

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institué des Sciences
Département de science de la nature et de la vie

Mémoire
Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Mme Labdi Hind Fatima Zahra

**Contribution à l'étude de la biologie des isolats bactérienne
de *streptomyces* des sols arides et semi arides d'Algérie et
évaluation de leur action antagoniste**

Encadrant :

M. Belahcene miloude
Professeur à C.U.B.B.A.T.

Soutenu en 2019

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme boughalem M.	M.C.A	C.U.B.B.A.T.
Examinatrice : Mme Ahmed ammar Y.	M.C.B	C.U.B.B.A.T.
Encadrant : Pr. Belahcene M.	Professeur	C.U.B.B.A.T.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon grand seigneur ALLAH le tout puissant à la santé et la volonté qu'il m'a donné pour réaliser ce travail.

J'aimerai, tout d'abord exprimer à M BELAHCENE mes profondes gratitudes d'avoir dirigé dans ma recherche, pour tout son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui me a appris la patience.

J'adresse mes vifs remerciements à Mme Boughalem M. pour l'honneur qu'elle me fait de présider mes jury de soutenance.

Mes remerciements vont également à Mme Ahmed Ammar Y. pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce modeste travail.

Mes remerciements les plus sincères aussi pour tous les enseignants de notre département pour leur patience et leurs efforts au cours de cette formation.

Mes remerciements à toutes les personnes de près comme de loin qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Avec l'aide de dieu tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie à toutes les personnes qui me sont chères ;

A ma très chère mère, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance.

J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheur.

A mon très cher père, de tous les pères, tu es le meilleur. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu te préserver et te procurer santé et bonheur.

A ma sœur chaima, qui a toujours été à mes côtés, je te remercie d'être toujours là pour moi.

Rien ne saurait exprimer tous les sentiments que je te porte. Que dieu te garde pour moi.

A mes frères mohamed, zaid et zakarya je ne saurai traduire sur du papier l'affection que j'ai pour vous,

j'implore Allah de vous réserver un avenir meilleur.

A mon mari Hamza, je te remercie de ton soutien et encouragement tout le long de ce Travail, Puisse Allah te protéger, je t'aime et je te souhaite tout le bonheur du monde.

A toute ma famille et mes amies, qui ont rendu ma vie agréable. pour tous les bons moments ainsi que les moments de désespoir que nous avons partagé.

A tous les enseignants qui m'ont accompagné tous le long de mon parcours et qui m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui.

A tous mes collègues de la promotion, Je vous souhaite tous un avenir plein de succès, de bonheur et de santé.

LABDI HIND FATIMA ZAHRA



Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 01	Cycle infectieux de <i>Verticillium dahliae</i>	07
Figure 02	Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide	10
Figure 03	Morphologie des spores des actinomycètes	10
Figure 04	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	15
Figure 05	Applications biotechnologiques des actinobactéries	16
Figure 06	Localisation géographique des sites de prélèvement des échantillons de sol	18
Figure 07	Vue générale de la zone de prélèvement – ville de Béchar	19
Figure 08	Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri entre la souche d'actinomycète et l'agent phytopathogène.	25
Figure 09	Aspect macroscopique des thalles de <i>Verticillium dahliae</i>	27
Figure 10	Aspect microscopique de <i>V.dahliae</i> , après coloration au bleu de méthylène (Gx100)	27
Figure 11	Photos des isolements des actinomycètes du sol sur milieu ISP2 (dilution 10 ⁻⁴)	28
Figure 12	Caractères cultureux des actinomycètes.	30
Figure 13	Caractères morphologiques et microscopiques des quatre isolats d'actinomycètes.	31
Figure 14	Conservation des isolats d'actinobactéries dans des tubes contenant le milieu ISP2.	32
Figure 15	Résultats de la dégradation de l'amidon	32
Figure 16	Résultats de l'hydrolyse de la caséine pour les quatre isolats bactériens	33
Figure 17	Résultats de l'hydrolyse de la gélatine	33
Figure 18	Résultats du test de pouvoir hémolytique des isolats	34
Figure 19	Résultats de l'assimilation des sucres par les actinobactéries	34
Figure 20	Croissance des isolats d'actinomycètes à différentes concentrations de Na Cl.	35
Figure 21	Résultats de la croissance des actinobactéries à différentes températures.	35
Figure 22	Résultats de l'antibiogramme sur le milieu Muller Hinton	38
Figure 23	Résultats des essais de confrontation directe	41
Figure 24	Diagramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de <i>V. dahliae</i> par la technique de confrontation directe.	41
Figure 25	Résultats des essais d'incorporation des filtrats de cultures d'actinobactéries.	42

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 01	Classification des actinobactéries	13
Tableau 02	Distribution des actinomycètes dans la nature	14
Tableau 03	Différents antibiotiques utilisés dans le test d'antibiogramme	24
Tableau 04	Résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des différents échantillons de sol sur les deux milieux de culture.	29
Tableau 05	Caractères morphologiques des actinomycètes.	31
Tableau 06	Résultats de la tolérance aux différentes concentrations de Na Cl %.	35
Tableau 07	Résultats de la tolérance des isolats à différentes températures	36
Tableau 08	Sensibilité des isolats d'actinobactéries aux différents antibiotiques testés.	37
Tableau 09	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats bactériens.	39

