique dans le sol et d'utiliser des molécules plus complexes pour leur croissance (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Ceci leur permet de s'adapter et de coloniser différents milieux rhizosphériques. Cette caractéristique est essentielle dans la lutte biologique. Ainsi, les actinomycètes peuvent agir par différents mécanismes d'action comme l'antibiose, la compétition nutritionnelle ou spatiale ou encore le parasitisme (Errakhi, 2008).

La plupart des études ont utilisé des streptomycètes comme agents potentiels de lutte biologique contre les champignons pathogènes (Tahvonen et Avikainen, 1987; Yuan et Crawford, 1995; Berg *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2002). Cependant et par rapport aux *Streptomyces* les informations sur le potentiel d'autres genres d'*Actinomycetales* est encore relativement faible (Tableau 6).

Le parasitisme des mycéliums de champignons par les actinomycètes a été démontré par plusieurs travaux (Yuan et Crawford, 1995; Tréjo-Estrada *et al.*, 1998; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b). Plusieurs enzymes chitinolytiques ont été identifiées chez

**Tableau 6:** le biocontrôle des maladies fongiques par les actinomycètes non-*Streptomyces* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b).

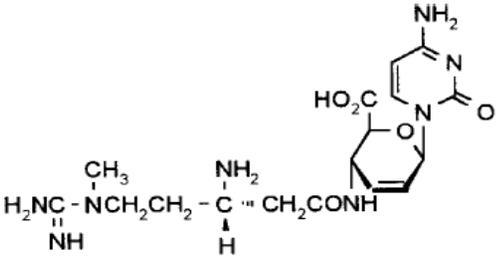
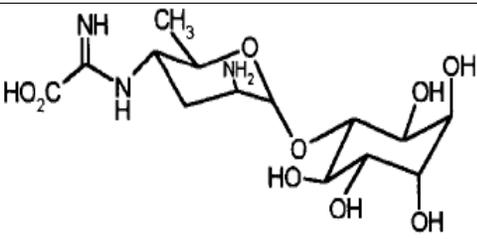
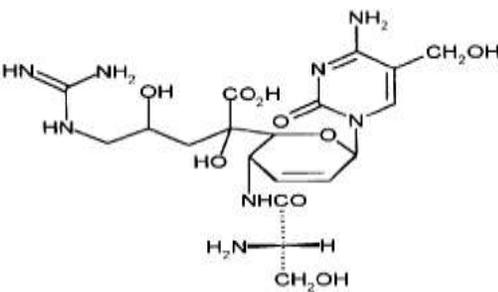
Antagoniste	Pathogène	Plante	Maladie	Référence
<i>Actinoplanes</i> sp.	<i>Pythium ultimum</i>	betterave	fonte des semis	Khan <i>et al.</i> (1997)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	soja	pourridié	Sutherland and Lockwood (1984)
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	concombre	fonte des semis	El-Tarabily (2006a)
<i>Micromonospora</i> sp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blé	piétin	Coombs <i>et al.</i> (2004)
<i>Nocardia globerula</i>	<i>Helminthosporium solani</i>	pomme de terre	tache argentée	Elson <i>et al.</i> (1997)
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blé	piétin	Coombs <i>et al.</i> (2004)
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>	framboise	pourridié	Valois <i>et al.</i> (1996)
<i>Streptosporangium albidum</i>	<i>Phytophthora coloratum</i>	carottes	cavité pythienne	El-Tarabily <i>et al.</i> (1997)
<i>Streptoverticillium netropsis</i>	<i>Phytophthora. coloratum</i>	carottes	cavité pythienne	El-Tarabily <i>et al.</i> (1997)

certaines espèces d'actinomycètes dont *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans* (Miyashita *et al.*, 1991), *Streptomyces lydicus* (Mahadevan et Crawford, 1997), *Streptomyces plicatus* (Abd Allah, 2001) et *Streptomyces halsteii* AJ-7 (Joo, 2005).

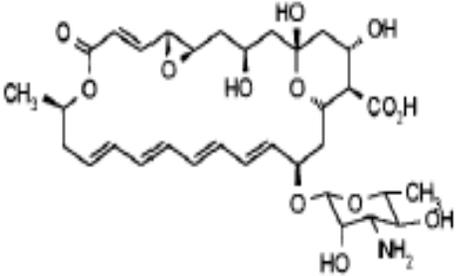
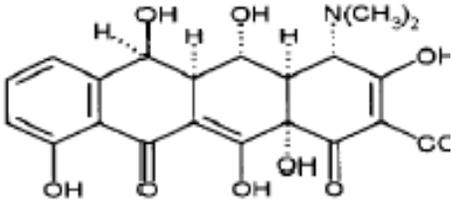
La compétence rhizosphérique semble être une condition requise pour le succès la lutte biologique. Ainsi, l'incapacité de coloniser les racines peut expliquer l'échec d'un biocontrôle fiable observé dans de nombreuses études (Weller, 1988). La capacité des actinomycètes à s'adapter à différentes conditions rhizosphériques, leur capacité à produire des antibiotiques et des enzymes lytiques, leur permet d'être parmi les meilleurs agents antagonistes. Sabaou *et al.* (1983) ont rapporté qu'une souche de *Nocardopsis dassonvillei* a montré des activités antibiotique, mycolytique et parasitaires contre le mycélium de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b). Les actinomycètes peuvent agir aussi par compétition nutritionnelle et spatiale contre les microorganismes phytopathogènes (Getha *et al.*, 2005).

Les actinomycètes sont connus par leur capacité de produire des antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999; Barakate *et al.*, 2002; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006; Errakhi, 2008). Tréjo-Estrada *et al.*, (1998) ont montré qu'il y a une corrélation entre la production d'antibiotiques dans le sol et l'efficacité des actinomycètes dans la lutte contre les phytopathogènes. Par exemple *Streptomyces violaceusniger* YCED9 produit trois antifongiques : l'anigreline, la geltanamycine et la guanidylfingine impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (Tréjo-Estrada *et al.*, 1998). *S. griseus* produit plusieurs antibiotiques antifongiques, comme l'actidione (Whiffen *et al.*, 1946), la candidine (Campelo et Gil, 2002) et les bafilomycines (Werner et Hagenmaier, 1984). La production des antifongiques endophénazines A-D de *S. anulatus* a été reportée par Gebhardt *et al.* (2002). De même, plusieurs antibiotiques produits par les actinomycètes sont actuellement utilisés dans la lutte biologique (Tableau 7).

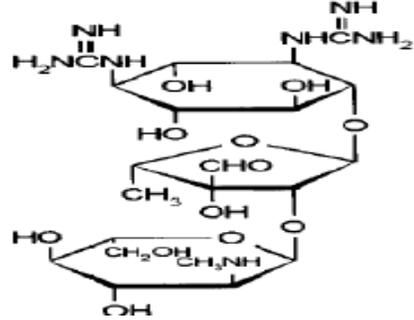
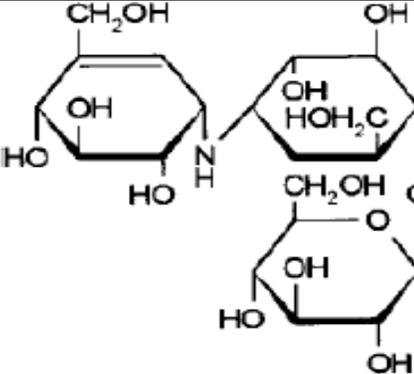
**Tableau 7:** les antibiotiques produits par les actinomycètes utilisés en biocontrôle (Copping et Menn, 2000; Errakhi, 2008).

Antibiotiques	Actinomycètes	Maladie/agent antagoniste	Mécanisme d'action	Formule chimique
Blasticidines S	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	<i>Pyricularia oryzae cavara</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines liées au ribosome 50S et par la suite l'inhibition de l'élongation des chaînes protéiques.	
Kasugamycine	<i>Streptomyces Kasugaensis</i>	<i>Falvia fulva</i> <i>Cercospora</i> spp. <i>Venturia</i> spp.	Inhibition de la biosynthèse des protéines en interférant l'association d'amino-acyl-tRN avec mRNA et la sous unité ribosomale mRNA-70S.	
Mildiomyicine	<i>Streptoverticillium rimofaciens</i> B-98891	Les mildious <i>Erysiphe</i> sp. <i>Uncinula necator</i> <i>Podosphaera</i> sp.	Inhibition de la biosynthèse des protéines chez les champignons par l'inhibition de la peptidyle-transphérase	

**Tableau 7:** les antibiotiques produits par les actinomycètes utilisés en biocontrôle (Copping et Menn, 2000; Errakhi, 2008).

Antibiotiques	Actinomycètes	Maladie/agent antagoniste	Mécanisme d'action	Formule chimique
Natamycine	<i>Streptomyces natalensis</i> <i>Streptomyces Chattanoogaensis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>		
Oxytetracycline		<i>Erwinia amylovora</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp.	Inhibition de la biosynthèse des protéines en se fixant sur les sous unités 30S et 50S bactériennes et inhibe l'agglutination d' aminoacyl tRNA.	
Polyoxine	<i>Streptomyces Cacaoi</i> var <i>asoensis</i>	<i>Alternaria</i> spp. <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (chitine).	

**Tableau 7:** les antibiotique produits par les actinomycètes utilisés en biocontrôle (Copping et Menn, 2000; Errakhi, 2008).

Antibiotiques	Actinomycètes	Maladie/agent antagoniste	Mécanisme d'action	Formule chimique
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Xanthomonas Oryzae</i> <i>X. citri</i> <i>Pseudomonas tabaci steven</i> <i>P. lachrymans</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines en se fixant sur la sous unité 30S et il cause une erreur de lecture du gène codant pour la synthèse des protéines	
Validamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition de la trihalase causant un mauvais branchement du mycélium et arrêt de la croissance mycélienne	

## Introduction

Les champignons phytopathogènes réduisent de façon importante la productivité des cultures dans le monde entier, causant des pertes économiques importantes (**Prapagdee et al., 2008**). La fusariose est l'une des maladies fongiques rencontrées en Algérie, elle est à l'origine de pertes économiques considérables. La fusariose s'attaque à plusieurs cultures telles que les lentilles (**Belabid et al., 2004**), le palmier dattier (**Sabaou et al., 1983**) et le pois chiches (**Larbi, 1990**). Les agents pathogènes responsables de cette maladie appartiennent au genre *Fusarium* spp.

Plusieurs autres espèces appartenant aux genres *Drechslera*, *Bipolaris* et *Exserohilum* sont des agents pathogènes des plantes. Elles sont responsables de la pourriture racinaire et des taches foncées sur les feuilles. Par exemple *Drechslera teres* attaque les champs d'orge et provoque l'helminthosporiose, caractérisée par ses stries horizontales de couleur brunâtre, entourées de chlorose. Au stade avancé, les différentes taches se rejoignent et induisent rapidement la mort des feuilles atteintes (**Bouzerzour, 1994**).

En Algérie, la fève occupe une place prédominante dans la culture des légumineuses alimentaires. La fève participe à l'amélioration de la fertilisation du sol grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. Cette culture est sujette à plusieurs maladies. La maladie des taches chocolat associée à *Botrytis fabae* est l'une des maladies les plus destructives sur culture de fève en Algérie (**Bouznad, 2001**). Dans la région du Maghreb (Libye, Tunisie, Algérie, Maroc), les pertes dues aux maladies des taches chocolat peuvent atteindre 60 à 80% sur les cultivars sensibles (**Bouhassan et al., 2004**).

La culture de l'olivier représente une place importante dans l'agriculture de nombreux pays du bassin Méditerranéen. L'oléiculture algérienne est constituée d'environ 20 millions d'arbres sur une superficie d'environ 207.822 hectares. L'olivier est sensible à de nombreuses maladies entre autres la verticilliose. Cette maladie vasculaire apparue

depuis quelques années présente une menace sérieuse pour l'oléiculture en Algérie (Bellahcene *et al.*, 2005).

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes fixés, dans cette partie, comme objectif l'isolement et l'identification des champignons phytopathogènes inféodés aux cultures céréalières, maraîchères rencontrés dans l'est Algérien.

## Matériel et méthodes

### 1-Prospection et échantillonnage (Tableau 8)

#### 1-1-Les grandes cultures

Dans le cadre des prospections faites par l'INRAA (unité de recherche Constantine), des sorties ont été réalisées durant la période s'étalant du mois de Mars au mois de Juin 2007. Des parcelles de cultures céréalières, situées au Nord-Est de l'Algérie, ont été explorées afin de repérer les foyers attaqués par les champignons et récupérer des échantillons de plantes infestées.

Les prospections sont effectuées, du stade fin de tallage au stade de la fin montaison/ début épiaison des cultures, selon la procédure classique du choix aléatoire des parcelles dont les cultures sont infestées. Ainsi, les prélèvements des échantillons ont été effectués au cours des périodes suivantes : du 15 mars au 15 avril pour les stades tallage/ début montaison et du 20 Avril au 15 juin pour les stades fin montaison à début épiaison.

Les échantillons de blé dur ont été collectés à partir de parcelles cultivées à Guelma et Bni Hmiden. Les plantules sont caractérisées par une pourriture des racines et de la base des tiges. Il est à noter que les épis des plantules en provenance de Bni Hmiden étaient de couleur rose. Les racines d'avoine échantillonnées à Ibn Ziad présentent un brunissement à la base des tiges et des points noirs sur les racines. Les plantules d'orge infestées sont collectées à Skikda, d'après le diagnostic macroscopique, elles présentent des symptômes de l'helminthosporiose (**Figure 7a**).

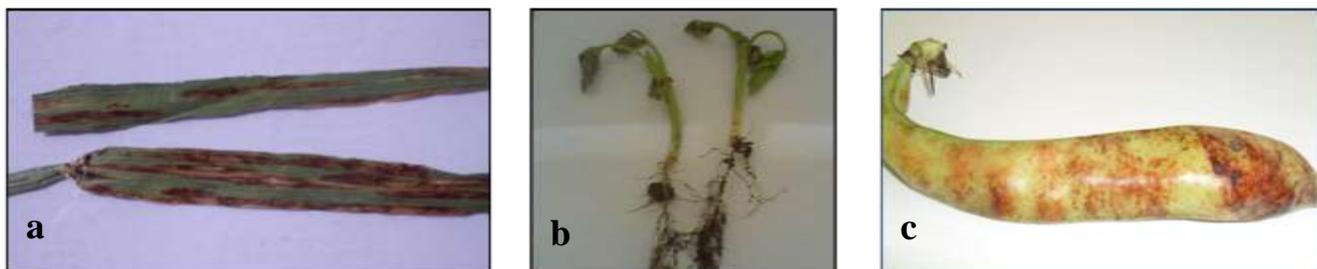
#### 1-2-Les cultures maraîchères

Au niveau d'une culture de pastèques, située dans la commune de Ben Badis, un foyer de plantules chétives présentant un jaunissement a été repéré et quelques éléments ont été prélevés (**Figure 7b**). Des gousses, d'une culture de fèves située au niveau de la station régionale de l'Istitut National de la Protection des Végétaux à Constantine (INPV), présentant des taches ont été collectées (**Figure 7c**).

**Tableau 8:** les échantillons collectés, leurs sites de prélèvement et les symptômes des maladies évoquées.

Sites	Culture et échantillons	Symptômes	Maladies Fongiques*
Skikda	Orge (feuilles)	Stries foliaires brunes entourées d'un halo jaune	helminthosporiose
Constantine (Ben badis)	Pastèque (racines)	Plantules chétives, flétris et jaunâtres	Fusariose
Guelma	Blé dur (tiges et racines)	Brunissement du collet et pourriture racinaire	Fusariose
Constantine (Ibn Ziad)	Avoine (tiges et racines)	Brunissement du collet et taches noires sur les racines	Fonte des semis
Constantine (Bni H'miden)	de blé dur (grains et tiges)	Taches noires sur les grains, grains de couleur rose et pourriture racinaire	Fusariose Alternariose
Constantine (station INPV)	Fèves (gousses)	Taches marron sur feuilles et gousses	Tache chocolat anthracnose

(\*) d'après le diagnostic macroscopique



**Figure 7:** les échantillons, (a) feuilles d'orge avec des taches helminthosporiennes; (b) plantules des pastèques flétris; (c) gousses de fèves avec les taches chocolat (tan spot).

Tous les échantillons sont recueillis dans des sacs stériles et sont acheminés directement au laboratoire pour être analysés ou bien conservés au congélateur jusqu'à analyse. En plus de ces échantillons, nous avons pris en considération une souche de *Verticillium dahliae* isolée d'un olivier qui nous a été fournie par l'INRAA (Unité de recherche/Constantine).

## **2-Pré-traitement et mise en culture des échantillons**

Les échantillons (feuilles, tiges, gousses et racines) sont trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 10 minutes, ensuite rincés dans de l'eau distillée stérile et séchés sur papier filtre (Zehhar *et al.*, 2006).

La mise en culture est réalisée sur milieu PDA et S (**Annexe 1**), cependant les gousses de fèves ont été cultivées sur milieu FDA (**Annexe 1**). Pour chaque échantillon, trois boîtes sont réalisées. La durée d'incubation est de sept jours à 20°C (Rémi, 1997).

## **3-Purification des isolats fongiques**

Les isolats obtenus sont purifiés par un repiquage successif sur milieu PDA jusqu'à l'obtention de souches pures. Cette pureté est contrôlée par observation microscopique des cultures.

## **4-Conservation des isolats**

Une méthode simple et peu coûteuse de conservation fongique de culture est le stockage des blocs d'agar dans l'eau. Les petits blocs d'agar (7-10 mm<sup>2</sup>) d'une jeune colonie fongique sont prélevés et placés dans de l'eau stérile. Les flacons sont ensuite stockés entre +1 et +10 °C. Les cultures peuvent être rétablies en plaçant un bloc dans un milieu de culture approprié. Cette méthode permet de maintenir les caractéristiques de mycètes au moins 7 ans (Nguyen, 2007). Les isolats fongiques sont aussi conservés dans du PDA en tubes.

## 5-Caractérisation des isolats fongiques

La détermination des genres et des espèces fait appel aux caractères morphologiques et culturaux. Après purification, les isolats sont ensemencés sur milieux PDA, S et Malt agar (**Annexe 1**). Des préparations fixées au lactophénol (**Annexe 2**) sont examinées au microscope optique (X 40). La couleur et la texture du thalle, le revers de la culture, la vitesse de croissance sont notées. L'identification est basée sur les clés de détermination des moisissures recommandées par **Botton et al. (1990)**, **Rémi (1997)** et **Messiaen (1991)**.

## Résultats

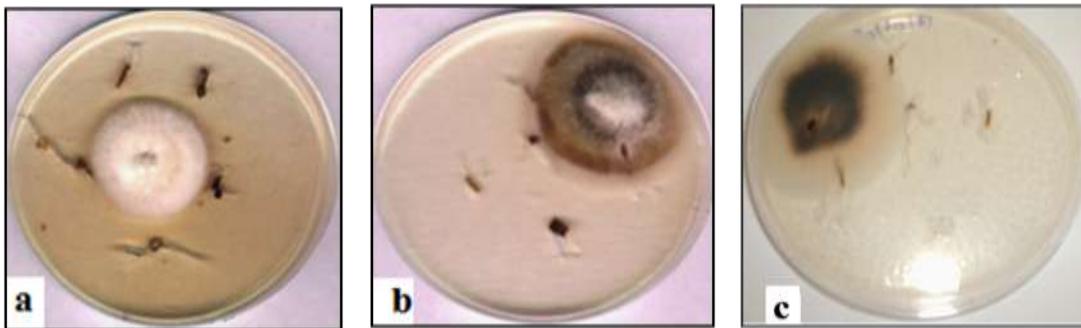
### 1-Isolement et caractérisation des champignons phytopathogènes

Après la phase d'incubation, 19 isolats fongiques ont été prélevés et purifiés. Les échantillons du blé dur suspectés d'avoir la fusariose ont permis l'isolement de sept isolats fongiques, trois isolats à partir des racines de blé (IF1, IF2, IF3) et quatre isolats à partir des graines (IF4, IF5, IF6, IF7). Pour les autres échantillons des cultures céréalières, trois souches ont été isolées à partir des racines et des collets d'avoine (IF8, IF9, IF10) et trois autres souches (IF11, IF12, IF13) à partir des feuilles d'orge (**Figure 8**).

Les échantillons des cultures maraîchères ont fourni six isolats fongiques, trois à partir des racines de pastèque atteintes du nanisme (IF14, IF15, IF16) et trois proviennent des gousses de fèves présentant des taches marron chocolat (IF17, IF18, IF19).

En se basant sur les clés de détermination des genres à savoir les caractères culturaux et la morphologie microscopique (la taille, la forme et l'arrangement des conidies sur le conidiophore), établies par **Botton et al. (1990)**, **Messiaen et al. (1991)** et **Rémi et al. (1997)**, il s'est avéré que les 19 isolats fongiques appartiennent à 10 genres :

- les isolats IF3, IF10 et IF18 sont classés dans le genre *Penicillium*;
- six isolats appartiennent au genre *Alternaria* (IF2, IF4, IF9, IF11, IF16, IF19) ce genre est présent dans tous les échantillons analysés;



**Figure 8:** aspect des colonies fongiques avant la purification, (a) feuilles de blé dur; (b) feuilles d'orge; (c) racines d'avoine.

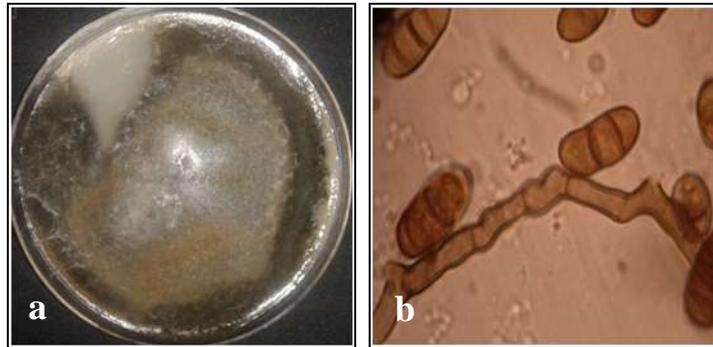
- quatre isolats sont rapprochés des genres *Aspergillus* (IF7 et IF14) et *Fusarium* (IF5 et IF15);
- les isolats notés IF1, IF6, IF8, IF12, IF13 et IF17 sont, respectivement, apparentés aux genres *Microdochium*, *Rhizopus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Drechslera* et *Botrytis*.

Seulement les espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Bipolaris*, *Microdochium*, *Drechslera* et *Botrytis* ont été retenues pour la suite de l'étude au vu de leur importance en tant qu'agents phytopathogènes, non saprophytes.

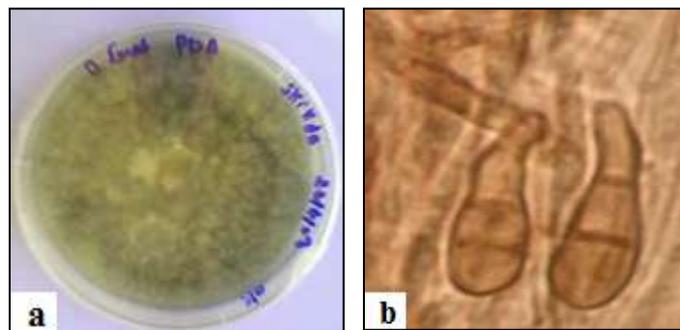
Les isolats appartenant aux genres *Drechslera* et *Bipolaris* sont cultivés, pour identification, sur des milieux qui favorisent leur sporulation et leur différenciation. Sur Malt-Agar, les colonies de l'isolat IF8 appartenant au genre *Bipolaris* sont vertes foncées à noirâtres et contournées à leur périphérie. Le champignon sporule abondamment. L'observation des préparations microscopiques montre que les conidiophores sont droit à flexueux et colorés. Les spores sont de couleur brune foncée, droites ou légèrement courbées. Elles ont entre 3 à 5 cloisons transversales souvent très épaisses (**Figure 9**). Selon **Remi (1997)** ces caractéristiques morphologiques sont typiques à *Bipolaris sorokiniana*.

D'après les clés d'identification de **Rémi (1997)**, l'isolat IF13 correspondant à *Drechslera* sp. présente les caractéristiques de *Drechslera teres*. Sur Malt-Agar les colonies sont de couleur grise-verdâtre (**Figure 10a**), le conidiophore est brun clair, les spores isolées ou par petits groupes, prennent naissance aux extrémités de ces conidiophores. Les spores sont cylindriques, arrondies à l'extrémité avec 2 à 7 cloisons transversales (**Figure 10b**).

D'après le diagnostic macroscopique, les feuilles d'orge présentant des rayures réticulées qui sont dues à *D. teres*, ces taches sont elliptiques, brun foncé et s'allongent pour former des stries étroites et longues se développant le long de la nervure. À l'intérieur de ces lésions, de minuscules lignes horizontales plus foncées sont présentes donnant l'apparence d'un réseau. Un jaunissement peut se développer autour des stries.



**Figure 9:** observation microscopique de l'isolat *Bipolaris sorokiniana*.



**Figure 10:** observation de l'isolat *Drechslera teres*, (a) aspect macroscopique;  
(b) aspect microscopique.

Pour les isolats assignés aux genres *Fusarium* et *Microdochium*, qui sont des genres très proches, l'identification de l'espèce est basée sur l'observation des préparations microscopiques (la présence, la taille et l'arrangement des microconidies et des macroconidies) après culture sur milieu de différenciation A.

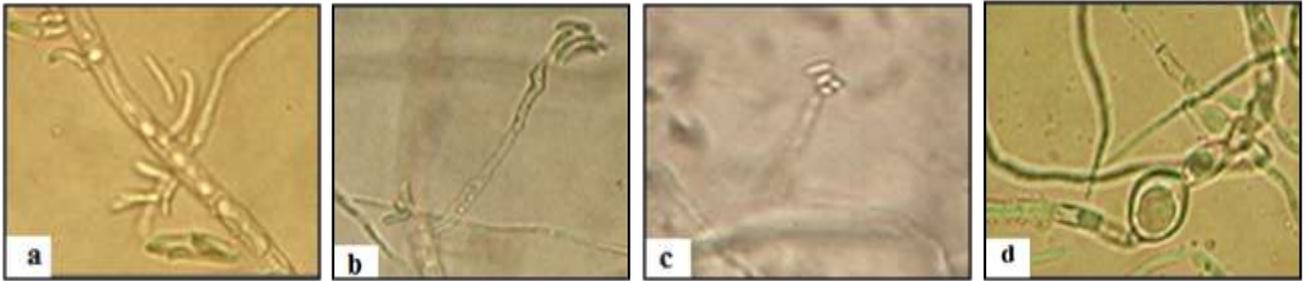
La culture de l'isolat IF15 (*Fusarium* sp.) sur milieu A, présente un mycélium aérien cotonneux de couleur blanc-rosé. L'aspect microscopique est caractérisé par la présence des microconidies, qui sont elliptiques et produites en fausse tête sur des conidiophores courts. Les macroconidies sont produites sur des sporodochies, les chlamydospores sont observés dans le mycélium (**Figure 11**).

Sur milieu A les colonies de l'isolat IF5 (*Fusarium* sp.) sont rouge brique à reflet jaune sous microscope, le mycélium présente des agglomérats translucides formés de sporodochies producteurs de nombreuses macroconidies. Ces dernières sont hyalines, épaisses et faiblement arquées. Ces spores ont 3 à 5 cloisons, elles portent des chlamydospores. Les microconidies sont absentes (**Figure 13**).

Sur Malt-Agar le mycélium de l'isolat IF1 (*Microdochium* sp.) est blanc et devient crémeux en vieillissant. Les conidiophores produisent seulement des macroconidies de dimensions uniformes, qui sont amincies aux deux extrémités et sont pédiculées à leur base. Elles ont de 1 à 3 cloisons (**Figure 12**).

La comparaison de ces caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques avec les clés d'identification recommandées par Rémi (1997), Botton (1990) et Messiaen (1991), permet d'assigner les isolats IF5, IF15 et IF1, respectivement, aux espèces *F. oxysporum*, *F. culmorum* et *Microdochium nivale*.

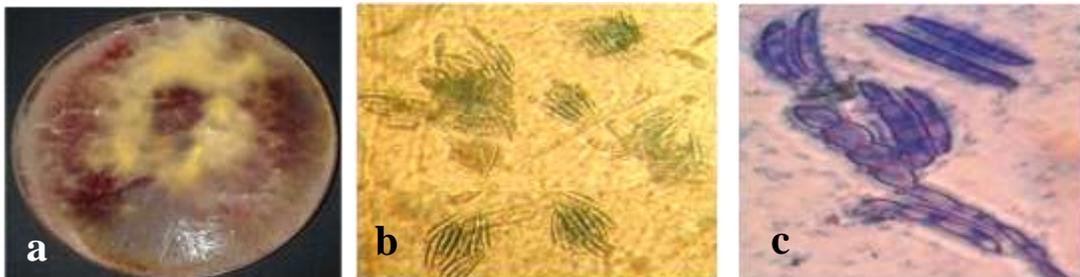
L'isolat IF17 appartenant au genre *Botrytis* présente un thalle à croissance très rapide, d'abord blanc puis gris à brun noir. Le conidiophore est d'aspect arbusculaire dans sa partie terminale. De nombreuses conidies ovoïdes sont produites et sont insérées en grappe, cet aspect correspond à *B. fabae*. Les sclérotites sont aussi formées (**Figure 14**).



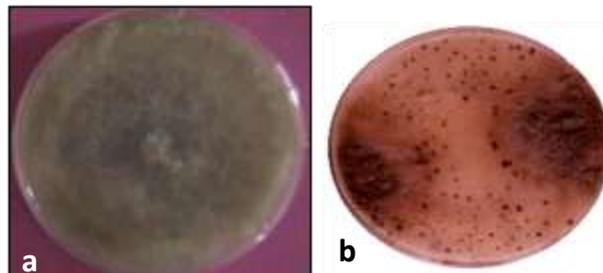
**Figure 11:** observation de l'isolat *F. oxysporum* (a) conidiophore; (b) les macroconidies; (c) microconidies; (d) chlamydozoospores.



**Figure 12:** observation des macroconidies de l'isolat *Microdochium nivale*.



**Figure 13:** observation de l'isolat *F. culmorum*, (a) aspect macroscopique; (b) sporodochies; (c) les chlamydozoospores.



**Figure 14:** observation de l'isolat *B. fabae*, (a) aspect macroscopique; (b) les sclérotés.

Considérant leur rôle en phytopathogénicité, les isolats retenus pour la suite de l'étude sont désignés: *F. culmorum* TRI-1, *M. nivale* TRI-2, *F. oxysporum* CIT-4, *D. teres* HOR-5, *B. sorokiniana* AVE-3 et *B. fabae* VIC-11. Au **Tableau 9** sont cités les plantes-hôtes et leurs isolats fongiques correspondant.

## Discussion

Les milieux de culture S et PDA utilisés pour l'isolement, se sont avérés efficaces sauf pour l'isolement de *Botrytis fabae* où un milieu sélectif a été utilisé (FDA). En plus du milieu Malt-Agar, l'identification des espèces appartenant au genre *Fusarium* et *Microdochium* a été effectuée sur milieu A, recommandé par **Messiaen (1991)**, qui a permis la différenciation des espèces appartenant à ces deux genres.

Sur les 19 isolats fongiques, seulement 6 ont été retenus car ils présentent un caractère pathogène important. D'après **Breault et al. (2009)** les champignons *Alternaria* et *Cladosporium* sont des champignons saprophytes, ils sont à l'origine des maladies de faiblesse, qui apparaissent à la fin de la saison de croissance où les feuilles desséchées sont recouvertes d'une pigmentation noire. Aussi, **Patkowska (2002)** a rapporté que *Penicillium* spp. isolés du blé à partir des racines et des bases de tiges nécrosées sont considérées comme saprophytes.

La fusariose des céréales sévit sous tous les climats où les céréales sont cultivées. Sur blé et orge, la fusariose peut affecter sévèrement le rendement des récoltes et potentiellement déprécier la qualité sanitaire des grains récoltés. Les échantillons de tiges de blé dur présentant les symptômes de la fusariose, d'après le diagnostic macroscopique, ont permis l'isolement de deux souches *Microdochium nivale* et *Fusarium culmorum*.

L'isolement *M. nivale* et *F. culmorum*, à partir des lésions de la base des tiges, a été déjà rapporté par **Gindrat et Frei (2004)**. En outre, une étude menée en France a montré que la fusariose de céréales à petits grains (blé, orge, etc...) est causée principalement par

**Tableau 9:** les souches de champignons phytopathogènes isolées et leurs plantes hôtes.

<b>La souche</b>	<b>Designation de la souche</b>	<b>Maladie</b>	<b>Plante hôte</b>
<i>Fusarium culmorum</i>	TRI-1	Fusariose	<i>Triticum durum</i> Desf.
<i>Microdochium nivale</i>	TRI-2	Fusariose	<i>Triticum durum</i> Desf.
<i>Botrytis fabae</i>	VIC-11	Taches chocolat	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	AVE-3	Fonte des semis	<i>Avena sativa</i> L.
<i>Verticillium dahliae</i>	OLE-2	Verticilliose	<i>Olea europa</i> L.
<i>Drechslera teres</i>	HOR-5	Helminthosporiose	<i>Hordeum vulgare</i> L.
<i>Fusarium oxysporum</i>	CIT-4	Fusariose	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai

quatre espèces entre autres *M. nivale* et *F. culmorum* (Loos, 2001). L'étude de Patkowska (2002), a montré que sur les échantillons de blé infectés (les racines et les bases de tiges nécrosées), les *Fusarium* spp. sont parmi les champignons phytopathogènes dominant, notamment les espèces *F. culmorum* et *F. oxysporum*.

*Fusarium culmorum* est l'une des quatre espèces du genre *Fusarium* les plus pathogènes à trichothécènes, qui sont les principaux agents de la fusariose décrite dans le monde. Selon Rémi (1997) il est très difficile de distinguer à l'œil nu *F. culmorum* de *F. graminearum*. La seule différence morphologique, c'est l'absence de chlamydospores chez *F. graminearum*, au moment que, *F. culmorum* en produit aussi bien à partir du mycélium que sur spores elles-mêmes.

*M. nivale* pathogène du blé, précédemment classé avec les *Fusarium*, est l'un des principaux agents responsables de la fonte des semis sur céréale d'hiver et du printemps (Inglis et Cook, 1981). Il se manifeste par des taches brunes marquées de stries plus foncées sur la graine et la base des tiges, il est incapable de produire les toxines typiques aux espèces appartenant au genre *Fusarium* (Loos, 2001). D'après Rémi le *M. nivale* ne peut pas être confondue avec les *Fusarium*, mais par contre avec d'autres champignons tels que *Botrytis cinerea* qui a un aspect macroscopique assez voisin. Contrairement à *Botrytis cinerea*, *M. nivale* est incapable de produire les sclérotés.

L'espèce *Fusarium oxysporum* est présente dans les sols du monde entier où il se comporte soit comme parasite ou saprophyte, elle est inféodée aux cultures maraîchères Messiaen et al. (1991). La souche isolée dans la présente étude peut être incriminée comme étant un agent pathogène car *Rhizopus* et *Alternaria* isolés aussi des racines de la pastèque ne provoquent pas le nanisme. Ce dernier est du à la fusariose vasculaire. Aussi, selon Larkin et al., (1996) le *F. oxysporum* var. *niveum* est connu pour être un agent pathogène de la pastèque provoquant une fusariose vasculaire qui se traduit par un nanisme (Van-Der-Vossen et al., 2004). D'après Rémi (1997), ce pathogène présente de nombreuses formes spécialisées qui s'attaquent à plusieurs végétaux (pois, tomate, pastèque, melon, lin, etc).

À partir des racines d'avoine présentant des taches noires, le champignon isolé, sur milieu Malt-Agar est *Bipolaris* sp. Après observation macroscopique et microscopique, le champignon a été identifié en tant que *Bipolaris sorokiniana* (synonyme de *Drechslera sorokiniana*) (**Acharya et al., 2011**). Ces deux genres sont très proches, précédemment classés dans le genre *Helminthosporium*. **Weikert-Oliveira et al. (2002)** ont montré que les espèces appartenant à ces genres sont génétiquement distinctes.

*Bipolaris sorokiniana* est l'agent causal de la pourriture commune, la maladie de taches foliaires, la fonte des semis, la brûlure de l'épi et le point noir des céréales (**Kumar, 2002; Asad et al., 2009**). Selon **Rémi (1997)** ce champignon est transmis par les semences et les espèces attaquées sont le blé, l'avoine, l'orge et les graminées fourragères. **Asad et al., 2009** ont rapporté que parmi les différentes souches de *Bipolaris sorokiniana*, celles qui présentent une coloration vert-noir sont les plus virulentes.

D'après **Rémi (1997)**, *Drechslera teres* attaque les plantules qui sont déjà bien développées, elle entraîne des taches foliaires que l'on trouve, également, sur les graines et les épis. **Breault et al. (2009)** ont rapporté que *Bipolaris sorokiniana* (agent de la fonte des semis) et *D. teres* (agent de la rayure réticulé) affectant l'avoine et l'orge, respectivement, sont régulièrement isolés au Québec.

À partir des échantillons de fève et de féveroles, les deux champignons isolés forment tous les deux des sclérotas. Afin de les différencier **Botton et al., 1990**, ont rapporté que chez *B. fabae* les conidies sont ovoïdes, contrairement à celles de *B. cinerea* qui sont globuleuses et moins volumineuses. En conditions favorables de température et d'humidité, le champignon progresse dans les tissus foliaires, les taches grandissent et fusionnent entre elles. Celles-ci se caractérisent par une couleur brunâtre à noirâtre au centre et sont entourées d'une lisière de couleur chocolatée (**Agrios, 1988**). Le champignon fructifie sur ces nécroses sous forme d'un feutrage gris et libère des spores aptes à provoquer de nouvelles infections.

## Introduction

L'utilisation excessive de fongicides chimiques peut entraîner la pollution de l'environnement et avoir pour conséquence l'émergence de pathogènes résistants aux fongicides spécifiques et, par ailleurs, sont responsables de divers problèmes de santé chez les humains et les animaux (**Gerhardson, 2002**).

Les microorganismes antagonistes à des agents phytopathogènes ont été découvert et certains d'entre eux sont utilisés comme agents de lutte biologique contre les maladies des plantes (**Prapagdee et al., 2008**).

Les actinomycètes sont bien connus pour leurs capacités métaboliques, en particulier *Streptomyces* spp. qui produisent des milliers d'antibiotiques (**Berdy, 2005**). Ils semblent être de bons candidats comme agents de lutte biologique (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b**). Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram-positif, la plupart sont des saprophytes (**Khamna et al., 2009**) et sont abondantes dans la rhizosphère (**Sardi, 1992**). Cet environnement a été jugée une source riche pour l'isolement des agents de biocontrôle et promoteurs de croissance des plantes (**Crawford et al., 1993; Jiménez-Esquilin et Roane, 2005; Yilmaz et al., 2008**).

L'objectif de la présente partie est l'isolement des actinomycètes rhizosphériques à partir de différents sols semi-arides de l'Est Algérien. Les isolats purifiés seront criblés pour leur antagonisme *in vitro* envers des champignons phytopathogènes *Verticillium dahliae*, *Fusarium culmorum*, *Drechslera teres*, *Microdochium nivale*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis fabae* et *Fusarium oxysporum*.

## Matériel et méthodes

### 1- Isolement des actinomycètes rhizosphériques

#### 1-1- Échantillonnage

Les sols rhizosphériques sont collectés à partir de sept sites dans la région semi aride du Nord-Est Algérien. Les racines des arbres sont dégagées, puis 100 g du sol fermement lié aux racines sont prélevés à l'aide d'une spatule stérile (**Yilmaz et al., 2008**). Les plantes des cultures maraîchères et céréalières sont arrachées, secouées puis rincées avec de l'eau distillée stérile. (**Jiménez-Esquilin et Roane, 2005**). Au **Tableau 10** sont cités les plantes utilisées, les sites et les dates des prélèvements.

#### 1-2- Dilution et mise en culture

L'isolement des actinomycètes, à partir de la rhizosphère, est basé sur la technique décrite par **Crawford et al. (1993)**. Elle consiste en la préparation d'une série de dilution décimale de l'échantillon, puis l'inoculation des quatre dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  sur milieux sélectifs aux actinomycètes YCED (Yeast Casamino-Acids-Extract Dextrose-Agar) et WYE (Water Yeast Extract Agar) (**Annexe 1**). Les boîtes de Pétri sont incubés à 30°C pendant 2 à 3 semaines.

#### 1-3- Purification et conservation des souches

Après trois semaines d'incubation, les colonies présentant des aspects macroscopique et microscopique typique aux actinomycètes sont repiquées sur milieu Amidon-Caséine (**Annexe 1**) et conservées à +4 °C en gélose inclinée (**Cavala et Everlin, 1994**).