Table des Abréviations

Table des Abréviations	Table des Abréviations	Table des Abréviations	Table des Abréviations
%	pourcentage	Min	Minute
DO	Densité Optique	MI	Millilitre
Ech	Echantillon	MS	Mycélium du substrat
G -	Gramme négatif	N°	Nombre
G+	Gramme positif	O2	Oxygène
G+C	Guanine+ Cytosine	P/V	Poids /volume
GLM	gélose à l'extrait de levure_extrait de malte	PDA	Potato Dextrose Agar
GN	Gélose nutritive	Ph	Potentiel hydrogène
ISP	International Streptomyces Project	S	Seconde
MA	Mycélium aérien	Sp	Species (esppèce)
Mg	Milligramme	T	Tours
MH	Muller Hinton	V/V	Volume sur Volume
Min	Minute		
MI	Millilitre		
Mm	Millimètre		
MS	Mycélium du substrat		

Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre 01 : Revue Bibliographique	
Généralités sur la verticilliose de l'olivier	03
1. historiques sur la verticilliose	03
2. Généralités sur la verticilliose	03
3. Symptômes de la maladie	03
4. Moyens de lutte contre la verticilliose	03
4.1. Moyens de lutte chimique	04
4.2. Moyens de lutte biologique	04
4.3. Moyens de lutte culturaux	04
4.4. La résistance génétique	04
5. L'agent causal : <i>Verticillium dahliae</i>	04
5.1. Morphologie et physiologie	05
6. Classification de <i>Verticillium dahliae</i>	05
7. Gamme d'hôtes	05
8. Cycle de développement de <i>V. dahliae</i>	06
9. Le pouvoir pathogène	07
II. les actinobactéries: Historique; Taxonomie; Importance et applications	
1. Historique	08
2. Généralités sur les actinomycètes	08
3. Caractères généraux des actinobactéries	09
4. Physiologie des actinomycètes	10
5. Conditions de croissance des actinomycètes	11
5.1. L'oxygène	11
5.2. Le Ph	11
5.3. La température	11
5.4. L'activité de l'eau (A.w.)	11
5.5. Tolérance en Na Cl	11
6. Milieux de culture des actinomycètes	12
7. Taxonomie des actinomycètes	12
8. Le genre Streptomyces	14
9. Ecologie des actinomycètes	14
10. Cycle de développement d'actinobactérie	15
11. Formation des spores par les actinobactéries	15
12. Applications des actinobactéries	16
13. Sol aride et semi-aride	16
Chapitre 02 : Matériel et méthodes	
I. Origine de la souche fongique de <i>Verticillium dahliae</i>	17
1. Etude des caractéristiques culturales et morphologiques de <i>Verticillium dahliae</i>	17
1.1. Etude macroscopique de la colonie fongique	17
1.2. Etude microscopique (méthode de scotch)	17
II. Etude des agents antagonistes (les actinomycètes)	18
1. Caractéristiques des régions de prélèvements de sol	18
1.1. Wilaya de BECHAR	18
1.2. Région de Béni Abbés	18
1.3. La wilaya de Naâma	18
2. Prélèvement des échantillons de sol	19
3. Isolement des actinobactéries	19

3.1. L'enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO ₃).....	19
3.2 . Les milieux de cultures utilisées.....	20
4. Purification des actinobactéries.....	20
5. Examen macroscopique et microscopique des actinomycètes	21
6. Principe de coloration de Gram.....	21
6.1. Technique de coloration de Gram	21
7. Conservation des souches d'actinobactéries.....	21
8. Etude physiologique des actinobactéries.....	21
8.1. Hydrolyse de l'amidon.....	21
8.2. Hydrolyse de la caséine.....	22
8.3. Hydrolyse de la gélatine (recherche de la gélatinase).....	22
8.4. Pouvoir hémolytique.....	22
9. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone.....	22
10. Croissance en présence d'inhibiteurs.....	23
10.1. Croissance à différentes concentrations de Na Cl.....	23
10.2. Croissance à différentes températures.....	23
11. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	23
11. 1. Méthode par diffusion en gélose.....	24
11.1.1. Antibiogramme par la méthode des disques.....	24
12. Essai d'antagonisme.....	25
12.1. Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri.....	25
12.2. Action du filtrat sur la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène.....	26
12.2.1. Préparation des filtrats de culture.....	26
Chapitre 03: Résultats et discussion	
I. Caractéristiques morphologiques et culturelles de l'isolat de <i>Verticillium dahliae</i>	
1. Etude macroscopique de <i>Verticillium dahliae</i>	27
2. Etude microscopique de <i>Verticillium dahliae</i>	27
3. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol.....	28
4. Isolement des actinomycètes.....	28
5. Identification de souches d'actinomycètes.....	30
5.1. Caractères culturels	30
5.2. Caractères morphologique.....	30
6. Conservation des isolats.....	31
Etude physiologique et biochimique	
7. Résultats de l'étude physiologique et biochimiques de isolas.....	32
7.1. Hydrolyse de l'amidon.....	32
7.2. Hydrolyse de la caséine.....	32
7.3. Hydrolyse de la gélatine.....	33
7.4. pouvoir hémolytique.....	33
7.5. Résultats du métabolisme glucidique (source de carbone).....	34
7.6. Résultats de la tolérance au chlorure de sodium (Na Cl).....	34
7.7. Résultats de la croissance des isolats à différentes températures.....	35
7.8. Résultat du test de sensibilité aux antibiotiques (l'antibiogramme).....	36
8. Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinomycètes	40
8.1. Résultats des essais de confrontation directe.....	40
8.2. Résultats des essais de filtrats de culture d'actinomycètes sur la croissance de <i>V. dahliae</i>	42
Conclusion	43
Référence bibliographique	44
Annexes	54

Introduction

Introduction

Les microorganismes sont présents dans tous les habitats de la biosphère, y compris dans les habitats souterrains. Ces habitats souterrains sont caractérisés par l'absence de lumière, une quantité limitée voire l'absence de nutriments organiques, une température relativement constante et une grande surface de minéraux (**Alabouvette et Sáiz-Jiménez, 2011**). Parmi ces microorganismes, les actinomycètes, qui représente un groupe hétérogène de bactéries Gram positif avec un taux élevé de guanine (G) + cytosine (C). Ces bactéries développent un réseau ramifié d'hyphes. Ceux-ci poussent à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat. Ce sont des bactéries omniprésentes dans presque tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile (**Goodfellow et William, 1983 ; Okami et Hotta, 1988**). Les actinomycètes, très ubiquitaires sont rencontrés sur tous les substrats naturels. Ils jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Larpent et Sanglier, 1989**). Les actinomycètes filamenteux sont à l'origine d'environ 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde. Cependant, le taux de nouvelles découvertes à partir des cultures d'Actinomycetales isolées des sols des régions méditerranéennes (sols arides et semi-arides) et des régions tempérées est en diminution remarquable. Si la plupart des actinobactéries sont chimioorganotrophes, mésophiles, neutrophiles et non halophiles, cependant, il existe une diversité physiologique importante au sein de cette communauté microbienne puisque l'on retrouve également des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles et des fixateurs d'azote (**Goodfellow et al., 2012**). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées dans divers environnement y compris les plus extrêmes (**Tiwari et Gupta, 2013**).

L'importance des actinobactéries a été soulignée dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agro-alimentaire (**George et al., 2012; Solecka et al., 2012**). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particulier le genre *Streptomyces*. Ce dernier est considéré parmi les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce genre bactérien est à l'origine d'environ 80 % de molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Il sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (**Solecka et al., 2012**) mais, aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (**Tiwari et Gupta, 2011**).

D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par les actinobactéries telles que, les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides (le Spinosad), les herbicides (anisomycine) (**Genilloud et al., 2011**).

La verticilliose est une maladie vasculaire causée par un champignon tellurique et hémibiotrophe appelé *Verticillium dahliae* Kleb. Le champignon est présent dans de nombreux sols, où il infecte aussi de nombreuses plantes hôtes appartenant à diverses familles botaniques, et forme des structures de survie appelées microsclérotos qui persistent pendant des années dans le sol. Par conséquent, la lutte contre cette maladie est difficile en raison de la biologie du champignon.

Dans le but d'étudier l'intérêt des actinomycètes bénéfiques du sol, plus précisément les effets antagonistes de ces derniers sur le *verticillium dahliae*, agent de la verticilliose de l'olivier, nous avons réalisé les étapes suivantes :

- Isolement et purification des espèces d'actinomycètes à partir du sol cultivé.
- Etude microscopique et macroscopique de ces bactéries ensuite l'étude de leurs propriétés culturales et physiologiques.
- Et enfin, effectuer des tests de confrontation *in vitro* entre ces espèces bactériennes et l'agent causal (*Verticillium dahliae*).

*Revue
Bibliographique*

I. Généralités sur la verticilliose de l'olivier

1. Historiques sur la verticilliose

En 1879 **Reinke et Bertold** isolent un champignon à partir de pomme de terre malade et le nomme *Verticillium albo-atrum*. Ce dernier est caractérisé par des conidiophores pigmentés à leur base, un mycélium aérien et abondant. En 1913, **Klebahn** isole un champignon à partir de dahliae malade et lui donne le nom de *Verticillium dahliae*. Selon l'auteur cette espèce serait différente de celle décrite par Reinke et Bertold. L'origine de la souche, l'âge, le milieu et la température peuvent modifier le phénotype des thalles de *V. albo-atrum* et *V. dahliae* (**Boisson et Lahlou, 1982**).