**Tableau 10:** les sites et les plantes des sols rhizosphériques explorés.

<b>Cultures</b>	<b>Plantes</b>	<b>Sites</b>	<b>Date du prélèvement</b>
Arbre fruitier	<i>Prunus domestica</i>	<b>Institut technique des cultures maraîchères et industrielles (ITCMI)</b> Bir Rokaa, OEB	Avril 2008
Cultures maraîchères	<i>Vicia fabae</i> <i>Allium cepa</i> <i>Lactuca sativa</i>	Parcelle cultivé à Batna	Mars 2008
Arbre forestier	<i>Pinus halepensis</i>	Conservation des forets, Khenchela	Novembre 2007
Cultures céréalières	<i>Triticum durum</i> <i>Hordeum vulagre</i>	Parcelle cultivée à Tébessa	Avril 2008

#### **1-4- Préparation d'un stock de spores de souches d'actinomycètes**

Les souches purifiées sont ensemencées sur milieu ISP<sub>2</sub> (**Annexe 1**) et incubées à 30 °C pendant 5 à 7 jours. Les cultures sont repiquées trois fois de suite pour s'assurer de la pureté des cultures produites. Ces dernières servent à inoculer le milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> (Yeast Malt Extract Agar) (**Annexe 1**). Les cultures sont incubées 72 heures à 30 °C, avant qu'elles ne soient étalées sur milieu gélosé YMEA+CaCO<sub>3</sub> (500 µl/boîte), leur pureté est contrôlée au microscope pour détecter les contaminants. Les boîtes sont ré-incubées à 30 °C pendant 15 jours jusqu'à obtention d'une bonne sporulation. Les spores sont récoltées à l'aide de billes de verre stériles dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

Les billes sont ensuite récupérées et rincées avec une solution à 20% de glycérol, le mélange, ainsi, obtenu est transvasé dans des eppendorfs stériles puis centrifugé à 4000 g. Le culot des spores obtenu est re-suspendu dans 1 ml de glycérol. Après 24 heures de congélation à - 80 °C, la pureté des stocks est vérifiée pour détecter une éventuelle contamination. Pour ce faire, les spores sont inoculées dans du bouillon TSB (**Annexe 1**), pendant 48 heures puis les cultures sont observées au microscope. Afin de dénombrer les spores viables des cultures pures, des dilutions décimales de spores sont préparées puis étalées sur milieu YMEA + CaCO<sub>3</sub>. Un bon stock doit avoir 10<sup>8</sup> spores/ml.

#### **2- Criblage des isolats d'actinomycètes antagonistes des champignons phytopathogènes**

Les actinomycètes sont ensemencés, sur milieu PDA (**Annexe 1**) au centre de la boîte de Pétri de 145 mm de diamètre, en une strie de 6 mm de large qui scinde la gélose en deux. Ces cultures sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Deux disques de 7 mm de diamètre de culture de champignons âgée de 8 jours sont déposés de part et d'autre de la culture d'actinomycètes. La distance entre le disque du champignon et le bord de la boîte est de 15 mm. Pour chaque isolat fongique est réalisé un traitement témoin, avec deux disques déposés sur milieu PDA sans actinomycètes. Toutes les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Chaque jour le diamètre de la colonie du champignon est mesuré pour tous les traitements y compris le témoin (**Soares et al., 2006**).

### 3- Étude statistique

Les données sont analysées par analyse de la variance (ANOVA). Le test LSD à 5% de probabilité est réalisé avec le logiciel SAS 9.1 pour déterminer la différence significative minimale entre les moyennes (Ryane et Kinkel, 1997; Alves-Santos *et al.*, 2002).

### 4- Spectre d'inhibition de la croissance d'espèces bactériennes et fongiques par les souches d'actinomycètes antagonistes sélectionnées

La méthode employée pour les bactéries et levures est celle d'Anibou *et al.* (2008) modifiée et celle de Soares *et al.*, (2006) pour les champignons-tests. Les cylindres d'Agar ont été découpés à partir des cultures d'actinomycètes sporulées. Ils sont placés sur les boîtes de Pétri déjà inoculées en masse par les microorganismes-tests ( $10^8$  cellules/ml). Les cultures sont d'abord incubées de 14 à 18 heures à 2 - 8 ° C pour permettre la diffusion des substances bioactives. Après la période d'incubation à la température adéquate pour chaque microorganisme, la présence ou l'absence d'inhibition est notée. L'activité antimicrobienne est évaluée par la mesure, en mm, de la zone stérile après 48 heures d'incubation pour les bactéries et levures et 7 jours pour les champignons. Les microorganismes testés sont :

- **champignons et levures** : *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Trichophyton rubrum* ATCC 28189, *Trichoderma harzianum*, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Saccharomyces cerevisiae*;

- **bactéries d'importance clinique** : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Citrobacter* sp., *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Serratia marcescens* ATCC 264 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583;

- **bactéries phytopathogènes** : elles ont été isolées à partir des arbres fruitiers (pommier, framboisier, etc) et de cultures maraîchères (pomme de terre, etc) au Québec : *Agrobacterium tumefaciens*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* 824, *E. carotovora* subsp.

*amylovora* 1111, *Erwinia carotovora* subsp. *amylovora* 998, *Erwinia carotovora* subsp. *amylovora* 1024 et *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 750;

- **autres actinomycètes** : c'est un antagonisme actinomycètes-actinomycètes à savoir nos souches sélectionnées contre des actinomycètes fournis par le Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne, Département de biologie, Université de Sherbrooke, Québec. Canada : *Streptomyces hygroscopicus hygroscopicus* ATCC 21840, *Streptomyces hygroscopicus geldanus* ATCC 55256, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces melanofaciens* EF-76, *Streptomyces aureofaciens* EF-31 et *Nocardia argentinensis* ATCC 31306.

## Résultats

### 1-Isolement et purification des actinomycètes rhizosphériques

L'isolement des bactéries actinomycétales a été effectué à partir de sept échantillons de sols rhizosphériques de cultures maraîchères (la fève, l'ail et la laitue), de cultures céréalières (orge et blé) et d'arbres forestier et fruitier (le pin d'Alep et le prunier). Un total de 72 actinomycètes ont été isolés. 39 et 33 souches, respectivement, à partir des milieux de culture YCED et WYEA (**Tableau 11**). Les isolats obtenus sont purifiés après plusieurs repiquages sur milieu Amidon-Caséine, conservés sur gélose inclinée à +4 °C et sous forme de stocks de spores congelés à -80°C.

L'analyse statistique des résultats montre que les proportions d'actinomycètes obtenues à partir des sept rhizosphères explorées sont différentes (**Tableau 11**). La rhizosphère de *Prunus domestica* et de *Pinus halepensis* ont fourni le même taux (25%) d'isolats, suivi par *Lactuca sativa* 19,44%. Les isolats de *Triticum durum*, *Hordeum vulgare* et *Vicia faba* représentent 18,05%, 5,55% et 4,16%, respectivement. La proportion des isolats en provenance de la rhizosphère d'*Allium cepa* est de 2,77%.

**Tableau 11:** nombre d'isolats d'actinomycètes isolés des différents sols rhizosphériques.

Sol rhizosphérique	Site	Nombre d'isolats		
		YCED	WYE	Total (%)
<i>Allium cepa</i>		1	1	2 (2,77)
<i>Lactuca sativa</i>	Parcelle cultivé, Batna	8	6	14 (19,44)
<i>Vicia faba</i>		1	2	3 (4,16)
<i>Triticum durum</i>		10	3	13 (18,05)
<i>Hordeum vulgare</i>	Champs, Tebéssa	2	2	4 (5,55)
<i>Prunus domestica</i>	ITCMI*	8	10	18 (25,0)
<i>Pinus halepensis</i>	Conservation des forêts, Khenchela	9	9	18 (25,0)
Total		39	33	72

(\*) ITCMI : institut technique des cultures maraîchères et industrielles.

## 2-Criblage des isolats antagonistes

La croissance du mycélium des sept champignons phytopathogènes (*F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Microdochium nivale*, *D. teres*, *B. sorokiniana*, *B. fabae* et *V. dahliae*) a été inhibée par les cultures d'actinomycètes, lorsqu'elles sont cultivées conjointement sur milieu PDA. Dans le **Tableau 12**, sont rapportés les résultats de l'antagonisme des 72 isolats actinomycètes contre les sept microorganismes-tests

Parmi les 72 isolats actinomycètes, deux n'ont montré aucune activité antagoniste, 22 isolats ont inhibé la croissance d'un seul des sept champignons phytopathogènes testés et 48 isolats ont inhibé au moins deux espèces de champignons. **Seuls les isolats inhibant la croissance d'au moins 6 champignons ont été retenus pour la suite de l'étude (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16).**

Les pourcentages des isolats actifs contre *F. oxysporum*, *B. sorokiniana*, *V. dahliae*, *M. nivale* et *F. culmorum* sont, respectivement, de 54%, 46%, 33%, 17%, 16%.

Les résultats des tests d'antagonisme pour les six isolats choisis sont présentés dans la **Figure 15**. Parmi les six isolats d'actinomycètes sélectionnés, cinq isolats (Lac1, Lac3, Vic8, Pru14 et Pru16) ont inhibé la totalité des champignons phytopathogènes. Seulement l'isolat Pin10 était incapable d'inhiber la croissance de *M. nivale*. Les isolats provenant de sols rhizosphériques de l'orge, du blé et de l'ail présentent une activité antagoniste, mais elle n'est pas significative par comparaison avec celles des autres isolats.

L'isolat Lac1 s'est avéré le plus efficace pour le contrôle de la croissance du mycélium de *D. teres*, *M. nivale*, *B. sorokiniana* et *B. fabae* avec une inhibition de croissance de 59,72%, 72,19%, 65,09% et 52,33%, respectivement. L'isolat Pru14 était efficace sur la réduction de la croissance du mycélium de *F. culmorum* (60,15%). Alors que Pru16 était le meilleur isolat pour le contrôle de la croissance du mycélium de *V. dahliae* et du *F. oxysporum* avec des réductions de croissance de 50,81% et 62,77%, respectivement. Les isolats Lac1 et Pru16 présente la plus forte activité antagoniste (**Figure 15**).

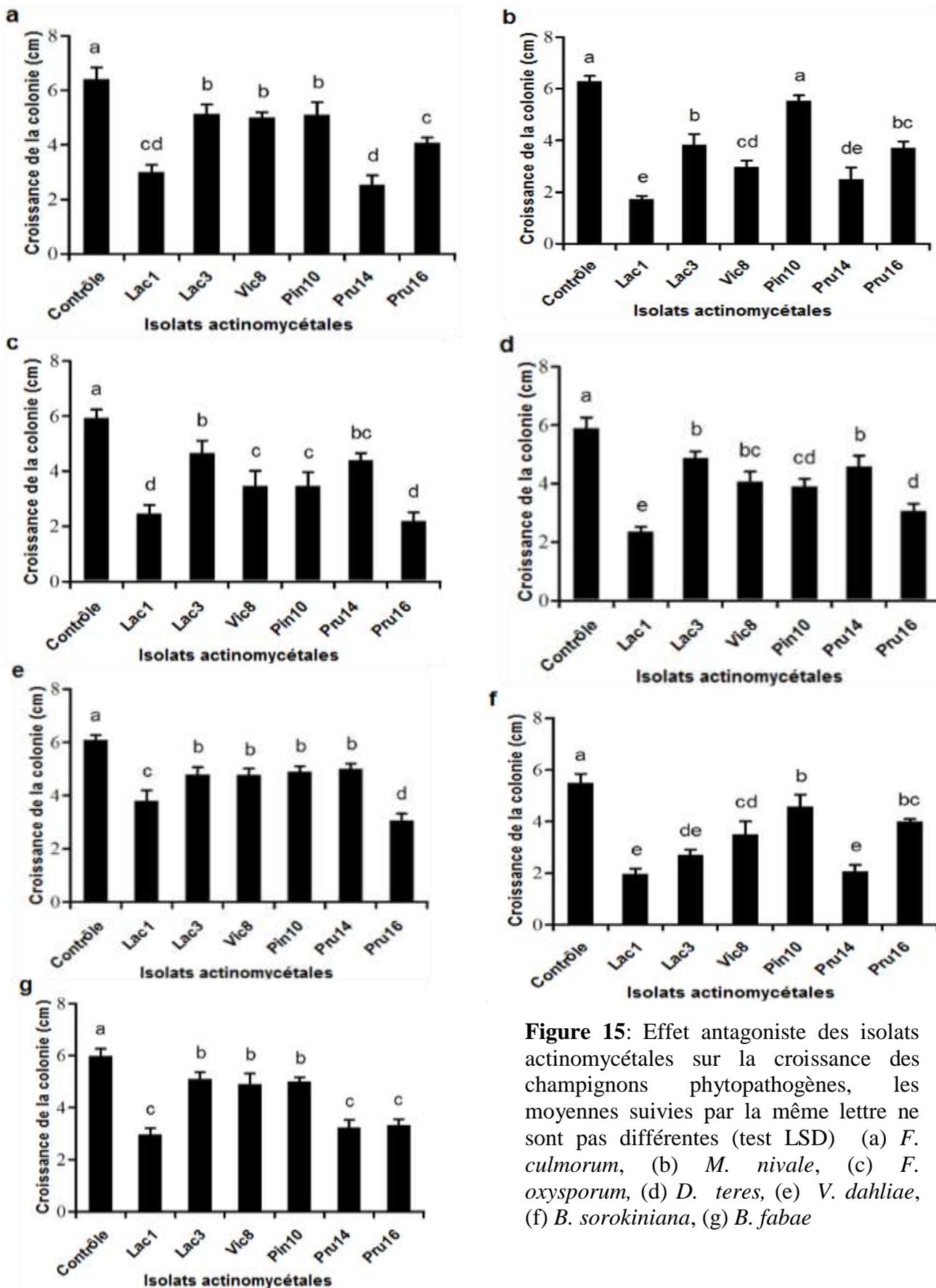
**Tableau 12:** antagonisme des 72 isolats d'actinomycètes vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

Isolats d'actinomycètes <sup>(1)</sup>	Champignons phytopathogènes <sup>(2)</sup>						
	<i>F. o</i>	<i>F. c</i>	<i>M. n</i>	<i>V. d</i>	<i>D. t</i>	<i>B. s</i>	<i>B. f</i>
Pru1, Pru4, Pru6, Pin5, Hor2, Hor3, Hor4, Pin1, Pin4 Pin8, Pin12, Tri3, Lac5, Lac7, Vic1, Tri9, Pin16,	+	-	-	-	-	-	-
Pru17, Lac2, Lac4, Lac9, Lac12, Vic4, Tri6, Tri7,	-	-	-	-	-	+	+
Pru2, Pru8, Pin17, Lac10, Pin3, Pin13	+	-	-	-	-	+	-
Lac13, Tri2, Tri5, Tri13, Tri12, Pin8, Pru1, Pin7, Tri1	+	-	-	+	-	-	-
Pru11, Pin2, Pin9, Lac6, Tri11, All1	-	-	+	-	-	+	-
Lac8, Pru7, Pin6, Pin11	-	+	-	+	-	-	-
Lac11, Pru3	-	-	+	+	-	-	-
Tri10, Tri4	-	-	+	-	+	-	-
Pin14, Pin5	-	-	-	-	+	+	-
Pru9, Pru12	-	-	-	+	+	-	-
Tri8	-	+	-	-	-	+	-
Lac14	-	-	-	-	+	-	-
Pru10, Pru5	-	-	-	-	-	+	-
All2, Hor1	-	-	+	-	-	-	-
Pru14, Pru16, Lac1, Lac3, Vic8	+	+	+	+	+	+	+
Pin10	+	+	-	+	+	+	+
Pru13, Pru15	-	-	-	-	-	-	-

(+) : inhibition ; (-) : pas d'inhibition.

(1) Pru : *Prunus domestica*; Hor : *Hordeum vulgare*; Pin : *Pinus halepensis*, Lac : *Lactuca sativa*; Vic8 : *Vicia faba*; All : *Allium cepa*; Tri : *Triticum durum*.

(2) *F. o* : *Fusarium oxysporum*; *F. c* : *fusarium culmorum*; *M. n* : *Microdochium nivale*; *V. d*: *Verticillium dahlia*; *D. t*: *Drechslera teres*; *B. s* : *Bipolaris sorkiniana*; *B. f*: *Botrytis fabae*.



**Figure 15:** Effet antagoniste des isolats actinomycétales sur la croissance des champignons phytopathogènes, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes (test LSD) (a) *F. culmorum*, (b) *M. nivale*, (c) *F. oxysporum*, (d) *D. teres*, (e) *V. dahliae*, (f) *B. sorokiniana*, (g) *B. fabae*

### 3-Activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes sélectionnés

Les résultats de l'activité antibactérienne des six isolats contre des bactéries-tests d'importance clinique figurent dans le **Tableau 13**. Lac1 est active contre toutes les bactéries sauf *Citrobacter* sp., *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*, qui ont présenté une résistance. L'isolat Lac3 montre la même activité que Lac1, à la seule différence qu'il n'inhibe pas la croissance de *Staphylococcus aureus*. Les isolats Vic8, Pru14 et Pru16 ne sont actifs que sur *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*, alors que l'isolat Pin10 s'est révélé actif seulement contre *E. coli*.

Aucun des six isolats n'agit sur *Candida albicans* et *Trychophyton rubrum*. *Sacharomyces cerevisiae* a résisté à l'action de Pin10. Contrairement aux isolats Lac3, Pin10 Pru14 et Pru16, les isolats Lac1 et Vic8 ne présentent aucune activité contre *Aspergillus niger* (**Tableau 14**).

L'antagonisme des six isolats vis-à-vis des bactéries phytopathogènes : *E. carotovora* subsp. *amylovora* 1111, *E. carotovora* subsp. *amylovora* 998 et *E. carotovora* subsp. *amylovora* 1024; a révélé une activité inhibitrice de deux isolats Lac1 et Pru14. Par comparaison des zones d'inhibition, celles obtenues avec la souche Lac1 (32 à 34 mm) sont plus importantes que celles obtenues avec la souche Pru14 (17 à 20 mm). Les souches *E. carotovora* subsp. *carotovora* 824 et *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 750 se sont avérées résistantes. Les isolats Lac1, Vic8 et Pru14 ont exhibé une activité antibactérienne contre la souche *A. tumefaciens*, les diamètres des zones d'inhibition sont de 21, 18 et 21 mm, respectivement (**Tableau 15**).

L'action inhibitrice des isolats sur les bactéries phytopathogènes est limitée à trois isolats antagonistes Lac1, Lac3 et Pru14. *Nocardia argentinensis* ATCC 31306 est sensible vis-à-vis l'isolat Lac1, alors que *S. aureofaciens* EF-31 et *S. griseofuscus* sont sensibles à Lac1, Lac3 et Pru14. Aucune zone d'inhibition n'a été obtenues avec les souches-tests : *S. hygroscopicus hygroscopicus* ATCC 21840, *S. hygroscopicus geldanus* ATCC 55256 et *S. melanofaciens* EF-76 (**Tableau 16**).

**Tableau 13:** activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cliniques.

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pru14	Pru16	Pin10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	22	0	15	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	40	40	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	10	21	12	25	24	24
<i>Citrobacter</i> sp.	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	30	0	0	0	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	10	8	14	12	12	13
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 264	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	0	0	0	0	0	0

**Tableau 14:** activité antimicrobienne vis-à-vis des champignons pathogènes.

	Inhibition					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pru14	Pru16	Pin10
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	0
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	-	+	-	+	+	+
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189	-	-	-	-	-	-

(+) : inhibition ; (-) : pas d'inhibition.

**Tableau 15:** activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries phytopathogènes.

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pru14	Pru16	Pin10
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 824	0	0	0	0	0	0
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 750	0	0	0	0	0	0
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>amylovora</i> 1111	33	0	0	19	0	0
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>amylovora</i> 998	32	0	0	17	0	0
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>amylovora</i> 1024	34	0	0	20	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35	0	18	21	0	0

**Tableau 16:** activité antimicrobienne vis-à-vis des souches actinomycétales.

	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pru14	Pru16	Pin10
<i>S. hygroscopicus hygroscopicus</i> ATCC 21840	0	0	0	0	0	0
<i>S. hygroscopicus geldanus</i> ATCC 55256	0	0	0	0	0	0
<i>S. melanofaciens</i> EF-76	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureofaciens</i> EF-31	23	13	0	12	0	0
<i>S. griseofuscus</i>	35	19	0	14	0	0
<i>Nocardia argentinensis</i> ATCC 31306	21	0	0	0	0	0

## Discussion

L'isolement des actinomycètes antagonistes a été réalisé à partir de la rhizosphère. Ce biotope a été choisi car il se caractérise par un accroissement considérable des populations microbiennes suite à l'abondance des substrats énergétiques. **Cooper et al. (1949)**, **Sirry et al. (1981)**, **Mohamed (1982)** et **Davet (1996)** ont rapporté que les actinomycètes sont plus abondants dans la rhizosphère que dans le sol avoisinant.

Les milieux de cultures employés pour l'isolement des actinomycètes sont YCED et WYE. C'est deux milieux se sont avérés efficaces pour l'isolement des actinomycètes à partir du sol rhizosphérique. D'après **Crawford et al. (1993)** c'est des milieux à faible teneur en nutriments organiques, ils retardent suffisamment la croissance des bactéries pour permettre la sporulation des actinomycètes, qui apparaît après 7 à 14 jours d'incubation.

Le nombre d'isolats d'actinomycètes obtenu dans cette étude n'est pas différent de celui rapporté par **El Mehalawy et al. (2004)** à partir des rhizosphères situées en Egypte (85 isolats), mais inférieur à celui obtenue par **Loqman et al. (2009)** au Maroc (142 isolats) et **Jiménez-Esquilin et Roane (2005)** aux États-Unis (122 isolats).

Ainsi, dans notre étude 72 isolats ont été isolés de la rhizosphère de différents plantes appartenant à différentes cultures (maraîchères, céréalières et fruitières). La rhizosphère de *Prunus domestica* et *Pinus halepensis* ont fourni 18,25 % des isolats et seulement 2,2 % ont été obtenus à partir de la rhizosphère d'*Allium cepa*. Le nombre d'actinomycètes isolés diffère d'une espèce végétale à une autre. Ce résultat est en concordance avec la littérature. **Davet (1996)** a rapporté que la composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante, et ceci est dû à la qualité et à la quantité de l'exsudation et de la sécrétion. Aussi d'après les travaux de **Grayston et al. (1998)**, la diversité des microorganismes rhizosphériques des espèces végétales peut être due à la variation des sources de carbone exsudées par ces plantes.

Il ya peu d'informations publiées sur le dépistage des actinomycètes antifongiques de la rhizosphère des sols semi-arides de l'Est Algérien. **Kitouni et al. (2005)** a exploré le sol non rhizosphérique de zone semi-aride et a obtenu un faible nombre d'isolats actinomycètes (8 isolats).

Afin de cribler les isolats d'actinomycètes antagonistes, le test d'antagonisme a été réalisé sur milieu solide en utilisant la technique des cylindres d'Agar. En effet, il a été démontré que le milieu solide est le plus adéquat pour le développement des actinomycètes et la production d'antibiotiques (**Shomura et al., 1979, Badji et al., 2005; Anibou et al., 2008**).

La rhizosphère de la laitue a déjà fait l'objet d'un isolement d'actinomycètes par **El-Tarabily et al. (2000)** à partir de laquelle il a isolé 129 actinomycètes dont deux isolats : *S. Viridodiasticus* et *Micromonospora carbonacea* se sont avérés très efficaces pour le biocontrôle de *Sclerotinia minor*. **Sheikova et Georgieva (1962)** ont aussi exploré la rhizosphère d'*Allium cepa* et *Prunus domestica* pour l'isolement des actinomycètes afin de déterminer leur spectre antimicrobien. **Crowford et al. (1993)** ont isolé des actinomycètes à partir de la rhizosphère du blé et de celle des arbres forestiers pour le biocontrôle de *Phytium ultimum*.

Le pourcentage le plus élevé des isolats actifs ont été obtenus contre *F. oxysporum* (54%), *B. sorokiniana* (46%) et *V. dahliae* (33%). Cette proportion élevée n'est pas surprenante car **Sessitsch et al. (2004)** a constaté que 43% des bactéries associés aux pommes de terre présentait des activités antagonistes contre les agents pathogènes et notamment l'actinomycète pathogène *Streptomyces scabies*. Néanmoins, la proportion des isolats actifs contre *V. dahliae* était plus élevée dans cette étude que dans celle réalisée au Maroc par **Barakate et al. (2002)** (8%). En outre, le pourcentage d'isolats actifs envers *F. oxysporum* était également plus élevé que celui obtenu par **Kitouni et al. (2005)** avec des échantillons de sol non rhizosphérique d'une région semi-aride dans le nord-est de l'Algérie.

Les actinomycètes sont caractérisés par un large spectre d'activité antimicrobienne. En plus de l'activité antifongique détectée pour les six isolats vis-à-vis des sept champignons phytopathogènes-tests, ils ont tous inhibé au moins la croissance d'une bactérie-test et/ou levure-test.

Les isolats Lac1, Lac3, Vic8 et Pru14 présentent un large spectre, ils agissent sur les levures et les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Alors que les deux isolats Pin10 et Pru16 n'ont montré qu'une activité anti Gram négatif. Certaines souches-tests ont montré une résistance envers tous les isolats notamment *Pseudomonas aeruginosa*, et ceci contrairement aux 13 isolats d'actinomycètes rhizosphériques obtenus par **Ting et al. (2009)** qui se sont tous avérés actifs contre cette espèce bactérienne.

De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des actinomycètes. Les résultats d'**Oskay et al. (2004)** indiquent que 34% des 50 isolats d'actinomycètes sont actifs contre au moins un microorganismes-test; *A. tumefaciens*, *E. carotovora* subsp. *amylovora*, *Pseudomonas viridiflova*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* et *Sarcina lutea*.

L'étude de **Yilmaz et al. (2008)** portant sur 55 souches d'actinomycètes isolées de différentes rhizosphères, a montré l'activité antimicrobienne de 22 souches. Cette activité est plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. En plus, environ 18% des actinomycètes ont montré une activité antifongique.

## **Introduction**

Les critères classiques utilisés pour l'affiliation des actinomycètes dans des genres et des espèces sont, continuellement et soigneusement, révisés et discutés. Incluant l'aspect morphologique, cultural, physiologique et environnemental. Le chemotype de la paroi, le profil des sucres pariétaux, le type de peptidoglycane, le profil des acides gras, les ménaquinones, les phospholipides et le GC% sont des outils utiles pour l'identification des actinomycètes. Les techniques de biologie moléculaire incluant l'analyse des ARN 16S et l'hybridation ADN/ADN sont maintenant couramment employées (**El Tarabily et Sivasithamparam, 2006**).

L'identification des genres d'actinomycètes repose principalement sur l'étude de caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium de substrat ou du mycélium aérien. Aussi, elle se base sur la présence de spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme et la présence de sclérotés ou de synnémata. D'autres examens au microscope électronique doivent également être effectués afin de déterminer l'ornementation des spores (**Larpent et al., 1989**). La chimiotaxonomie est un système de classification des actinomycètes elle s'intéresse à la détermination des composants (acides aminés, glucides, lipides) de la paroi cellulaire (**O'donnell, 1988**).

L'identification des espèces appartenant aux genres d'actinomycètes, nécessite en plus des caractères morphologique, des caractères physiologiques et biochimiques (température, pH, assimilation de sources carbonées et azotées, dégradation de certains substrats comme la gélatine, l'amidon, la caséine, etc) (**Boudemagh, 2007**).

Dans cette partie nous attarderons sur l'identification polyphasique des six isolats antagonistes sélectionnés. À savoir, la détermination des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques, environnementaux et chimiotaxonomiques. Ensuite, le GC% et le séquençage de l'ADN 16S.

## Matériel et méthodes

### 1-Étude morphologique des six isolats antagonistes sélectionnés

#### 1-1- Aspect macroscopique

L'inoculum est préparé selon le protocole de **Shirling et Gottlieb (1966)**. Pour les souches qui n'ont pas encore produit de spores, des fragments de mycélium de substrat sont transférés dans un tube contenant 3 ml d'eau distillée stérile. Ces fragments sont écrasés, stérilement, à l'aide d'une tige en verre. Si les spores sont formées, une suspension sporale très trouble est préparée en raclant la surface de la colonie. Les suspensions d'inoculum sont préparées à chaque essai.

##### 1-1-1- Détermination de la couleur du mycélium aérien

Les milieux ISPS<sub>2</sub>; ISP<sub>3</sub>; ISP<sub>4</sub>; ISP<sub>5</sub> et Olsen (**Annexe 1**) sont refroidis à environ 50 °C puis distribués aseptiquement dans les boîtes de Pétri stériles. Ces boîtes sont incubées pendant 24 heures à 28°C afin de sécher la surface de la gélose et de contrôler la stérilité. Puis, elles sont inoculées par des suspensions sporales à raison de 2 à 4 gouttes par boîte. L'aspect macroscopique des colonies est observé tous les 7, 14 et 21 jours comme le préconisent **Shirling et Gottlieb (1966)**; **Mocheva et al., (2002)** et **Oskay et al., (2004)**.

##### 1-1-2- Détermination de la couleur du mycélium du substrat

La couleur du mycélium de substrat est déterminée selon la méthode décrite par **Shirling et Gottlieb (1966)**. Une partie de la gélose est découpée à partir des cultures matures, puis déposée sur un support désinfecté au préalable. L'excès de la gélose est éliminé par une lame de rasoir et la couleur est notée.

##### 1-1-3- Pigments diffusibles et pigments mélanoides

Si les pigments solubles autres que le brun-noir sont produits sur le milieu ISP<sub>5</sub>, leurs couleurs sont notées (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les milieux ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub> (**Annexe 1**) en gélose inclinée sont ensemencés en surface pour mettre en évidence les pigments mélanoides produits par les actinomycètes. Un tube non ensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2<sup>ème</sup> jour et au 4<sup>ème</sup> jour, en comparant les tubes ensemencés avec le témoin (**Shirling et Gottlieb, 1966; Mocheva et al., 2002**).

## **1-2- Aspect microscopique**

### **1-2-1-Microscopie optique (Technique des lamelles)**

Cette technique a été décrite par **Williams et Cross (1971)** et **Liu et al. (2005)**. Une partie d'une colonie isolée est broyée stérilement avec une tige en verre, puis introduite dans 3 à 4 gouttes d'eau distillée et déposée sur une lamelle fermement fixée au milieu ISP<sub>4</sub> (**Annexe 1**) et faisant un angle de 45°. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation les lamelles sont retirées puis déposées sur une lame et observées sous microscope (x 100).

### **1-2-2-Microscopie électronique**

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique a été réalisée selon les recommandations de **Rueda et al. (2001)**. À partir des cultures d'actinomycètes bien sporulées, âgées de 14 à 22 jours, cultivées sur milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> (**Annexe 1**). La masse de spores est récoltée à l'aide des supports en aluminium, qui sont ensuite fixés avec une solution de tétraoxyde d'osmium 1% (P/V). Ces supports sont ensuite lavés avec de l'eau distillée, puis déshydratés avec de l'éthanol. Enfin ils sont traités avec du platine dans le Sputter Coater Emitech K550 (Soquelec, Canada) et observés au microscope électronique S-4700 (Hitachi, Canada). la morphologie des chaînes de spores ainsi que l'ornementation des spores a été déterminée selon les descriptions préconisées par **Locci (1994a)** et **Williams et al., (1983b)**, respectivement.

## 2-Étude physiologique et biochimique des six isolats antagonistes sélectionnés

### 2-1-Préparation de l'inoculum lavé

Un Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu ISP<sub>1</sub> (**Annexe 1**) est inoculé à raison de 10 % (10<sup>5</sup> UFC/ml), puis incubé pendant 72 heures à 30° C avec agitation (180 rpm). La culture est centrifugée stérilement pendant 10 minutes à 10 000 g. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois à l'eau distillée stérile puis repris dans 50 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension constitue l'inoculum lavé (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

### 2-2-Utilisation de sources de carbone

L'assimilation de sources de carbone a été étudiée selon les méthodes de **Shirling et Gottlieb (1966)**, **Hsu et lockwood (1975)** et **Williams et al. (1983b)**. Le milieu ISP<sub>9</sub> est utilisé comme milieu basal (**Annexe 1**). Les sucres sont incorporés à une concentration finale de 1%, tandis que les sucres alcool et les acides organiques à 0,1% (P/V), les sources utilisées sont :

- **Sucres** : D- glucose, L-arabinose, levulose, D-maltose, D-melobiose, methyl  $\alpha$ -glucose, saccharose, D-fructose , D-mannose, cellulose, D-cellobiose, xylose, raffinose, L-rhamnose, salicin, D-threhalose, galactose, D-xylose, ribose, sorbose, melezitose, melibiose et D-lactose;
- **Sucres Alcool** : Mannitol, *myo*-inositol, sorbitol, adonitol, D-glycerol et dulcitol, xylitol;
- **Acides organiques**: propionate de sodium, oxalate de sodium, succinate de sodium, acétate de sodium, le citrate de sodium, le lactate, le pyruvate et le glutamate.

### 2-3-Utilisation de sources azotées

La capacité des souches à utiliser différentes sources d'azote a été déterminée selon la méthode décrite par **Williams et al., (1983b)**. Les substrats azotés sont ajoutés au milieu basal (MB) (**Annexe 1**) à une concentration de 0,1% (P/V). Les résultats d'assimilation

sont notés après 14 jours par comparaison avec le témoin positif (asparagine) et négatif (sans source d'azote ajoutée).

#### **2-4-Les activités enzymatiques**

Quatre activités enzymatiques ont été recherchées : la nitrate réductase (**Gorden et Smith, 1953**), l'uréase (**Christensen, 1946; Blackall et al., 1989**), la bêta-galactosidase (**Flores et al., 1990**) et l'action sur le lait écrémé (**Williams et Cross, 1971**).

#### **2.5-Les activités de dégradation**

La dégradation de la gélatine (0,4%), la caséine (1%), l'amidon (1%) la tyrosine (0,5%) l'adénine (0,1%), la xanthine (0,4%), l'hypoxanthine (0,4%), l'esculine (0,1%), l'arbutine (0,1%), l'allantoïne (0,1%), le xylane (0,4%) a été déterminée sur le milieu basal de Bennett modifié (BMA) (**Annexe 1**). L'hydrolyse du tween (20, 60 et 80) à 0,1% a été testée sur milieu de Sierra (**Annexe 1**).

Les activités de dégradation sont notées après 7, 14 et 21 jours d'incubation. Pour les composés insolubles, les activités ont été détectées par l'apparition, autour des colonies, de zones claires. Cependant, le résultat pour la gélatine et l'amidon est noté après inondation des cultures avec la solution de chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) et de lugol, respectivement (**Williams et al., 1983a**).

#### **2-6-Les caractéristiques environnementales**

Les deux paramètres environnementaux température et pH ont été testés selon les recommandations de **Williams et al. (1983b)**. La croissance sur le milieu MBA est estimée à 14 jours d'incubations à différentes températures 4, 10, 25, 30, 45 °C et différents pHs 4, 3, 7, 8, 9.

#### **2-7-La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques**

Le milieu Bennett modifié MBA (**Annexe 1**) est additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes : chlorure de sodium 4, 7, 10, 13 % (P/V), phénol (0,1 P/V), azide

de sodium (0,01% P/V), potassium tellurite (0,01 P/V), acétate de thallium (0,01 P/V), crystal violet (0,0001 P/V) lysozyme 10, 50, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ ). La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée après 7 et 14 jours d'incubation par comparaison avec le témoin (Williams *et al.*, 1983b; Gorden et Barnett, 1977).

### **2-8-La résistance aux antibiotiques**

La mise en évidence de la sensibilité des six isolats aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé sur milieu de Muller Hilton (Annexe 1), recommandée par Williams *et al.* (1983a). Les différents antibiotiques utilisés sont : la fosfomycine, la penicilline, la chloramphenicol, la gentamycine, l'erythromycine, la pristinamycine, la rifampicine, la kanamycine, l'acide fusidique, l'oxacilline, l'amoxicilline, la tetracycline, la vancomycine et l'acide nalidixique. À partir d'une culture pure d'une souche d'actinomycète, une suspension à 0,5 Mc Farland en eau physiologique est préparée. Cette dernière estensemencée par inondation. Une fois la surface de la gélose est sèche, les disques d'antibiotiques y sont déposés. Après une pré-diffusion de 30 minutes, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures, ensuite les diamètres d'inhibition sont mesurés.

### **3-Étude chimiotaxonomique**

Les stéréo-isomères de l'acide diaminopimélique (DAP), un des constituants majeurs de la paroi cellulaire, ont été déterminés par chromatographie sur couche mince selon le protocole de Staneck et Roberts (1974), où la forme L de l'acide diaminopimélique (caractéristique du genre *Streptomyces*) migre plus vite que la forme *méso* (caractéristique du genre *Nocardia*).

#### **3-1-Préparation des cellules**

Les actinomycètes ont été cultivés dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon de culture TSB (Annexe 1). Après 3 à 4 jours d'incubation sur un agitateur rotatif (180 rpm) à 30°C, les cellules sont tuées par l'addition d'une solution de formaldéhyde à 1%, puis laissées à la température de la pièce pendant 24 heures. Après centrifugation à 4000 g

durant 15 minutes, les cellules sont lavées à l'eau distillée puis à l'éthanol 95%. Ensuite elles sont séchées toute la nuit à 45°C (**Berd, 1972**).

### **3-2-Détermination des acides aminés des cellules entières**

3 mg des cellules séchées sont placés dans une ampoule contenant 1 ml d'acide chlorhydrique 6N. Les ampoules sont chauffées à 100°C pendant 18 heures, puis leurs contenus sont été filtrés sur du papier Whatman N° 1. Le filtrat est évaporé, séché, et redissous dans 1 ml d'eau distillée puis séché de nouveau. Le résidu est dissous dans 0,3 ml d'eau distillée et 2 µl sont appliqués sur une plaque de chromatographie à base de cellulose. Le système de migration utilisé est composé de méthanol, d'eau distillée, d'acide chlorhydrique 6N et de pyridine (80: 26: 4: 10, v/v). La migration du solvant nécessite 4 à 5 heures. La plaque de chromatographie est séchée à l'air libre, puis pulvérisée avec de la ninhydrine à 0,2% dans l'acétone, et séchée encore à 100°C pendant 3 minutes (**Staneck et Roberts, 1974**).

### **3-3-Détermination des sucres des cellules entières**

Les sucres de la paroi sont déterminés à partir de l'hydrolysat de 50 mg de cellules entières par l'acide sulfurique 2N pendant 2 heures à 100°C dans un tube scellé. L'hydrolysat est neutralisé à pH 5,5 avec une solution de Ba(OH)<sub>2</sub> avec en présence de rouge méthyle comme indicateur de pH. Le précipité de BaSO<sub>4</sub> obtenu est éliminé par centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est évaporé à sec et le produit final est dissout dans 0,4 ml d'eau distillée. Un volume de 0,2 µl de l'hydrolysat est déposé sur une plaque de cellulose. Des sucres témoins, traités de la même manière que les échantillons, sont utilisés (glucose, arabinose, rhamnose, ribose xylose et galactose) à 0,1 % (P/V). Après séchage, une chromatographie ascendante est réalisée dans le système solvant constitué de n-butanol- eau distillée- pyridine-toluène (10 : 6 : 6 : 1 volume/volume). Les sucres sont révélés par pulvérisation du réactif d'aniline-acide phtalique suivi d'un chauffage à 100°C pendant 4 minutes (**Staneck et Roberts, 1974**).

#### **4-Étude phylogénétique**

##### **4-1-Extraction de l'ADN**

La méthode employée pour l'extraction et la purification de l'ADN total est celle décrite par **Pospiech et Neumann (1995)**. 30 ml de la culture en phase exponentielle sont centrifugés durant 15 minutes à 4000 g. Le culot est dissout dans 5 ml du tampon SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM tris-HCl, pH 7,5). Le lysozyme est ajouté à une concentration de 1 mg/ml, le mélange est incubé pendant 60 min à 37°C. 0,6 ml du SDS à 10% et la protéinase K 0,5 mg/ml sont additionnés. L'ensemble est mélangé par inversion puis incubé pendant 2 heures à 55°C. Par la suite 5 ml du NaCl (5 mM) et 7,5 ml du chloroforme sont ajoutés et le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes avec une fréquente inversion. Le mélange est centrifugé à 4500 g pendant 15 minutes, l'ADN contenu dans le surnageant est précipité en ajoutant un 0,6 ml d'isopropanol avec une légère inversion.

L'ADN est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur, rincé dans 5 ml d'éthanol à 70%, puis séché à l'air libre, suspendu dans 5 ml du tampon TE (10 mM Tris, EDTA 1 mM, pH 8) et incubé à 55°C. L'ADN dissout est traité avec la ribonucléase (ARNase) (20 µg/ml), puis incubé à 37°C durant 1 heure.

##### **4-2-Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN**

La pureté de l'ADN est évaluée par mesure des rapports  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$ . Idéalement, le rapport  $A_{260}/A_{280}$  doit être compris entre 1,8 et 2,0. Un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou du phénol et lorsque le rapport est supérieur à 2,0, la contamination est due à la présence d'ARN, les sels ou l'acide urique. Le rapport  $A_{260}/A_{230}$  doit être compris entre 1,8 et 2. Il est supérieur à 2 lors d'une contamination par des molécules qui absorbent à 230 nm (acides organique, sels, etc).

#### **4-3-Détermination du % en GC**

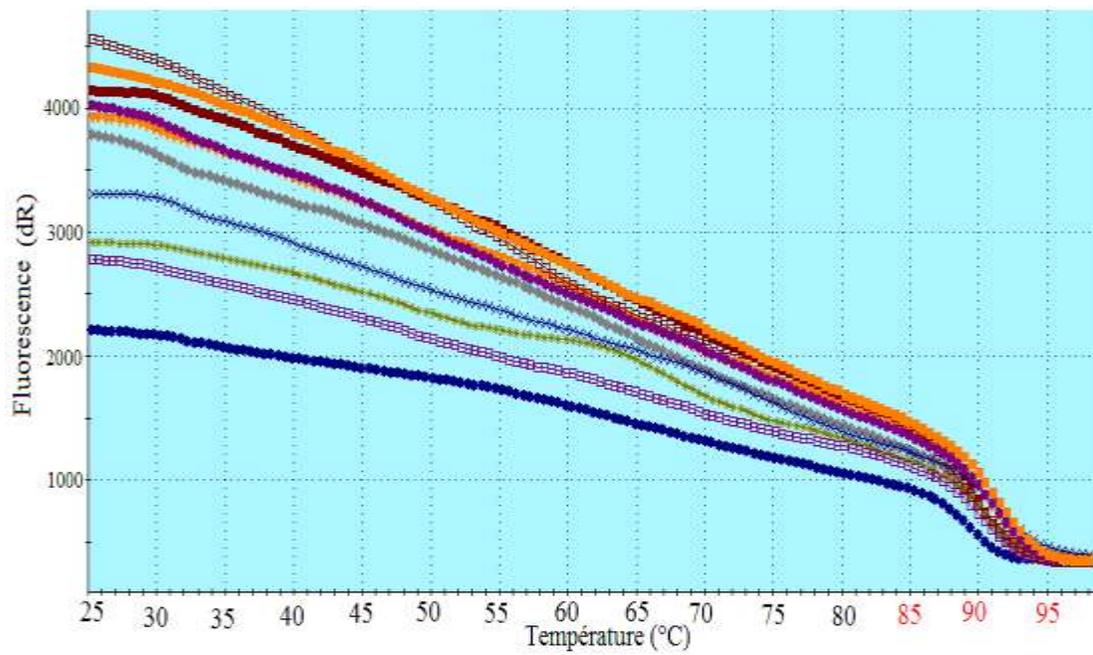
Un moyen simple et rapide consiste en une technique fluorimétrique à haut débit utilisant le thermocycleur de la q RT-PCR pour déterminer la température de fusion  $T_m$  à partir de la courbe de dissociation. Le procédé utilise un colorant fluorescent spécifique de l'ADN double brin : SYBRGreen et un tampon SSC 0,1 X (0,15 M NaCl et 0,015 M tri-sodium citrate, pH 7,0), ce tampon a été recommandé par **De Ley *et al.* (1970)**. Après amplification les  $T_m$  sont calculés à partir de la valeur minimale de la pente de la courbe de dissociation : la fluorescence en fonction de la température (**Figure 16**). Le contenu en GC est calculé à partir du  $T_m$  selon l'équation de **Gonzalez et Saiz-Jiménez (2005)**.

$$\text{GC}\% = 1,98 T_m - 106,91$$

Le volume final du milieu réactionnel est de 50 $\mu$ l, contenant 2 $\mu$ g de l'ADN génomique, 5 $\mu$ l du SYBR Green (dilué 1/10000) puis le volume est complété avec du SSC 0,1X. Les réactions sont réalisées en trois répétitions. L'expérience commence avec une incubation du mélange réactionnel pendant 15 minutes à température ambiante (25°C) suivie d'une gamme de température allant de 25 à 100 ° C (1 ° C / min). Des mesures de fluorescence sont réalisées à chaque étape au cours de cette gamme de température (une mesure/12 secondes). Ensuite, ces mesures seront exprimées sous forme de courbe de dissociation.

#### **4-4-Amplification des séquences d'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle**

La PCR (Polymérase Chain Reaction) consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier. Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le gène ribosomal 16S. Très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences avec celles d'organismes connus.



**Figure 16:** la courbe de dissociation des bases G et C de l'ADN génomique des six isolats.

Une paire d'amorces universelle a été utilisée pour amplifier l'ADN 16S des souches antagonistes: la directe F27 et la reverse R1492 (**Heuer et al., 1997; Monciardini et al., 2002; Coombs et Franco, 2003**). La paire d'amorces a été fournie par Integrated DNA Technologies (IDT, USA) avec une concentration de 100  $\mu$ M. La spécificité et la description des amorces sont portées sur le **Tableau 17**. L'amplification est réalisée pour un volume 200  $\mu$ l, dans un Thermocycleur de type Biometra. Les microtubes contiennent 2  $\mu$ l de l'ADN (200 ng/ $\mu$ l) et 50  $\mu$ l d'un mélange réactionnel. La composition du milieu de réaction et les cycles employés figurent sur les **Tableaux 18 et 19**.

#### **4-5-Électrophorèse sur gel d'agarose**

Pour s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur un gel d'agarose-TAE à 1%. Les produits de la PCR sont additionnés d'une solution de dépôt (bromophenol 0,25% (P/V); xylène cyanol 0,25% (P/V); EDTA 25 mM, glycerol 50% (V/V). La migration se fait dans un tampon TAE (Tris-HC 1,6 mM; acétate de sodium 1,6 mM; EDTA 0,04 mM ; pH : 8), sous une tension de 120 volts. L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire (GenRuler™ 1KB DNA Ladder) de 250 à 10000 paires de bases. Après la migration, le gel est trempé dans une solution de bromure d'éthidium (0,5%) pendant 10 minutes, puis le gel est rincé dans de l'eau pendant 15 minutes. Le gel est placé sous les rayons UV pour visualiser et photographier les bandes d'ADNr 16S. Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm grâce au bromure d'éthidium qui s'est inséré entre les plateaux de bases de l'ADN.

#### **4-6-Le séquençage**

La technique du séquençage adaptée est de celle décrite par **Sanger et al. (1977)**. Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP) et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluorochromes. L'incorporation d'un

**Tableau 17:** spécificité et description des amorces universelles utilisées.

Amorces	Position	Séquence	Spécificité
F27	8-27	5'AGAGTT TGATCCTGGCTCAG3'	Bactérie
R1492	1492-1513	5'TACGGC TACCTTGTTACGACTT3'	

**Tableau 18:** la composition du milieu réactionnel de la PCR.

Composés	Volumes ( $\mu$ l)
Eau stérile	202,5
DMSO 50%,	30
Amorce F (100 $\mu$ M) (Integrated DNA Technologies)	6
Amorce R (100 $\mu$ M) (Integrated DNA Technologies)	6
Tampon de la Taq (New England Biolab)	30
dNTP (25 mM) (Fermentas)	7,5
Taq polymérase (5U.ml <sup>-1</sup> ) (New England Biolab)	3
Solution d'ADN (200 ng. $\mu$ l <sup>-1</sup> )	2

**Tableau 19:** les cycles d'amplification employés.

	Etapes	Températures (°C)	Temps (min)
35 cycles	Pré-dénaturation	95	5
	Dénaturation	95	1
	Association	60	1
	Elongation	72	2
	Fin d'amplification	72	10

ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent. Les amorces utilisées pour le séquençage sont semblables à celles utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S. Le séquençage a été effectué par le Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill à Montréal (Canada) selon le protocole Applied Biosystems sur le séquenceur automatique (ABI-modèle 3730xl).

#### **4-7-Analyse des séquences**

Les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST ( Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National center for Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1997). Les alignements des séquences sont réalisés grâce au logiciel CLUSTAL W2 (Larkin *et al.*, 2007).

L'homologie des séquences pariées a été évaluée et le taux de substitution par transformation a été soumis à la méthode à deux paramètres de Kimura (1980). La matrice des taux de substitutions résultante a été analysée par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) du logiciel MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2007). Les niveaux de confiance de la topologie des arbres phylogénétiques obtenus par la méthode de Neighbor-joining (MEGA 4), ont été estimés par la méthode des analyses de ré-échantillonnage des données avec 1000 répliques.

#### **4-8- Amplification du gène de l'ARNr 16S des souches affiliées au genre *Streptomyces* avec la paire d'amorces spécifique aux *Streptomyces***

Après séquençage avec les amorces universelles, les isolats appartenant au genre *Streptomyces* ont été, également, séquencés avec une deuxième paire d'amorces spécifique aux Streptomycètes : la directe Strept (B)F (Rintala *et al.*, 2001) et la reverse Sm5R (Monciardini *et al.* 2002). Ces amorces amplifient 1144 paires de nucléotides (Tableau 20). La composition du milieu réactionnel et les cycles de l'amplification sont les mêmes employés pour la paire d'amorces universelle.

**Tableau 20:** paire d'amorces spécifique aux Streptomycètes.

Amorces	Position	Séquence	Spécificité
Strept (B)F	139-158	5'ACAAGC CCTGGAACGGGGT3'	Streptomycètes
Sm5 R	1283-1303	5'GAACTGAGACCGGCTTTTTGA3'	

## Résultats

### 1-Identification des isolats antagonistes sélectionnés

#### 1-1-Caractères morphologiques et cultureux

##### 1-1-1-Aspect macroscopique

Les souches peuvent être réparties en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Les colonies visibles à l'œil nu des six isolats Lac1, Lac3, Pru14, Pru16, Vic8 et Pin10 apparaissent après 48 à 72 heures d'incubation. Ce sont des souches à croissance rapide.

Les isolats Lac1, Lac3, Pru14, Pru16 présentent une bonne croissance sur les différents milieux utilisés (ISP, Olsen), excepté les souches Vic8 et Pin10 qui n'ont pas bien poussé, également, sur les milieux ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub>, ISP<sub>4</sub>. Cependant la culture des isolats Vic8 et Pin10 sur la gélose contenant du glycérol a donné une bonne croissance. Tous les isolats présentent un aspect poudreux, les colonies sont plates ou surélevées. Cette élévation est en pic ou en dôme avec toujours des marges plates sinuées (**Tableau 21**).

Pour tous les isolats, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Mais, après 7 jours d'incubation, l'observation des colonies deviennent duveteuses ou légèrement poudreuses. Les souches Vic8 et Pin10 requièrent au moins 10 jours pour apparaître poudreuses.

Au 14<sup>ème</sup> jour, la totalité des souches donnent des colonies poudreuses de couleur jaunâtre, grisâtre, blanchâtre, verdâtre et crème. Cet aspect est particulier pour les souches actinomycétales développant un mycélium aérien.

**Tableau 21:** aspect macroscopique des isolats antagonistes.

Souches	Milieux	Aspect de la colonie	mycélium aérien	mycélium substrat	Pigment soluble
Lac1	ISP <sub>2</sub>	ronde, en dôme, poudreuse	jaune	beige	jaune
	ISP <sub>3</sub>		jaune	beige	jaune
	ISP <sub>4</sub>		jaune	orange	jaune
	ISP <sub>5</sub>		jaune foncé	beige	jaune
	Olsen		jaune	beige	jaune
Lac3	ISP <sub>2</sub>	ronde, plate, poudreuse	gris	beige	–
	ISP <sub>3</sub>		gris	beige	–
	ISP <sub>4</sub>		gris	beige	–
	ISP <sub>5</sub>		gris	crème	–
	Olsen		gris	crème	–
Vic8	ISP <sub>2</sub>	petite, ronde, plate, poudreuse	beige verdâtre	beige	verdâtre
	ISP <sub>3</sub>		crème	beige	–
	ISP <sub>4</sub>		crème	brun	brun
	ISP <sub>5</sub>		crème	brun	brun
	Olsen		crème	brun	–
Pru14	ISP <sub>2</sub>	plate, poudreuse	blanc	blanc/beige	–
	ISP <sub>3</sub>		crème	crème	–
	ISP <sub>4</sub>		blanc	crème	–
	ISP <sub>5</sub>		crème	crème	–
	Olsen		blanc	crème	–
Pru16	ISP <sub>2</sub>	Petite, plate, poudreuse	vert	beige	verdâtre
	ISP <sub>3</sub>		vert	beige	–
	ISP <sub>4</sub>		vert/jaune	beige	verdâtre
	ISP <sub>5</sub>		Vert/jaune	jaune	jaune
	Olsen		vert	jaune	acajou
Pin10	ISP <sub>2</sub>	Plate, ronde, poudreuse	Crème jaunâtre	crème	–
	ISP <sub>3</sub>		blanc	crème	–
	ISP <sub>4</sub>		Crème jaunâtre	crème	–
	ISP <sub>5</sub>		Crème jaunâtre	crème	–
	Olsen		Crème	crème	–

Sur les milieux ISP<sub>4</sub> et Olsen, au 21<sup>ème</sup> jour d'incubation, pratiquement toutes les souches apparaissent pigmentées, c'est la maturation des cultures. Pour quelques souches (Lac3, Vic8, Lac1), la masse de spores est si importante, au point qu'elle peut tomber dans le couvercle de la boîte de Pétri lors de l'incubation. La surface de toutes les colonies est lisse, plissée.

L'observation du revers de la colonie, après élimination de l'excès d'agar, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat. En effet, pour toutes les souches, ce mycélium est pigmenté soit en crème, jaune, brun. Après maturation des souches, et selon la couleur des spores, il est possible de définir 5 séries: **jaune** (Lac1), **grise** (Lac3), **beige** (Vic8, Pin10), **blanche** (Pru14) et **verte** (Pru16) (**Figure 17**).

Pour la souche Lac1 des gouttelettes d'eau de couleur jaune, sont déposées à la surface des colonies, elles apparaissent après la maturation du mycélium aérien. Elles sont différentes de celles dues à l'humidité (condensation lors de l'incubation) du fait qu'elles sont pigmentées et ne sont présentes que sur le mycélium aérien.

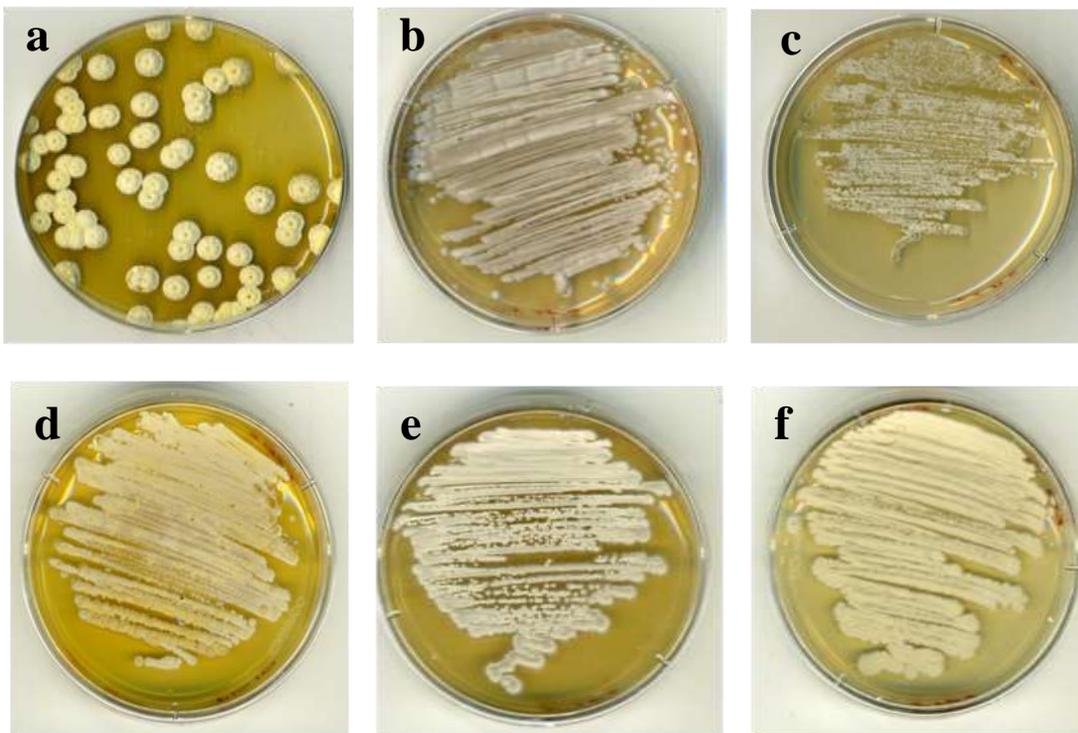
### **1-1-2- Pigments solubles et pigments mélanoides**

La souche Lac1, élabore un pigment, de couleur jaune/orange, qui diffuse dans tous les milieux de culture utilisés. Dans le milieu Olsen, la souche Pru16, produit un pigment rouge/acaïou, et verdâtre dans le milieu ISP<sub>2</sub>. Cependant, la souche Vic8 produit un pigment vert dans le milieu ISP<sub>2</sub> et brun dans le milieu Olsen et ISP<sub>5</sub>. Les souches Lac3, Pru14 et Pin10 ne produisent aucun pigment soluble. Aucune des six souches ne produit des pigments mélanoides, que ce soit sur milieu ISP<sub>6</sub> ou ISP<sub>7</sub>.

## **1-2- Aspect microscopique**

### **1-2-1-Technique des lamelles**

Les observations de l'étude microscopique sont rassemblées dans le **Tableau 22**. Après 7 jours d'incubation, les lamelles sont retirées de la gélose et déposées sur une lame, puis observées au microscope optique. Il apparaît que toutes les souches développent un



**Figure 17:** aspect macroscopique des isolats sur milieu ISP<sub>2</sub>, (a) l'isolat Lac1; (b) l'isolat Lac3, (c) l'isolat Vic8; (d) l'isolat Pin10; (e) l'isolat Pru14 et (f) l'isolat Pru16.

**Tableau 22:** aspect microscopique des souches actinomycétales purifiées.

Souches	Mycélium de substrat		Mycélium aérien (21 <sup>ème</sup> jour)							
	fragmentation	Sporulation	fragmentation	La forme des chaînes de spores*			La longueur des chaînes de spores		La forme de la spore	
				RF	S	RA	< 20	> 20	cylindrique	arrondie
<b>Lac1</b>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<b>Lac3</b>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>Vic8</b>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<b>Pin10</b>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<b>Pru14</b>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<b>Pru16</b>	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

(\*) R: chaîne de spores droite; RF: rectiflexible ; S: spirale ; RA : boucle ouverte (retinaculum-apertum)

mycélium de substrat, ce mycélium se présente sous forme de longs filaments ramifiés dépourvus de septums. L'observation des lamelles, retirées de la gélose après 14 jours d'incubation, montre que toutes les souches développent un mycélium aérien. Ce mycélium est épais, plus foncé et moins ramifié que le mycélium de substrat. Il est peu abondant pour les souches Pru14 et Pru16, et très abondant pour les autres souches.

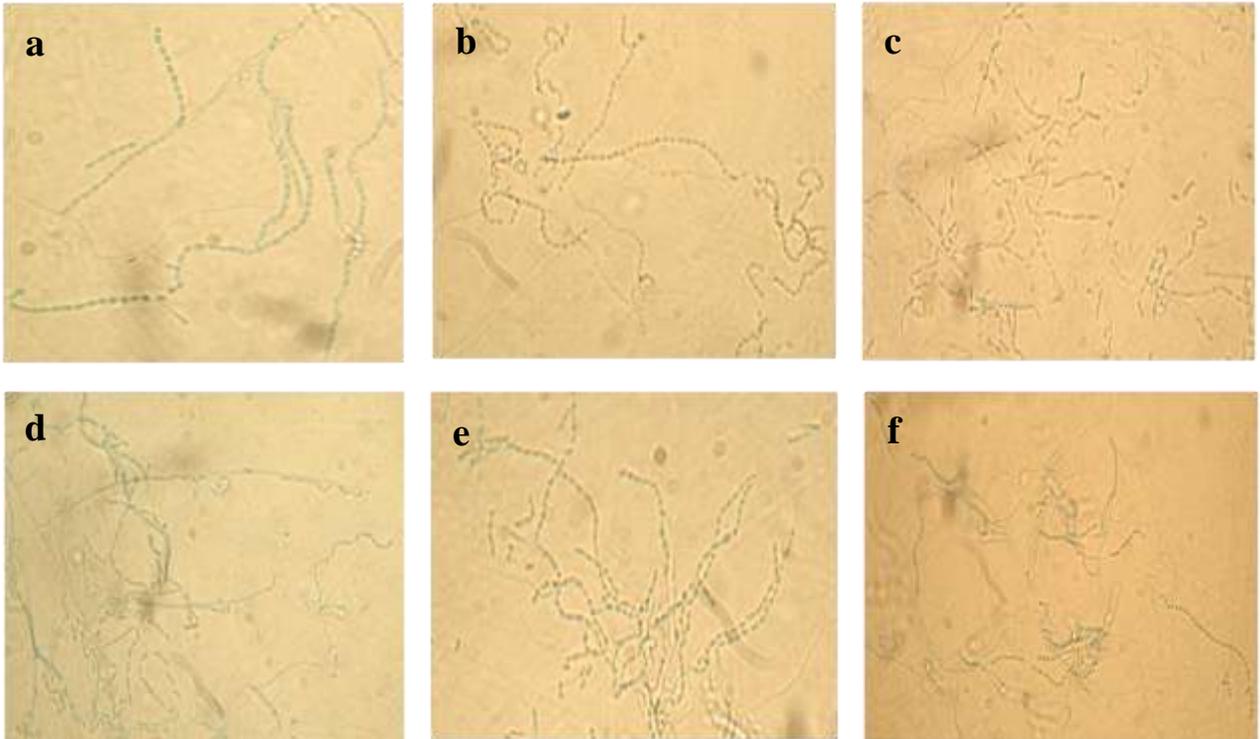
Les chaînes de spores se forment par septation du mycélium aérien. Elles sont droites à rectiflexibles pour les souches Lac1 et Pru16. La souche Lac3 forme des chaînes de spores en spirale (S), le nombre de spires varie de 2 à 4 (**Figure 18 b**). Seule la forme en crochet (RA) caractérise les longues chaînes de spores de la souche Pru14. Pour cette dernière souche la forme spirale aussi a été observée. Les souches Vic8 et Pin10 présentent des chaînes de spores rectiflexibles en forme de zig-zag, qui apparaissent fragmentées dans les cultures âgées.

Sur les six souches, développant un mycélium aérien, quatre souches forment des chaînes de spores où le nombre de spores est supérieur à 20 à l'exception des souches Vic8 et Pin10 où le nombre de spores est inférieur à ce nombre. L'observation au microscope optique (X100) des spores montre qu'elles sont de forme cylindrique, et celles des isolats Vic8 et Pin10 sont allongées (**Tableau 22, Figure 18**).

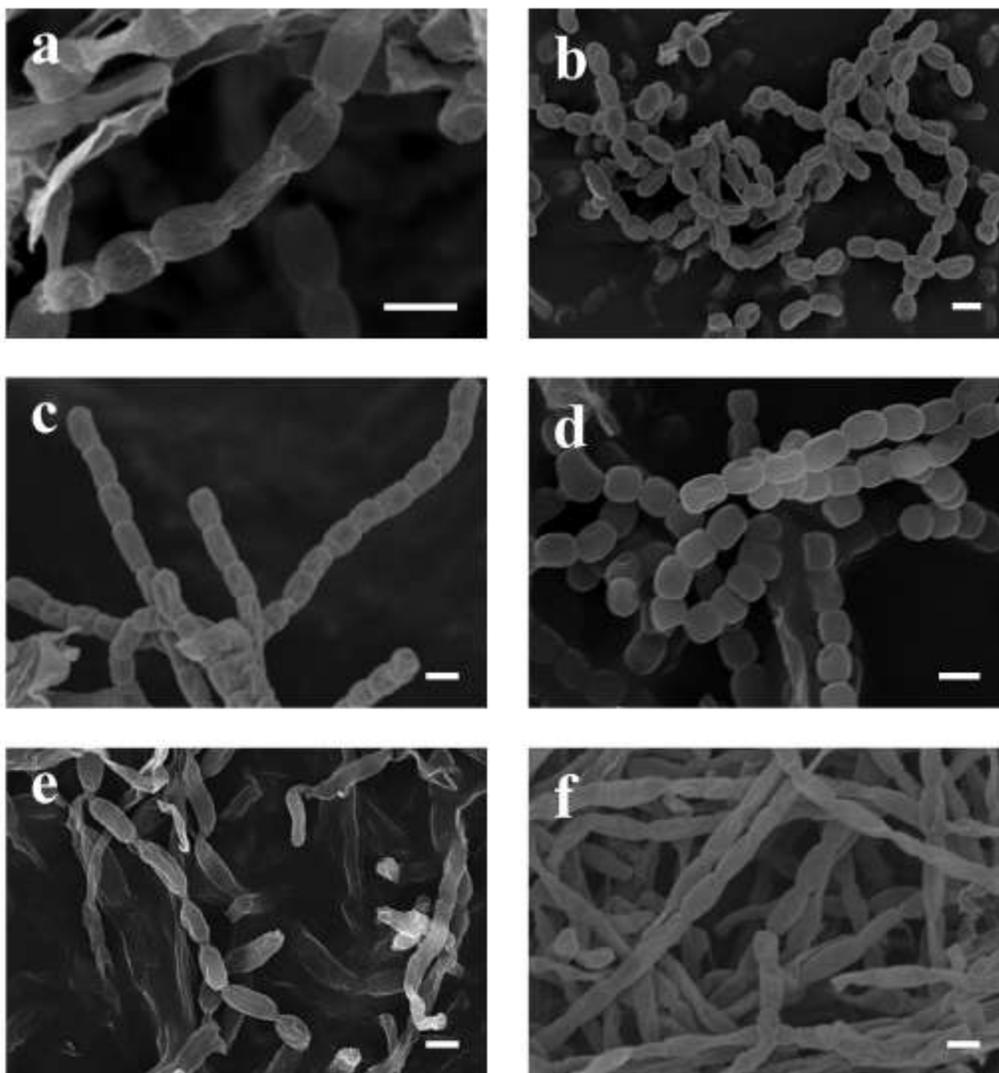
### **1-2-2-Microscopie électronique**

Les isolats sont cultivés sur des milieux permettant le maximum de sporulation. Le milieu Olsen pour les isolats Vic8 et Pin10, et le milieu YMEA+CaCo3 pour les autres isolats. Les formes des spores observées par microscopie électronique viennent confirmées celles observées par la technique des lamelles. Elles sont cylindriques pour les isolats Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16, et allongées et volumineuses dans le cas des isolats Vic8 et Pin10.

À partir du 14<sup>ème</sup> jour, les chaînes de spores des isolats Vic8 et Pin10 apparaissent fragmenté. Les spores des tous les isolats présentent la même ornementation, elles sont toutes lisses (**Figure 19**). Aucune structure particulière telle que les synnéma ou les sporangium n'a été observée.



**Figure 18:** morphologie microscopique des isolats actinomycétales (a) Lac1; (b) Lac3; (c) Vic8; (d) Pin10; (e) Pru14; (f) Pru16.



**Figure 19:** la morphologie des chaînes de spores : (a) *Streptomyces griseus* Lac1; (b) *Streptomyces rochei* Lac3; (c) *Streptomyces anulatus* Pru14; (d) *Streptomyces champavatii* Pru16; (e) *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 et (f) *Nocardioopsis alba* Pin10, après 21 jours de croissance, la barre représente 1 µm.

### **1-3-Caractères physiologiques et biochimiques**

Les résultats de l'assimilation des substrats carbonés (sucres 1%, sucres alcool 0,1% et acides organiques 0,1%) comme seule source de carbone sont portés dans le **Tableau 23**. Les isolats diffèrent par leurs capacités à utiliser les différentes sources de carbone, mais pour certains caractères, ils sont similaires. Tous les isolats sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le ribose, le pyruvate, le glutamate comme seule source de carbone. Alors qu'ils sont tous incapables d'assimiler l'adonitol, le melezitose, le mélibiose et le xylitol.

L'utilisation des 36 sources de carbone testées diffère d'un isolat à un autre. Lac3 arrive à utiliser 22 sources, suivie de Lac1 et Pru16 avec 21 sources. Cependant les isolats Pru14, Pin10 et Vic8 assimilent 18, 17 et 13 sources de carbone, respectivement.

Les isolats Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16 ont assimilés 12 sucres, mais les isolats Vic8 et Pin10 ont utilisé 8 et 9 sucres, respectivement. Par rapport au nombre de sucres alcools utilisés comme seule source de carbone, les isolats Lac1, Pin10, Pru14 et Pru16 ont en utilisé 2, excepté les isolats Lac3 et Vic8 qui ont utilisé 3 et 1, respectivement.

Par rapport à l'assimilation des acides organiques, les isolats sont répartis en trois groupes : Les isolats utilisant 7 acides organiques (Lac1, Lac3), ceux assimilant 6 acides organiques (Pin10 et Pru16). Le dernier groupe renferme les isolats ayant utilisé seulement 4 acides organiques (Vic8 et Pru14).

Les résultats de l'utilisation de sources d'azote sont portés dans le **Tableau 24**. Comme seule source d'azote, l'isolat Lac3 assimile la totalité des sources testées, alors que l'isolat Lac1 s'est avéré capable d'en assimiler seulement trois à savoir : la proline, l'arginine et l'asparagine. Quant aux isolats Pru14 et Pru16 ils ont utilisés 6 acides aminés sur les 10 sources testées, tandis que les isolats Pin10 et Vic8 utilisent 4 et 5 sources d'azotes, respectivement.

**Tableau 23:** résultats de l'utilisation des sucres à 1%.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
D-glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	+
D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	-	+	-
D-Lactose	+	+	-	-	+	+
Levulose	+	+	-	-	+	+
D-Maltose	-	-	-	+	-	+
D-Mannose	+	-	-	-	-	-
D-Melobiose	+	-	-	-	-	-
Methyl $\alpha$ -D-glucose	$\pm$	$\pm$	-	+	+	+
Raffinose	-	+	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	+	+	-	+	-
Salicin	-	-	-	+	-	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	+	+	-	-
D-Threhalose	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	-	+	+
Dulcitol	-	+	-	-	-	-
Mannitol	+	+	-	-	+	+
D-Glycerol	-	-	+	+	+	-
<i>myo</i> -Inositol	$\pm$	+	-	+	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
Acétate	+	+	-	-	+	+
Citrate	+	+	-	+	-	-
Lactate	-	$\pm$	-	+	-	+
Oxalate	+	-	+	-	-	+
Propionate	+	+	-	+	+	+
pyruvate	+	+	+	+	+	+
succinate	+	+	+	+	+	+
glutamate	+	+	+	+	+	+

 (+) : croissance; ( $\pm$ ) : croissance faible; (-) : absence de croissance

**Tableau 24:** résultats de l'utilisation de sources d'azote.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
Alanine	-	+	+	-	-	+
Cysteine	-	+	-	-	-	-
Lysine	-	+	+	-	+	+
Méthionine	-	+	-	-	+	-
Phénylalanine	-	+	-	-	-	-
Tryptophane	-	+	-	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	-	+	-	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Asparagine	+	+	+	+	+	+

(+) : croissance ; (-) : absence de croissance.

Comme indiqué dans le **Tableau 25**, tous les isolats sont dotés des activités enzymatiques à savoir : uréase, nitrate réductase et B-galactosidase. Leur coagulation du lait écrémé (10 %) s'est avérée aussi positive elle a commencé aux 5<sup>ème</sup> jours et devenue totale au 8<sup>ème</sup> jours. Ensuite la peptonisation est devenue positive. L'isolat Lac3 présente une très faible activité de coagulation et de peptonisation par rapport aux autres isolats.

Les résultats des activités de la dégradation figurent dans le **Tableau 26**. Ils montrent que tous les isolats se sont révélés positifs pour la dégradation de l'amidon (1%), la gélatine (0,4%), le xylane (0,4%), l'adénine (0,5%), la chitine (1%), les tweens 20, 60 et 80 (1%). Alors qu'aucun des six isolats n'a dégradé l'allantoïne (0,3%) et la cellulose (1%). Les isolats Lac3, Vic8 et Pru16 ont montré une capacité à dégrader la tyrosine (0,5%), mais seul l'isolat Pru14 a agi sur le chitosane. L'esculine a été dégradée par les isolats Lac1 et Pru14. Ce dernier a également dégradé l'arbutine, de même que les isolats Lac3, Pin10 et Pru16.

Parmi les six isolats seul Lac3 a faiblement dégradé la caséine (1%), aussi il présente une faible activité de dégradation envers la xanthine (0,4%) et l'hypoxanthine (0,4%). Les isolats Pin10 et Pru14 ont dégradé seulement l'hypoxanthine, alors que les isolats Vic8 et Pru16 ont dégradé la xanthine, seulement l'isolat Lac1 n'a agi sur aucune des bases puriques.

#### **1-4- Les caractères environnementaux**

Les résultats de la croissance à différentes températures figurent dans le **Tableau 27**. Les isolats Lac1, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16 se développent à des températures comprises entre 25 et 37°C, avec un optimum de croissance à 30°C. Excepté la souche Lac3 qui est capable de croître encore à 45 °C. Les six isolats ont montré un pH optimum égal à 7. Selon leur croissance à différents pHs (**Tableau 27**), ils peuvent être classés dans trois groupes. Le premier rassemble les isolats Lac1, Pru14 et Pru16 qui se sont avérés aptes de croître à un pH compris entre 6 et 9. Le second regroupe les isolats Vic8 et Pin10 dont la croissance commence à pH 7. Le troisième groupe représenté par l'isolat Lac3, est capable de croître à partir de pH 5.

**Tableau 25:** résultats des activités enzymatiques.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
Uréase	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+
B-galactosidase	+	+	+	+	+	+
Coagulation du lait	+	±	+	+	+	+
Peptonisation du lait	+	±	+	+	+	+

(+) : croissance; (±) : croissance faible; (-) : absence de croissance

**Tableau 26:** résultats des activités de dégradation.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
Tyrosine	-	+	+	-	-	+
Adénine	+	+	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+
Caséine	+	±	+	+	+	+
Xanthine	-	±	-	+	+	-
Hypoxanthine	-	±	+	-	-	+
Aesculine	+	-	-	-	+	-
Arbutine	-	+	-	+	+	+
Chitine	+	+	+	+	+	+
Chitosane	-	-	-	-	+	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-
Xylane	+	+	+	+	+	+
Allantoïne	-	-	-	-	-	-
Tween 20	+	+	+	+	+	+
Tween 60	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	+

(+) : croissance; (±) : croissance faible; (-) : absence de croissance

**Tableau 27:** résultats de la croissance à différents températures et pHs.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
<b>Températures</b>						
4°C	-	-	-	-	-	-
10°C	-	-	-	-	-	-
25°C	+	+	+	+	+	+
30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37°C	++	++	+	+	+	++
45°C	-	+	-	-	-	-
55°C	-	-	-	-	-	-
<b>pHs</b>						
pH 4	-	-	-	-	-	-
pH 5	-	+	-	-	-	-
pH 6	++	+	-	-	+++	+++
pH 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 8	++	+++	++	++	+	+++
pH 9	+	+	++	++	+	+

(-) : pas de croissance ou croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante, (+++) croissance très abondante.

Dans le **Tableau 28** sont portés les résultats de la croissance des six isolats en présence de différents inhibiteurs. Pour la totalité des isolats, leur croissance a été inhibée en présence d'azide de sodium (0,1% P/V), d'acétate de thallium (0,01% P/V), de cristal violet (0,0001% P/V). Seuls les isolats Lac3, Pru16 et Pin10 ont pu résister à l'action inhibitrice du phénol (0,1% P/V), du benzoate de sodium (0,1% P/V) et le potassium tellurite (0,01% P/V), respectivement.

Une croissance positive a été notée, pour tous les isolats, en présence de 10µg/ml de lysozyme, mais ils se sont révélés différents par leur croissance en présence de concentrations plus élevées (75, 50 et 100µ/ml). Les quatre isolats La1, Pru14 et Pru16 ont toléré une concentration 50µ/ml. Alors que l'isolat Lac3 a résisté à la concentration de 75µg/ml.

Pour la totalité des isolats et en présence de 4% de NaCl, la croissance n'a pas été affectée. Une tolérance de 4 % a été enregistré pour les isolats Vic8 et Pin10 et de 7% pour les isolats Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16. Cependant, aucun des six isolats n'a toléré la concentration de 10% et plus.

Tous les isolats sont résistants à la pénicilline, la fosfomycine, l'oxacilline et l'acide nalidixique. Cependant, elles sont toutes sensibles au chloramphenicol, à la gentamycine, pristinamycine, kanamycine et la tetracycline. L'isolat Lac3 présente le profil le plus résistant, sur les 14 antibiotiques testés seulement 6 ont pu inhibés sa croissance.

Lac1 et Pru14 se sont avérés sensibles à 10 antibiotiques : la chloramphenicol, la gentamycine, l'érythromycine, la pristinamycine, la rifampicine, la kanamycine, l'acide fusidique, l'amoxicilline, la tetracycline et la vancomycine. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées avec la kanamycine et la gentamycine. Aussi Vic8, Pin10 et Pru16 ont montré un profil qui est peu différent de celui de Lac1 et Pru14, la seule différence réside dans la sensibilité des isolats Vic8 et Pin10 à l'érythromycine, et la sensibilité de l'isolat Pru16 à l'amoxicilline (**Tableau 29, Figure 20**).

**Tableau 28:** résultats de la croissance en présence d'inhibiteurs.

	Isolats					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
<b>NaCl (%)</b>						
0	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
<b>Lysozyme (µg/ml)</b>						
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	+	++	±	+	+	+
25	+	++	+	+	+	+
50	+	++	-	-	±	±
75	-	+	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
<b>Autres inhibiteurs</b>						
Cristal violet	-	-	-	-	-	-
Phénol	-	+	-	-	-	-
Potassium tellurite	-	-	-	+	-	-
Acétate de thallium	-	-	-	-	-	-
Benzoate de sodium	-	-	-	-	-	+
Sodium azide	-	-	-	-	-	-

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante, (+++) croissance très abondante.

**Tableau 29:** résultats de la sensibilité aux antibiotiques.

	zones d'inhibition (mm)					
	Lac1	Lac3	Vic8	Pin10	Pru14	Pru16
Fosfomycine (50)	0	0	0	0	0	0
Penicilline (10)	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicol (30)	16	18	30	21	16	32
Gentamycine (10)	40	46	44	56	39	44
Erythromycine (15)	15	13	0	0	13	11
Pristinamycine (15)	30	25	25	16	15	17
Rifampicine (5)	21	0	15	23	15	19
Kanamycine (30)	46	44	50	46	44	33
Acide fusidique (10)	15	0	25	25	15	20
Oxacilline (5)	0	0	0	0	0	0
Amoxycilline (25)	21	0	25	32	16	0
Tetracycline (30)	30	18	33	60	38	50
Vancomycine (30)	34	0	40	38	30	28
Acide nalidixique (30)	0	0	0	0	0	0

En général les six isolats sont sensibles aux antibiotiques de la famille des aminosides, des macrolides, des tetracyclines et des phénicolés. Cependant ils sont sensibles au fosfomycine et au  $\beta$ -lactamines.

## 2-La chimiotaxonomie

L'analyse chimiotaxonomique a révélée la présence du LL-diaminopimélique (LL-DAP) et de la glycine dans les hydrolysats de cellules entières des isolats Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16, ces résultats permettent de rapprocher ces souches au genre *Streptomyces*. D'autre part, les hydrolysats de cellules entières des isolats Pin10 et Vic8 contiennent de l'acide méso-diaminopimélique (méso-DAP), aussi les sucres arabinose, le xylose et madurose n'ont pas été détectés. La présence du méso-DAP et l'absence de sucres caractéristiques permet leur affiliation au genre *Nocardiopsis* (Lechavalier et Lechevalier, 1970).

## 3-Étude phylogénétique

### 3-1-Pureté et dosage de l'ADN génomique extrait

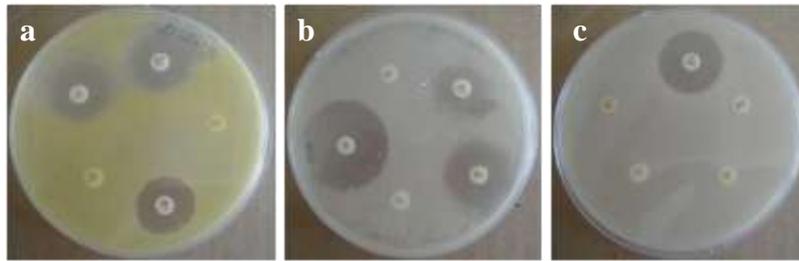
Après extraction des ADN génomiques des six isolats, un dosage au spectrophotomètre 'NanoDrop' a été réalisé afin de déterminer leur concentration et confirmer aussi leur pureté. Les rapports  $abs_{260} / abs_{280}$  varie entre 1,92 et 2,04, alors que les valeurs du ratio  $abs_{260} / abs_{230}$  sont comprises entre 1,75 et 1,98.

### 3-2-Détermination du contenu GC de l'ADN génomique

Les valeurs des  $T_m$  et des C+C% obtenus pour les isolats sont portées dans le **Tableau 30**. À partir des  $T_m$  déterminés de la courbe de dissociation (**Figure 16**), les GC% sont calculés suivant l'équation :  $GC\% = 1,98 T_m - 106,91$ . La composition en guanine et en cytosine varie de 68,51 à 73,66%. L'isolat Pru14 présente le GC% le plus faible alors que celui de l'isolat Vic8 est le plus élevé.

### 3-3-Amplification et séquençage de l'ADNr 16S avec des amorces universelles

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le gène ribosomal 16S. Très représenté dans les banques de données, ce marqueur nous permettra d'affilier



**Figure 20:** la sensibilité antimicrobienne des isolats Pin10, Lac1 et Lac3

**Tableau 30:** résultats des Tm et GC%.

<b>Isolats</b>	<b>Tm</b>	<b>GC %</b>
Lac1	89,8	70,89
Lac3	90,2	71,68
Vic8	91	73,27
Pin10	90,6	70,66
Pru14	88,6	68,51
Pru16	91,2	73,66

nos séquences à un groupe d'organismes connu. Des séquences de 1465 paires de base ont fait l'objet d'une amplification en utilisant une paire d'amorces universelle F27 et R1492.

Les ADN codant pour les ARN ribosomiaux 16S des six isolats ont d'abord été amplifiés par la technique de la PCR. Une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose-TAE. Après migration, le gel est photographié sur table UV (ChemiImager<sup>TM</sup> system 5500) (**Figure 21**). Les bandes d'ADN ont migré dans la région 1500 paires de bases du gel d'agarose à 1 %. Les produits de la PCR ont été séquencés et les séquences obtenues (**Annexe 2**) ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données GenBank.