Les maladies vasculaires causent des dégâts importants sur de nombreuses cultures. Les champignons des genres *Fusarium* et *Verticillium* en sont les responsables. Les verticillioses sont des maladies très répandues dans le monde. Elles sont particulièrement importantes dans les régions à climat tempéré ou méditerranéen. Les verticillioses affectent une large gamme de plantes, notamment les arbres fruitiers et certaines plantes ornementales mais, également des cultures maraîchères (**Thanassoulopoulos et Kistos, 1971**).

2. Généralités sur la verticilliose

La verticilliose est une maladie fongique, causée *Verticillium dahliae*. Il pénètre dans l'arbre par les racines et bouche les vaisseaux conducteurs. On observe alors un dépérissement de l'arbre : Les feuilles deviennent ternes, puis s'enroulent vers leur face inférieure puis deviennent brunes, sa dissémination se fait grâce à sa conservation sous forme de microsclérotés (**Daayf, 1993**). La verticilliose menace de plus en plus l'oléiculture dans plusieurs pays du bassin méditerranéen. En Algérie, la maladie a été signalée dans la région du Kabylie (**Benchabane, 1990**). Ensuite, plusieurs oliveraies sont également infestées dans la région de Tlemcen et Mascara (**Bellahcene, 2004 ; Boukenadel, 2002**).

3. Symptômes de la maladie

Le *V. dahliae* affecte en premier temps les racines de jeunes plantes, colonise les cellules du xylème et du phloème, puis les tiges ainsi que les feuilles par le flux de la sève. Cela provoque des lésions vasculaires avec des perturbations circulatoires qui se traduisent par deux types de symptômes (**Jabnoun-Khiareddine et al., 2007**): Le dépérissement rapide, aigu «apoplexie» et le dépérissement lent, chronique.

4. Moyens de lutte contre la verticilliose

Il n'existe aucune méthode permettant de lutter efficacement contre cette maladie. Bien que l'utilisation de fongicides soit l'une des méthodes les plus employées car elle est la plus pratique pour lutter contre les maladies, d'autres solutions complémentaires sont souvent utilisées par les agriculteurs. Le potentiel infectieux est lié aux microsclérotés présents dans la terre exploitée par les racines (**Julien, 2005**). Parmi les moyens de lutte, on peut citer :

4.1. Moyens de lutte chimique

La lutte chimique constitue le moyen le plus utilisé pour la gestion de la verticilliose (Yangui *et al.*, 2010; Alfano *et al.*, 2011). Elle se fait par stérilisation du sol à l'aide de fumigants chimiques (le bromure méthylique) (Fravel et Larkin, 2000 ; Martin- Lapierre, 2011) ou l'utilisation de fongicides systémiques (méthyl-thiophanate, thiabendazole, bénomyl et carbendazime) (Henni, 1982 ; Boukenadel, 2001 ; Kumar *et al.*, 2012). Ce recours aux produits chimiques, toujours valables dans certaines situations, engendrent des coûts élevés et des impacts sur l'environnement (Nannipieri *et al.*, 1990). Actuellement aucun traitement curatif n'a prouvé son efficacité (Arslan et Dervis, 2010).

4.2. Moyens de lutte biologique

Des études ont indiqué que certaines bactéries et extraits des plantes peuvent servir d'excellents agents de lutte biologique contre certains pathogènes telluriques (Pegg et Brady, 2002 ; Mercado-Blanco *et al.*, 2004 ; Arfaoui *et al.*, 2007). Les agents de bio-contrôle fonctionnent par la production de substances antibiotiques à l'encontre des parasites et des substances appelées sidérophores qui ont une grande capacité à chélater le fer ferrique (Meyer et Addallah, 1978 ; Thomashow et Weller, 1995 ; Presse *et al.*, 2001) ou par compétition trophique aux dépens des parasites (Lugtenberg *et al.*, 2003). Ils peuvent agir également par compétition de l'espace et induction de la résistance systémique acquise de plante (Ongena *et al.*, 1999, 2000 ; Sturz *et al.*, 2000 ; Tjamos *et al.*, 2005).

4.3. Moyens de lutte culturaux

Des chercheurs roumains ont observé que les plants d'olivier sont plus susceptibles à l'attaque du champignon dans les conditions suivantes : une température du sol inférieure ou égale à 25°C, une humidité relative de 40% plutôt que 80%, une courte photopériode et une fertilisation azotée excessive (Costache *et al.*, 1979). Toutes mesures qui permettent d'éviter ces conditions aident à prévenir le développement de la maladie.

4.4. La résistance génétique

Le meilleur contrôle de la maladie se fait par l'utilisation de variétés résistantes (Romane et Vigouroux, 1999, in Boukendal, 2002). Plusieurs chercheurs ont essayé de sélectionner des variétés résistantes, ou tolérantes telles que les variétés Frantoio, Fragivento et Coratina d'origine italienne (Cirulli et Montemurro, 1976) ainsi qu'Arbequina et Empeltre d'origine espagnole (Civantos, 1999).