Les produits de la PCR des six souches ont été séquencés et les séquences obtenues (**Annexe 2**) ont été comparés avec celles d'autres organismes de la base de données GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). L'analyse des séquences d'ADNr 16S souches bactériennes de la banque a permis d'affilier les six souches antagonistes à deux genres *Streptomyces* et *Nocardopsis* (**Tableau 31**).

- **L'isolat Lac1**

La séquence d'ADNr 16S de la souche Lac1 présente jusqu'à 99% d'identité avec celle de *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup> et *S. anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>.

- **L'isolat Lac3**

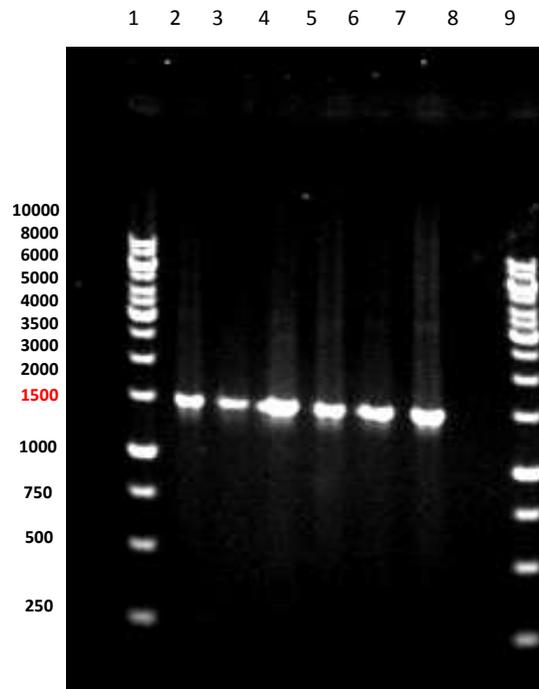
L'isolat Lac3 présente des homologies de 99 % avec *S. rochei* DSM 40231<sup>T</sup> et 100% avec *Streptomyces enissocaelis* ATCC 43682<sup>T</sup>.

- **L'isolat Vic8**

Un pourcentage d'identité de 99% a été obtenu entre les séquences de l'ADNr 16S de la souche Vic8 et celle de *Nocardopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111<sup>T</sup> et il est de 98 % avec *Nocardopsis synnemataformans* DMS 44143<sup>T</sup>.

- **L'isolat Pin10**

La séquence de l'ADNr 16S de la souche Pin10 présente 96% d'homologie à celle de *Nocardopsis alba* DSM 43377<sup>T</sup> et 95% avec *Nocardopsis aegyptia* DSM 44442<sup>T</sup>.



**Figure 21:** résultats de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S des six souches antagonistes. Marqueur moléculaire (canal 1 et canal 9); souche Lac1 (canal 2); souche Lac3 (canal 3); souche Vic8 (canal 4); souche Pru14 (canal 5); souche Pru16 (canal 6); souche Pin10 (canal 7); témoin (canal 8).

**Tableau 31:** affiliation phylogénétique des six isolats antagonistes (paire d'amorces universelle).

Souches	Groupe	Identité (%)	Espèces proches	Numéro d'accession
Lac1	<i>Streptomyces</i>	99 99	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 23345 <sup>T</sup> <i>Streptomyces anulatus</i> NBRC 15393 <sup>T</sup>	AB184211 AB184644
Lac3	<i>Streptomyces</i>	99 100	<i>Streptomyces rochei</i> DSM 40231 <sup>T</sup> <i>Streptomyces enissocaesilis</i> ATCC 43682 <sup>T</sup>	EF626598 DQ026641
Vic8	<i>Nocardiopsis</i>	99 98	<i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111 <sup>T</sup> <i>Nocardiopsis synnemataformans</i> DMS 44143 <sup>T</sup>	X97886 Y13593
Pin10	<i>Nocardiopsis</i>	96 95	<i>Nocardiopsis alba</i> DSM 43377 <sup>T</sup> <i>Nocardiopsis aegyptia</i> DSM 44442 <sup>T</sup>	AY999914 AJ539401
Pru14	<i>Streptomyces</i>	100	<i>S. anulatus</i> NBRC 15393 <sup>T</sup>	AB184644
Pru16	<i>Streptomyces</i>	99	<i>Streptomyces champavatii</i> DSM 40841 <sup>T</sup>	DQ026642

- **L'isolat Pru14**

Une similitude de 100% a été obtenue entre la séquence de la souche Pru14 et la souche type *Streptomyces anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>.

- **L'isolat Pru16**

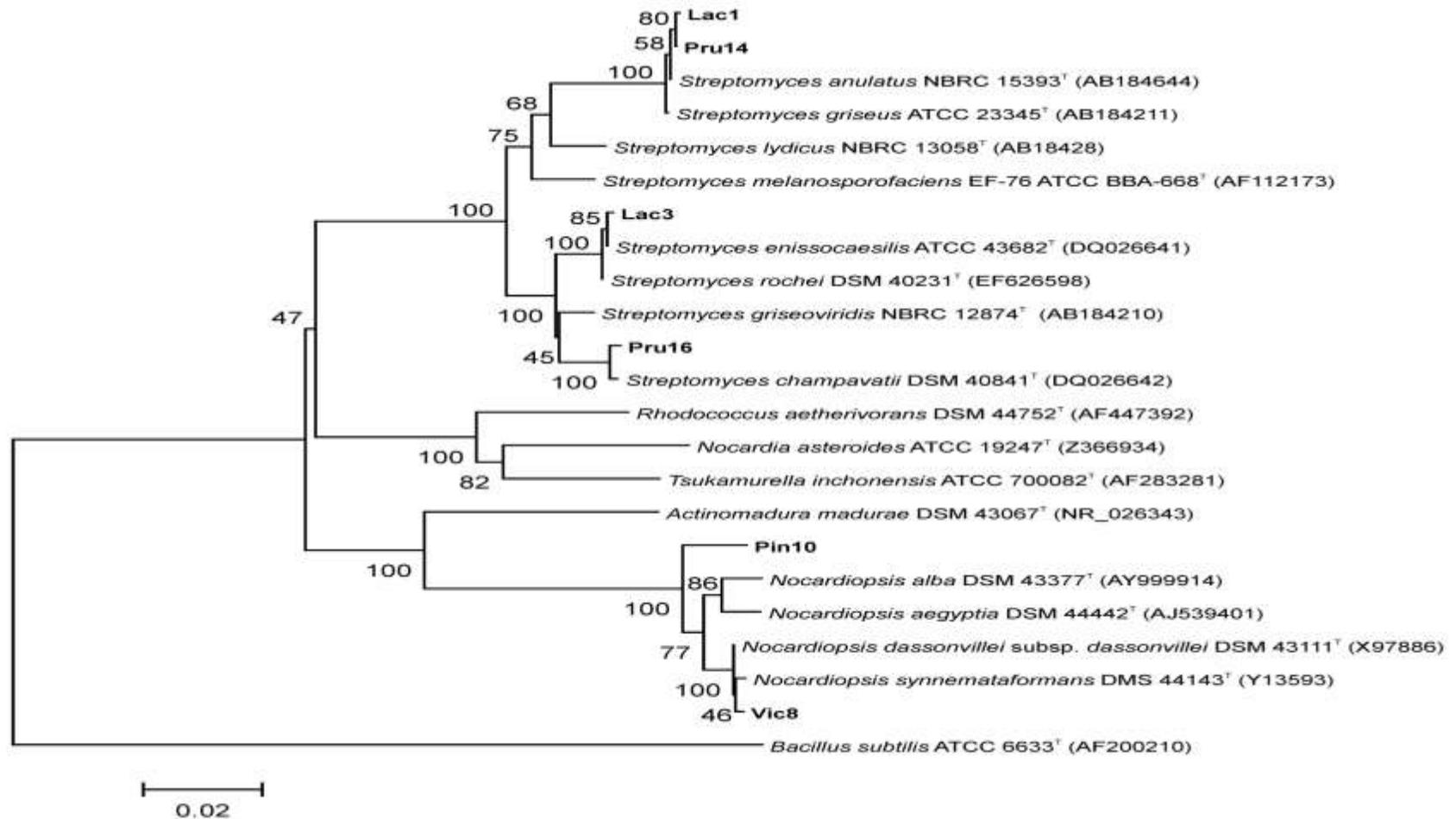
La séquence de la souche Pru16 est affiliée aux membres du genre *Streptomyces* avec une homologie de 100% avec la souche *Streptomyces champavatii* DSM 40841<sup>T</sup>.

À partir des séquences obtenues après amplification avec la paire d'amorces universelle, une étude phylogénétique a été réalisée. En plus de l'arbre phylogénétique, les distances génétiques ont aussi été calculées. Cette analyse représente une vision synthétique de la relation entre les isolats et leurs souches apparentées. Des alignements des séquences d'ADNr sont réalisés par Clustal W2 (**Larkin et al., 2007**).

L'arbre est construit à partir de Neighbor-Joining en utilisant le test de « bootstrap » (nombres sur les branches) de 1000 réplifications en utilisant les distances de Kimura qui prend en compte les transitions et les transversions du programme MEGA 4 (**Tamura et al., 2007**). L'enracinement a été réalisé en utilisant la séquence ribosomale de la bactérie *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> (**Figure 22**).

Le séquençage du gène de l'ARNr et l'alignement avec des séquences extraites de GenBank confirme l'appartenance des isolats Lac1, Lac3, Pru14 and Pru16 au genre *Streptomyces*. L'arbre phylogénétique a regroupé les 6 isolats et d'autres espèces d'actinomycètes. Le dendrogramme est divisé en distincts clades. Le premier supporté par 100% de bootstrap regroupe différentes espèces de *Streptomyces* et aussi nos souches.

Les isolats Pru14 et Lac1 apparaissent dans le même cluster avec leurs souches apparentées *S. anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup> et *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup>, respectivement. L'isolat Pru16 forme une ligne phylogénétique avec *Streptomyces champavatii* DSM 40841<sup>T</sup>, supportée avec 100% de bootstrap. Alors que, l'isolat Lac3 est phylogénétiquement relié à deux espèces *S. enissocaesilis* ATCC 43682<sup>T</sup> et *S. rochei* DSM 40231<sup>T</sup>.



**Figure 22:** arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant les positions des souches antagonistes Lac1, Lac3, Vic8, Pru14, Pru16 et Pin10. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Bacillus subtilis* a été utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap.

Les isolats Vic8 et Pin10 apparaissent dans le clade incluant *Actinomadura madurea* DSM 43067<sup>T</sup> et des espèces appartenant aux genres *Nocardioopsis*. Ce cluster est supporté par 100% de bootstarp, est composé de l'isolat Pin10, *N. alba* DSM 43377<sup>T</sup>, *N. aegyptia* et l'isolat Vic8 et ses deux espèces apparentées *N. synnemataformans* DMS 44143<sup>T</sup> et *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111<sup>T</sup>.

Aucun des six isolats ne figure dans le clade regroupant les espèces *Nocardia asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup>, *Rhodococcus aetherivorans* DSM 44752<sup>T</sup> et *Tsukamurella inchonensis* ATCC 700082<sup>T</sup>.

Les six séquences des isolats Lac1, Lac3, Vic8, Pru14, Pru16 et Pin10 portent les numéros d'accèsion HQ184949, HQ184950, HQ184951, HQ184952, HQ184953 et HQ184954, respectivement.

Pour mieux cerner l'affiliation des souches étudiées aux espèces connues de *Streptomyces* et de *Nocardioopsis*, des calculs de distance génétique entre les séquences des gènes d'ARN ribosomiaux ont été entrepris selon le test de Kimura. Le résultat de cette étude est représenté dans le **Tableau 32**. Les distances génétiques qui les séparent des souches de références sont variables.

La distance est nulle entre *S. enissocaesilis* ATCC 43682<sup>T</sup> et *Streptomyces Rochei* DSM 40231<sup>T</sup>, et aussi est elle de l'ordre de 0 entre *S. enissocaesilis* et Lac3. Cependant, elle de 0,003 entre Lac3 et *S. rochei* DSM 40231<sup>T</sup> malgré le fait que la séquence du gène d'ARNr de l'isolat Lac3 soit similaire de 99 et de 100% avec les deux souches de références. La distance nulle est le reflet d'une étroite parenté entre ces souches mais n'inclut pas nécessairement que la souche Lac1 soit affiliée à l'espèce de *S. enissocaesilis*. Une distance nulle aussi a été obtenue entre la souche de référence *S. anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup> et l'isolat Pru14. Les plus faibles distances de l'ordre de 0,001 sont notées entre l'isolat Lac1 avec *Streptomyces anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>, *Streptomyces griseus*

**Tableau 32:** matrice de distances génétiques bactériennes calculées selon Kimura du programme MEGA 4 pour les six isolats.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1																								
2	0.002																							
3	0.015	0.015																						
4	0.123	0.123	0.133																					
5	0.251	0.250	0.256	0.223																				
6	0.123	0.129	0.136	0.001	0.228																			
7	0.123	0.129	0.132	0.047	0.225	0.046																		
8	0.003	0.001	0.006	0.128	0.256	0.028	0.125																	
9	0.127	0.127	0.134	0.001	0.227	0.001	0.046	0.126																
10	0.124	0.124	0.123	0.050	0.234	0.050	0.020	0.120	0.043															
11	0.023	0.024	0.009	0.131	0.261	0.027	0.122	0.020	0.125	0.116														
12	0.127	0.125	0.130	0.045	0.226	0.048	0.002	0.128	0.047	0.019	0.028													
13	0.125	0.124	0.129	0.044	0.224	0.046	<b>0.000</b>	0.125	0.045	0.019	0.025	<b>0.000</b>												
14	0.015	0.018	0.003	0.130	0.259	0.033	0.135	0.006	0.132	0.127	0.023	0.130	0.130											
15	0.123	0.123	0.136	0.009	0.224	0.001	0.048	0.127	<b>0.000</b>	0.049	0.030	0.052	0.052	0.143										
16	0.124	0.119	0.125	0.047	0.227	0.050	0.022	0.124	0.043	0.003	0.023	0.018	0.018	0.125	0.084									
17	0.127	0.123	0.129	0.040	0.227	0.044	0.018	0.127	0.043	0.017	0.024	0.013	0.013	0.130	0.048	0.074								
18	0.125	0.121	0.125	0.033	0.230	0.036	0.032	0.124	0.037	0.030	0.023	0.032	0.032	0.123	0.043	0.004	0.028							
19	0.095	0.033	0.097	0.115	0.226	0.015	0.117	0.093	0.115	0.109	0.092	0.114	0.110	0.095	0.117	0.034	0.110	0.106						
20	0.127	0.124	0.127	0.119	0.243	0.024	0.113	0.129	0.023	0.113	0.003	0.109	0.109	0.125	0.128	0.109	0.112	0.110	0.113					
21	0.132	0.123	0.134	0.108	0.223	0.010	0.098	0.129	0.111	0.103	0.036	0.088	0.096	0.132	0.118	0.109	0.038	0.099	0.020	0.082				
22	0.125	0.122	0.129	0.029	0.231	0.030	0.031	0.127	0.023	0.037	0.028	0.032	0.032	0.127	0.037	0.103	0.031	0.022	0.015	0.115	0.099			
23	0.123	0.123	0.127	0.110	0.246	0.015	0.112	0.127	0.115	0.108	0.030	1.108	0.105	0.123	0.117	0.036	0.103	0.105	0.012	0.087	0.055	0.115		

[1] *Nocardiopsis. synnemataformans* DSM 44143<sup>T</sup>, [2] *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* 43111<sup>T</sup>, [3] *Nocardiopsis alba* DSM 43377<sup>T</sup>, [4] *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup>, [5] *Bacillus subtilis* 6633<sup>T</sup>, [6] Lac1, [7] Lac3, [8] Vic8, [9] Pru14, [10] Pru16, [11] Pin10, [12] *Streptomyces rochei* DSM 40231<sup>T</sup>, [13] *Streptomyces enissocaesilis* ATCC 43682<sup>T</sup>, [14] *Nocardiopsis egyptia* DSM 44442<sup>T</sup>, [15] *Streptomyces annulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>, [16] *Streptomyces champavatii* DSM 40841<sup>T</sup>, [17] *Streptomyces griseoviridis* NBRC 12874<sup>T</sup>, [18] *Streptomyces melanosporofaciens* EF -76 ATCC BBA-668<sup>T</sup>, [19] *Actinomadura madurae* DSM43067<sup>T</sup>, [20] *Nocardia asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup>, [21] *Rhodococcus aetherivorans* DSM 44752<sup>T</sup>, [22] *Streptomyces lydicus* NBRC 13058<sup>T</sup>, [23] *Tsukamurella inchonensis* ATCC 700082<sup>T</sup>.

ATCC 23345<sup>T</sup> et l'isolat Pru14. L'isolat Pru16 montre 100% de similitude avec *Streptomyces champavatii* alors que la distance entre les deux souches est de 0,003. En outre de faibles distances génétiques sont obtenues entre certaines souches affiliées au genre *Nocardiopsis*. Les distances entre l'isolat Vic8 et les deux souches *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111<sup>T</sup> et *Nocardiopsis synnemataformans* DMS 44143<sup>T</sup> sont de 0,001 et 0,003, respectivement. Alors que la distance entre les deux souches de référence est de 0,001.

#### **3-4- Amplification de l'ADNr 16S des souches affiliées au genre *Streptomyces* avec des amorces spécifiques aux *Streptomyces***

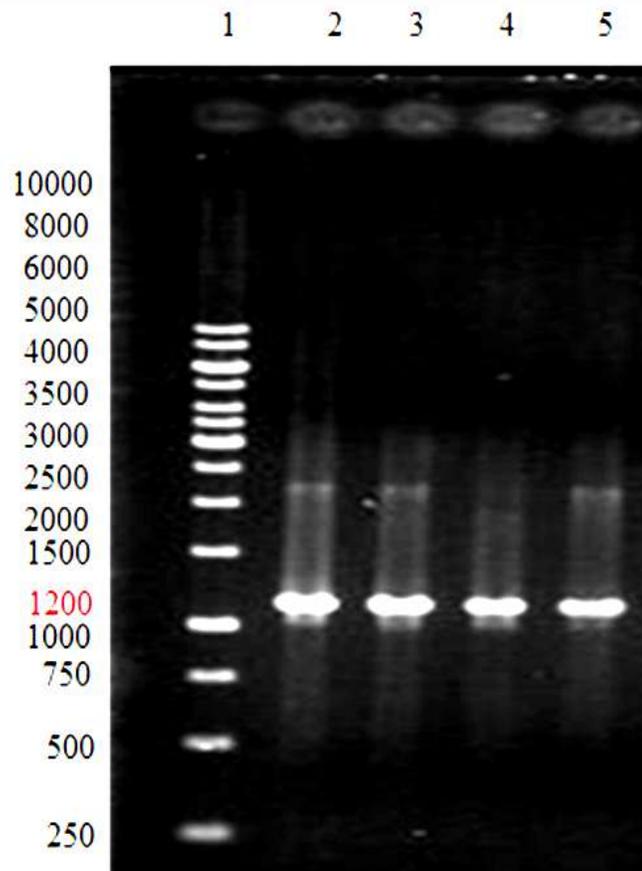
Dans cette partie l'analyse phylogénétique porte aussi sur le séquençage du gène ribosomal 16S. Cependant, seules les souches affiliées au genre *Streptomyces* (Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16) ont fait l'objet d'une amplification en utilisant une paire d'amorces spécifique aux *Streptomyces*. Après l'amplification, une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose-TAE. Après migration, le gel est photographié sur table UV (**Figure 23**). Les bandes d'ADN ont migré dans la région de 1200 paires de bases du gel. Les produits de la PCR ont été séquencés et les séquences obtenues (**Annexe 2**) ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données GenBank. Les affiliations phylogénétiques des quatre isolats antagonistes sont portées dans le **Tableau 33**.

##### **- L'isolat Lac1**

La séquence d'ADNr 16S de la souche Lac1 présente jusqu'à 99% d'identité avec celle de *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup>, *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* NBRC 12342<sup>T</sup>, *S. flaveus* NBRC 12345<sup>T</sup> et *S. anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>.

##### **- L'isolat Lac3**

L'isolat Lac3 présente une similitude de 99 % avec *S. rochei* DSM 40231<sup>T</sup> et *Streptomyces enissocaelis* ATCC 43682<sup>T</sup>



**Figure 23:** l'ADN ribosomal 16S des souches antagonistes. Marqueur Moléculaire (canal 1); souche Lac1 (canal 2); souche Lac3 (canal 3); souche Pru14 (canal 4); souche Pru16 (canal 5).

**Tableau 33:** affiliation phylogénétique des quatre isolats *Streptomyces*.

Souches	Groupe	Identité (%)	Espèces proches	Numéro d'accèsion
Lac1	<i>Streptomyces</i>	99	<i>S. griseus</i> ATCC 23345 <sup>T</sup>	AB184211
		99	<i>S. lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> NBRC 12342 <sup>T</sup>	AB184079
		99	<i>S. anulatus</i> NBRC 13369 <sup>T</sup>	AB184875
		99	<i>S. flaveus</i> NBRC 12345 <sup>T</sup>	AB184082
Pru14	<i>Streptomyces</i>	98	<i>S. griseus</i> ATCC 23345 <sup>T</sup>	AB184211
		98	<i>S. lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> NBRC 12342 <sup>T</sup>	AB184079
		99	<i>S. anulatus</i> NBRC 13369 <sup>T</sup>	AB184875
		98	<i>S. flaveus</i> NBRC 12345 <sup>T</sup>	AB184082
Lac3	<i>Streptomyces</i>	99	<i>S. rochei</i> DSM 40231 <sup>T</sup>	EF626598
		99	<i>S. enissocaesilis</i> ATCC 43682 <sup>T</sup>	DQ026641
Pru16	<i>Streptomyces</i>	99	<i>S. champavatii</i> DSM 40841 <sup>T</sup>	DQ026642
		99	<i>S. albidoflavus</i> DSM 40792 <sup>T</sup>	Z76677
		99	<i>S. argenteolus</i> CGMCC 41693 <sup>T</sup>	EU048540

- **L'isolat Pru14**

Une homologie de 99% a été obtenue entre la séquence de la souche Pru14 avec les souches type *Streptomyces anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup>. Cependant la distance avec *S. flavescens* NBRC 12345<sup>T</sup>, *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup> et *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* NBRC 12342<sup>T</sup> est de 98%.

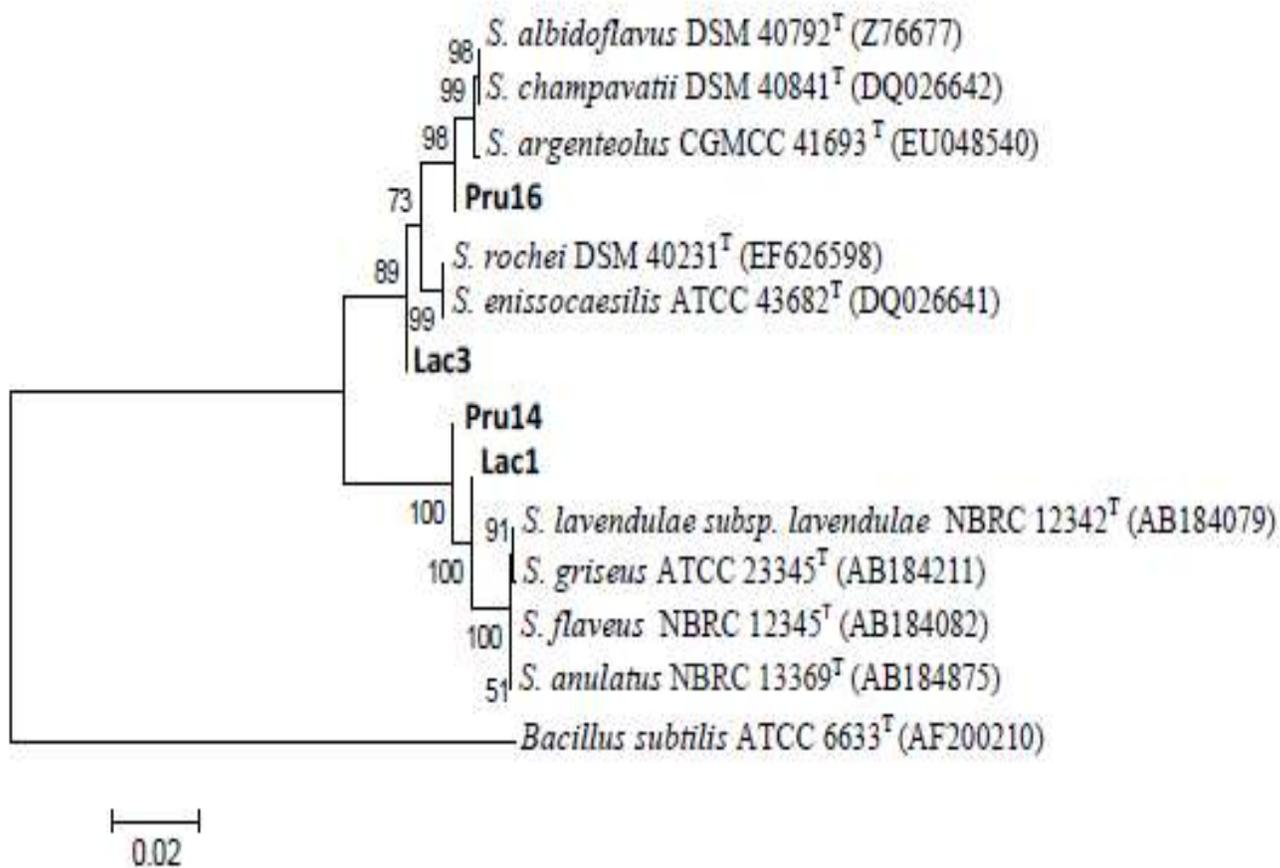
- **L'isolat Pru16**

La séquence de la souche Pru16 est affiliée aux membres du genre *Streptomyces* avec une homologie de 99% avec les souches de référence *Streptomyces champavatii* DSM 40841<sup>T</sup>, *S. albidoflavus* DSM 40792<sup>T</sup> et *S. argenteolus* CGMCC 41693<sup>T</sup>.

L'étude moléculaire est complétée par la construction d'un arbre phylogénétique regroupant les séquences des quatre isolats (**Annexe 2**) ainsi que celles des souches de références obtenues par le BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Cet arbre est construit en utilisant le même logiciel et les mêmes paramètres que ceux du premier arbre (**voir page 90**). Contrairement au dendrogramme construit après l'amplification avec la paire d'amorce amorces universelle, les *Streptomyces* cette fois-ci se répartissent en deux clades (**Figure 24**).

Le premier clade supporté par 89% de bootstrap regroupant les isolats Lac3 et Pru16 avec leur souches apparentées. Le second clade, quant à lui, est supporté par 100% de bootstrap. Il rassemble les deux isolats Lac1 et Pru14 et d'autres souches qui leurs sont très proches.

L'analyse phylogénétique est accomplie par le calcul des distances génétiques entre les séquences des gènes d'ARN ribosomal 16S des isolats et des souches de référence (**Tableau 34**). Les distances nulles ont été enregistrées entre plusieurs souches : l'isolat Lac3 avec ses deux souches affiliées et l'isolat Pru16 et ses trois souches proches. Aussi la distance a été estimée nulle entre les isolats Lac1 et Pru14. Par rapport aux distances ces deux isolats s'avèrent très proches l'un de l'autre qu'à leurs souches de référence apparentées. Ainsi la distance entre Lac1 et *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup>, *S.*



**Figure 24:** arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant les positions des souches antagonistes Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Bacillus subtilis* a été utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap.

**Tableau 34:** matrice de distances génétiques bactériennes calculées selon Kimura du programme MEGA 4 pour les quatre isolats Streptomyces.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.042													
3	<b>0.000</b>	0.042												
4	0.042	0.030	0.042											
5	0.002	0.042	0.005	0.042										
6	0.002	0.042	0.005	0.042	0.001									
7	0.002	0.042	0.005	0.042	<b>0.000</b>	0.001								
8	0.002	0.042	0.005	0.042	0.001	<b>0.000</b>	0.001							
9	0.043	0.050	0.050	<b>0.000</b>	0.072	0.073	0.072	0.073						
10	0.043	0.050	0.050	<b>0.000</b>	0.074	0.075	0.080	0.074	<b>0.000</b>					
11	0.047	0.050	0.050	<b>0.000</b>	0.052	0.063	0.062	0.063	0.003	0.003				
12	0.047	0.043	0.043	0.003	0.074	0.075	0.077	0.075	0.013	0.013	0.013			
13	0.047	0.043	0.043	0.003	0.047	0.047	0.046	0.047	0.013	0.013	0.013	<b>0.000</b>		
14	0.206	0.133	0.205	0.123	0.255	0.225	0.262	0.223	0.223	0.223	0.234	0.213	0.215	

[1] Lac1, [2] Lac3, [3] Pru14, [4] Pru16, [5] *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendula* NBRC<sup>T</sup> 12342  
 [6] *Streptomyces flaveus* NBRC 12345<sup>T</sup>, [7] *Streptomyces griseus* ATCC 23345<sup>T</sup>, [8] *Streptomyces anulatus* NBRC 13369<sup>T</sup>, [9] *Streptomyces albidoflavus* DSM 40792<sup>T</sup>, [10] *Streptomyces champavatii* DSM 40841<sup>T</sup>, [11] *Streptomyces argenteolus* CGMCC 41693<sup>T</sup>, [12] *Streptomyces rochei* DSM 40231<sup>T</sup>, [13] *Streptomyces enissocaesilis* ATCC 43682<sup>T</sup>, [14] *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup>.

*lavendulae* subsp. *lavendulae* NBRC 12342<sup>T</sup>, *S. flaveus* NBRC 12345<sup>T</sup> et *S. anulatus* NBRC 15393<sup>T</sup> est faible et égale à 0,002; alors qu'entre ces trois souches de référence et Pru14 elle est de l'ordre de 0,005.

## Discussion

L'étude des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches actinomycétales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. Par exemple, la présence ou l'absence des spores sur le mycélium de substrat ou la formation de sporanges, permettent de différencier plusieurs genres. Ainsi, la morphologie, la présence ou l'absence d'hyphes aériens et la couleur du mycélium fournissent une indication sur le genre (**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology; Saubolle et Sussland , 2003**).

La totalité des isolats développent des colonies après 48 heures d'incubation. C'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide. Ces souches à croissance rapide sont dépourvues des acides mycoliques dans leurs paroi et peuvent être, donc, rapprochées des aux *Streptomyces* et genres apparentés ou bien aux *Thermomonospora* et genres apparentés (*Thermomonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc)

La croissance des six isolats purifiées (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16) débute par la formation d'un mycélium très ramifié et pâteux dans le milieu et aussi à la surface de la gélose, c'est le mycélium de substrat, sur lequel apparait le mycélium aérien.

Le mécanisme de la morphogénèse a fait l'objet d'une étude réalisée par **Sprusansky et al. (2003)** et **Kim et al. (2005)** sur *S. coelicolor*. Il s'est avéré qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium de substrat. La libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes, démontré par l'apparition d'un mycélium aérien.

La masse du mycélium aérien diffère d'un milieu à un autre pour la même souche. Il semble que la composition du milieu est impliquée dans le développement d'hyphes aériens. Sur cette base **Vijgenboom et Keijer (2001)** ont rapporté que la disponibilité des ions cuivriques dans le milieu est importante pour le développement du mycélium aérien pour *Streptomyces coelicolor*. La sporulation de nos isolats diffère d'un milieu à un autre. Pour les isolats Pin10 et Vic8, elle est très importante sur les milieux ISP<sub>5</sub> et Olsen contenant du glycérol, cependant pour les autres isolats tous les milieux ISP ont permis une bonne sporulation.

Les six isolats sont à croissance rapide, assignés dans un premier temps aux actinomycètes dépourvus d'acides mycoliques. Quatre d'entre eux (Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16) forment des chaînes de spores de plusieurs formes; rectiflexibles, spirales (2 à 4 spires), et en crochets. Ces formes sont typiques des *Streptomyces* selon **Miyadoh et al. (2002)**. À cela s'ajoute la forme cylindrique des spores qui selon **Ezra et al. (2004)** caractérise exclusivement les *Streptomyces*.

L'ornementation des spores est un critère de taxonomie chez les *Streptomyces* (**Locci 1994a**), l'utilisation de la microscopie électronique permet d'observer plusieurs types d'ornements entres autres : lisse (*Streptomyces griseus* et *Streptomyces niveus*), rugueux (*Streptomyces hygrosopicus*), épiné (*Streptomyces viridochromogenes*). Dans notre étude la microscopie électronique a montré que les spores des quatre Isolats présentent une ornementation lisse.

D'après les données de **Meyer (1994)**, les isolats Vic8 et Pin10 peuvent être classées dans le genre *Nocardioiopsis*, d'après leurs volumineuses spores lisses et allongées, les longues chaînes de spores en forme de zigzag qui se fragmentent dans les cultures âgées.

Certains isolats (Lac1, Pru16, Vic8) produisent des pigments solubles, qui peuvent différer d'un milieu à l'autre. Ces pigments sont élaborés pendant la maturation du mycélium aérien. **Thompson et al. (2002)** ont rapporté que les actinomycètes sont dotés d'un programme de morphogénèse de la colonie coordonné avec l'excrétion des molécules

bioactives. Ces dernières sont le plus souvent des antibiotiques pigmentés. Leur élaboration est une réponse à un déséquilibre du métabolisme ou à l'arrêt de la croissance.

L'isolat Lac1 produit un pigment jaune dans tous les milieux. Aussi **Horinouchi et Beppu (1994)** ont rapporté aussi que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune. Pour les isolats Pru16 et Vic8, la production des pigments solubles diffère d'un milieu à un autre. Il est possible que la composition du milieu puisse être responsable de cette différence, où la biosynthèse d'un pigment est conditionnée par un substrat approprié indispensable. **Bruheim et al. (2002)** ont étudié la production de l'actinorhodine par *Streptomyces lividans*, ils ont trouvé qu'elle nécessite la présence de glucose.

Selon **Larpen et Larpen-gourgaud (1985)** les gouttelettes d'eau jaunes observées sur les colonies de Lac1 sont des gouttelettes de sudation. En plus, vu qu'elles ont la même couleur que celle du milieu, il peut s'agir donc du même pigment, qui est probablement hydrophiles. **Thompson et al. (2002)** ont montré que les gouttelettes d'eau bleues, apparues sur les colonies de *S. coelicolor*, contiennent de l'actinorhodine, antibiotique diffusé également dans le milieu.

Selon **Holt et al. (1994)**, la présence du *méso*-DAP et l'absence de sucres caractéristiques arabinose, galactose, rhamnose évoquent les genres *Nocardiopsis*, *Actinosynnema*, *Geodermatophilus*, *Thermomonospora* et *Thermoactinomyces*. Cependant, la morphologie microscopique et électronique ont révélées la présence de longs filaments en formes de zig-zag, toutes ces caractéristique sont typique du genre *Nocardiopsis*. En outre, **Lechevalier et Lechevalier (1980)**, ont rapporté qu'une paroi de chemotype III, un spectre glucidique de type C en plus du mycélium aérien en forme de zig-zag sont typiques du genre *Nocardiopsis* (**Meyer, 1976**).

La détection du *LL*-DAP chez les isolats Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16 reflète la présence du type pariétal chemotype I caractérisant les *Streptomyces* et apparentés tels que *Intrasporangium* et *Streptoverticillium*. Cependant, l'étude microscopique de ces quatre

isolats n'a montré aucune structure spécifique de type verticilles ou sporangiums, ce qui amène à rapprocher ces isolats au genre *Streptomyces*.

Les résultats de l'utilisation de sources de carbones et d'azotes, ainsi que les activités de dégradation sont variables. D'après **Meyer (1994)** la majorité des *Nocardiosis* dégradent l'adénine, la caséine, la gélatine, la tyrosine, l'amidon, la xanthine, l'hypoxanthine et l'aesculin. Ce dernier n'a pas été dégradé par les isolats Vic8 et Pin10 pré-identifiés comme étant des *Nocardiosis*. Quant aux *Streptomyces*, ils sont capables d'utiliser une gamme très variées de sources de carbone et d'azote, à l'exception de quelques composés comme l'inuline, le xylitol et la méthionine qui sont très peu utilisés.

Les isolats Lac1, Pin10, Pru14, Pru16 et Vic8 ont montré une croissance entre 20 et 37 °C, à l'exception de l'isolat Lac3 qui a pu pousser à 45°C ces résultats concordent avec les données rapportées par **Meyer (1989)**, où la majorité des *Streptomyces* et *Nocardiosis* sont mésophiles à l'exception de quelques souches qui sont capables de pousser à +4°C ou bien au-delà de 45°C.

Nos résultats indiquent que les quatre isolats affiliés au genre *Streptomyces* présentent un pH optimum égal à 7 caractérisant la majorité des *Streptomyces* telluriques. Cependant Les deux isolats assignés au genre *Nocardiosis* (Vic8 et Pin10) présentent une bonne croissance à pH 9 et elle est quasiment absente à pH inférieur à 7, ceci pourrait confirmer l'appartenance de ces deux isolats à ce genre. Car selon **Meyer (1994)** la majorité des souches de *Nocardiosis* ont un pH optimum égal à 8 et pour certaines souches il varie de 9 à 10. En plus, **Miyashita et al. (1984)** ont rapporté que la majorité des espèces de *Nocardiosis* sont des alcalophiles.

La croissance en présence d'inhibiteurs est un critère utilisé pour la classification et l'identification des actinomycètes. Parmi ces paramètres la résistance à la présence du NaCl. D'après **Tresner (1968)** seulement une minorité des *Streptomyces*, isolés du sol, résistent à 13% de NaCl. Pareillement, aucun de nos six isolats n'a poussé à cette concentration de NaCl.

Notre étude a montré que parmi les isolats suspectés d'être classés avec les *Streptomyces* (Lac1, Lac3, Pru14 et Pru16), les deux isolats Lac1 et Pru14 présentent un profil de sensibilité aux antibiotiques assez semblable, cependant il est différent de celui de l'isolat Lac3. Les spectres des isolats Vic8 et Pin10, précédemment rapprochés des *Nocardioopsis*, sont aussi similaires.

Contrairement à ce qui a été rapporté par **Veyssier (1979)** que les macrolides et les  $\beta$ -lactamines sont inefficaces contre les *Streptomyces*. Les quatre isolats préliminairement assignés au genre *Streptomyces* sont sensibles à l'érythromycine et à la pristnamycine qui font parties de la famille des macrolides, cependant ils sont résistants aux  $\beta$ -lactamines.

**Burkholder et al. (1954)** et **Okami (1956)** ont trouvé que des souches placées dans les mêmes espèces montrent de différents spectres de sensibilité aux antibiotiques. Alors que, **Williams (1967)** a rapporté que les souches appartenant à la même espèce présentent généralement le même profil de sensibilité, la différence est généralement notée par rapport à un ou deux antibiotiques. Après ses résultats **Williams (1967)** a proposé d'inclure la sensibilité aux antibiotiques comme critère de classification des actinomycètes.

La composition en base de l'ADN, ou le pourcentage en moles de GC du génome d'un microorganisme, est une caractéristique recommandée pour la description standard des espèces microbiennes (**Rosseló-Mora et Amann, 2001**). En plus des techniques connues pour la détermination du GC%, entre autres l'HPLC et la dénaturation thermique, une technique fluorimétrique rapide et facile, proposée par **Gonzalez et Saiz-Jimenez (2005)**. Elle permet de calculer les **T<sub>m</sub>** à partir de la courbe de dissociation en réalisant une amplification dans le système de la q RT-PCR en présence du SYBR Green.

Notre étude à montrer que cette méthode est efficace est le GC % des six isolats sont compris entre 68,51 est 73,27 %. Le résultat obtenu corrobore avec l'intervalle de GC% caractérisant les procaryotes **Vandamme et al. (1996)** et celui de la classe *Actinobacteria* dont le GC% est supérieur à 50.

**Sun et al. (2010)** ont rapporté que *Nocardiopsis dassonvillei* présente un GC% qui est de 73%, ce qui est très proche du GC% de l'isolat Vic8, mais celui de l'isolat Pin10 assigné aussi au genre *Nocardiopsis* est de 70,66%. Aussi, selon la littérature le GC% des *Streptomyces* est de compris entre 68 et 78 mol% (**Locci, 1994a**), par exemple *S. griseus* S104 présente un GC% qui est égal à 69±1% (**Germaine et Anderson, 1966**).

Plusieurs études ont rapporté l'utilisation des propriétés physiologiques et biochimiques pour l'identification des espèces appartenant au genre *Streptomyces* (**Faucher et al., 1992, Khamna et al., 2009; BenCheikh et Setti, 2007**). En combinaison avec l'analyse moléculaire et les données morphologiques, les propriétés physiologiques et biochimiques permettent d'assigner chaque isolat dans une espèce.

Les propriétés physiologiques et les données reportées par **Shirling et Gottlieb (1968)** et **Liu et al. (2005)**, suggèrent que l'isolat Lac1 ait affilié à *S. griseus*. Comme *S. griseus*, Lac1 produit un pigment soluble, utilise le fructose, le galactose, le lactose, le mannitol, le mannose, le ribose, le xylose et le propionate. En plus, il dégrade l'adénine et les Tweens.

Les caractéristiques de *S. anulatus* reportées par **Shirling et Gottlieb (1972)** et **Gebhardt et al. (2002)** indiquent que l'isolat Pru14 appartient à cette espèce. À l'instar des souches de *S. anulatus* l'isolat Pru14 ne produit pas des pigments mélanoides, utilise le glucose, l'arabinose, le fructose, le mannitol, le rhamnose et le xylose comme seule source de carbone, mais il est incapable d'assimiler l'inositol, le raffinose ou le saccharose.

L'isolat Pru16 et la souche type de *S. champavatii*, toute les deux développent un mycélium aérien de couleur jaune. Elles présentent aussi une morphologie identique des chaînes de spores et la même ornementation des spores, qui est lisse. Selon les données de **Locci (1994a)**, les deux souches assimile l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannitol, le xylose mais pas le raffinose, le rhamnose ou saccharose. La seule différence entre les deux souches réside dans l'assimilation du fructose et de l'inositol. Ceci est peut être dû aux variations intraspécifiques dans le genre *Streptomyces*, qui ont été souvent rapportées (**Clayton et al., 1995; Anderson et Wellington, 2001**).

Un taux élevé de similitude entre les séquences de L'ARNr 16S de l'isolat Lac3, *S. rochei* et *enissocaesilis* a été obtenu. Cependant, l'isolat Lac1 est facilement distingué de *S. enissocaesilis*. Cette dernière espèce, selon **Wink (2001)**, se caractérise par un mycélium aérien blanc, des chaînes de spores rectiflexibles et la production de pigments mélanoides sur milieu ISP<sub>7</sub>. La comparaison avec les données de **Shirling et Gottlieb (1968)** confirme que l'isolat Lac3 doit être assigné à *S. rochei*. Les deux souches développent un mycélium aérien gris avec des chaînes de spores spirales et sont toutes deux incapables de synthétiser les pigments mélanoides. En plus, ces deux souches montrent des caractéristiques physiologiques similaires comme l'assimilation du glucose, fructose, inositol, mannitol, rhamnose et xylose; et l'incapacité à utiliser le saccharose.

Par comparaison de nos résultats phénotypiques de l'isolat Vic8 avec ceux de **Yassin et al. (1997)**, l'isolat doit être assigné à *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* plutôt qu'à *N. synnemataformans* cela est due à leurs différences par rapport à la couleur de la masse sporale et aussi l'absence des synnema typique de *N. synnemataformans*. D'après **Hamedi et al. (2010)** et **Yassin et al. (1997)**, *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* comme isolat Vic8 utilisent le galactose, le rhamnose, le threhalose, le xylose, le gluconate, le propionate, l'alanine et la proline. Cependant le fructose, l'inositol, le lactose, le maltose, le mannose, le mélibiose, le raffinose, le mannitol et l'adonitol ne sont pas assimilés. Aussi, les deux souches montrent des activités de nitrate réductase et d'uréase.

Parmi les espèces figurant dans le clade de *Nocardiopsis*, l'espèce la plus proche de l'isolat Pin10 est *N. alba*. La comparaison de leurs caractéristiques, basée sur les données de **Hamedi et al. (2010)** et **Yassin et al. (1997)**, montre que l'isolat Pin10, comme *Nocardiopsis alba*, développe un mycélium aérien blanc. Il dégrade l'adénine et la xanthine mais il est incapable de produire des pigments mélanoides et de croître à 10 et 45 °C. Les deux souches n'utilisent pas l'arabinose, le mélibiose, le fructose, le lactose, le raffinose, le xylose, le rhamnose, le mannose, le mannitol et l'adonitol. Mais elles assimilent le glycerol, le saccharose, le threhalose, le maltose, le glutamate, le propionate et la proline.

Après identification polyphasique, les six Isolats antagonistes sont notés ainsi : *Streptomyces griseus* Lac1, *Streptomyces rochei* Lac3, *Streptomyces anulatus* Pru14, *Streptomyces champavatii* Pru16, *Nocardioopsis dassonvillei* susp. *dassonvillei* Vic8 et *Nocardioopsis alba* Pin10.

Parmi les isolats actifs obtenu dans cette étude, la proportion des *Streptomyces* est de (66,66%), ce genre est prévalent par rapport aux isolats appartenant au genre *Nocardioopsis*. Ce résultat confirme l'abondance des *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques. **Miyadoh (1993)** et **El-Tarabily et Sivasithamparam (2006b)** ont rapporté que *Nocardioopsis* spp. appartiennent aux genres rares des actinomycètes. Jusqu'à ce jour, le genre *Nocardioopsis* abrite 30 espèces avec des noms valides publiés. Au cours de cette étude la proportion des *Nocardioopsis* obtenue (4,54%) est supérieure à celle obtenue par **Yilmaz et al. (2008)** isolées des sols rhizosphériques en Turquie.

Les espèces du genre *Streptomyces* ont la capacité de produire une grande variété d'enzymes extracellulaires et d'antibiotiques (**Trejo-Estrada et al., 1998; Sing et al., 1999**) ce qui peut expliquer leur grande capacité à coloniser différents environnements. L'antagonisme *Streptomyces*-champignon a été démontrée contre une grande variété de pathogènes des plantes, comme *Alternaria* (**Khamna et al., 2009**), *Rhizoctonia* (**Chamberlain et Crawford, 1999**), *Verticillium* (**Berg et al., 2000**), *Fusarium* (**El-Shanshoury et al., 1996**), et *Macrophomina* spp. (**Etebarian, 2006**). Cependant, peu d'études ont porté sur l'activité antifongique de *S. griseus*, *S. champavatii*, *S. rochei*, *S. anulatus* contre *V. dahliae*, *F. culmorum*, *D. teres*, *M. nivale*, *B. sorokiniana*, *B. fabae* et *F. oxysporum*. Néanmoins, la production de endophenazines AD, molécules antifongiques, par *S. anulatus* a été rapporté (**Gebhardt et al. 2002**).

*S. champavatii* est connu par son activité chitinolytique (**Hosny et al., 2010**) et sa production d'antibiotiques antifongiques polyéniques et non polyéniques appelés champamycin A, champamycin B et champavatin (**Rao et Narasimha, 1967**). *S. rochei* produit le 1-propanone, 1 - (4-chlorophényl) impliqué dans le biocontrôle des *Phytophthora*

(Ezziyani *et al.*, 2007). *S. griseus* est un producteur de plusieurs antibiotiques antifongiques tels que l'actidione (Whiffen *et al.*, 1946), la candidine (Campelo et Gil, 2002) et les bafilomycines (Werner et Hagenmaier, 1984). Tu (1988) a également, signalé l'utilisation d'une souche de *S. griseus* pour contrôler le champignon phytopathogène *Lindemuthianum colletotricum*. Dans ce dernier cas, l'efficacité de la lutte biologique a été attribuée à l'antibiose. Hoster *et al.* (2005) a aussi rapporté qu'une souche de *S. griseus* contrôle la croissance de *F. culmorum* grâce à son activité chitinolytique. Il est intéressant, que la souche Lac1, ainsi que toutes les actinobactéries sélectionnés dans cette étude soient dotées d'une activité chitinolytique.

Il y a très peu d'études qui se sont intéressées à la production de produits antifongiques par *Nocardiopsis dassonvillei*. Ali *et al.* (2009) ont rapporté la production de d'un antibiotique WA 52-A de la famille des macrolides par *Nocardiopsis dassonvillei*. Tandis Schumacher *et al.* (2001) ont isolé deux nucléosides indole kanakamides à partir du *N. dassonvillei*. En outre, Sabaou *et al.* (1983) ont rapporté qu'une souche de *Nocardiopsis dassonvillei* présente des activités antibiotique, mycolytique et parasitaire contre les hyphes végétative de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

Dans la littérature, les *Nocardiopsis alba* bioactives sont rarement reportées. À notre connaissance, aucune production d'antibiotique par *N. alba* n'a été signalée. Cependant, la production d'un lipopeptide biosurfactant *Nocardiopsis alba* 10 MSA a été reportée (Gandhimathi *et al.*, 2009). En comparant l'activité antifongique des deux isolats appartenant au genre *Nocardiopsis*, l'isolat Pin10 est moins actif que l'isolat Vic8, pourtant cet isolat diminue la croissance radiale de 6 champignons phytopathogènes, l'activité inhibitrice n'était significative que contre *F. oxysporum* et *D. teres*. La présente étude a révélé la détection de l'activité chitinolytique chez les deux souches *Nocardiopsis*, cette activité est déjà mise en évidence chez les souches *N. prasina* OPC-131 (Tsujibo *et al.*, 2003) et *Nocardiopsis* sp. F96 (Matsui *et al.*, 2004). L'activité chitinolytique peut donc être un des mécanismes utilisés par les isolats *Nocardiopsis* pour inhiber la croissance des champignons.

## Introduction

La gale commune de la pomme de terre est une maladie qui cause des pertes économiques. Cette maladie peut aussi affecter d'autres types de cultures maraîchères comme celle du radis. La gale commune est associée à quatre espèces principales de streptomycètes, soit *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces caviscabies* et *Streptomyces turgidiscabies*.

*S. scabies* est l'espèce qui occasionne le plus fréquemment la gale commune. De plus, ce microorganisme inhibe la croissance des jeunes plantules de monocotylédones et de dicotylédones. Les études taxonomiques sur les *Streptomyces* phytopathogènes ont démontré une grande diversité génétique à l'intérieur de ce groupe. Une caractéristique commune à ces microorganismes est leur capacité à synthétiser des phytotoxines, nommées les thaxtomines (Vachon, 1999).

Plusieurs études ont été menées pour contrôler la gale commune. Parmi les méthodes employées l'irrigation excessive durant la formation des tubercules, l'application des engrais verts, la rotation des cultures et la lutte chimique. Aussi, *Streptomyces albidoflavus* CH-33, agissant par antibiose, est actuellement utilisé comme agent de lutte biologique (Liu *et al.*, 1995).

Cette partie du travail est consacrée, d'une part, à l'étude de l'antagonisme *in vitro* et *in planta* (sur des radis) des six isolats d'actinomycètes antagonistes de *Streptomyces scabies* EF-35 et, d'autre part, à la caractérisation préliminaire de la molécule active contre ce pathogène.

## Matériel et méthodes

### Le microorganisme pathogène *Streptomyces scabies* EF-35

Cette souche a été isolée par **Faucher *et al.* (1992)** à partir de la pomme de terre cultivée au Québec, atteinte de la gale commune. La souche nous a été fournie par Mme la Professeur Carole Beaulieu du Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne, Département de biologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

### 1-Antagonisme *in vitro* contre *S. scabies* EF-35

#### 1-1-Méthode de strie verticale (croisement)

La détermination des activités antimicrobiennes des six isolats actinomycétales a été effectuée par la méthode de strie verticale ou de croisement. Le milieu Muller-Hinton est inoculé par une strie unique de l'isolat actinomycétale antagoniste, après une incubation de 4 jours à 28 °C, le milieu estensemencé avec *Streptomyces scabies* par une strie perpendiculaire à celle de l'antagoniste. Le résultat de l'interaction inhibitrice entre l'isolat antagoniste et *S. scabies* est noté après 4 jours d'incubation à 28 °C (**Selvin *et al.*, 2009**).

#### 1-2-Technique des cylindres d'agar

Selon la méthode de **Beauer *et al.* (1966)**, les six isolats sont cultivés sur milieu Bennett ou GBA (**Annexe 1**) jusqu'à une bonne sporulation. Les cylindres d'Agar sont déposés sur milieu Muller Hilton déjàensemencé avec la souche phytopathogène (*S. scabies* EF-35). Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 4 heures puis à 30°C pendant 24 heures avant de lire les résultats.

#### 1-3-Technique des puits

Les extraits méthanoliques des isolats sont préparés selon la méthode de **Kutzner (1981)**. Une pré-culture âgée de 48 heures, dans un bouillon nutritif (**Annexe 1**), sert d'inoculum pour le milieu de fermentation ISP<sub>2</sub> (**Annexe 1**). Ce dernier est incubé à 30 °C pendant 5 jours sous une agitation de 180 rpm.

L'extraction est réalisée avec un mélange de 2,5 volumes de méthanol additionné d'un volume du milieu de fermentation. Le mélange est incubé à 4 °C pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 4000 g, ensuite séché et dissout dans l'eau. La technique des puits est effectuée selon les recommandations de **Peela et al. (2005)**. La gélose Muller Hilton est ensemencée par 0,1 ml d'une suspension de la souche pathogène à une concentration  $10^5$  UFC/ml. Après séchage, des puits de 5 mm de diamètre sont creusés dans la gélose Muller Hilton et 100 µl de l'extrait sont déposés dans chaque puits.

#### **1-4-Technique des disques de diffusion**

Les extraits organiques sont obtenus après fermentation selon deux méthodes:

-L'extrait N°1 est préparé d'après les recommandations de **Wu et al. (2007)**, une pré-culture de 24 heures sert d'inoculum du milieu de fermentation (MF1) (**Annexe 1**). L'incubation est de 4 jours, à 28 °C avec une agitation de 180 rpm. L'extraction du surnageant est réalisée avec un volume d'acétate d'éthyle additionné d'un volume égal du surnageant, elle est répétée deux fois. Les deux phases organiques sont récupérées et mélangées. L'extrait est concentré, séché puis dissout dans du méthanol.

- L'extrait N°2 est obtenu selon la méthode **Caveri et Giolliti (1963)**, une pré-culture de 24 heures dans un milieu ISP sert d'inoculum pour milieu de production (MF2) (**Annexe 1**), la taille de l'inoculum est de 10%. Après une fermentation sous agitation (à 180 rpm) de 7 jours à 28°C, le surnageant est récupéré puis lui sont ajoutés trois volumes de benzène. Cette extraction est répétée trois fois. Les trois phases organiques sont mélangées puis concentrées, séchées et dissoutes dans du méthanol.

Les disques de papier stériles de 8 mm de diamètre (Whatman N°1) sont trempés dans une solution de l'extrait organique (0,25 mg/ml) ou bien saturés avec 10 à 20 µl de l'extrait. Les disques séchés sont ensuite placés sur la gélose Muller Hilton déjà ensemencée par la souche phytopathogène (**Amade et al., 1994; Wu et al., (2007)**).

## 2-Antagonisme *in planta* des actinomycètes sélectionnés contre *S. scabies* EF-35

### 2-1-Stérilisation et germination des radis

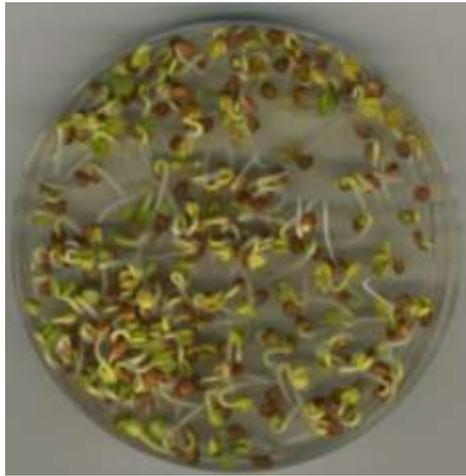
Les grains de radis (*Raphanus sativus* 'Cherry Belle') sont d'abord stérilisés avec de l'éthanol 70% avec agitation pendant 5 minutes. Après un rinçage avec de l'eau distillée stérile, les radis sont traités deux fois avec une solution de SDS à 0,02% (dans de l'eau de javel à 10 %), après chaque traitement les radis sont lavés avec de l'eau distillée stérile. Ainsi, les grains stériles sont distribués sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Agar-eau (1,5%) (**Annexe 1**). Les boîtes sont incubées à l'obscurité, pour germination, à 30 C° pendant 48 heures (**Figure 25**).

### 2-2-Pré-cultures d'actinomycètes antagonistes et de *Streptomyces scabies* EF-35

20 µl d'une suspension de spores de 10<sup>8</sup> UFC/ml conservés à -80C°, sert d'inoculum pour 25 ml du milieu TSB (**Annexe 1**). Le milieu est incubé à 30C° dans un agitateur rotatif (190 rpm) pendant 48 heures. La culture est, ensuite, centrifugée à 4000 g pendant 10 minutes, le culot est récupéré puis dilué dans de l'eau physiologique (0,9 %) à raison d'un volume pour cinquante.

### 2-3-Montage des pochettes de croissance

Le dispositif employé est celui recommandé par **Legault et al. (2011)**. Six pousses de radis sont placés dans chaque pochette de croissance préalablement stérilisée (125 X 75 mm, Mega International) et remplies avec 18 ml d'eau distillée stérile. Les pousses de radis sont cultivés en présence d'1 ml de la suspension d'actinomycète antagoniste et d'1 ml d'eau physiologique dans le but de tester l'effet des six isolats antagonistes sur la croissance des radis, comme témoin négatif, la suspension bactérienne est remplacée avec 1 ml d'eau physiologique. Afin de déterminer l'éventuel effet antagoniste des six isolats contre *S. scabies* EF-35, les pousses de radis sont inoculées avec 1 ml de la suspension de *S. scabies* EF-35 et 1 ml de la suspension de la souche antagoniste et le témoin positif est inoculé avec 1 ml d'eau physiologique et 1 ml de la suspension de *S. scabies* EF-35.



**Figure 25:** les graines de radis germinées sur milieu Agar-eau

Un dispositif expérimental complètement aléatoire avec 4 répétitions à été adopté. Les pochettes de croissance emballées dans du papier aluminium sont incubées dans le plantarium pendant 6 jours à 21 C° et 68% d'humidité.

#### **2-4-Scan des pochettes et analyse des images par WinRhizo**

Après la période de croissance, les pochettes sont vidées de leur jus puis scannées avec EPSON Expression 836 XL. Les images obtenues en format TIFF sont ensuite analysées avec un logiciel Winrhizo (V. 2002c; Pro Regent Instruments Inc., Québec, QC, Canada) qui fournit une détermination rapide des différents paramètres morphologiques des racines (longueur, surface, diamètre et volume) (Legault *et al.*, 2011).

#### **2-5-Étude statistique**

Pour tous les essais (témoin positif, témoin négatif et essais) les moyennes des différents paramètres mesurés par Winrhizo sont comparées par analyse de la variance à un seul paramètre (ANOVA). Le logiciel SAS 9.1 (Statistical Analysis System) avec le programme GLM (General Linear Model) a été utilisé pour augmenter la précision des procédures d'ANOVA. À chaque fois que la Fisher (F) calculée est significative, le test de la plus petite différence significative protégé de Fisher, a été employé pour comparer les moyennes.

### **3- Bioautographie des extraits actifs contre *S. scabies* EF-35**

Parmi les six souches, seul l'extrait de l'isolat Lac1 s'est avéré actif contre *S. scabies* EF-35. Dans le but d'extraire et de caractériser de façon préliminaire la molécule active, une bioautographie a été réalisée. Ainsi, un volume de 50 µl de l'extrait de Lac1 (extrait N°1) re-dissout dans le méthanol est déposé en plusieurs reprises sur une plaque analytique de silice (0,2 mm). Le temps de migration est de 2 heures dans un système de solvants : chloroforme : méthanol (9 :1) (Wu *et al.*, 2007).

Après migration, la plaque est séchée, puis visionnée avec la lumière visible et ultraviolette, et les spots sont entourés. La plaque est découpée en bandes qui seront ensuite

stérilisées par UV dans une boîte de Pétri stérile pendant 10 minutes. Sur la bande on verse une couche mince d'une gélose molle (0,3% d'Agar) du milieu TSA (**Annexe 1**) préalablement ensemencé, en masse, avec *S. scabies* EF-35. Le bioautogramme est incubé pendant 48 heures à 30 °C.

#### **4-Extraction et caractérisation préliminaire des molécules actives**

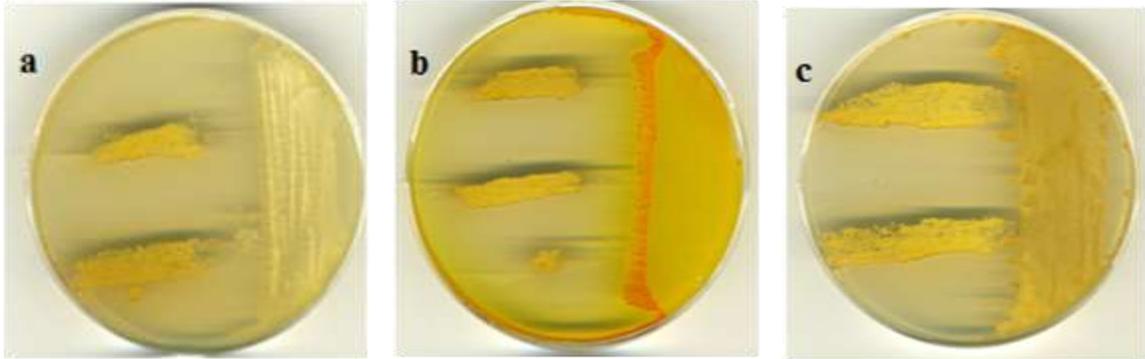
Un volume de 500 µl de l'extrait de l'isolat Lac1 est déposé sur chaque plaque de silice préparatoire (2 mm d'épaisseur). Après la migration dans le système chloroforme : méthanol (9:1), les plaques sont séchées, puis les spots de couleur jaunâtre sont entourés puis grattés. L'élution des spots se fait avec l'acétate d'éthyle, suivie de plusieurs centrifugations jusqu'à élimination totale de la silice. L'extrait est concentré puis dissout dans l'acétonitrile.

La caractérisation est réalisée par une chromatographie HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) avec la chromomycine A<sub>3</sub> comme standard. Ce dernier est préparé dans de l'acétonitrile avec une concentration de 1 mg/ml. La phase mobile est un gradient d'acétonitrile 10 à 90 %. La colonne utilisée est la Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies), avec un débit 1 µl/min et un détecteur UV visible Diode Array Detector (DAD).

### **Résultats**

#### **1-Antagonisme *in vitro* des isolats contre *S. scabies* EF-35**

L'étude de l'antagonisme *in vitro* contre *S. scabies*, selon la technique du croisement vertical révèle que sur l'ensemble des isolats (Lac1, Lac3, Pru14, Pru16, Vic8 et Pin10) seulement Lac1 et Pru14 inhibent la croissance de ce pathogène. Pour ces deux isolats la zone d'inhibition notée est de 20 mm. Par ailleurs, la zone d'inhibition de 3 mm, obtenue dans le cas de l'isolat Pru16 s'est avérée non significative (**Figure 26**). Ces résultats montrent aussi que l'isolat Lac1 est plus actif sur *S. scabies* par la technique des cylindres



**Figure 26** : technique d'antagonisme des stries croisées (a): Pru14; (b): Lac1; (c): Pru16.

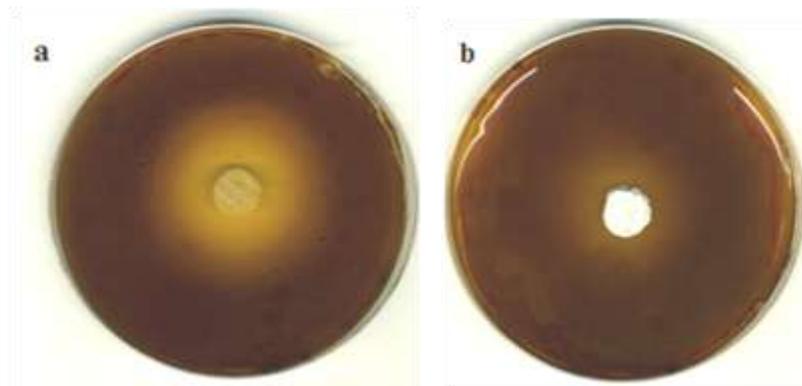
que celle du croisement vertical. Alors que l'isolat Pru14 ne présente pas de différences entre les deux techniques d'antagonisme employées (**Figure 27**). Les résultats de l'antagonisme réalisé par la technique des puits indique que seul l'isolat Lac1 est actif (**Figure 28a**). Le surnageant de culture de Lac 1 inhibe la croissance de *S. scabies*. La zone d'inhibition est de l'ordre de 20 à 30 mm. Alors que le surnageant de l'isolat Pru14 n'a présenté aucune activité.

Après traitement des surnageants avec l'acétate d'éthyle et le benzène. Les extraits organiques sont déposés sur des disques de papier préalablement stérilisés. Après incubation, des zones d'inhibition ont été obtenues, seulement pour deux isolats Lac1 et Pru14. Les diamètres des zones d'inhibition sont, respectivement, de 25 mm et 3 mm. La taille de la zone d'inhibition pour l'isolat Pru14 n'est pas significative.

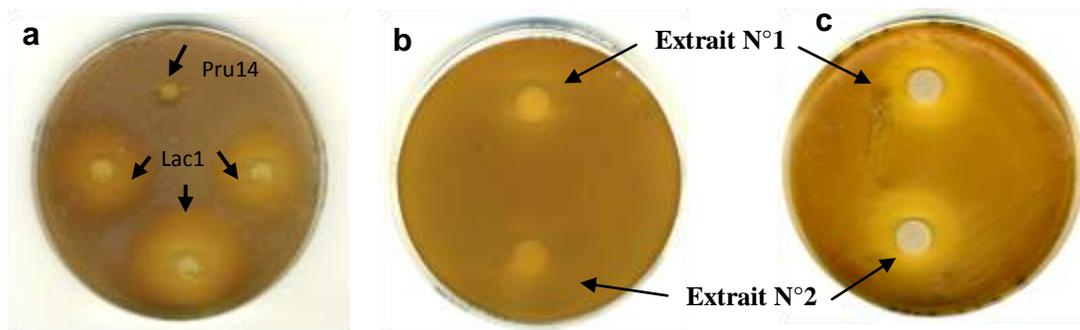
Les isolats Lac3, Pin10, Vic8 n'ont présenté aucune activité inhibitrice vis-à-vis de *Streptomyces scabies*, quelle que soit la technique utilisée : technique des cylindres d'agar, technique des puits ou encore celle des disques de diffusion. Ainsi, l'isolat Lac1 présente la meilleure inhibition contre *S. scabies* EF-35 *in vitro*. L'extrait à l'acétate d'éthyle (N°1) et l'extrait au benzène (N°2) ne présente aucune différence d'activité (**Figure 28b**).

## **2-Effet des actinomycètes antagonistes sur la croissance des radis**

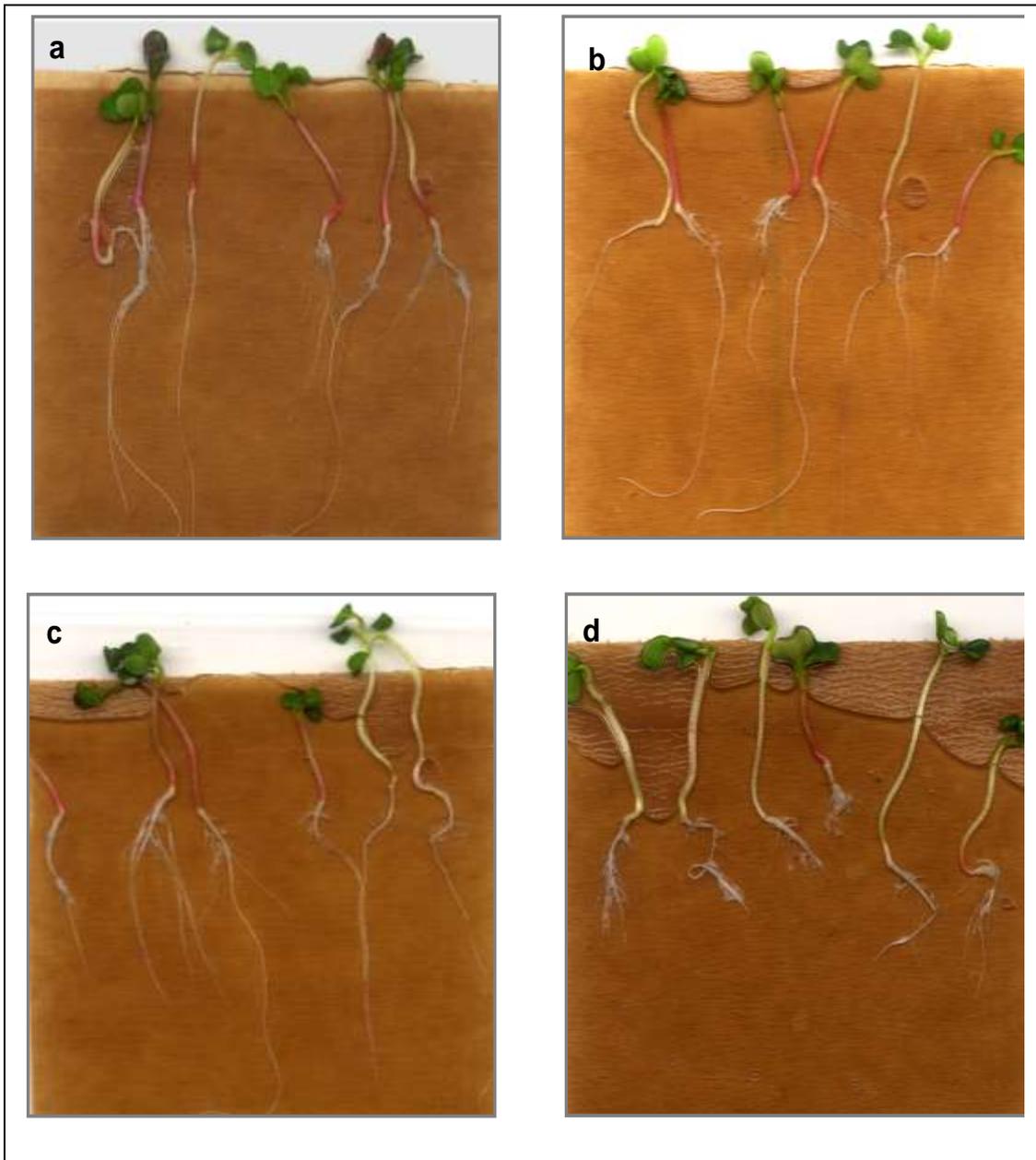
L'analyse des résultats de la croissance de pousses de radis par le logiciel WinRhizo suivie d'une analyse statistique ANOVA consolidée avec le test LSD à ( $P < 0,05$ ) ont montré que les actinomycètes Lac1, Lac3, Vic8, Pru14 et Pru16 sont sans effet sur la croissance des plantules de radis. En plus, ces dernières ne présentent aucun symptôme de maladie, leur aspect est parfaitement similaire à celui des plantes cultivées sans actinomycètes antagonistes (**Figure 29**).



**Figure 27:** technique des cylindres d'Agar (a): Lac1; (b): Pru14



**Figure 28:** résultat d'antagonisme, (a): technique des puits; (b): technique des disques de diffusion Pru14; (c): technique des disques de diffusion Lac1.



**Figure 29:** effet des isolats antagonistes sur la croissance des radis.

Comparativement à la longueur des racines des plantules contrôles (témoins négatif) (122,99 cm), les longueurs de racines mesurées en présence des isolats Lac1, Lac3, Pru14, Pru16, Vic8 sont 78,05; 105,64; 109,26; 78,84 et 70,58 cm, respectivement. Seul l'isolat Pin10, diminue la longueur des racines et augmente leur diamètre.

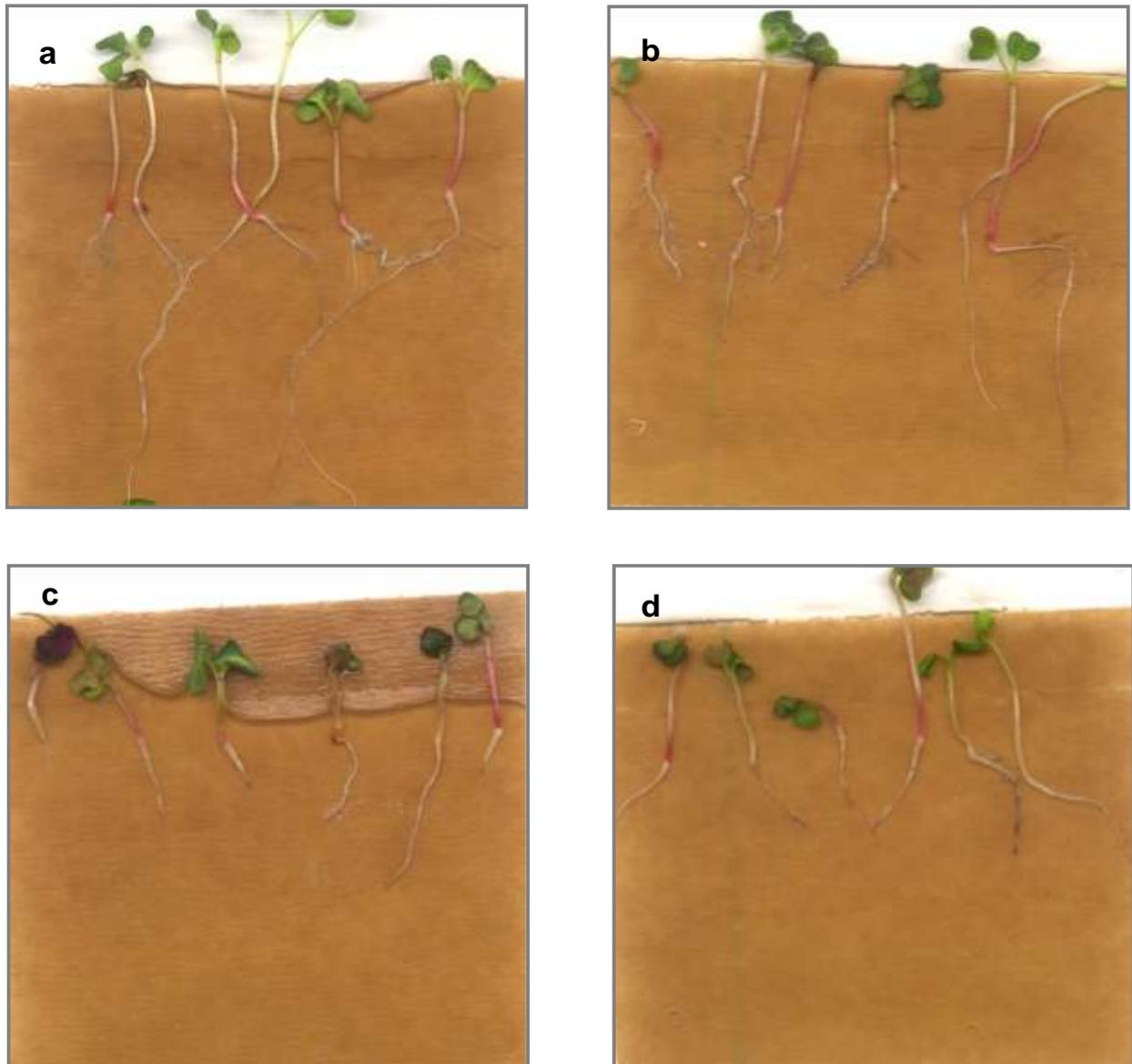
### **3-Antagonisme *in planta* des actinomycètes sélectionnés contre *S. scabies* EF-35**

La gale commune causée par *S. scabies* a pour symptômes l'apparition des taches jaunâtres, des nécroses sur les racines, diminution de la croissance racinaire et surtout la disparition des racines secondaires. Dans notre étude, Après incubation des plantules dans le plantarium à l'obscurité, les pochettes sont scannées (**Figure 30**), ensuite les paramètres de croissance sont mesurés. Les résultats indiquent que les plantules de radis inoculées de *S. scabies* présentaient toutes ces symptômes, contrairement au témoin négatif, où les plantules montrent une bonne rhizogénèse et l'absence de nécroses.

L'analyse statistique des résultats (ANOVA et test LSD) montrent que tous les isolats à exception de Pin10 ont corrigé d'une façon partielle ou totale les symptômes de la gale par l'apparition des racines secondaires et l'augmentation de la longueur de la racine principale. Les témoins négatif et positif présentent une croissance de 87,51 et 20,26 cm, respectivement. Cependant, en présence des actinomycètes antagonistes sélectionnés Lac1, Lac3, Pru14, Pru16 et Vic8 les longueurs de racines obtenues sont de : 81,56; 52,90; 42,88; 51,29 et 42,98 cm, respectivement (**Tableau 35**). Pour ce qui est de la surface de racines, il s'est avéré que l'inoculation des isolats Lac1 et Lac3 avec les plantules contribuent à l'augmentation de la surface de leurs racines. Sur l'ensemble de six antagonistes, seul l'isolat Pin10 a augmenté le diamètre de la racine principale.

### **4-Bioautographie des isolats actifs contre *Streptomyces scabies* et extraction des molécules actives**

Les résultats de l'antagonisme *in vitro* et *in planta* ont permis de sélectionner le meilleur antagoniste contre *S. scabies* EF-35: l'isolat Lac1. Pour ce dernier un bioautogramme



**Figure 30:** effet des isolats sur la croissance des racines de radis inoculées par *S. scabies*  
(a): Lac1; (b): Pru14; (c): témoin positif; (d): Pin10.

**Tableau 35:** effet antagoniste des isolats actinomycétales sur la croissance des racines de radis inoculées par *S. scabies* EF-35.

		Les paramètres de croissance des racines		
		Longueur (cm)	Surface (cm <sup>2</sup> )	Diamètre (mm)
Témoin négatif		87,51 ± 16,40 <b>a</b>	6,36 ± 0,99 <b>ab</b>	0,21 ± 0,04 <b>d</b>
Témoin positif		20,36 ± 02,43 <b>d</b>	3,44 ± 0,33 <b>c</b>	0,59 ± 0,08 <b>b</b>
Les racines inoculées par <i>S. scabies</i> et les antagonistes	Lac1	81,56 ± 19,54 <b>a</b>	8,06 ± 1,644 <b>a</b>	0,31 ± 0,01 <b>cd</b>
	Lac3	52,90 ± 19,74 <b>b</b>	6,80 ± 1,81 <b>ab</b>	0,43 ± 0,08 <b>bcd</b>
	Vic8	42,98 ± 18,19 <b>bc</b>	5,96 ± 0,99 <b>b</b>	0,53 ± 0,32 <b>cb</b>
	Pin10	22,56 ± 07,34 <b>cd</b>	5,76 ± 1,28 <b>b</b>	0,86 ± 0,32 <b>a</b>
	Pru14	42,88 ± 14,78 <b>bc</b>	5,66 ± 1,76 <b>b</b>	0,42 ± 0,06 <b>bcd</b>
	Pru16	51,29 ± 15,71 <b>b</b>	5,57 ± 1,167 <b>b</b>	0,35 ± 0,06 <b>bcd</b>

Note : les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes.

a été réalisé pour caractériser la molécule inhibitrice. La révélation du bioautogramme aux rayons UV et visible a permis de détecter cinq spots : un spot de coloration jaune et quatre visibles seulement aux rayons UV. Seul le spot de couleur jaunâtre a révélé une zone d'inhibition après ensemencement de la souche phytopathogène *Streptomyces scabies*. Ce qui signifie l'implication de cette molécule dans l'inhibition de *S. scabies* (**Figure 31**).

Cette zone a été grattée puis éluée avec de l'acétate d'éthyle puis l'acétonitrile et analysée par HPLC avec la chromomycine A<sub>3</sub> comme standard. Les deux spectres de la chromomycine A<sub>3</sub> et celui de la molécule jaune sont présentés dans la **Figure 32**. Le chromatogramme montre que le temps d'élution de la chromomycine A<sub>3</sub> est 8,89 min, alors que l'extrait de l'isolat Lac1 ne présente aucun pic à ce temps-ci. Par comparaison des temps d'élution, il est donc clair que cette molécule est absente dans l'extrait de l'isolat Lac1. Cependant, un pic élué à 12,20 minutes semble être la molécule.

## Discussion

La gale commune causée par *S. scabies*, affecte non seulement la pomme de terre mais aussi d'autres cultures maraîchères comme les radis. Dans cette étude, la plante de radis a été choisie pour effectuer ce test *in planta* pour deux raisons : sa sensibilité à *S. scabies* et sa croissance rapide dans le plantarium.

L'isolat Lac1 s'est avéré actif aussi bien *in vitro* qu'*in planta*. Ainsi, il a montré des zones d'inhibition significatives avec les différentes techniques employées (croisement vertical, technique des puits et disque de diffusion). Cet isolat a été identifié comme *Streptomyces griseus*. Cette espèce est connue pour sa production de nombreuses molécules antifongiques et antibactériennes. En plus, elle est connue pour sa production de phytohormone qui stimule la croissance des plantes.

L'isolat Pru14 a montré une activité inhibitrice avec la technique des cylindres d'Agar. Cependant, celle des disques de diffusion n'était que partielle. Ceci pourrait être



Figure 31: bioautogramme de l'extrait de Lac1 contre *Streptomyces scabies* EF-35.