5. L'agent causal : *Verticillium dahliae*

5.1. Morphologie et physiologie

Le champignon *V. dahliae* est un parasite facultatif, saprophyte du sol et biotrophe des plantes (Hiemstra et Harris, 1998). Son développement *in vivo* nécessite un sol humide (40% à 80%) neutre à alcalin, (Pegg et Brady, 2002), une courte photopériode et une fertilisation azotée excessive. Ces facteurs prédisposent l'olivier à la maladie (Costache *et al.*, 1979). Le champignon *V. dahliae* a un taux de croissance relativement lent, il se développe différemment sur les milieux communs aussi bien organiques que synthétiques (PDA, MEA...) (Malik, 2008). Sa croissance sur milieu synthétique est optimale aux températures de l'ordre 21 à 27 °C (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996), avec un pH compris entre 6 et 9 (Pegg et Brady, 2002). La croissance est inhibée par des températures extrêmes telles que 5 ou 35 °C (Malik, 2008) et des pH au-dessous de 5 (Pegg et Brady, 2002).

Les *Verticillium* spp. vivent dans le sol. Ils sont présents dans les sols du monde entier, et sont importants à la fois comme saprophytes et comme agents pathogènes sur des plantes cultivées. La plupart des espèces du genre *Verticillium* sont phytopathogènes et sont très polyphages et attaquent une grande diversité de cultures (Mesian et Lafon, 1970). L'infection de l'arbre par la verticilliose commence à priori au niveau du système racinaire et à la base du tronc. Le développement du champignon est favorisé par la présence de blessures.

6. Classification de *Verticillium dahliae*

Le genre *Verticillium* sp est un champignon supérieur. Selon Agrios (Agrios, 1988), il appartient au :

- Division : Amastigomycota
- Groupe : Deutéromycètes
- Classe : Hyphomycètes
- Ordre : Hyphales ou moniliales
- Famille : Moniliaceae
- Genre : *Verticillium*
- Espèce : *V. dahlia*

7. Gamme d'hôtes

Verticillium dahliae est un champignon très polyphage, il attaque une large gamme d'hôtes de genres et de familles botaniques éloignées (Mesian et Lafon, 1970) dont la plupart ont un intérêt agricole et économique. Parmi ces espèces végétales, on rencontre : des arbres fruitiers à noyau, des arbres forestiers, des plantes maraîchères et d'autres cultures.

8. Cycle de développement de *V. dahliae*

V. dahliae peut survivre dans le sol durant plusieurs années, jusqu'à 20 ans, sous forme de microsclérotés (amas de cellules de 0.1 à 0.5 mm) libres ou dans des tissus infectés (Civantos, 1999 ; Julien, 2005).

C'est un parasite facultatif, son cycle de développement se déroule en 2 phases, une phase saprophytique qui comprend une période d'activité et une phase parasitaire qui se déroule dans la plante-hôte (Hiemstra, 1998) (Figure 1).

Pendant la phase saprophytique, le champignon pérennise, sous forme de microsclérotés plus de 14 ans dans le sol aux dépens des débris végétaux et des matériaux organiques (Triki *et al.*, 2006). Il se dissémine par le mouvement des sols infectés, les débris végétaux infectés, l'eau d'irrigation, l'équipement agricole, le vent, les insectes, les prédateurs et les pollinisateurs. (Civantos, 1999 ; Klosterman *et al.*, 2009; Chawla *et al.*, 2012). Il résiste aussi bien au froid qu'à la chaleur et supporte des écarts thermiques allant de 30°C à 55°C (Schnathorst et Mathre, 1966). Le saprophyte s'active et redevient agressif au rétablissement des bonnes conditions de température et d'humidité du sol.

La phase parasitaire du champignon débute par la germination des microsclérotés en réponse aux exsudats racinaires de l'olivier. Il en résulte une émission des hyphes qui colonisent le cortex des racines. Le mycélium s'introduit par l'extrémité ou par les cellules épidermiques (Garber, 1966) et gagne ensuite via la sève les vaisseaux du xylème, c'est l'infection primaire (Fradin et Thomma, 2006 ; Vallad et Subbarao, 2008). Le parasite se reproduit asexuellement dans les vaisseaux, à l'intérieur desquels il progresse grâce aux transports des conidies par le flux de la sève ascendante aux parties aériennes de l'arbre (Vallad et Subbarao, 2008) où elles constituent des foyers secondaires d'infection ; c'est l'infection secondaire (Garber, 1966). La poursuite de l'infection du système vasculaire conjugué aux toxines émises par le parasite, font que la plante produise des dépôts gommeux qui obstruent les vaisseaux conducteurs y entravant ainsi le transport d'eau (Klosterman *et al.*, 2009) et donne des symptômes de flétrissement qui se déclenchent sur les parties aériennes atteintes (Tombesi *et al.*, 2007 ; Laoune *et al.*, 2011).

A la fin du cycle d'infection, le champignon forme des microsclérotés dans les parties mortes de l'arbre. Cela permet le retour du champignon au sol et la reprise éventuelle d'un nouveau cycle infectieux (Fradin et Thomma, 2006 ; Klosterman *et al.*, 2009).