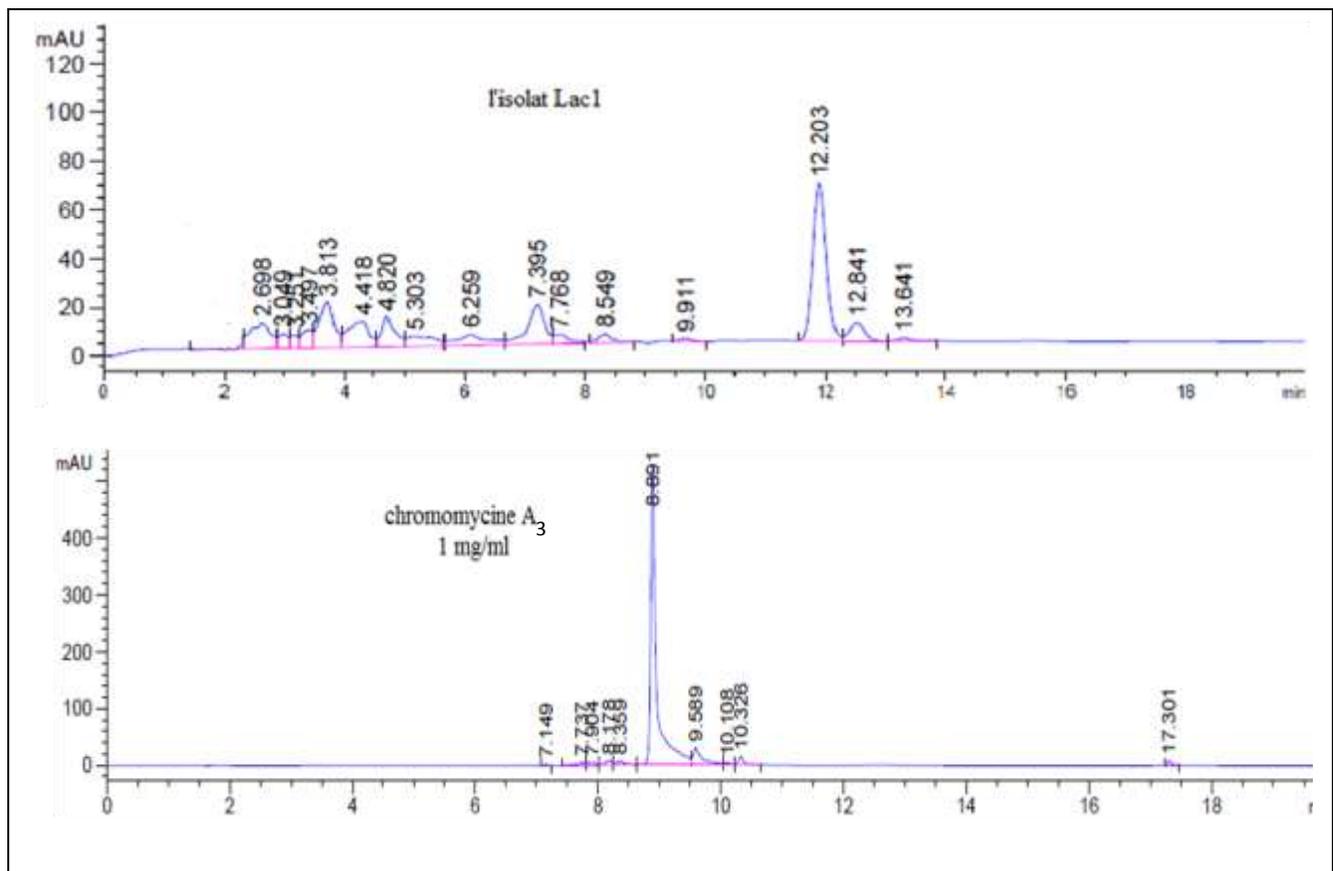


Figure 32 : chromatogramme de la molécule active de l'isolat Lac1 et la chromomycine A<sub>3</sub>

expliqué par le fait que la molécule active n'a pas été produite en milieu liquide ou encore elle a été produite mais n'a pas été extraite avec l'acétate d'éthyle et/ou le benzène. **Anibou et al. (1994)** ont rapporté que dans le cas des actinomycètes, le milieu solide est le milieu adéquat pour la production des molécules bioactives. En plus, certains métabolites sont élaborés pendant la maturation du mycélium aérien car les actinomycètes sont dotés d'un programme de morphogénèse de la colonie coordonné avec l'excrétion des molécules bioactives **Thompson et al. (2002)**. En outre, la solution aqueuse déposée dans les puits n'a présenté aucune activité inhibitrice contrairement aux cylindres d'Agar. Il est possible que la molécule en question diffuse mal en milieu gélosé ou encore n'est pas soluble dans l'eau.

Les isolats Lac3, Pru16 et Vic8 n'ont présenté aucune activité inhibitrice *in vitro* vis-à-vis de *S. scabies*. Cependant *in planta*, ces même isolats ont pu diminuer les effets de l'agent pathogène sur les radis ce qui a été traduit par l'apparition des racines secondaires. Il est possible que la molécule d'antibiotique diffuse mal dans la gélose, ou bien l'inadéquation du milieu de fermentation et/ou du solvant d'extraction. Ceci peut être en accord avec les résultats obtenus par **Selvin et al. (2009)**, qui ont trouvé que les molécules bioactives extraites, de la souche *N. dassonvillei* MAD08, par les solvants organiques inhibaient *in vitro* la croissance des bactéries à coloration de Gram positif et à coloration de Gram négatif, alors que la phase soluble dans l'eau, quant à elle inhibait *Candida albicans*.

Par ailleurs, et selon **Beauchamp (1993)**, près de 5 % des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les agents pathogènes tels les bactéries et les champignons. Ainsi, l'antibiose n'est pas le seul mécanisme employé par les rhizobactéries pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Les actinomycètes rhizosphériques peuvent aussi entrer en compétition avec *Streptomyces scabies* et de ce fait diminuer, son effet pathogène sur les plantules ou encore produire des phytohormones. Il semble que les isolats Lac3, Pru16 et Vic8 agissent soit par complétion et/ou par production de sidérophores.

La lutte biologique ou le biocontrôle contre *S. scabies* a déjà fait l'objet de plusieurs études. **Hayashida *et al.* (1988)** ont employé une souche de *Streptomyces albidoflavus* CH33 comme biofertilisant pour lutter contre la gale due à *S. scabies*. Cet agent de lutte biologique agit par antibiose, ils ont pu démontrer la production d'un antibiotique actif sur *S. scabies*. L'étude menée par **Liu *et al.* (1995)** a montré la capacité de trois souches appartenant aux espèces *Streptomyces albogriseolus* et *Streptomyces diastatochromogenes* à inhiber la croissance de *S. scabies*.

Dans le but de caractériser la molécule impliquée dans l'inhibition de *S. scabies*, la molécule chromomycine A<sub>3</sub> a été choisie, comme standard, du fait que l'isolat Lac1 a été classé dans l'espèce *Streptomyces griseus*. Cette espèce est connue pour sa production de la chromomycine A<sub>3</sub>, qui est un antibiotique anti Gram positif. Le chromatogramme de l'extrait de Lac1 indique l'absence du pic caractéristique de la chromomycine A<sub>3</sub>. Ce résultat signifie soit l'absence de la chromomycine A<sub>3</sub>, soit sa présence couplée avec d'autres substituants qui retarde son élution. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour purifier et caractériser la molécule en question.

## Introduction

Les espèces de *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses, connues pour leur capacité à produire un nombre importants de métabolites secondaires ayant un intérêt pour l'agriculture et le domaine médical. Seulement quelques espèces, comme *Streptomyces scabies*, peuvent agir comme agents phytopathogènes causant la gale sur des cultures économiquement importantes telles que la pomme de terre (**Kers et al., 2005**). Les souches pathogènes de *S. scabies* produisent des phytotoxines : les thaxtomines. Ces dernières sont des dipeptides nitrés qui inhibent la synthèse de la cellulose durant le développement des tissus de la plante. La biosynthèse de la thaxtomine implique des peptide-synthétases non-ribosomal conservées (NRPS), des monooxygénases P450 et une oxyde nitrique synthétase qui est nécessaire pour la nitration de la toxine (**Loria et al., 2008**).

La peptide-synthétase non-ribosomal conservée est codée par les gènes *txtA* et *txtB*. Ces gènes sont responsables de la production de N-méthyle dipeptide cyclique : l'ossature de la toxine. Après la cyclisation, la monooxygénase P450 et la TxtC sont nécessaires pour les étapes d'hydroxylation. Le séquençage à proximité des gènes *txtA* et *txtB* révèle la présence d'un gène d'une séquence de haute similitude avec le domaine oxygénase de l'oxyde nitrique synthétase des mammifères (*nos*). Chez les *Streptomyces* produisant la thaxtomine, le gène *nos* assure la nitration de la thaxtomine (**Kers et al., 2004**). L'oxyde nitrique synthétase est aussi responsable de la libération de l'oxyde nitrique provoquant la gale à l'interface hôte-pathogène. Ce qui suggère que la production d'oxyde nitrique pourrait jouer un rôle supplémentaire pendant le processus d'infection (**Healy et al., 2002**).

Les thaxtomines jouent un rôle central dans l'induction de la formation de lésions sur les tubercules. **King et al. (1991)** ont montré que toutes les souches pathogènes de *S. scabies* EF-35 testées produisent la thaxtomine. Ils ont démontré une corrélation entre la production de la thaxtomine et la pathogénicité.

Pour cette cinquième partie nous nous attarderons sur l'effet du surnageant de culture de la souche représentative *S. griseus* Lac1 (active contre *S. scabies* *in vitro* et *in planta*) sur l'expression du gène *nos*, impliqué dans la biosynthèse de la thaxtomine chez *Streptomyces scabies*-EF-35. Le gène gyrase est choisi comme gène de référence.

## Matériel et méthodes

### 1-Effet du surnageant de Lac1 sur l'expression du gène de la thaxtomine A (*nos*)

#### 1-1-La culture de la souche *S. scabies* EF-35

Suivant les recommandations de **Lerat *et al.* (2010)**, des pré-cultures de 48 heures sur milieu TSB (**Annexe 1**) sont préparées. Elles servent d'inoculum pour le milieu minimum (MM) (**Annexe 1**) amendé de (0,1% P/V) de subérine et (0,5% P/V) de cellobiose, qui induisent la production de la thaxtomine A. L'incubation est de 05 jours à 30°C sous agitation de 180 rpm. Contrairement aux témoins, les autres cultures (essais) sont additionnées de l'extrait méthanolique de la souche Lac1 à une concentration de 4 µg/ml. Un plan de randomisation de 3 répétitions a été réalisé.

#### 1-2-Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN nécessite plusieurs étapes, la première est de stopper les cultures avec une solution stop (acide phénol/ éthanol : 95/5) pour prévenir la dégradation des ARN. Un volume de cette solution est rajouté aux 5 volumes du milieu de culture. Après avoir mélangé par inversion, le mélange est centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes à -4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots contenant les ARN totaux sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation (**Legault *et al.*, 2010**). L'eau utilisée pour l'extraction des ARN est exempte de ribonucléase (RNAase), elle est traitée avec le pyrocarbonate d'éthyl (DEPC) (**Annexe1**).

Le culot est additionné de 1 ml du lysozyme préparé dans du tampon TE (15 mg/ml). Après une incubation de 10 minutes à 37°C, les mélanges obtenus sont vortexés puis additionnés d'un volume adéquat de la β-mercaptoéthanol (β-ME) préparée dans du tampon RLT (10 µL β-ME /ml tampon RLT). L'étape suivante est la sonification sur glace à amplitude 50 % à raison de 3 fois 30 secondes avec une pause de 15 secondes entre chaque sonification. Deux volumes de phénol-chloroforme sont additionnés à 1 volume du mélange précédent, suivi d'une centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes à -4 °C. Le surnageant est récupéré et cette étape est répétée trois fois. À la fin, à ces surnageants contenant les ARN est ajouté un volume de 600 µl d'éthanol (96-100%) et sont conservés sur glace.

Les étapes qui suivent sont celles d'une préparation commerciale « kit » d'extraction d'ARN 'Rneasy MiniKit Protocol' (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). C'est des réactifs prêts à l'emploi, il est conçu pour l'isolement et la purification des ARN totaux à partir des bactéries. Les échantillons de l'ARN extraits sont susceptibles de contenir de l'ADN, l'étape de la digestion des ADN incluse dans le Kit 'Rneasy MiniKit Protocol' peut ne pas être suffisante. Pour être sûr de ne pas avoir de l'ADN dans les échantillons, une seconde digestion est accomplie avec une désoxyribonucléase suivant les instructions du protocole Turbo DNA-free (Turbo DNase; Ambion, Austin, TX). Les ARN purifiés ainsi obtenus sont dosés au spectrophotomètre NanoDrop.

### **1-3-Électrophorèse des ARN extraits sur gel de formaldéhyde (FA gel)**

Pour vérifier l'intégrité de l'ARN purifié, une électrophorèse est effectuée sur un gel de formaldéhyde. Une quantité de 1,2 g d'agarose est dissoute dans 10 ml de 10X FA gel tampon (200 mM MOPS, 50 mM sodium acétate, 10 mM EDTA, pH 7,0). Le volume est complété à 100 ml avec de l'eau DEPC. Avant de couler le gel, 100 µl du fluorescent nucléique (GelRed™, Biotium) et 1,8 ml du formaldéhyde (37%) sont ajoutés. Les échantillons de l'ARN sont d'abord dilués avec de l'eau DEPC (5µg / tube) puis chauffé à 65°C pendant 7 minutes, puis rapidement refroidis sur glace. Les volumes des ARN sont complétés avec 2 µl du tampon de chargement des ARN (**Annexe 1**) ensuite chargés dans les puits du gel. La migration se fait dans un tampon 1X FA gel additionné de formaldéhyde, sous une tension de 75 volts pendant 2 heures.

L'électrophorèse est suivie par un marqueur moléculaire (GenRuler™ 1KB DNA Ladder) de 250 à 10000 paires de bases. Le gel est passé à travers les rayons UV pour visualiser et photographier les bandes des deux sous unités 16S et 23S. Les fragments d'ARN sont visibles aux UV à 300 nm grâce au fluorescent nucléique qui s'est inséré entre les plateaux de bases de l'ARN.

### **1-4-Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)**

Le nombre de copie des ARN messagers transcrits d'un gène cible, à un temps donné, peut être déterminé indirectement par la quantification de son ADN complémentaire. Pour cela, les ADNc ont été générés par la transcription inverse, qui consiste en la

synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARNm grâce à l'ADN polymérase ARN-dépendante.

4 µg d'ARN dans 20 µl d'eau DEPC sont dénaturés par chauffage à 65°C pendant 7 min puis placée rapidement sur glace (le refroidissement progressif est à éviter). La synthèse du premier brin est effectuée avec une préparation commerciale 'kit' (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Un Eppendorf contenant le mélange suivant est préparé : 1µl du dithiothreitol (DDT), 11 µl BulkF-s cDNA RnMix et 1 µl d'amorce oligonucléotide pd(N)<sub>6</sub> (72%) ensuite l'ARN dénaturé est incorporé au mélange. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 1 heure. Une fois la réaction du premier brin d'ADN<sub>C</sub> est terminée, le produit est prêt pour une amplification q RT-PCR ou pour la synthèse du deuxième brin.

### **1-5-Amplification des ADN<sub>C</sub> par PCR**

Afin de vérifier l'intégrité des ADN<sub>C</sub> synthétisés et surtout celle des gènes d'intérêt, une amplification des produits de la transcriptase inverse a été pratiquée. Ainsi, deux gènes cibles *nos* et *gyr* ont été amplifiés. Les paires d'amorces ont été fournies par Integrated DNA Technologies (IDT, USA) avec une concentration de 100 µM. La spécificité et la description des amorces sont portées dans le **Tableau 36**. La composition du milieu de la réaction et les cycles employés sont les mêmes que ceux précédemment cités dans les **Tableaux 18 et 19** du chapitre 3.

Après amplification des séquences des gènes *nos* et *gyr*, les produits de la PCR ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose TAE à 2% avec le fluorescent nucléique. Le tampon de chargement est composé de bromophénol 0,25% (P/V), de xylène cyanol 0,25% (P/V), d'EDTA 25 mM et de glycérol 50% (V/V). La migration se fait dans un tampon TAE (Tris-HCl 1,6 mM ; acétate de sodium 1,6 mM ; EDTA 0,04 mM ; pH : 8), sous une tension de 120 volts. L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire (BioLabs<sup>TM</sup> 100 pb DNA Ladder) de 100 à 1500 paires de bases.

**Tableau 36:** spécificité et description des amorces *nos* et *gyr*.

Fonction	Gènes	Nombre (bp)	L'amorce directe	L'amorce reverse
Gène de référence	<i>gyr</i>	2457	ggacatccagacgcagtaca	ctcgggttgagcttctct
Synthèse de la thaxtomine A	<i>nos</i>	1173	gagctggtcttgaggtccctatc	cgcattgttgagatgacgggtacg

### **1-6- Extraction de l'ADN génomique de la souche EF-35**

La souche *S. scabies* EF-35 est cultivée dans le milieu TSB (30 ml) pendant 5 jours. Après centrifugation à 4000 g, les culots ont fait l'objet d'une extraction de l'ADN génomique. La méthode employée est celle de **Pospiech et Neumann, 1995**. L'ADN génomique sera amplifié en même temps que les ADNc, il servira de témoin pour les deux gènes *nos* et *gyr*.

### **1-7- Étude de l'expression du gène *nos* par la PCR quantitative en temps réel**

L'analyse de la réaction en chaîne de polymérase quantitative en temps réel (q RT-PCR) des transcrits des gènes a été menée sur le Stratagene Mx3000P avec SYBRGreen PCR master mix. Selon les recommandations de **Legault et al. (2011)**, les conditions de la PCR sont : 95°C pendant 3 minutes suivie de 35 cycles à 95 ° C pendant 15 s et 60° C pendant 45 s. Les séquences des amorces (la directe et la reverse) employées pour l'amplification des gènes *nos* (de la thaxtomine A) et *gyr* sont cités dans le **Tableau 36**. Les ADNc sont dilués 1/10 et la l'ADN polymérase employée est la Taq JumpStar DNA (Sigma-Aldrich). La composition du milieu réactionnel est portée dans le **Tableau 37**. Le gène *gyr* est couramment utilisé comme gène de référence pour le genre *Streptomyces*. Le taux de transcription de *gyr* s'est avéré uniforme dans plusieurs études (**Joshi et al., 2007, Lerat et al., 2009a; Lerat et al., 2010; Legault et al., 2011**).

### **1-8-Analyse des résultats**

Les résultats obtenus sont traités par le logiciel REST 2009 (Qiagen), avec lequel les seuils d'amplification (Ct) des deux gènes *nos* et *gyr* sont traduits en expression relative.

## **2-Effet du surnageant de *Lac1* sur la production de la thaxtomine A**

### **2-1-Production de la thaxtomine A**

Le milieu minimum amendé de subérine et de cellobiose (**Annexe 1**) est inoculé avec une pré-culture sur milieu TSB (**Annexe 1**) de la souche *Streptomyces scabies* EF-35 âgée de 48 heures. Les milieux inoculés sont incubés à 30°C pendant 1 semaine sous agitation à 200 rpm. Les traitements sont additionnés de 4µg/ml du surnageant *Lac1*. Quatre répétitions sont réalisées aussi bien pour les essais que pour le contrôle (culture exempte du surnageant de *Lac1*) (**Lauzier et al., 2002**).

**Tableau 37:** la composition du milieu réactionnel de la q RT-PCR.

Composés	Volumes ( $\mu$ l)
Eau DEPC	6
ADNc	2
Amorce directe (F) (100 $\mu$ M) (Integrated DNA Technologies)	1
Amorce reverse (R) (100 $\mu$ M) (Integrated DNA Technologies)	1
dNTP (25 mM) (Fermentas)	16
Taq Jumpstar (Sigma-Aldrich)	10
SYBR Green PCR master mix	10

## 2-2-Extraction de la thaxtomine A

Le milieu de culture inoculé est centrifugé à 4000 *g* pendant 20 minutes, ensuite les surnageants sont récoltés. Pour la détermination de la biomasse, les culots sont séchés à 55°C jusqu'à poids sec. L'extraction de la thaxtomine A est réalisée avec un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique, contenant la thaxtomine A, est concentrée puis séparée par chromatographie sur couche mince préparative (2 mm) avec le gel de 60 G comme support. La phase mobile est le chloroforme : méthanol (9 : 1). Après migration la tache jaune avec un *R<sub>f</sub>* égal à 0,27 correspondant à la thaxtomine A, a été grattée puis éluee avec un mélange méthanol : chloroforme (7 : 3) (**Beauséjour *et al.*, 1999**).

## 2-3-Quantification de la thaxtomine par HPLC

La thaxtomine A purifiée est dissoute dans l'acétonitrile grade HPLC puis filtrée à travers un filtre de 0,2 µm. Elle est ensuite quantifiée par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée en utilisant une série Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) avec la colonne: Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies). L'élution a été réalisée avec un gradient linéaire d'acétonitrile 25-75% et détectée à 249 nm avec un détecteur à barrette de diodes (DAD) (160-620 nm).

## 2-4-La courbe étalon de la thaxtomine A

Afin de réaliser la courbe étalon de la thaxtomine, des solutions avec différentes concentrations de 5 à 500 µg/ml, sont préparées dans l'acétonitrile puis filtré à travers un filtre de 0,2 µm. Ainsi, les solutions sont dosées par HPLC à 249 nm et les surfaces des pics sont déterminées. La courbe correspondant à la surface du pic en fonction de la concentration de la thaxtomine est tracée, et la pente est déterminée (**Figure 33**).

## Résultats

### 1-Extraction et dosage des ARN totaux

Les résultats de l'extraction de l'ARN et les ratios de purification sont portés dans le **Tableau 38**. Après réaction avec la désoxyribonucléase (turbo DNAase), la concentration en ARN a diminué, ce qui peut être expliqué par l'élimination des

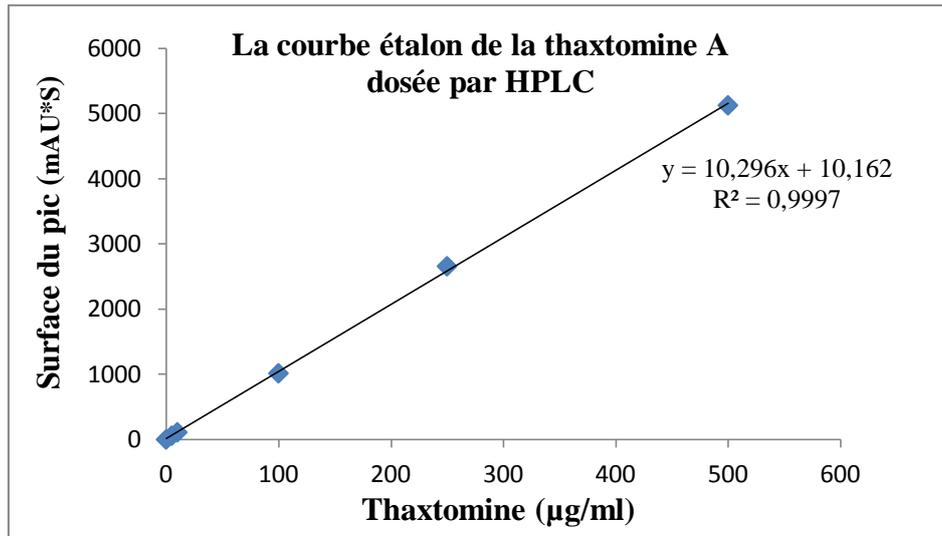


Figure 33: courbe étalon de la thaxtomine A.

Tableau 38: les résultats du dosage des ARN totaux.

	Répétitions	Temps	[ARN] ng/µl	[ARN] ng/µl après traitement avec turbo DNAase	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub>	Moyenne des 3 répétitions ng/µl
<b>Contrôles</b>	a	24h	3838,2	3320,8	1,74	2541,43
	b		2932,1	1611,1	2,03	
	c		3365,2	2692,4	1,92	
	a	48h	1093,1	1031,9	2,12	1790,63
	b		2172,2	2159,6	2,1	
	c		2747,5	2180,4	2,03	
	a	72h	1819,9	1425,6	2,1	1464,166
	b		1221,6	1201,2	2,12	
	c		1933,1	1765,7	2,05	
<b>Essais*</b>	a	24h	3840,7	3119,5	1,71	2947,73
	b		3546,1	2844	2,03	
	c		3624,8	2879,7	1,84	
	a	48h	1018,3	1003,8	2,11	1317,16
	b		1696,8	1443,1	2,09	
	c		1787,4	1504,6	2,09	
	a	72h	2315,5	1782,3	2,07	1609,56
	b		1584,3	1473,1	2,1	
	c		1821,1	1573,3	2,09	

(\*) Les cultures sont additionnées de 4 µg/ml du surnageant de la souche *Lac1*.

ADN traces d'ADN génomique contaminant. Les ratios  $Abs_{260}/Abs_{280}$  varient entre 1,84 et 2,09, ces ratios reflètent la pureté des ARN. Selon les indications du fabricant Qiagen un ARN pur est caractérisée par un ratio compris entre 1,9 à 2,1 un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou du phénol. Les quantités d'ARN extraites varient entre 1317,16 et 2541,43 ng/ $\mu$ l, ces quantités sont suffisantes pour la synthèse des ADN complémentaires. D'après les recommandations du fabricant du Kit commercial il faut au minimum 1  $\mu$ g d'ARN pour réussir la transcription inverse.

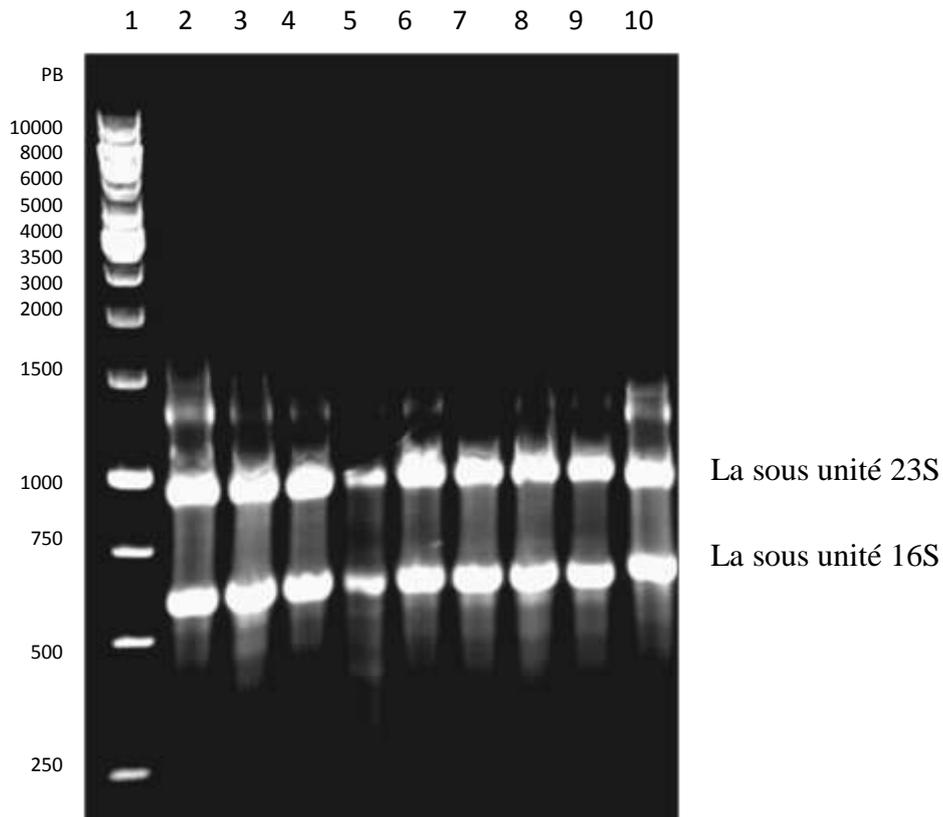
L'étude statistique des résultats du dosage des ARN par le test de Student montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les quantités d'ARN extraites à partir des contrôles est des essais ( $P = 0,9492$ ; le niveau de confiance  $\alpha = 0,05$ ). Pour ce qui est de la durée d'incubation, les quantités extraites à 24 heures sont plus importantes que celles obtenues après 48 h et 72 h ( $P = 0,0295$ ), donc à 24 heures il y a le maximum de copies d'ARN transcrits. Cependant, les quantités d'ARN extraites après 48 h et 72 h ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,9432$ ).

## **2-Électrophorèse des ARN extraits sur gel de formaldéhyde**

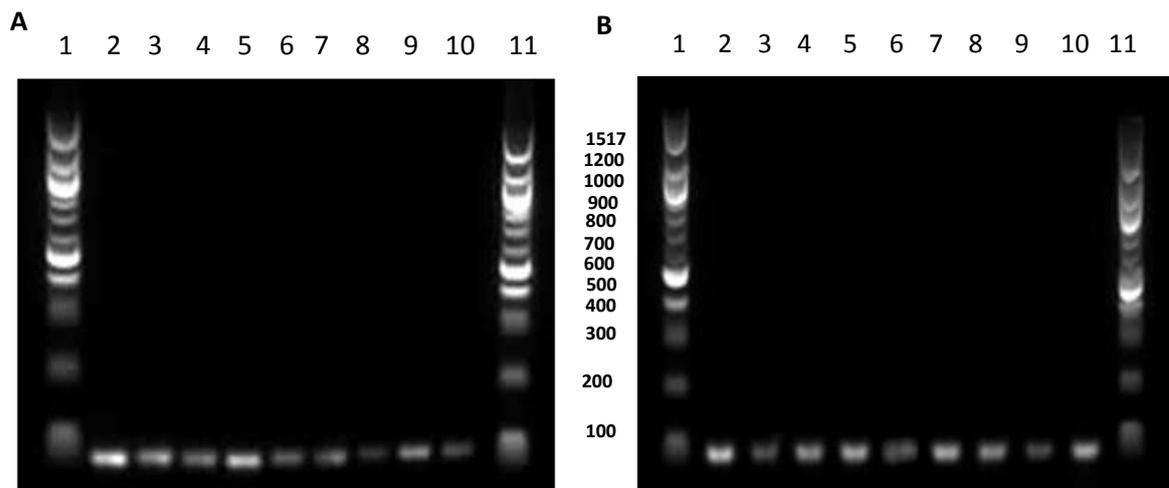
L'ARN est une macromolécule biologique très sensible aux ribonucléases (ARNase) qui sont omniprésentes dans la nature. Ainsi, l'utilisation de l'eau traitée avec le DEPC est impérative et la vérification de son intégrité est une étape importante avant de passer à q RT-PCR. La migration sur gel d'agarose contenant le formaldéhyde permet de contrôler sa qualité. L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire de 250 à 10000 paires de bases. Après migration, le gel est photographié sur table UV (ChemImager<sup>TM</sup> system 5500) (**Figure 34**). Électrophorégramme montre deux bandes correspondant aux sous unités ARN 16S et 23S, la présence des deux sous unités non dégradées reflète l'intégrité de l'ARN extrait. De ce fait, cet ARN peut servir de matrice pour la synthèse de l'ADN complémentaire.

## **3-Synthèse des ADNc et amplification par PCR**

À partir des ARN purifiés, des ADNc sont ainsi synthétisés, ils devraient être vérifiés pour leur qualité et surtout pour la présence des gènes cibles *nos* et *gyr*. L'amplification par PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 35**) confirme la présence



**Figure 34:** électrophorèse des ARN ribosomiaux de *S. scabies* EF-35 sur gel de formaldéhyde : marqueur moléculaire 10000 paires de bases (canal 1); ARN de 24 heures (canaux 1, 2, 3); ARN de 48 heures (canaux 4, 5 et 6); ARN de 72 heures (canaux 7, 8 et 9).



**Figure 35:** les produits d'amplification des 09 échantillons (A) du gène *nos* des ADNc; (B) du gène *gyr* des ADNc.

des deux gènes cibles. Par comparaison avec le marqueur moléculaire, la taille des gènes *nos* et *gyr* et au voisinage de 100 pb.

#### 4-Étude de l'expression du gène *nos* par la PCR quantitative en temps réel

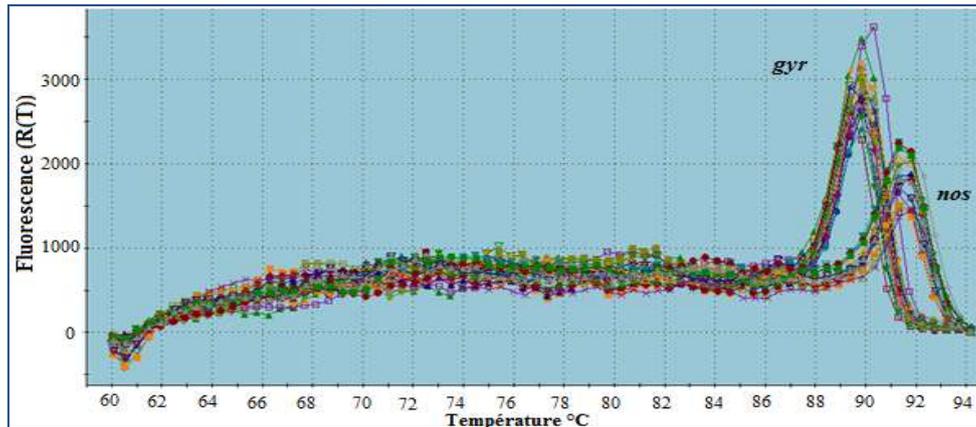
La courbe de dissociation révèle deux pics correspondant aux deux amplicons formés *nos* et *gyr* (**Figure 36**). Ce résultat montre clairement l'absence de dimères d'amorces (des amorces qui se reconnaissent entre elles pour s'hybrider et réaliser des amplicons non spécifiques). La température de dissociation  $T_m$  (la température à laquelle la moitié en quantité des amplicons formés par la réaction PCR se dissocie) est égale à 89,9°C pour le gène *gyr* et à 92°C pour le gène *nos*.

Une réaction positive de la q RT-PCR est détectée par l'accumulation d'un signal fluorescent (SyberGreen). Le  $C_t$  (seuil du cycle) est défini comme le nombre de cycles nécessaires pour que le signal de la fluorescence croise le seuil (**Figure 37**). Ces valeurs sont inversement proportionnelles à la quantité d'ADN initial, et l'incertitude sur la mesure est minimisée au maximum (en général inférieur à 5 %).

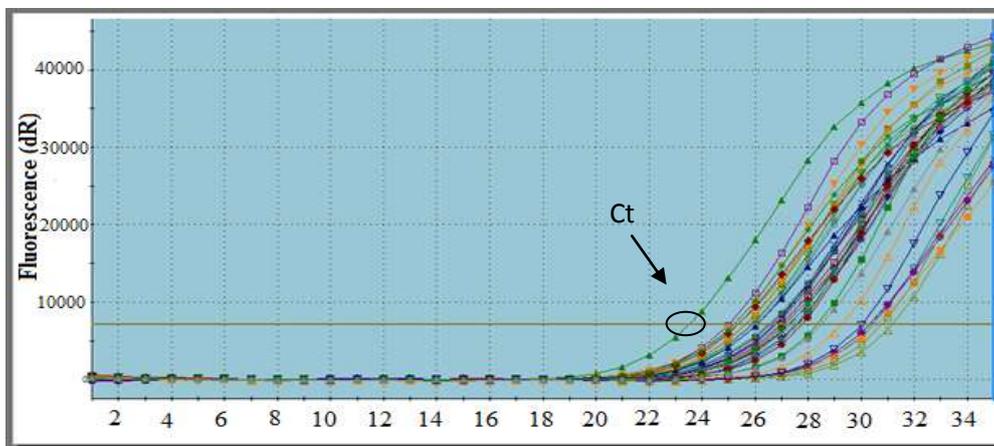
- $C_t < 29$  sont des réactions positives indiquant l'abondance de l'ADN cible dans l'échantillon
- $C_t$  varie de 30 à 37 sont des réactions positives reflétant des quantités modérées d'ADN cible
- $C_t$  varie de 38-40 sont des réactions faibles indiquant des quantités minimales d'ADN cible qui pourrait représenter une contamination de l'environnement.

Dans notre étude les valeurs des  $C_t$  obtenus après amplification par q RT-PCR sont significatives et varient entre 23,2 et 31. La valeur la plus élevée (23,2) correspondant à l'ADN génomique, les  $C_t$  d'amplification du gène référence *gyr* sont de l'ordre de 27 que ce soit pour les contrôles que pour les essais. C'est pour cette raison que le gène *gyr* ait été choisi comme gène de référence. Les  $C_t$  enregistrés dans le cas du gène cible *nos* varient de 28 et 31 (**Figure 37**).

Le traitement des résultats obtenus par le logiciel RESET (**Tableau 39, Figure 38**) montre qu'à 24, 48 et 72 heures aucune différence significative entre les contrôles et



**Figure 36:** la courbe de dissociation des amplicons des gènes *nos* et *gyr*



**Figure 37:** résultats de l'amplification par q RT-PCR.

**Tableau 39:** résultats de la q RT-PCR des gènes *nos* et *gyr*.

Gène	Type	l'efficience	Expression	Erreur standard	95% C.I.	P(H1)	Taux d'expression
<i>gyr</i> 24 h	Réf	1,0	1,581				
<i>gyr</i> 48 h	Réf	1,0	0,796				
<i>gyr</i> 72 h	Réf	1,0	0,794				
<i>nos</i> 24 h	Trg	1,0	1,215	0,867-1,668	0,703-1,717	0,292	Pas d'effet
<i>nos</i> 48 h	Trg	1,0	0,927	0,712-1,149	0,624-1,258	0,856	Pas d'effet
<i>nos</i> 72 h	Trg	1,0	1,499	1,128- 4,484	0,754-7,730	0,240	Pas d'effet

Trg : cible; Réf: référence; P(H1) probabilité de l'hypothèse alternative que la différence entre le groupe des échantillons et celui des essais est due uniquement au hasard.

les essais n'a été enregistrée. Ce qui indique l'absence d'effet du surnageant de la souche Lac1 sur le taux d'expression du gène *nos*.

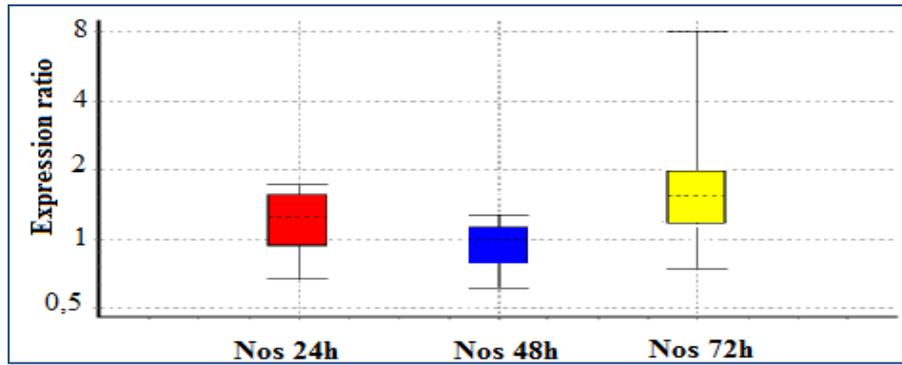
### **5-Extraction et quantification de la thaxtomine A**

Le milieu minimum enrichi avec la subérine et le cellobiose, amendé ou non avec le surnageant de la souche Lac1, a induit la production de la thaxtomine A chez la souche *Streptomyces scabies* EF-35. Après extraction de la thaxtomine A avec de l'acétate d'éthyle, des chromatographies sur couche mince analytique et préparative ont été effectuées. Le chromatogramme obtenu après migration des extraits (**Figure 39**), indique deux spots l'un des deux présentant un Rf égal à 0,27 concorde avec celui de la thaxtomine A témoin. En plus de la thaxtomine, les traitements présentent un second spot, présentant un Rf égal à 0,60, il correspond à celui de l'extrait de la souche Lac1.

L'analyse HPLC est réalisée avec la thaxtomine A comme standard, ce qui a rendu facile la détermination du pic correspondant à cette molécule parmi les pics de l'extrait analysé. D'après la phase mobile employée, la thaxtomine A est éluée à 4,90 minutes (**Figure 40 A**), son pic présente un spectre d'absorption typique de 150 à 500 nm avec un maximum à 249 nm (**Figure 41**). Le chromatogramme de l'extrait de la souche *S. scabies*, révèle un pic à 4,91 minutes qui présente le même spectre d'absorption que la thaxtomine A témoin (**Figure 40 B**).

L'observation du chromatogramme d'HPLC montre que le pic de la thaxtomine A de *S. scabies* présente la plus forte concentration (**Figure 40 B**). Ceci reflète la spécificité du milieu de culture et aussi l'efficacité des procédés d'extraction et de purification de la thaxtomine A.

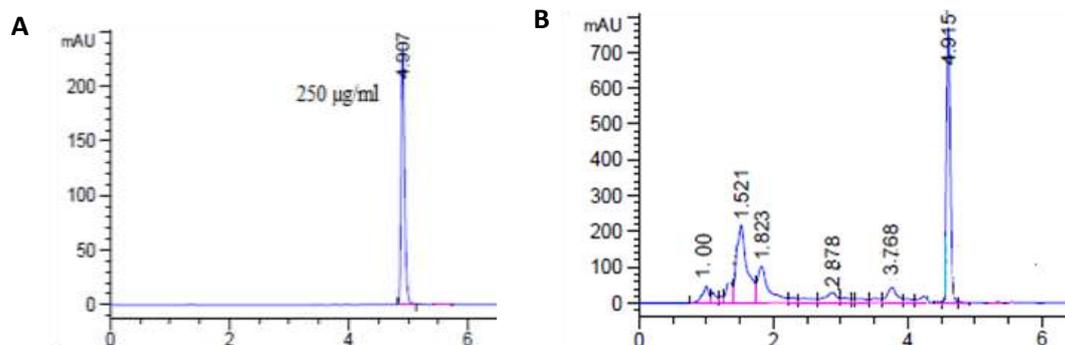
Les résultats de déterminations des poids secs ainsi que les dosages par HPLC de la thaxtomine A purifié sont portés dans le **Tableau 40**. Les quantités de la thaxtomine produite ont été déterminées grâce à la courbe étalon, la pente de la courbe est égal à 10,29. L'analyse statistique des moyennes par le test de Student à un intervalle de confiance  $\alpha = 0,05$  montre bien l'absence de différence significative ( $P = 0,1737$ ) entre les quantités de thaxtomine A en l'absence et en présence du surnageant de la souche



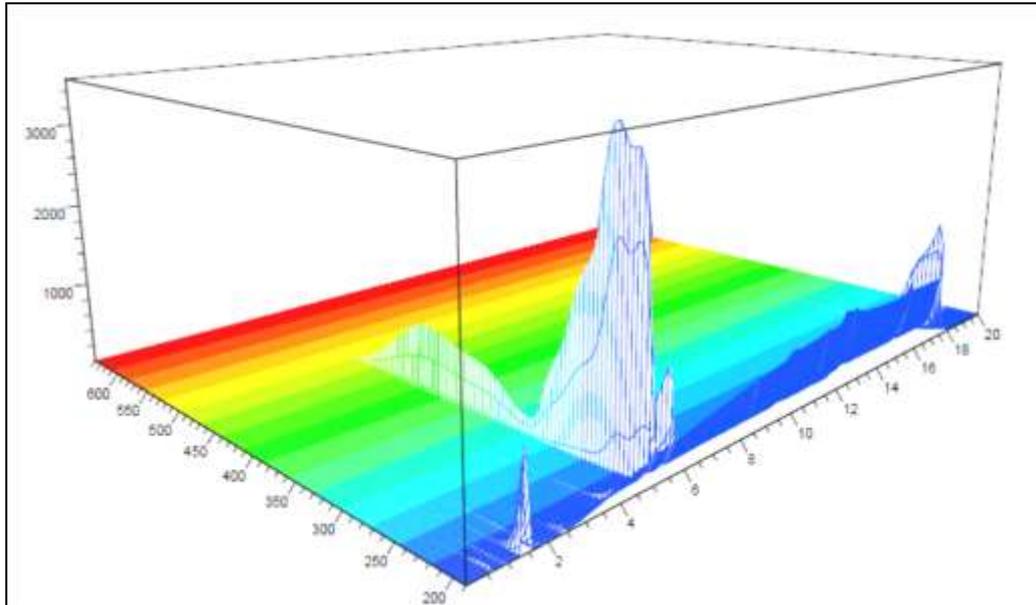
**Figure 38:** taux d'expression du gène *nos* en présence du surnageant de *Lac1*.



**Figure 39:** chromatographie sur couche mince de l'extrait de souche *S. scabies* EF-35.



**Figure 40:** chromatogramme d'HPLC (A): la thaxtomine A témoin; (B): l'extrait de la souche *S. scabies* EF-35.



**Figure 41:** spectre d'absorption caractéristique de la thaxtomine A.

**Tableau 40:** résultats du dosage de la thaxtomine A produite par *S. scabies* EF-35.

	répétitions	Surface du pic	Thaxtomine A (µg/ml)	Poids sec de la culture	Thaxtomine A (µg/mg)	Moyenne (µg/mg)	écart-type
<b>Contrôles</b>	a	4492,12	436,55	0,1623	2689,78	2543,39	248,47
	b	3481,25	338,31	0,1558	2171,46		
	c	4353,36	423,07	0,1595	2652,46		
	d	4469,48	434,35	0,1633	2659,84		
<b>Essais</b>	a	4647,96	451,70	0,1585	2849,82	2802,88	225,66
	b	4264,76	414,46	0,1628	2545,80		
	c	4929,28	479,04	0,1553	3084,58		
	d	4353,49	423,08	0,1549	2731,31		

Lac1. Ainsi, à cette concentration de 4 µg/ml, le surnageant de la souche Lac1 ne présente aucun effet sur la production de la thaxtomine A.

### Discussion

La synthèse de la thaxtomine A, exige la présence de deux gènes clés codant deux enzymes, *txtA* code pour un peptide-synthétase impliquée dans la cyclisation, tandis que *nos* code pour une oxyde nitrique synthétase impliquée dans la nitration du tryptophanyle (**Legault et al., 2011**). Dans la présente étude, le gène *nos* a été ciblé pour analyser la production de cette toxine, chez *S. scabies* EF-35, en présence et en l'absence du surnageant de la souche antagoniste Lac1.

Afin d'extraire les ARN totaux destinés à la quantification de l'expression du gène *nos*, le milieu de culture employé est un milieu minimum amendé de subérine et de cellobiose. L'emploi de ce milieu a été recommandé par **Lerat et al. (2010)** qui ont démontré que la subérine et la cellobiose sont des inducteurs pour la production de la thaxtomine A chez *Streptomyces scabies* EF-35. Nos résultats confirment ceux de **Lerat et al. (2010)**. En effet, la combinaison du milieu minimum avec la subérine et la cellobiose ont déclenché la production d'une quantité importante de thaxtomine. La quantité des ARN est maximale à 24 heures, ceci peut être dû à la synthèse protéique qui est maximale durant la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

Notre étude a indiqué que la production de la thaxtomine A par l'agent pathogène *S. scabies* EF-35 n'a pas été inhibée en présence du surnageant de la souche Lac1 à une concentration de 4 µg/ml. La quantification du taux d'expression du gène *nos* par la q RT-PCR a montré un taux d'expression pareil aussi bien en présence ou en l'absence du surnageant. Contrairement aux résultats rapportés par **Legault et al. (2011)** qui ont trouvé que dans une culture de *Streptomyces scabies* EF-35 additionnée du tryptophane entraîne une diminution significative dans l'expression du gène *nos*.

Les résultats de l'approche protéomique concorde avec ceux de la génomique car la quantification par HPLC de la thaxtomine produite par *S. scabies* EF-35 dans le milieu de culture liquide, confirme le résultat obtenu par la q RT-PCR. Aussi, les études menées par **Legault et al. (2011)** sur la régulation de la production de la thaxtomine ont été confirmées par HPLC et par q RT-PCR.

La biosynthèse de la thaxtomine est modulée par plusieurs facteurs, tels que le stade de développement des bactéries, des composés végétaux, le glucose et d'autres acides aminés aromatiques (**Babcock et al., 1993; Beauséjour et al., 1999**).

**Lauzier et al. (2002)** ont étudié l'effet des certains acides aminés sur la biosynthèse de la thaxtomine A. ils ont montré que le tryptophane avait un effet inhibiteur prononcé sur la biosynthèse de la toxine chez cinq souches de *Streptomyces scabies*. Deux autres acides aminés aromatiques (tyrosine et phénylalanine) ont également inhibé la biosynthèse de la thaxtomine, alors que les acides aminés aliphatiques n'ont pas occasionnés un déclin important dans la biosynthèse de la thaxtomine.

Un des travaux menés sur la modulation de la synthèse de la thaxtomine, celui réalisé par **Lerat et al. (2009a)**, a permis de mettre en évidence que la scopolétine (phytoaléxines) provoque une sévère diminution dans la production de thaxtomine A. Donc, la scopolétine agit par répression d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la toxine.

En plus de l'effet inhibiteur des acides aminés (tryptophane, phénylalanine) et de la scopolétine sur la production de la thaxtomine, **Babcock et al. (1993)** ont testé l'effet du glucose. Leurs résultats montrent que le milieu d'avoine additionné de 0,5% du glucose affecte négativement la production de cette toxine.

D'après les résultats du chapitre 4, la souche Lac1 s'est révélée le meilleur antagoniste aussi bien *in vitro* qu'*in planta* contre *S. scabies* EF-35. En effet, la concentration de 8 µg/ml du surnageant affecte sévèrement la croissance du pathogène, cependant la concentration permettant d'extraire de l'ARN est 4 µg/ml. Cette dernière concentration n'affecte pas la production de la thaxtomine. Il est sûr que la souche Lac1 agit par antibiose, qui est l'un des mécanismes d'action des agents de lutte biologique. Il est aussi possible que cette souche agit par production des phytohormones promotrices de croissance des plantes ou encore par production de sidérophores.

L'objectif de ce travail était de sélectionner et d'identifier de potentiels agents de lutte biologique. La première partie a été consacrée à l'isolement et l'identification de six souches fongiques pathogènes, à partir d'échantillons de plantes infestées. Ainsi, *F. culmorum* TRI-1, *F. oxysporum* CIT-4, *M. nivale* TRI-2, *D. teres* HOR-5, *B. sorkiniana* AVE-3 et *B. fabae* VIC-11, ont été isolés à partir de graines de blé dur, racines de pastèque, tiges de blé dur, feuilles d'orge, racines d'avoine et les gousses de fèves, respectivement. Ces isolats fongiques en provenance de diverses cultures et de diverses régions ont été sélectionnés à cause de leur rôle en phytopathologie.

Dans une deuxième partie, le travail que nous avons mené sur les actinomycètes isolés dans la région semi-aride à partir de différentes rhizosphères (cultures maraîchères, céréalières, d'arbres fruitier et forestier), nous a permis de mettre en évidence l'abondance des actinomycètes dans la rhizosphère et leur potentialité antifongique. En effet, 72 isolats d'actinomycètes purifiés ont été testés pour leur activité antifongique vis-à-vis les sept champignons phytopathogènes (*F. culmorum*, *F. oxysporum*, *M. nivale*, *D. teres*, *B. sorkiniana*, *B. fabae* et *V. dahliae*). Le criblage a abouti à la sélection de six isolats antagonistes ayant inhibé la croissance d'au moins six champignons parmi les sept testés. Ainsi, le screening a été orienté sur la capacité des isolats à produire les antibiotiques antifongiques et/ou la production d'enzymes lytiques (chitinase).

Une partie, importante, du travail a porté sur l'identification polyphasique des six isolats d'actinomycètes antagonistes. L'étude morphologique et culturale a permis de les classer en cinq séries (jaune, grise, blanche, verte et crème) dans le groupe des actinomycètes à croissance rapide. L'analyse des composants chimiques de la paroi, sucres et acides aminés, nous a amené à assigner les isolats aux genres *Streptomyces* et *Nocardiopsis*. L'analyse moléculaire basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S, a confirmé le résultat de la chimiotaxonomie. L'étude des caractères morphologiques, physiologiques et environnementaux ont permis l'affiliation des isolats à leurs espèces correspondantes, comme suit : *Streptomyces griseus* Lac1, *Streptomyces rochei* Lac3, *Streptomyces anulatus* Pru14, *Streptomyces champavatii* Pru16, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 et *Nocardiopsis alba* Pin10. Ce résultat reflète la

diversité des actinomycètes rhizosphériques de la région semi-aride et le potentiel antifongique des isolats *Streptomyces* et aussi non-*Streptomyces*.

L'étude du spectre d'inhibition des isolats d'actinomycètes antagonistes, a révélé qu'ils présentent en plus de l'activité antifongique une activité antibactérienne. Cette dernière a été vérifiée contre des bactéries phytopathogènes (*Erwinia* spp. *Agrobacterium tumefaciens* et *Streptomyces scabies* EF-35), contre d'autres actinomycètes et aussi contre des souches d'importance clinique.

La deuxième partie est consacrée aux tests d'antagonisme *in vitro* et *in planta* vis-à-vis de *Streptomyces scabies* EF-35 agent causal de la gale commune. L'antagonisme *in vitro* est réalisé par la technique des cylindres d'agar s'est montré positif seulement avec les souches Lac1 et Pru14. Ce qui reflète leur action d'antibiose. Cependant, les expériences *in planta* menées sur les radis, ont montré que la majorité des isolats, à l'exception de *Nocardiopsis alba* Pin10, réduisent les symptômes de la maladie (nécroses racinaires, absence des racines secondaires, etc...). Le meilleur résultat est obtenu avec la souche *S. griseus* Lac1 aussi bien *in vitro* qu'*in planta*. Malgré que, les souches *Streptomyces champavatii* Pru16, *Streptomyces griseus* Lac3 et *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 n'ont montré aucune activité *in vitro*, mais *in planta* ils se sont révélés actifs car ils ont pu diminuer les effets de l'agent pathogène. Ces trois souches semblent avoir l'avantage de stimuler la croissance des plantules de radis. Cette stimulation participe certainement dans le processus de biocontrôle (Kleopffer *et al.*, 1980). Ces souches peuvent être affiliées aux PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Il est connu que certaines de ces rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) peuvent aussi protéger les plantes contre les infections des phytopathogènes (Gamalero *et al.*, 2005).

La thaxtomine A est la molécule impliquée dans la pathogénicité chez *S. scabies*, sa biosynthèse est régulée grâce à plusieurs gènes, entre autres le gène *nos*, nécessaire à la nitration de la toxine. La souche *Streptomyces griseus* Lac1, la souche la plus efficace dans le contrôle de *S. scabies* EF-35 sur les radis, a été choisie pour tester l'effet de son surnageant (à une concentration permettant une croissance) sur l'expression du gène *nos*.

L'analyse des résultats, de l'approche génomique, a indiqué que la présence du surnageant n'affecte pas le taux l'expression de ce gène.

Les résultats de l'approche protéomique (quantification par HPLC de la thaxtomine A produite par *S. scabies* EF-35 en présence du surnageant de l'isolat Lac1) confirment ceux de la génomique. Donc en plus de l'antibiose, cet isolat antagoniste pourrait réduire les symptômes de la maladie par la stimulation de la croissance de la plante ou bien un autre mécanisme de la lutte biologique.

Ces isolats sont d'intérêt pour la lutte biologique car non seulement ils produisent des molécules antifongiques, mais ils ont tous montré des activités chitinolytiques. En outre certains d'entre eux, qui se sont révélés actifs seulement *in planta*, peuvent être rapprochés des PGPR à cause de leur effet stimulateur sur la croissance des plantes. Parmi les six isolats, deux appartiennent au genre *Nocardiopsis*. Selon **El-Tarabily et Sivasithamparam (2006b)**, *Streptomyces* sp. ont été largement étudiés en raison de leur abondance dans le sol et leur production d'antibiotiques qui présente une importance commerciale.

Des produits de lutte biologique commerciaux contenant des cellules vivantes de *Streptomyces* comme ingrédients actifs sont disponibles pour les agriculteurs (Mycostop, Actinovate et Actino-Iron) (**Tahvonen et Avikainen, 1987; Cross et Polonenko; Crawford et al., 2005**). À l'inverse, le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes par des actinomycètes non-*Streptomyces* est rarement rapporté dans la littérature (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006b**). Les membres du genre *Nocardiopsis*, obtenus dans cette étude, pourraient être de « bons » candidats.

En conclusion l'originalité de ce travail de thèse a été, d'une part, de confirmer l'intérêt des actinomycètes dans le contrôle des maladies des plantes et d'autre part, la mise en évidence de nouveaux candidats prometteurs en lutte biologique appartenant au genre *Nocardiopsis*.

En perspective des études complémentaires sont cependant nécessaires pour achever ce travail préliminaire :

- Evaluer l'efficacité de ces agents de lutte biologique potentiels sur une grande échelle (en serre puis en champ sur des pommes de terre),
- purifier les antibiotiques produits par ces isolats et déterminer leur structure,
- étudier les mécanismes d'action d'éventuelles PGPR : production de phytohormones, production de sidérophores, solubilisation du phosphate, induction du système de la résistance de la plante.

- Abd-Allah E.F. (2001).** *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. *Folia Microbiol.* **46**, 309-314.
- Abraham T.A. and Herr L.J. (1964).** Activity of actinomycetes from rhizosphere and non-rhizosphere soils of corn and soybean in four physiological tests. *Can. J. Microbiol.* **10**, 281-285.
- Acharya K., Dutta A.K. and Pradhan P. (2011).** *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Aus. J. Crop Sci.* **5(9)**, 1064-1071.
- Agrios G.N. (1988).** Plant Pathology. Academic Press, San Diego, California. 801.
- Alderman S.C., Coats D.D. and Crowe F.J. (1996).** Impact of ergot on Kentucky bluegrass grown for seed in northeastern Oregon. *Plant Dis.* **80**, 853-855.
- Alexander M. (1977).** Introduction to Soil Microbiology. Wiley, New York. 480.
- Ali M.I., Ahmed M.S. and Hozzein W.N. (2009).** WA52-A macrolide antibiotic produced by alkalophile *Nocardioopsis dassonvillei* WA52. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **3(2)**, 607-616.
- Altieri M.A. (1999).** The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agri. Ecosystems Environ.* **74**, 19-31.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Alves-Santos F.M., Cordeiro-Rodrigues L., Sayagués J.M., Martin-Domniguez R., Garcia-Benavides P., Crespo M.C., Diaz-Minguez J.M. and Eslava A.P. (2002).** Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathol.* **51**, 605-611.
- Amade P., Mallea M. and Bouaicha N. (1994).** Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsoniibainier* and Sartory. *J. Antibiot.* **47(2)**, 201-207
- Anderson A.S. and Wellington E.M.H. (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 797-814.

**Anibou M., Chait A., Zyad A., Taourirt M. and Ouhdouh Y. (2008).** Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2019-2025.

**Antoun H., Bordeleau L. M. and Gagnon C. (1980).** Identification d'un isolat d'actinomycète par la caractérisation partielle d'un antibiotique qu'il produit. *Phytoprotection.* **61**, 79-87.

**Asad S., Iftikhar S., Munir A. and Ahmad I. (2009).** Characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in Pakistan. *Pak. J. Bot.* **41(1)**, 301-308.

**Babcocke M.J., Eckwall E.C. and Schottel J. L. (1993).** Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. G. Microbiol.* **139**, 1579-1586.

**Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E. and Tillequin F. (2007).** Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 403-412.

**Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).** Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Med. Myco.* **15**, 211-219.

**Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. and Beaulieu C. (2002).** Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 49-54.

**Basil A.J., Strap J.L., Knotek-Smith H.M. and Crawford D.L. (2004).** Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 278-288.

**Bauer A.W., Kirby W.M. Sherric J.C. and Turck M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45(4)**, 493-496.

**Beauchamp C. J. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection.* **74(1)**, 19-27.

- Beauséjour J. and Beaulieu C. (2004).** Characterization of *Streptomyces scabies* mutants deficient in melanin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **50**, 705-709.
- Beauséjour J., Goyer C., Vachon J. and Beaulieu C. (1999).** Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* **45**, 764-768.
- Belabid L., Baum M., Fortas Z., Bouznad Z. and Imad-Eujayl I. (2004).** Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol.* **3**(1), 25-31.
- Bellahcene M., Fortas Z., Fernandez F. and Michel-Nicole M. (2005).** Vegetative compatibility of *Verticillium dahlia* isolated from olive trees (*Olea europea* L.) in Algeria. *Afr. J. Biotechnol.* **4**(9), 963-967.
- Benbrook C.M., Groth E., Halloran J.M., Hansen M.K. and Marquardt S. (1996).** Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers. 272
- Bencheikh M. and Setti B. (2007).** Characterization of *Streptomyces scabies* isolated from common scab lesions on potato tubers by morphological, biochemical and pathogenicity tests in Chlef region in western Algeria. *Sci. Technol. C.* **26**, 61-67.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C. and Codón A.C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **7**, 249-260.
- BeomSeok K., SurkSik M. and ByungKook H. (1999).** Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *J. Agri. Food Chem.* **47**, 3372-3380.
- Berd D. (1972).** Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **25**(4), 665-681.
- Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J antibiot.* **58**, 1- 26
- Berg G., Kurze S., Buchner A., Wellington E.M. and Smalla K. (2000).** Successful strategies for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilt. *Can. J. Microbiol.* **46**, 1128-1137
- Blackall L., Parlett J.H., Hayward A.C., Minnikin D.E., Greenfiel P.F. and Harbers A.E. (1989).** *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *J. General Microbiol.* **135**, 1547-1558.

**Bonde M.R. and McIntyre G.A. (1968).** Isolation and biology of a *Streptomyces* sp. causing potato scab in soils below pH 5.0. *Am. J. Potato Res.* **45(8)**, 273-278.

**Botton B., Breton A., Fèvre M. Gauthier S., Guy Ph., Larpent J-P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. and Veau R. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Édition Masson, Paris.

**Boudemagh A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat. Université Mentouri Constantine, Algérie.

**Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamidken H., Oulmi L., Reghioua S. et al. (2005).** Isolation and molecular identification of Actinomycetes microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Med. Myco.* **15**, 39-44.

**Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010).** Antibiotic r2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J. antibiot.* **63**, 709-711.

**Boughachiche F., Reguioua S., Zerizer H., Oulmi L., Boudemagh A., Kitouni M. and Boulahrouf A. (2005).** Production and preliminary characterization of antibiotics produced by an Actinomycetale strain isolated from Ain Mlila Saltpans (Algeria). *Antibiot.* **7**, 234-238.

**Bouhassan A., Sadiki, M. and Tivoli, B. (2004).** Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia fabae* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica* **135**, 55-62.

**Bouregghda H. and Z. Bouznad (2009).** Biological Control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **44**, 25-38.

**Bouzerzour H. and Benmahamed A. (1994).** Environmental factor limiting barley grain yield in the high plateaux of eastern Algeria. *Rachis.* **12**, 11-14.

**Bouznad Z., Porta-puglia A., Tivoli B., Kharrat M., Di Vito M., Rubiales D., Labdi M. and Meskine M. (2001).** Contraintes biotiques des légumineuses alimentaires dans le bassin méditerranéen: Etat des problèmes, principaux parasites et pertes de rendements. In: *Symposium of legumed. GrainLegumes in the mediterranean Agriculture.* IAV Hassan II, Rabat, Morocco.

**Breault J., Duval B., Parent C., Pouleur S. and Rioux S. (2009).** Maladies des céréales et stratégies de lutte. Réseau d'avertissement phytosanitaire. *Bulletin d'information : grande culture*. **11**, 1-10.

**Bressan W. (2003).** Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol*. **48**, 233-240.

**Brimmer A. and Boland G.J. (2003).** A review of the non-target effects of fungi used to biologically control of plant diseases. *Arg. Ecosyst. Environ.* **100**, 3-16.

**Bruheim P., Sletta H. and Bibbo M.J. (2002).** High-yield actinorhodin production in fed culture by a *Streptomyces lividans* strain over expressing the pathway-specific activator gene actII-ORF4. *J. Indus. Microbiol. Biotech.* **28**, 103-111.

**Burkholder R., Sun S.H., Anderson E. and Ehrlich J. (1954).** Criteria of speciation in the genus *Streptomyces*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 102-103.

**Campbell R. and Greaves M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. *In: the rhizosphere*. Lynch I. M. (Eds). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. 11-34.

**Campelo A.B. and Gil J.A. (2002).** The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU. 3570. *Microbiol.* **148**, 51-59.

**Cavalla M. and Éberlin T. (1994).** Isolement des *Streptomyces* du sol L'opéron, XIX, **4**, 13-17.

**Caveri R. and Giolliti G. (1963).** Antibiotic, flavensomycin and process of preparing it. United States Patent Office. **11**, 1-8.

**Chamberlain K. and Crawford D.L. (1999).** *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 641-646.

**Chibane B., Boutaleb A. and Lacroix M. (2010).** Geochemistry study and isotopic approach in semi-arid region: Case of the Djelfa syncline (Algeria). *Eur. J. Sci. Res.* **45(2)**, 270-290

**Chorin A.C. (2009).** Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, Toulouse, France.

- Christensen W. B. (1946).** Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J. Bacteriol.* **52(4)**, 461-466.
- Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S.J., Bult C. and Fields C. (1995).** Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 595-599.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(9)**, 4951-4959.
- Cook R.J. (1993).** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 53-80.
- Coombs J.T. and Franco C. M. M. (2003).** Isolation and Identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(9)**, 5603-5608.
- Coombs J.T., Michelsen P.P. and Franco M.M. (2004).** Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control.* **29**, 359-366.
- Cooper R., Truumees I., Gunnarsson I., Loebenberg D., Horan A., Marquez J., Patel M., Gullo V., Puar M.S., Das P. and Mittelman S. (1992).** SCH 42137, a novel antifungal antibiotic from an *Actinoplanes* sp. fermentation, isolation, structure and biological properties. *J. Antibiot.* **45**, 444-453.
- Cooper W.E. and Shilton S.J.P. (1949).** Antibiosis of *Actinomyces* strains to *Pythium arrhenomanes* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* **19**, 5.
- Copping L.G., and Menn J.J. (2000).** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manage. Sci.* **56**, 651-676.
- Corbaz R. (1990).** Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes.*
- Crawford D.L., Kowalski M., Roberts M.A., Merrell G. and Deobald L.A. (2005).** Discovery, development, and commercialization of a microbial antifungal biocontrol agent, *Streptomyces lydicus* WYEC108: history of a decade long endeavor. *Soc. Indu. Microbiol. News.* **55**, 88-95.

**Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M. and Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(11)**, 3899-3905.

**Cross J.V. and Polonenko D.R. (1996).** An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* **18**, 446-454.

**Curl E. A. and Truelove B. (1986).** The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288.

**Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. 1<sup>ère</sup> édition, INRA, Paris.

**De Ley J., Cattoir H. and Reynaerts A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**, 133-142.

**Dommergues Y. and Mangenot F. (1970).** Écologie Microbienne du sol. Masson, Paris.

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

**Driesche Van R.G. and Bellows T.S. (1996).** Biological control. Chapman and Hall. U.S.A.

**Elad Y. and Kapat A. (1999).** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 177-189.

**El-Mehalawy A.A., Hassanein N.M., Khater H.M., Karam-El-Din E.A. and Youssef Y.A. (2004).** Influence of maize root colonization by the rhizosphere Actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int. J. agric. Biol.* **6**, 599-605.

**El-Shanshoury A.R., Abu El-Sououd S.M., Awadalla O.A. and El-Bandy N.B. (1996).** Effects of *Streptomyces corchorusii*, *Streptomyces mutabilis*, pendimethalin, and metribuzin on the control of bacterial and *Fusarium* wilt of tomato. *Can. J. Bot.* **74**, 1016-1022.

**Elson M.K., Schisler D.A. and Bothast R.J. (1997).** Selection of microorganisms for biological control of silver scurf (*Helminthosporium solani*) of potato tubers. *Plant Dis.* **81**, 647-652.

- El-Tarabily K.A. (2006a).** Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-Streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* **84**, 211-222.
- El-Tarabily K.A., Soliman M.H., Nassar A.H., Al-hassani H.A., Sivasithamparam K., McKenna F. and Hardy G. E. St. J. (2000).** Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol.* **49**, 573-583.
- El-Tarabily K.A. and Sivasithamparam K. (2006b).** Non-Streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1505-1520.
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J., Sivasithamparam K., Hussain A.M. and Kurtboke D.I. (1997).** The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pythium coloratum*, by Streptomycetes and non-Streptomycetes actinomycetes. *New Phytologist*, **137**: 495-507.
- Emmert E.A.B. and Handelsman J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS. Microbiol. Lett.* **171**, 1-9.
- Errakhi R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- Errakhi R., Lebrihi A. and Barakate M. (2009).** *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. App. Microbiol.* **107**, 672-681.
- Etebarian H.R. (2006).** Evaluation of *Streptomyces* strain for biological control of charcoal stem rot of melon caused by *Macrophomina phaseolina*. *J. Plant Pathol.* **5**, 83-87.
- Ezra D., Castillo U.F. and Strobel G.A. (2004).** Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic *Monstera*. *Microbiol.* **150**, 785-793.
- Ezziyyani M., Requena M.E., Egea-Gilabert C. and Candela M.E. (2007).** Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathol.* **155**, 342-349.

- F** **Faucher E., Savard T. and Beaulieu C. (1992).** Characterization of Actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant. Pathol.* **14**, 197-202.
- Fellows H. (1926).** Relation of growth in the potato tuber to the potato scab disease. *J. Agric. Res.* **32**, 757-781.
- Fett W.F., Gerard H.C., Jones L.E., Osman S.F. and Moreau R.A. (1994).** Production of cutin-degrading enzymes by plant pathogenic bacteria. *In: Plant pathogenic bacteria.* Lamattre M., Freigoun S., Rudolph k. and Swings J.G. (Eds). 8 International Conferences, Versailles, INRA, Paris. 641-646.
- Flores M., Ford E.G. and Janda J.M. (1990).** Value of the O-Nitrophenyl-D-galactopyranoside test to differentiate among the aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **28(9)**, 2142-2144.
- Floyd M.H., Piper R.L. and Mertz F.P. (1987).** Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 235-241.
- Frankenberger W.T. and Arshad M. (1991).** Microbial production of plant growth regulating substances in soil. *In: Plant growth-promoting rhizobacteria- progress and prospects.* Keel C., Koller B. and Défago V. (Eds).
- Fravel D.R. (2005).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 337-359.
- G** **Gagné S., Antoun H. and Richard C. (1985).** Inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria from soils and legume rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **31(9)**, 856-860.
- Gamalero E., Lingua G., Tombolini R., Avidano L., Pivato B. and Berta G. (2005).** Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability. *Microbial. Ecol.* **50**, 289-297.
- Gandhimathi R., Kiran G.S., Hema T.A., Selvin J., Raviji T.R. and Shanmugapriya S. (2009).** Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge- associated marine actinomycetes *Nocardiosis alba* MSA 10. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **32**, 825-835.
- Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the Procaryotes, Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology, Second Edition .Release 5.0, Springer-Verlag, New Tork. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>.

- Gebhardt K., Schimana J., Krastel P., Dettner K., Rheinheimer J., Zeeck A. and Fiedler H.P. (2002).** Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. Part 1. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **55(9)**, 794-800.
- Gerhardson B. (2002).** Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* **20(8)**, 338-343.
- Germaine G.R. and Anderson D.L. (1966).** Binding of homologous polymerized deoxyribonucleic acid by *Streptomyces griseus*. *J. bacterial.* **92(3)**, 662-667.
- Getha K., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A. and Goodfellow M. (2005).** Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 24-32.
- Gindrat D. and Frei P. (2004).** Champignons associée aux lésions de la base des tiges du blé d'automne : variation dans l'espace et dans le temps. *Rev. Suisse Agric.* **36(2)**, 37-41.
- Gonzalez J.M. and Saiz-Jimenez C. (2005).** A simple fluorimetric method for the estimation of DNA–DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. *Extremophiles.* **9**, 75-79.
- Goodfellow M. and Cross T. (1984).** Classification *In: The Biology of Actinomycetes.* Goodfellow M.M., Williams S.T. (Eds). Academic Press, London. 7-164.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189-216.
- Gordon R.E. and Barnett D.A. (1977).** Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 176-178.
- Gordon R.E. and Smith M.M. (1953).** Rapidly growing acid fast bacteria: species description of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* **66**, 41-48.
- Goyer C. and Beaulieu C. (1997).** Host range of *Streptomyces* causing common scab. *Plant Dis.* **81**, 901-904.
- Goyer C., Faucher E. and Beaulieu C. (1996).** *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 635-639.

**Goyer C., Vachon J. and Beaulieu C. (1998).** Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopatol.* **88**, 442-445.

**Grayston S., Wang S., Campbell C.D. and Edwards A.C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Bio. Biochem.* **30**, 369-378.

**Gundliffe E. (2006).** Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 500-506.

**Güssow H.T. (1914).** The systematic position of the organism of the common potato scab. *Sci.* **39**, 431-432.

**Hacène H., Boudjellal F. and Lefebvre G. (1998).** AH7, a non-polyenic antifungal antibiotic produced by a new strain of *Streptosporanium roseum*. *Microbios.* **96**, 103-109.

**Hacène H., Kebir K., Othmane D.S. and Lefebvre G. (1994).** HM17, a new polyene antifungal antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 484-489.

**Hacène H., Daoudi-Hamdad F., Bhatnagar T., Baratti J.C. and Lefebvre G. (2000).** H107, a new aminoglycoside anti-*Pseudomonas* antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. *Microbios.* **102**, 69-77.

**Hale V., McGeew M., Carlson B. and Schottel J.L. (1992).** Heterologous expression and secretion of a *Streptomyces scabies* esterase in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 2431-2439.

**Hamedi J., Mohammadipanah F., Von-Jan M., Pötter G., Schumann P., Spröer C. et al. (2010).** *Nocardiosis sinuspersici* sp. nov., isolated from Sandy rhizospheric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2346-2352.

**Hayakawa M., Yoshida Y. and Iimura Y. (2004).** Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces Violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 973-981.

**Hayashida S., Choi M.Y., Nanri N. and Miyaguchi M. (1988).** Production of potato common scab-antagonistic biofertilizer from swine feces with *Streptomyces albidoflavus*. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 349-354.

- Healy F.G., Wach M., Krasnoff S.B., Gibson D.M. and Loria R. (2000).** The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38**, 794-804.
- Healy F.G., Krasnoff S.B., Wach M., Gibson D.M. and Loria R. (2002).** Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* **184**, 2019-2029.
- Hegde V.R., Patel M.G., Horan A.C., King A.H., Gentile F., Puar M.S. and Loebenberg D. (1998).** A novel macrolactam-trisaccharide antifungal antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical properties, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* **51**, 464-470.
- Helluy S. and Holmes J.C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. *Behav. Processes.* **68**, 185-99.
- Heuer H., Kserk M., Baker P., Smalla K. and Wellington E.M.H. (1997).** Analysis of Actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.
- Holt J.D., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staly J.T. and Williams S.T. (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> edition. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Hopwood D.A., Lydiate D.J., Malpartida F. and Wright H.M. (1985).** Conjugative sex plasmids of *Streptomyces*. **30**, 615-634.
- Horinouchi S. and Beppu T. (1994).** A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **12**, 859-864.
- Hosny A., El-Dein M.S., El-Shayeb N.A., Abood A. and Abdel-Fattah A.M. (2010).** A potent chitinolytic activity of marine actinomycete and enzymatic production of chitooligosaccharides. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **4(4)**, 615-623.
- Hoster F., Schmitz J.E. and Daniel R. (2005).** Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 434-442.

**Howell C.R. and Stipanovic R.D. (1980).** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluterin. *Phytopathol.* **70**, 712-715.

**Hsu S.C. and Lockwood J.L. (1975).** Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29**, 422-426.

**Igarashi Y., Takagi K., Kajiura T., Furumai T. and Oki T. (1998).** Glucosylquestiomycin, a novel antibiotic from *Microbispora* sp. TPA0184: fermentation, isolation, structure determination, synthesis and biological activities. *J. Antibiot.* **51**, 915-920

**Inglis D.A. and Cook R. (1981).** *Calonectaria nivalis* causes scab in the pacific north-west. *Plant Dis.* **65**, 923-924.

**Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, *In* : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

**Jimenez-Esquilin T.M. and Roane A.E. (2005).** Antifungal activities of actinomycetes strains associated with high altitude sagebrush rhizosphere. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 378-381.

**Joo G.J. (2005).** Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1483-1486.

**Joshi M.V., Bignell D.R.D., Johnson E.G., Sparks J. P., Gibson D.M., and Loria R. (2007).** The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* **66**, 633-642.

**Kalakoutskii L.V. and Agre N.S. (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40 (2)**, 469-524.

**Kempe J. and Sequeira L. (1983).** Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Dis.* **67**, 499-501.

**Kennedy A.C. (1999).** Bacterial diversity in agroecosystems agriculture. *Ecosys. Environ.* **74**, 65-76.

**Kers A., Cameron K.D, Joshi M.V., Bukhalid R.A., Morello J.E., Wach M.J., Gibson D.M. and Loria R. (2005).** A large mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species Johan. *Mol. Microbiol.* **55** (4), 1025-1033.

**Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R. and Loria R. (2004).** Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature.* **429**, 79-82.

**Keulen G.V., Jonkers H.M., Closson D. and Woston H.A.B. (2003).** Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185**(4), 1455-1458.

**Khamna S., Yokot A. and Lumyong S. (2009).** Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 649-655.

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

**Kim D.W., Chater K., Lee K.J. and Hesketh D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187**(9), 2957-2966.

**Kim B.S. and Hwang B. (2007).** Microbial fungicides in the control of plant diseases. *J. Phytopathol.* **155**, 641-653.

**Kimura M. (1980).** A simple method for estimation evolutionary rate of bases substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.

**King R.R., Lawrence C.H. and Calhoun L.A. (1992).** Chemistry of phytotoxines associated with *Streptomyces scabies*, the causal organisms of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 834-837.

**King R.R., Lawrence C.H. and Clark M.C. (1991).** Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *Am. Potato J.* **68**(10), 675-680.

**King R.R., Lawrence C.H., Clark M.C. and Calhoun L.A. (1989).** Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J. Chem. Soc.* **13**, 849-850.

**King R.R. and Lawrence C.H. (1996).** Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1108-1110.

**Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H. et al. (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Med. Myco.* **15**, 45-51.

**Kleopfer J.L., Leong J., Teintze M. and Schroth M.N. (1980).** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* **286**: 885-886.

**Kloepper J.W., Lifchitz R. and Zablotowicz R.M. (1989).** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**, 39-44.

**Koch E. and Löffler I. (2009).** Practical characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *J. Phytopathol.* **157**, 235-242.

**Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S. and Kogel K-H. (2002).** *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant Pathol.* **3(4)**, 185-195.

**Kuster K. (1979).** The concept of gens and species within the *Actinomycetales* in *Nocardia* and *Streptomyces*. *Gutar fisher Verglas.* 21-25

**Kutzner H.J. (1981).** The family *Streptomycetaceae*. In: *The Prokaryotes*. Starr M. P., Stolp H., Trüper H. G., Balows A. and Schlegel H. G. (Eds). A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Vol. 2. Springer Verlag, Berlin. 2028- 2090.

**L**abeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinozynnzmataceae* fam. nov. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 331-336.

**Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* **4**, 113-121.

**Lambert D.H. and Loria R. (1989).** *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** :387-392.

- Larbi M. (1991).** Chickpea in Algeria. *Options Méditerranéennes-Série Séminaires*. **9**, 137-140.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Cenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. et al. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**, 2947-2948.
- Larkin R.B., Hopkins D.L. and Martin F.N. (1996).** Suppression of *Fusarium* Wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathol.* **86(8)**, 812-819.
- Larpent J-P. and Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris. 481.
- Larpent J-P. and Larpent-Gourgaud M. (1985).** Eléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264.
- Lauzier A., Goyer C., Ruest L., Brzezinski R., Crawford D.L. and Beaulieu C. (2002).** Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. *Can. J. Microbiol.* **48**, 359-364.
- Lebuhn M., Heulin T. and Hartmann A. (1997).** Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 325-334.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435-443.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1980).** The chimiotaxonoy of actinomycetes. *In: actinomycetes taxonomy, special publication 6.* Arlington, VA: Society for Industrial Microbiolgy. 227-291.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* *In: Biology of industrial microorganisms.* The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 315-316.
- Legault S.G., Lerat S., Nicolas P. and Beaulieu C. (2011).** Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathol.* **101(9)**, 1045-1051.

**Lehtonen M.J., Rantala H., Kreuze J.F., Bang H., Kuisma L., Koski P., Virtonen E., Vihlman K. and Valkonen J.P.T. (2004).** Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant pathol.* **53**, 280-287.

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

**Lerat S., Babana A.H., El Oirdi M., El Hadrami A., Daayf F., Beaudoin N., Bouarab K. and Beaulieu C. (2009a).** *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Rep.* **28**, 1895-1903.

**Lerat S., Simao-Beaunoir A.-M., and Beaulieu C. (2009b).** Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 579-585.

**Lerat S., Simao-Beaunoir A.-M., Wu R., Beaudoin N. and Beaulieu C. (2010).** Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathol.* **100**, 91-96.

**Lesuffleur F. (2007).** Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Thèse de doctorat. Institut de biologie fondamentale et appliquée (IBFA). Université de CAEN, France.

**Liu D., Anderson N.A. and Kinkel L. (1995).** Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathol.* **85**, 827-831.

**Liu Z., Shi Y., Zhang Y., Zhou Z., Lu Z., Li W. et al. (2005).** Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of *Microstreptospora cinerea* to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1605-1610.

**Locci R. (1994a).** *Streptomyces* and related genera. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins. Baltimore. 2451-2492.

**Locci R. (1994b).** Actinomycetes as plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**, 179-200.

**Loos R. (2001).** Les *Fusarium* et les *Microdochium* sur grains de céréales en France. *Phytophoma, la défense des végétaux.* **539**, 52-55.

**Loper J.E. and Henkels M.D. (1999).** Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 5357-5363.

**Loqman S., Ait-Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. (2009).** Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 81-91.

**Loria R., Bignell D.R.D., Moll S., Huguet-Tapia J.C., Joshi M.V., Johnson E.G., Seipke R.F. and Gibson D.M. (2008).** Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie van Leeuw.* **94**, 3-10.

**Loria R., Bukhalid R.A. and Fry B.A. (1997).** Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Agri. Agri-Food Canada, Fredericton.* **81**, 3336-3846.

**Mahadevan B. and Crawford D.L. (1997).** Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbil. Tech.* **20**, 489-493.

**Maiese W.M., Korshalla J., Goodman J., Torrey M.J., Kantor S., Labeda D.P. and Greenstein M. (1990).** Simaomicin (LL-D42067), a novel antibiotic from *Actinomadura madurae*. I Taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot.* **43**, 1059-1063.

**Mao W., Lewis A., Lumsden R.D. and Hebbar K.P. (1998).** Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* **17**, 535-542.

**Mariat F. and Sebald M. (1990).** Actinomycètes. *In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2<sup>ème</sup> édition, Flammarion. Paris. 935-949.*

**Matsui T., Kumasaka T., Endo K., Sato T., Nakamura S. and Tanaka N. (2004).** Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of chitinase F1 (ChiF1) from the alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. strain F96. *Acta. Christ. D.* **60**, 2016-2018.

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

**McKenna F., El-Tarabili K.A., Petrie S. and Dell B. (2002).** Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 107-112.

**Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F. and Lafon R. (1991).** Les maladies des plantes maraîchères. INRAA, Paris.