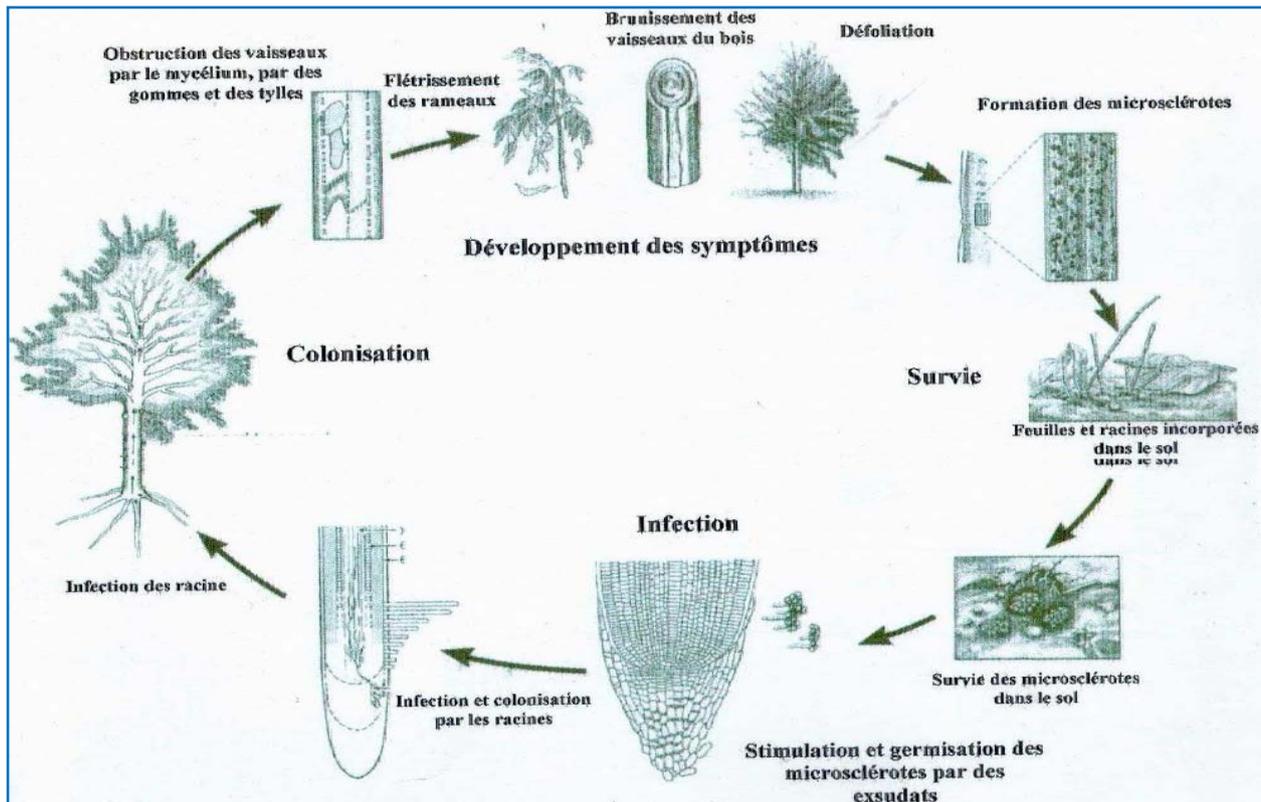


Figure 1 : Cycle infectieux de *Verticillium dahliae* (Hiemstra et Harris, 1998).

9. Le pouvoir pathogène

Dans une population de *V. dahliae* présentant les mêmes caractéristiques de virulence, les individus peuvent différer par leur niveau d'agressivité (Bellahcene, 2004). L'agressivité de l'espèce *V. dahliae* vis-à-vis de l'olivier le partage en deux pathotypes ; défoliant (D) et non défoliant (ND) selon leur capacité à défolier la plante hôte (López-Escudero *et al.*, 2004 ; Dervis *et al.*, 2007). Les isolats du pathotype (D) sont plus virulents que ceux du pathotype (ND) (Bejarano-Alcázar *et al.*, 1996 ; López-Escudero et Blanco-López, 2007). Cependant, il y a une difficulté pour déterminer la classification de *V. dahliae* en raison de l'absence de la forme spéciale, donc la distinction de groupes bien définis par différents critères est souvent délicate (Bellahcene, 2004).

II. Les actinobactéries: historique, taxonomie, importance et applications

1. Historique

Le terme actinomycète a été utilisé pour la première fois par **Bollinger, en 1877** pour désigner l'agent responsable d'une maladie du bétail. **Waksman (1959)** divise en quatre grandes périodes l'histoire des actinomycètes. La première (1874-1900), est celle de la découverte de leurs rôles dans la pathologie. Cohn en 1875 découvre le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foeresteri*. Harz en 1877, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis* (**Messaoudi, 2013**). La seconde période de 1900 à 1919, se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol : avec les travaux **d'Orla Yensen (1909)** qui créa la famille des Actinomycétacées qui comprend un seul genre *Actinomyces*. La troisième période de 1919 à 1940, au cours de laquelle une meilleure connaissance des genres a été acquise grâce aux travaux de (**Krassilnikov, 1938**). Ce dernier ajouta le genre *Micromonospora* qui comprend les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. **Jensen (1932)** regroupe dans le genre *Paraactinomyces* (actuellement désigné *Nocardia*) les actinomycètes dont le mycélium de substrat se fragmente. (**Baldacci, 1962**).

La dernière époque allant de 1940 à ce jour est celle des antibiotiques produits par les actinobactéries, avec la création du genre *Streptomyces* (en combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) par **Waksman et Henrici en (1943)**. En **1958, Pridham et al.**, proposa un système de classification des *Streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien. **Ettling et al., (1958)** introduit un critère important dans la différenciation des espèces, la production des pigments mélanoides.

2. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Rastogi et Kishore, 1997**). Cela explique leur dénomination.

Le mot « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs et signifie « champignons à rayons » ou « champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en anglais (Ray fungi). Et aussi en allemand et en russe (**Messaoudi, 2013**).

Les actinobactéries ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons. Actuellement, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes. Pourtant, ces micro-organismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons (**Andriambololona, 2010**).

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote) (**Otto, 1998**), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoïdes (**Lefebvre, 2008**).

Actuellement ils sont classés définitivement parmi les bactéries (procaryote), du fait que leurs matériels génétiques et dépourvut de noyau, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Les principales différences entre les champignons et les actinomycètes peuvent être résumées dans les points suivants :

- Leurs parois qui ne renferment ni cellulose ni chitine, se retrouvent respectivement chez les plantes et les champignons (**Shukla, 2010**)
- Le diamètre de leurs mycéliums est approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8 μm),
- Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysozymes (**Hawker et Linton, 1971**).
- Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens (**Rangaswami et al., 2004, Winn et Koneman, 2006**).

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration Gram positif (**Dgigal, 2003**) à taux élevés de (G+C) compris entre 60-70 % (**Pelmont, 2005**), formant des filaments minces et ramifiés qui, lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme la gélose, ils se développent à la fois sur la surface et à l'intérieur de celui-ci (**Prescott, 2010**). Ils ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyenne est environ 2 à 3 heures (**Beckers et al., 1982**).

3. Caractères généraux des actinobactéries

D'après **Noureddine, (2006)** et **Boudjella, (2007)**, les caractères cultureux contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi les caractères cultureux :

- **Les caractères macromorphologiques** : Ces caractères reposent sur une observation à l'œil nu. Il s'agit de noter :
 - La présence ou l'absence du mycélium aérien (MA),
 - La couleur de MA et du mycélium du substrat (MS) (**Harir, 2018**),
 - La présence ou l'absence des pigments diffusibles dans le milieu de culture (**Saker, 2015**).
- **Les caractères micro morphologiques** : La micromorphologie des actinobactéries est réalisée par observation au microscope optique et parfois électronique des colonies poussant sur milieux gélosés (**Saker, 2015**). Il s'agit de noter :
 - La fragmentation ou non du mycélium de substrat.
 - La formation des spores exogènes sur le MA et/ou le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées ou en chaînes).

- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores (**Harir, 2018**) (Figure 2 et Figure 3).

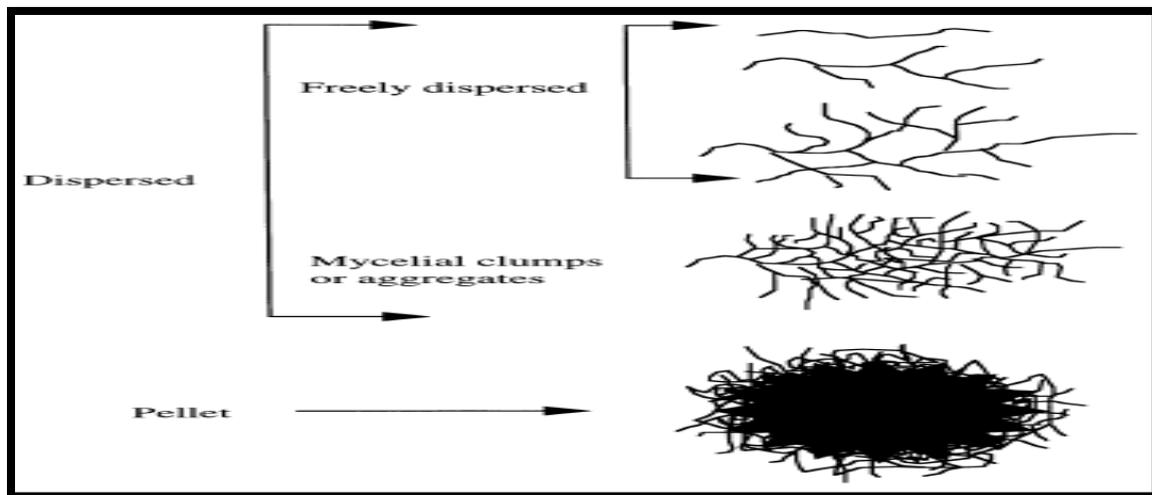


Figure2 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (**Almaris, 2007**).