- Meyer J. (1976).** *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 487-493.
- Meyer J. (1989).** Genus *Nocardiopsis*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams S. T., Sharpe M. E. and Holt J. G. (Eds). The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 2562-2568.
- Meyer J. (1994).** The Genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9<sup>ème</sup> Ed. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. and Williams S. T. (Eds). Baltimore, Williams & Wilkins. 2562-2568.
- Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A. and Fenical W. (2002).** Widespread and persistent population of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments. *Appl. Env. Microbiol.* **68(10)**, 5005-5011.
- Miyadoh S. (1993).** Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *Actinomycetol.* **7**, 100-106.
- Miyadoh S. Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002).** Digital atlas of actinomycetes. ([Http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas](http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas)). Tokyo: The Society for Actinomycetes , Japan.
- Miyashita K., Fujii T. and Sawada Y. (1991).** Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2065-2072.
- Miyashita K., Mikami Y. and Arai T. (1984).** Alkalophilic actinomycetes isolate, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *prasina* subsp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 405-409.
- Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V. Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** Characteristics of actinomycetes from Antarctica. *J. Cult. Collect.* **3**, 3-14.
- Mohamed Z.K. (1982).** Physiological and antagonistic activities of Streptomycetes in rhizosphere of some plants. *Egypt. J. Phytopathol.* **14**, 121-128.
- Monciardini P., Sosio M., Cavaletti L., Chiocchini C. and Donadio S. (2002).** New PCR primers for the Selective amplification of 16S DNA from different groups of Actinomycetes. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **42**, 419- 429.
- Mukherjee P.K., Nautiyal C.S. and Mukhopadhyay A.N. (2008).** Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. *Soil Biol.* **15 (2)**, 243-262.

**Murray R.G.E., Brenner D.J., Holt J.G., Krieg N.R., Mulder J.W., Pfenning N., Sneath P.H., Stoley J.T. and Williams S.T. (1989).** In Bergry's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Eds. 4, 2333-2648.

**N**asraoui B. and Lepoivre R. (2003). Les champignons phytopathogènes. *In* : *Phytopathol.* Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

**Nautiyal C.S. (2000).** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. *In*: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture. Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. 9-23.

**Nguyen M.T. (2007).** Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - Étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat université de Toulouse. France.

**O**'Donnel A.G. (1988). Recognition of novel actinomycetes. *In*: Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M. Williams S.T. and Mordarski M. (Eds), Academic Press. London.

**Okami Y. (1956).** A study for classification of *Streptomyces*. On the *S. lavendulae* group, with reference to its immunological properties. *J. G. Microbiol.* 2, 63.

**Okami Y. and Hotta K. (1988).** Search and discovery of new antibiotics. *In*: Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M.G., Williams S.T. and Modarski M. (Eds). Academic Press London, New-York. 33-68.

**Orakci G.E., Yamaç M., Amoroso M.J and Cuzzo S.A. (2010).** Selection of antagonistic actinomycete isolates as biocontrol agents against root-rot fungi. *Fresenius. Environ. Bul.* 19(3), 417-424.

**Oskay M., Tamer A.Ü. and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. Biotechnol.* 3(9), 441-446.

**O'Sullivan D.J. and O'gara F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56, 662-676.

- Pakowska E. (2002).** The role of rhizosphere antagonistic microorganisms in limiting the infection of underground parts of spring. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture*. Vol.5.
- Palleroni N.J. (1989).** Genus *Actinoplanes*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds), Williams and Wilkins, Baltimore. 2419-2428.
- Pamboukian C.R.D., Guimarães L.M. and Facciotti M.C.R. (2002).** Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz. J. Microbiol.* **33(1)**, 17-21.
- Paradis E., Goyer C., Hodge N.C., Hoge R., Stall R.E. and Beaulieu C. (1994).** Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in Eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 561-564.
- Paradkar V.R., Gupte T.E., Joshi A.P. and Naik S.R. (1998).** A novel *Streptoverticillium cinnamoneum* var. *scleroticum* producing a polyene antibiotic. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 705-709.
- Patel M., Conover M., Horan A., Loebenberg D., Marquez J., Mierzwa R., Puar M.S., Yarborough R. and Waitz J.A. (1988).** SCH 31828, a novel antibiotic from a *Microbispora* sp.: taxonomy, fermentation and biological properties. *J. Antibiot.* **41**, 794-797.
- Paul R. and Impens P. (2003).** Les maladies non parasitaires. In : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Pawlowski K. and Sirrenberg A. (2003).** Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 1165-83.
- Peela S., Bapiraju-Kurada V.V.S.N. and Terli R. (2005)** Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 583-585.
- Pospiech A. and Neuman B. (1995).** A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends. Gent.* **11**, 217-218.
- Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S. (2008).** Antifungal potential of extracellular metabolite produces by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 330-337.

**Punja Z.K. and Utkhede R. (2003).** Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotech.* **21**, 400-407.

**Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuw.* **81**, 537-547.

**Rao U.K. and Narasimha Rao P.L. (1967).** Actinomycetes. II. Purification and pharmacological properties of champamycin-B from *Streptomyces champavatii*. *Indian J. Exp. Biol.* **5(1)**, 39-42.

**Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Oulmi L., Kitouni M., Boudemagh A. and Boulahrouf A. (2006).** Antibacterial activity of rare actinomycetes isolated from arid soil samples of the south-east of Algeria. *Antibiot.* **8(3)**, 147-152.

**Rémi C. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.

**Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(10)**, 3807-3812.

**Rintala H., Nevalainen A., Ronka E. and Sutari M. (2001).** PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of Streptomyces. Molecular and cellular probes **15(6)**, 337-347.

**Rosello-Mora R. and Amann R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 36-67.

**Rueda B., Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. (2001).** Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **47**, 1042-1047.

**Rugthaworn P., Dilokkunanant U., Sangchote S., Piadang N. and Kitpreechavanich V. (2007).** Search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens. *Kasetsart. J. (Nat. Sci.)*. **41**, 248-254.

**Ryan A.D. and Kinkel L.L. (1997).** Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biological Control of potato scab. *Biol. Control.* **10**, 180-186.

- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. et al. (1998).** Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9**, 147-153.
- Sabaou N., Bounaga N. and Bounaga D. (1983).** Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et autres formae speciales. *Can. J. Microbiol.* **29**, 194-199.
- Sabaratnam S. and Traquair J.A. (2002).** Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control.* **23**, 245-253.
- Saitou N. and Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **63**, 406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
- Sanglier J.J. and Trujiollo M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12(13)**, 269-276.
- Sardi P., Saracchi M., Petrolini B., Borgonovi G.E. and Merli S. (1992).** Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl. Env. Microbiol.* **58(8)**, 2691-2693.
- Saubolle M.A. and Sussland D. (2003).** Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4497-4501.
- Sawada Y., Hatori M., Yamamoto H., Nishio M., Miyaki T. and Oki T. (1990).** New antifungal antibiotics pradimicins FA-1 and FA-2: D-serine analogs of pradimicins A and C. *J. Antibiot.* **43**, 1223-1229.
- Schumacher R.W., Harrigan B.L. and Davidson B.S. (2001).** Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycetes. *Tetrahedron Lett.* **42**, 5133-5135.
- Seitz L.M., Sauer D.B., Mohr H.E. and Aldis D.F. (1982).** Fungal growth and dry matter loss duringbin storage of high-moisture corn. *Cereal Chem.* **59**, 9-14.
- Selvin J., Shanmughapriya S., Gandhimathi R., Seghal-Kiran G., Rajeetha Ravji T., Natarajaseenivasan K. and Hema T.A. (2009).** Optimization and production of

novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 435-445.

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

**Sessitsch A., Reiter B. and Berg G. (2004).** Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* **50**, 239-249.

**Sheikova G. and Georgieva J. (1962).** Actinomycetes-antagonists isolated from Bulgarian soils. *Folia. Microbiol.* **8(5)**, 308-312.

**Shirling E.B. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of *Streptomyces*: V. Additional descriptions. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **22(4)**, 265-394.

**Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **16(3)**, 313-340.

**Shirling E.B. and Gottlieb D. (1968).** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. Syst. Bacteriol.* **18(4)**, 279-392.

**Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., Inouye S. and Niida T. (1979).** Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF 1993. *J. Antibiot.* **32**, 425-427.

**Singh A., Mehta S., Singh H.B. and Nautiyal C.S. (2003).** Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Cur. Microbiol.* **47**, 153-158

**Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S. and Chung Y.R. (1999).** Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathol.* **89(1)**, 92-99.

**Sirry A.R., Salem S.H., Zayed M.A. and Anwar D. (1981).** Rhizosphere microflora of some plants infected with root-rot disease and their activities on antagonizing the main pathogen. *Egypt. J. Microbiol.* **16**, 65-78.

**Soares A.C.F., Sousa C.D.S, Garrido M.D.S, Perez J.O. and Santos de Almeida N. (2006).** Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Braz. J. Microbiol.* **37(4)**, 456-461.

**Song J., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Go S.G. and Suh J.W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinimycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 97-102.

**Soufiane B. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec.

**Sprusansky O., Zhou L., Jordan S., White J. and Westpheling J. (2003).** Identification of a new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185(20)**, 6147-6157.

**Stackebrandt E. and Schumann P. (2000).** Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacocaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder *Micromcoccineae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**, 1279-1285.

**Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.

**Staneck J.L. and Roberts G.D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**, 226-231.

**Sun H., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Glavina Del Rio1 T., Tice H., Cheng J-F., Tapia R. et al. (2010)** Complete genome sequence of *Nocardiopsis dassonvillei* type strain (IMRU 509T). *Standards Gen. Sci.* **3**, 325-336.

**Sutherland E.D. and Lockwood J.L., (1984).** Hyperparasitism of oospores of some *Peronosporales* by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Can. J. Plant Pathol.* **6**, 139-145.

**Tahvonen R.T. and Avikainen H. (1987).** The biological control of seedborne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agr. Sci. Finland.* **59**, 199-208.

**Takahashi Y. and Omura S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Appl. Microbiol.* **49**, 141-154.

**Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.

**Tashiro N., Miyashita K. and Suzui T. (1990).** Taxonomie studies on the *Streptomyces* species, isolated as causal organisms of potato common scab. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* **56**, 73-82.

**Thaxer R. (1892)** the potato scab. *Conn. Agric. Exp.* **1891**, 153-160.

**Thirupl L., Johsen K. and Winding A. (2001).** Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. and *Actinomycetes* on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens DR54* and the fungicide imazalil. *Appl. Env. Microbiol.* **67(3)**, 1147-1153.

**Thomashow L.S., Bonsall R.F. and Weller D.M. (1997).** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: Manual of environmental microbiology. Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. and Walter M.V. (Eds). ASM Press, Washington. 493-499.

**Thompson C.J., Fink D. and Nguyen L.D. (2002).** Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Gen. Biol.* **3(7)**, 10201-10204.

**Ting A.S.Y., Tan S.H. and Wai M.K. (2009).** Isolation and characterization of *Actinobacteria* with antibacterial activity from soil and rhizosphere soil. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **3(4)**, 4053-4059.

**Toussaint V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

**Trejo-Estrada S.R., Paszczynski A. and Crawford D.L. (1998).** Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 81-90.

**Tresner H.D., Hayes J.S. and Backus E.J. (1968).** Differential tolerance of Streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* **16**, 1134-1136.

**Tshen J.S.M. (1985).** Biological control of plant Diseases by Microorganisms. *Chinese Bioscience.* **26**, 33-39.

**Tsujibo H., Kubota T., Yamamoto M., Miyamoto K. and Inamori Y. (2003).** Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis prasina* OPC-131. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2), 894-900.

**Tu J.C. (1988).** Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. phytopathol.* **121**, 97-102.

**Vachon J. (1999).** Construction d'une banque génomique de *Streptomyces scabies* EF-35: identification de clones impliqués dans le pouvoir pathogène. Mémoire de maîtrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

**Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Déry C., Brzezinski R. and Beaulieu C. (1996).** Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(5), 1630-1635.

**Valueva T.A. and Mosolov V.V. (2004).** Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* **69**, 1305-1309.

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. and Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.

**Van-Der-Vossen H.A.M., Denton O.A. and El-Tahir I.M. (2004).** *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. In: Fiche de Protabase. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa) Grubben G.J.H. and Denton O.A. (Eds). Wageningen, Pays Bas.

**Veyssier P. (1979).** Actinomycose-nocardioses. In: Encyclopédie médico-chirurgicale. Elsevier, Paris. 8123.

**Vijigenboom E. and Keijser B.J.F. (2001).** Copper and the morphological development of *Streptomyces*. In: hand book of copper pharmacology and toxicology. Massaro E. (Eds). Humana Press. 503-525.

**Waksman S.A. and Henrichi, A.T. (1948).** *Actinomycetaceae* Buchanan and family *Streptomycetaceae* Waksman and Henrichi. In: Breed R.S., Murray E.G.O. and Hitchens H.P. (Eds.) Bergers manual of determinative microbiology, 6th ed. The William & Wilkins Co, Baltimore. 892-980.

**Wanner L.A. (2006).** A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathol.* **96**, 1363-1371.

- Watson E.T. and Williams S.T. (1974).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 43-52.
- Weikert-Oliveira R.C.B., Resende M.A., Valério H.M., Caligiorne R.B. and Paiva E. (2002).** Genetic variation among pathogens causing *Helminthosporium* diseases of rice, maize and wheat. *Fitopatol. Bras.* **27**, 639-643.
- Weller D.M. (1988).** Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**, 379-407.
- Wellington E.M.H., Al-Jawadi M. and Bandoni R. (1987).** Selective isolation of *Streptomyces* species-groups from soil. *Devel. Indust. Microbiol.* **28**, 99-104.
- Werner G. and Hagenmaier H. (1984).** Metabolism product of microorganisms. 2241 Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiot.* **2**, 110-117.
- Westover K.M., Kennedy A.C. and Kelley S.E. (1997).** Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *J. Ecol.* **85**, 563-873.
- Whiffen A., Bohonqs J.N. and Emerson R.L. (1946).** The production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* **52**, 610-611.
- Whipps J. M. (1990).** Carbon economy in the rhizosphere. In: Ecological and applied microbiology. Lynch J.M. (Eds). Wiley Series. 59-97.
- Whipps J.W. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**, 487-511.
- Williams S.T. (1967).** Sensitivity of Streptomyces to antibiotics as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* **46**, 151-160.
- Williams S.T. and Cross T. (1971).** Actinomycetes In: Method in microbiology. Booth C. (Eds). Vol 4, Academic Press, London. 295-334.
- Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H.A. and Sackin M.J. (1983b).** A probability matrix for identification of some Streptomyces. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1815-1830.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A. and Sackin M.J. (1983a).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.

**Williams, S.T. and Wellington, E.M.H. (1982).** Actinomycetes. *In: Methods of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties, second ed.* Page A.L., Miller R.H. and Keency O.R. (Eds). American society of agronomy/Soil science society of America, Madison. 967-987.

**Wink J.M. (2001).** Compendium of Actinobacteria [online]. Available from: [http://www.gbif-prokarya.de/microorganisms/wink\\_pdf/DSM41454.pdf](http://www.gbif-prokarya.de/microorganisms/wink_pdf/DSM41454.pdf).

**Wu X.C., Chen W.F., Qian C.D., Li P. O. and Wen Y.P. (2007).** Isolation and Identification of newly isolated antagonistic *Streptomyces* sp. strain AP19-2 producing Chromomycins. **45(6)**, 499-504.

**Xiao K., Kinkel L.L. and Samac D.A. (2002).** Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol. Control*. **23**, 285-295.

**Yassin A.F., Rainey F.A., Burghardt J., Gierth D., Un-Gerechts J., Lux I. et al. (1997).** Description of *Nocardiopsis synnematafomans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 983-988.

**Yilmaz E.I., Yavuz M. and Kizil M. (2008).** Molecular characteriazation of rhizospheric soil Streptomycetes isolated from indigenous plans and their antimicrobial activity. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1461-1470.

**Yuan W.M. and Crawford D.L. (1995).** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 3119-3128.

**Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Peer-reviewe, J. AWWA*, **95 (2)**, 113-118.

**Zehhar G., Ouzzani Touhami A., Badoc A. and Douira A. (2006).** Effet des *Fusarium* des eaux de rizière sur la germination et la croissance des plantules de riz. *Bull. Soc, Pharm. Bordeaux*. **145**, 7-18.

**Zitouni A., Bennadji H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.* **156**, 984-993.

**Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004a).** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103, I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. antibiot.* **57**, 367-372.

**Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D. P. (2004b).** *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **54**, 1377-1381.

**Annexe 1 : milieux de cultures et solutions****ISP1**

Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7- 7,2

**ISP2 (YMEA)**

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

**ISP3**

Solution d'avoine*	1000 ml
Solution d'oligo- éléments**	1 ml
Agar	18 g

pH = 7,2

**ISP4**

Amidon soluble	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0 – 7,4

**ISP5**

Asparagine	1 g
Glycérol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solution d'oligo-éléments**	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,4

**ISP6**

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sodium thiosulfate	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 – 7,2	

**ISP 7**

Glycérol	15 g
L-tyrosine	0,5 g
L-asparagine	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 – 7,4	

**ISP9**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,38 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,65 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 g
Solution d'oligo-éléments***	1 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0	

**Bouillon nutritif**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2	

**Amidon-Caséine**

Amidon soluble	10 g
Caséine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0-7,5

**Milieu S**

CaNO <sub>3</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,125 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125 g
Extrait de malt	1 g
Saccharose	5 g
Acide citrique	0,05 g
Agar	25 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,5

**YMEA + CaCO<sub>3</sub>**

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

**MB (source d'azote)**

Glucose	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub>	0,001 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

**BMA (Bennett modifié)**

Glycérol	10 g
Extrait de levure	1 g
NZ amine (caséine digest)	2 g
Extrait de viande	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

**Muller Hilton**

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	10 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,4

**MF1**

Extrait de levure	2,6 %
Amidon	4 %
Dextrine	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub>	0,25
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,4
CaCO <sub>3</sub>	0,3
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

**MSM**

Amidon	5 g
Asparagine	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	10 mg
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

**WYE**

Extrait de levure	0,25 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Agar	18 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

**GBA**

Glycérol	20 g
Amidon soluble	20 g
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

**YCED**

NZ casamino acide	0,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Glucose	0,3 g
Extrait de levure	0,3g
Agar	18 g

PH = 7,2

**FDA**

Glucose	20 g
Fèves	200 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,5

**Agar- eau**

Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

**TSB**

Hydrolysats pancréatique de caséine	17 g
Hydrolysats papique de soja	3 g
Dextrose	2,5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

**TSA 0,3%**

TSB	1000 ml
Agar distillée	3 g

pH = 7,0

**Milieu Sierra**

Tryptone	3 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	5 g
Tween	1%
CaCl <sub>2</sub>	0.01%
Agar	15 g

Eau distillée  
pH=7,0

**Milieu A**

Farine d'avoine	40 g
Agar	15 g

Eau distillée 1000 ml  
pH = 7,2

**Olsen**

Sodium caséine	2 g
L-asparagine	0,1 g
Sodium propionate	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
FeSO <sub>4</sub>	0,01
Agar	10 g

Eau distillée 1000 ml  
pH = 7,2

**Malt Agar**

Extrait de malt	30 g
Peptone de soja	3 g
Agar	15 g

Eau distillée 1000 ml  
pH = 5,6

**PDA**

Glucose	20 g
Pomme de terre	200 g
Agar	15 g

Eau distillée 1000 ml  
pH 6,5

**Les solutions****Solution d'oligo-éléments\*\***

FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée	100 ml

**Solution d'oligo-éléments\*\*\***

FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,11 g
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,79 g
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,15 g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,64 g
Eau distillée	100 ml

**Eau DEPC**

DEPC	0,1 ml
Eau distillée	100 ml

Autoclaver pendant 15 min à 120 °C

**Lactophénol**

Aniline bleue	0,05 g
Acide lactique	20 ml
Phénol crystal	20 g
Glycérol	40 ml
Eau distillée	20 ml

**Tampon de chargemet ARN**

Solution bleu bromophénol saturée	16 µl
EDTA 500 mM	80µl
Formaldéhyde (37%)	720µl
Glycérol	2 ml
Formarnide	3 ml
10 X FA gel tampon	4 ml
Eau DEPC	284 µl

**Solution d'avoine\***

Faite bouillir 20 g d'avoine dans 1000 ml d'eau distillée pendant 20 minutes.  
Filtrer à l'aide d'une gaze et compléter le volume du filtrat à 1000 ml.

**Annexe 2 : résultats de l'étude statistique ANOVA et test LSD**

**Antagonisme *in vitro* des isolats actinomycétales sélectionnés contre les sept champignons phytopathogènes**

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Drechslera teres*.

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	6	32.54537143	5.42422857	21.14	0.0001
Erreur	21	5.38872500	0.25660595		
Total	27	37.93409643			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Fusarium culmorum*

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	6	130.6985994	21.7830999	33.17	0.0001
Erreur	21	13.7914480	0.6567356		
Total	27	144.4900474			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Verticillium dahliae*

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	6	77.79375093	12.96562515	41.62	0.0001
Erreur	21	6.54195575	0.31152170		
Total	27	84.33570668			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Fusarium oxysporum*.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	77.10844286	12.85140714	27.36	0.0001
Erreur	21	9.86310000	0.46967143		
Total	27	86.97154286			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Botrytis fabae*.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	22.80732143	3.80122024	73.75	0.0001
Erreur	21	1.08235000	0.05154048		
Total	27	23.88967143			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Bipolaris sorokiniana*.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	23.95052143	3.99175357	33.59	0.0001
Erreur	21	2.49577500	0.11884643		
Total	27	26.44629643			

**Tableau** : analyse statistique de l'antagonisme contre *Microdochium nivale*.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	7	16576.22623	2368.03232	9.99	0.0001
Erreur	24	5689.08898	237.04537		
Total	31	22265.31520			

**Effet des isolats antagonistes sélectionnés sur la croissance de radis**

**Tableau** : la longueur des racines de radis inoculées avec les isolats antagonistes

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	5913.712699	985.618783	1.89	0.045127
Erreur	7	3656.975555	522.425079		
Total	13	9570.688254			

**Tableau** : la surface des racines de radis inoculées avec les isolats antagonistes.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	119.2407865	19.8734644	2.43	0.04127
Erreur	7	57.2535481	8.1790783		
Total	13	176.4943347			

**Tableau** : le diamètre des racines de radis inoculées avec les isolats antagonistes.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>S.C</b>	<b>M.C</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Traitements	6	0.03726891	0.00621148	2.17	0.0374
Erreur	7	0.02006293	0.00286613		
Total	13	0.05733184			

**Antagonisme *in planta* des isolats sélectionnés contre *S. scabies* EF-35.**

**Tableau:** la longueur des racines de radis inoculées par *S. scabies* EF-35 et les agents antagonistes.

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	6	96.4436857	16.0739476	34.97	0.0001
Erreur	21	9.6532000	0.4596762		
Total	27	106.0968857			

**Tableau:** la surface des racines de radis inoculées par *S. scabies* EF-35 et les agents antagonistes

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	7	47.63539117	6.80505588	3.83	0.0062
Erreur	24	42.64198038	1.77674918		
Total	31	90.27737155			

**Tableau:** le diamètre des racines de radis inoculées par *S. scabies* EF-35 et les agents antagonistes

Source de variation	dl	S.C	M.C	F	P>F
Traitements	7	1.12455168	0.16065024	5.40	0.0008
Erreur	24	0.71380942	0.02974206		
Total	31	1.83836110			

### Annexe 3 : séquences de l'ADNr 16S des isolats sélectionnés

#### Séquences obtenues après amplification avec des amorces universelles

##### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces griseus* Lac1

TGCAGTCNNNNATGAAGCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC  
 CTTACCGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAA  
 AGCTCCGGGGTGAAGGATGAGCCCCGGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG  
 ACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
 CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCG  
 GGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA  
 GCGGGCTTGTACAGTCCGATGTGAAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTA  
 GAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAACCGGTG  
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATC  
 CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGTA  
 ACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG  
 ACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATATACCGG  
 AAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGT  
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGT  
 GATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCC  
 CCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCCGAGGGCGGAGCG  
 AATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGT  
 AATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACGTCACGAA  
 AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

##### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces rochei* Lac3

GCAGTCGACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC  
 TGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGT  
 TCGAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCCCGGGCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG  
 GCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGAC  
 GGCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCG  
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
 AGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTGTGAAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGG  
 GCAGGCTAGAGTTCCGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA  
 ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG  
 GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCG  
 TGCCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGA  
 CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTG  
 ACATACACCGGAAAACCCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCT  
 CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGG  
 CCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAG  
 TCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCG  
 AGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG  
 AGTCCGTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGT  
 ACGTCACGAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCT

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8

GCAGTCGAGCGNNGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCC  
 CTGACTCTGGGATAAGCGGTGGAAACGCCGTCTAATACCGGATACGACCCGCCACCTCATGGTGGAGGGT  
 GGAAAGTTTTTCGGTAGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGCG  
 ATTACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTGCGGG  
 AGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCCGGTGGGGGATGACGGC  
 CTTCCGGGTGTAAACCTCTTTTACCACCAACGCAGGCTCGAAGTTTTCTTCGGGTGACGGTAGGTGGGG  
 AATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTAT  
 TGGGCGTAAAAGACTCGTAGGCGGCGTGTGCGCTGTGCTGTGAAAGACCGGGGCTTAACTCCGGTTCTGC  
 AGTGGATACGGGCATGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGACTGGAATTCCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA  
 TATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGG  
 GGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTTCC  
 ACGGTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA  
 AAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTA  
 CCAAGGTTTACATCACCCGTGGACTCGCAGAGATGTGAGGTCATTTAGTTGGCGGGTGACAGGTGGTGC  
 ATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCCATG  
 TTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
 TCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCGTGCAT  
 ACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGA  
 AGGTGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG  
 CCCGTCACGTCATGAAAGTCGGCAACACCCGAAACTTGCGGCCTAACCC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces anulatus* Pru14

GCAGTCGACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC  
 TTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGT  
 TAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGG  
 CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
 GGAGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGG  
 CCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTACGACAGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCGCAGAAGAAGCGCCGGCT  
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC  
 TCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCT  
 AGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA  
 CCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCTGGAGCGAACAGGATTA  
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTGGTGGCCG  
 CAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATA  
 TACCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCT  
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTT  
 CGGGGTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT  
 CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCCGGAGGC  
 GGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTT  
 GCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGT  
 CACGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces champavatii* Pru16

ATGACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGG  
 GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCGTCTGCCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCC  
 GCGGTGCAGGATGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT  
 AGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
 TGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT  
 GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTG  
 CCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG  
 GCTTGCACGTGCGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTT  
 CGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA  
 AGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT  
 GGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAAC  
 GCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC  
 AAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGGCTTGACATACCCGGAA  
 ACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT  
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGT  
 GGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCT  
 TATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAAT  
 CTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT  
 CGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGT  
 CGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Nocardiosis alba* Pin10

AGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCC  
 TGACTCCGGGATAAGCGGTGGAACGCCGTCTAATACCGGATACGACCCTCCTCCGCATGGTGGGGGGTG  
 GAAAGTTTTTTCGGTCCGGGATGGGCTCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGC  
 GATTACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTGCGG  
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGG  
 CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTACCCTCACGCAGGCCCCACGTTTTTTCGTGGGGTTGACGGTAGGTGGG  
 GAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTA  
 TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCGTGTGCGTCTGCTGTGAAAGACCGGGCTTAACCCCGGTTCTG  
 CAGTGGATACGGCATGCCTAGAGGTAGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  
 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCAT  
 GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTT  
 CCACGGTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCT  
 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACC  
 TACCAAGGTTTGACATCACCCGTGGACCTGTAGAGATACAGGTCATTTGGTTGGCGGGTGACAGGTGGT  
 GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTC  
 TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGA  
 CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCGTGC  
 ATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCAT  
 GAAGGTGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACAC  
 CGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGCAACACCCGAAACTTGTGGCCTAACCTTCGGGGAGGGAG

## Séquences obtenues après amplification avec des amorces spécifiques aux *Streptomyces*

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces griseus* Lac1

GGAGGGGTAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCT  
 ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGG  
 GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA  
 GCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTGTCCGGAATTATTGGGC  
 GTAAAGAGCTCGTAGGCGCTTGTACAGTCCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCCG  
 ATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCA  
 GGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC  
 GAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAC TAGGTGTTGGCGACATTCCACGT  
 CGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGG  
 AATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACC TTACCAA  
 GGCTTGACATATAACCGAAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGC  
 TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGNNNNNTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCGTG  
 TTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGG  
 GACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACA

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces rochei* Lac3

CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA  
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC  
 AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTC  
 GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACT  
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
 AGGCGGCTTGTACAGTCCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCT  
 AGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG  
 TGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCA  
 GCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGC  
 CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACC TTACCAAGGCTTGACATACA  
 CCGGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCG  
 TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGT  
 GGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCAT  
 GCCCCTTATGTC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces anulatus* Pru14

CGCANGGAGGGGTTNNAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAT  
GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGANNNNNNNN  
NNNNNNNGACACGGCCANNNNNNNGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGA  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGA  
AGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCTGTTCACGTCCGGATGTGAAAGC  
CCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT  
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACT  
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTG  
GGAAGTAGGTGTGGCGACATTCACGTCTGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAA  
TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCT  
TGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCNNNN  
NNCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTNNNNNNNNGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACT  
CACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTN  
NGCTGCACACGTGTACA

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche *Streptomyces champavatii* Pru16

GCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTTAGTGGCTCACCAAGGCGACG  
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT  
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG  
TAGGCGGCTTGTACGTCTGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGC  
TAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG  
GTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG  
ATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGC  
AGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG  
CCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC  
ACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTC  
GTGTCTGNNNNNTGAGATGTTGGGTTNNNNNNNAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCC  
AGCAGGCCCTTGTGGTGTCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGAC  
GTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTNNNGCTGCACACGTGTACA

## Résumé

Les maladies de plantes causent une importante perte, elle est de 40% dans les pays industrialisés et dépasse les 50 % dans les pays en voie de développement. La rhizosphère est riche en actinobactéries et certains membres de ce groupe bactérien présentent de fortes aptitudes dans la lutte biologique contre les maladies végétales. Dans la présente étude, l'isolement des champignons phytopathogènes a été réalisé sur des plantes infestées de cultures maraichère et céréalière. Les six champignons phytopathogènes isolés, identifiés et retenus pour la suite de l'étude sont : *Fusarium culmorum*, *Drechslera teres*, *Microdochium nivale*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis fabae* et *Fusarium oxysporum*. Par ailleurs, 72 souches d'actinobactéries ont été isolées de différents sols rhizosphériques échantillonnés dans la région semi-aride du Nord-Est Algérien. L'antagonisme de ces isolats a été testé envers les six champignons phytopathogènes isolés, et contre une souche de *Verticillium dahliae*. Tous les isolats ont montré une activité chitinolytique. Cependant, six isolats (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16) inhibant la croissance d'au moins six des sept champignons testés, ont été identifiés par l'étude des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S. Quatre de ces isolats ont été apparentés aux espèces, du genre *Streptomyces*, suivantes : *S. griseus* Lac1, *S. rochei* Lac3, *S. anulatus* Pru14 et *S. champavatii* Pru16. Les deux autres isolats Vic8 et Pin10 ont été classés dans le genre *Nocardiopsis* et ont été identifiés comme *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 et *N. alba* Pin10, respectivement. Le test d'antagonisme *in vitro* des six isolats envers *Streptomyces scabies* EF-35 (agent de la gale commune) a révélé un résultat positif avec les souches *S. griseus* Lac1 et *S. anulatus* Pru14. Cependant, le test d'antagonisme *in planta*, contre *S. scabies* EF-35, réalisé sur des radis, indique qu'à l'exception de l'isolat Pin10, tous les autres isolats réduisent de façon plus ou moins significative les symptômes de la maladie.

La thaxtomine A est la toxine impliquée dans la pathogénicité de *S. scabies*, parmi les gènes codant pour cette toxine, le gène *nos*. Le surnageant d'une souche représentative agissant par antibiose (*S. griseus* Lac1) contre *S. scabies* n'a présenté aucun effet sur l'expression de ce gène et aussi sur la production de la thaxtomine A. Cette étude a permis de révéler que des souches d'actinomycètes du genre *Nocardiopsis* peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique.

**Mots clés** : champignons phytopathogènes, lutte biologique, activité antifongique, *Streptomyces scabies* EF-35, rhizosphère, isolement, *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, gale commune.

## Summary

Plant diseases cause a significant loss, it is 40% in industrialized countries and exceeds 50% in developing countries. The rhizosphere is a rich source of actinobacteria and some members of this bacterial group present strong abilities in the biocontrol of plant diseases. In the present study, isolation of plant pathogenic fungi was carried out on infested plants collected from market gardener and cereal cultures. The six selected phytopathogenic fungi selected for the further examination are *Fusarium culmorum*, *Drechslera teres*, *Microdochium nivale*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis fabae* and *Fusarium oxysporum*. 72 strains of actinobacteria were isolated from different rhizospheric semi-arid soils collected in North-eastern Algeria. Their *in vitro* antagonistic activity was tested against the six phytopathogenic fungi, also against a strain of *Verticillium dahliae*. All isolates showed chitinolytic activity. However, six isolates (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 and Pru16), which inhibited the growth of six or more of the fungi tested, were selected for further study. According to morphological and physiological characteristics, as well as phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, isolates Lac1, Lac3, Pru14 and Pru16 were identified as members of the genus *Streptomyces*, namely *S. griseus* Lac1, *S. rochei* Lac3, *S. anulatus* Pru14 and *S. champavatii* Pru16, respectively. Two isolates, Vic8 and Pin10, were associated with the *Nocardioopsis* genus and identified as *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* Vic8 and *N. alba* Pin10, respectively. The *in vitro* antagonism test of actinomycetes isolates against *Streptomyces scabies* EF-35, revealed a positive result with isolates *S. griseus* Lac1 and *S. anulatus* Pru14. However, antagonism test *in planta*, against *S. scabies* EF-35, performed on radish, showed that except the isolate Pin10, all other isolates reduced the disease symptoms.

Thaxtomin A is a toxin involved in the pathogenicity of *S. scabies*. Among genes encoding this toxin, the gene *nos*. The supernatant of a representative strain (*S. griseus* Lac1) acting by antibiosis against *S. scabies* EF-35, showed no effect on the expression of this gene as well as the production of thaxtomin A. This study revealed that strains of actinomycetes belonging to the genus *Nocardioopsis* can be used as biocontrol agents.

**Key words:** phytopathogenic fungi, biocontrol, antifungal activity, *Streptomyces scabies* EF-35, rhizosphere, isolation, *Nocardioopsis*, *Streptomyces*, common scab.

## الملخص

تتسبب الامراض النباتية في خسارة كبيرة حيث تقدر ب 40% في البلدان الصناعية و50% في البلدان النامية و لتربة الجذور قدرة كبيرة في مكافحة هذه الامراض و ذلك لكونها غنية باللاكتينوبكتيريا (*Actinobacteria*). خلال هذه الدراسة تم عزل ستة أنواع من الفطريات المسببة لأمراض النباتات و هي كالاتي : *Botrytis fabae* ، *Fusarium culmorum* ، *Microdochium nivale* ، *Fusarium oxysporum* و *Drechslera teres* ، *Bipolaris sorokiniana* الريزوسفير (Rhizosphere) المتواجدة في منطقة تتميز بإقليم شبه جاف و التي تقع في شمال الشرق الجزائري. و لقد تم اختبار نشاط التضاد لهذه السلالات المعزولة ضد الفطريات الستة الممرضة للنباتات. كما تم اختبار فعاليتها ايضا ضد سلالة أخرى ممرضة: *Verticillium dahliae*. و على أساس نتائج التضاد، تم انتقاء ستة سلالات (*Lac1* ، *Lac3* ، *Vic8* ، *Pin10* ، *Pru16* و *Pru14*) فقط و التي ابدت تثبيط نمو ستة فطريات على الاقل من اصل السبع المدروسة. كما اظهرت النتائج ان جميع السلالات المعزولة ابدت نشاط تحليلي لمادة الكيتين (chitin). من أجل تصنيف هذه العزلات تمت دراسة الصفات المورفولوجية ، الفيزيولوجية و تحليل الحمض النووي الريبوزومي ARN 16S. و على هذا الاساس تم تعريف كل من *Pru14* ، *Pru16* ، *Lac3* و *Lac1* كسلالات من جنس *Streptomyces* و ذلك ضمن الانواع الاتية : *S. anulatus* *Pru14* ، *S. griseus* *Lac1* ، *S. rochei* *Lac3* ، *S. champavatii* *Pru16* ، و قد صنفت العزلات *Pin10* و *Vic8* ضمن جنس *Nocardiosis* ، و عرفت علي انها: *N. alba* و *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* *Vic8* و *Pin10* و أظهر التضاد *in vitro* للعزلات *Pru14* و *Lac1* مع السلالة الممرضة *Streptomyces scabies* نتائج إيجابية حيث انهما يثبطان نموها. لكن التضاد *in planta* الذي اجري على نبات الفجل في وجود *Streptomyces scabies* اظهر ان كل من العزلات: *Lac3* ، *Vic8* ، *Pru14* ، *Lac1* و *Pru16* تنقص من حدة الاعراض المرضية لنبات الفجل على الرغم من أنها لم تبدي أي نشاط *in vitro*.

الثاكتستومين (Thaxtomin) هي مادة سامة مفرزة من طرف *Streptomyces scabies* و هي المسؤولة عن مرض الجرب المشترك (common scab) لدى النباتات. من بين الجينات المشفرة لهذه المادة ، المورثة *nos*. دراسة اثر المواد الفعالة المنتجة من طرف العزلة *Streptomyces griseus* *Lac1* (الفعالة ضد *Streptomyces scabies* في *in vitro* و *in planta*) على التعبير الجيني للمورثة *nos* اعطى نتيجة سلبية على غرار التحليل الكمي لمادة Thaxtomin بواسطة ال HPLC. هذه الدراسة أثبتت انه يمكن استعمال *Nocardiosis* كوسيلة مكافحة بيولوجية على غرار جنس *Streptomyces* المعروف بفعاليتيه ضد مجموعة واسعة من مسببات الأمراض النباتية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الممرضة للنبات ، مكافحة البيولوجية ، النشاط المضاد، الفطريات، rhizosphere، العزل،

*Streptomyces* ، *Nocardiosis* ، common scab .

<b>Nom :</b> AOUAR <b>Prénom :</b> Lamia	<b>Date de soutenance :</b> 27 Novembre 2012
<b>Thème:</b> Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes.	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Les maladies de plantes causent une importante perte, elle est de 40% dans les pays industrialisés et dépasse les 50 % dans les pays en voie de développement. La rhizosphère est riche en actinobactéries et certains membres de ce groupe bactérien présentent de fortes aptitudes dans la lutte biologique contre les maladies végétales. Dans la présente étude, l'isolement des champignons phytopathogènes a été réalisé sur des plantes infestées de cultures maraichère et céréalière. Les six champignons phytopathogènes isolés, identifiés et retenus pour la suite de l'étude sont : <i>Fusarium culmorum</i>, <i>Drechslera teres</i>, <i>Microdochium nivale</i>, <i>Bipolaris sorokiniana</i>, <i>Botrytis fabae</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>. Par ailleurs, 72 souches d'actinobactéries ont été isolées de différents sols rhizosphériques échantillonnés dans la région semi-aride du Nord-Est Algérien. L'antagonisme de ces isolats a été testé envers les six champignons phytopathogènes isolés, et contre une souche de <i>Verticillium dahliae</i>. Tous les isolats ont montré une activité chitinolytique. Cependant, six isolats (Lac1, Lac3, Vic8, Pin10, Pru14 et Pru16) inhibant la croissance d'au moins six des sept champignons testés, ont été identifiés par l'étude des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S. Quatre de ces isolats ont été apparentés aux espèces, du genre <i>Streptomyces</i>, suivantes : <i>S. griseus</i> Lac1, <i>S. rochei</i> Lac3, <i>S. anulatus</i> Pru14 et <i>S. champavatii</i> Pru16. Les deux autres isolats Vic8 et Pin10 ont été classés dans le genre <i>Nocardiopsis</i> et ont été identifiés comme <i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> Vic8 et <i>N. alba</i> Pin10, respectivement. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i> des six isolats envers <i>Streptomyces scabies</i> EF-35 (agent de la gale commune) a révélé un résultat positif avec les souches <i>S. griseus</i> Lac1 et <i>S. anulatus</i> Pru14. Cependant, le test d'antagonisme <i>in planta</i>, contre <i>S. scabies</i> EF-35, réalisé sur des radis, indique qu'à l'exception de l'isolat Pin10, tous les autres isolats réduisent de façon plus ou moins significative les symptômes de la maladie.</p> <p>La thaxtomine A est la toxine impliquée dans la pathogénicité de <i>S. scabies</i>, parmi les gènes codant pour cette toxine, le gène <i>nos</i>. Le surnageant d'une souche représentative agissant par antibiose (<i>S. griseus</i> Lac1) contre <i>S. scabies</i> n'a présenté aucun effet sur l'expression de ce gène et aussi sur la production de la thaxtomine. Cette étude a permis de révéler que des souches d'actinomycètes du genre <i>Nocardiopsis</i> peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique.</p>	
<b>Les mots clés:</b> champignons phytopathogènes, lutte biologique, activité antifongique, <i>Streptomyces scabies</i> , rhizosphère, isolement, <i>Nocardiopsis</i> , <i>Streptomyces</i> , gale commune.	
<b>Laboratoire de recherche :</b> laboratoire de génie microbiologique et applications	
<b>Président :</b> Mr. DEHIMAT Laid <b>Rapporteur :</b> Mr. BOULAHROUF Abderrahmane <b>Examineurs :</b> Mr. GUECHI Abdelhadi Mr. ARHAB Rabah Mr. BRANES Zidane	Prof. Univ. Mentouri-Constantine Prof. Univ. Mentouri-Constantine Prof. Univ. Ferhat Abas-Sétif M.C. Univ. Larbi ben M'hidi-OEB M.C. Univ. Badji Mokhtar-Annaba