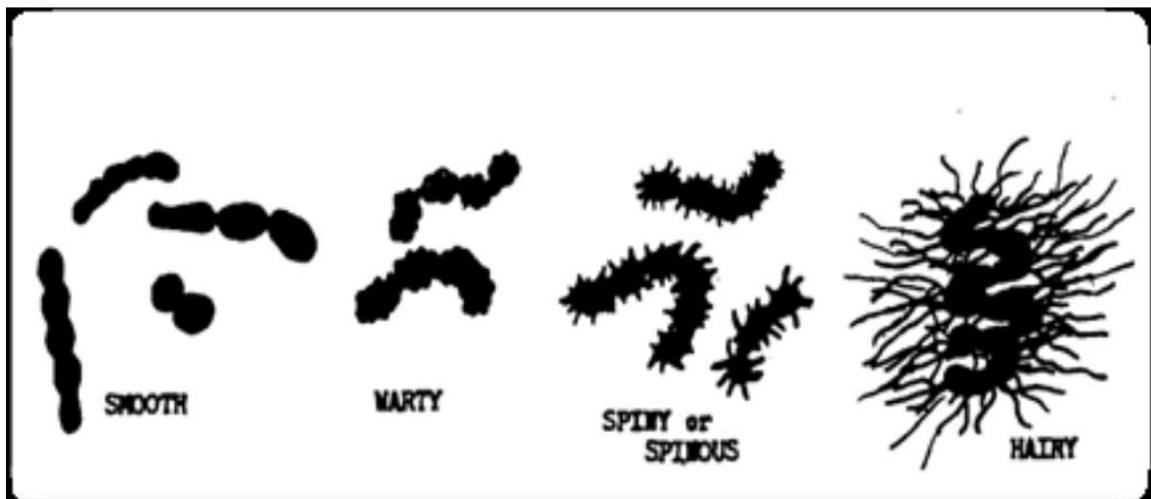


Figure 3 : Morphologie des spores des actinomycètes (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

4. Physiologie des actinomycètes

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH et salinité) (**Djinni, 2009**).

5. Conditions de croissance des actinomycètes

5.1. L'oxygène

On peut classer les actinomycètes selon leurs types respiratoires en deux groupes :

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

5.2. Le pH

Pour le pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, ayant une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8. On peut aussi observer une croissance à des valeurs de pH inférieures à 4 (**McKinney, 2004**), le cas des souches acidophiles comme le genre *Streptacidiphilus* (**Wang et al., 2006**).

5.3. La température

Les actinomycètes sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles et tolèrent des températures avoisinant 50°C et pouvant même croître à une température de 60°C ou plus (**Omura, 1992**).

5.4. L'activité de l'eau (A.w.)

La germination des spores de la plupart des actinomycètes peut-être observée à des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0.67. L'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égal à 0,98 (**Zvyagintsev et al., 2005**).

5.5. Tolérance en Na Cl

Selon leurs exigences en Na Cl, les microorganismes sont divisés en deux groupes :

- Les halophiles : Ce sont des actinobactéries ayant besoin de sel (Na Cl) pour leurs croissances. La concentration peut varier de 1 à 6 % (P/V) chez les actinobactéries faiblement halophiles, tandis qu'elle peut atteindre 15 à 30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.
- Les halotolérants acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance.

On distingue alors trois catégories :

- Des actinobactéries légèrement tolérantes (6 à 8 % de Na Cl (P/V).
- Des actinobactéries modérément tolérantes (18 à 20 % de Na Cl (P/V).
- Des actinobactéries extrêmement tolérantes (se développent de 0 % jusqu'à saturation en Na Cl) (**Nanjani, 2011**).

6. Milieux de culture des actinomycètes

La composition d'un milieu de culture doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. Les meilleurs milieux de culture pour l'isolement des actinomycètes sont ceux contenant de l'amidon, du glycérol ou de la chitine comme source de carbone, la caséine, l'asparagine ou l'arginine comme source d'azote organique (**Burman, 1973 ; Williams *et al.*, 1993 ; Hilali *et al.*, 2002**). Pour l'isolement des actinomycètes, les antibiotiques sont ajoutés dans les milieux sélectifs pour inhiber la croissance de certains germes indésirables.

Les molécules les plus utilisées sont : la nystatine, le cycloheximide (Actidione), la pimaricine, l'amphotéricine B pour inhiber des champignons. La polymyxine, la novobiocine, l'acide nalidixique, la colistine pour stopper les bactéries Gram négatives (**Nonomura et Hayakawa, 1988 ; Larpent et Larpent, 1990, Takizawa *et al.*, 1993 ; Kurtbaoke et Wildman, 1998**). L'incubation se fait généralement, à une température de 28 à 30°C favorisant ainsi le développement des actinomycètes (**Burman, 1973**).

7. Taxonomie des actinomycètes

Selon le système de classification de Murray qu'on retrouve dans le **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986, 1989)**, les Actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes (organismes cellulaires sans noyau), à la division des Firmicutes (Bactéries à coloration Gram-positive) et à la classe des Thallobacteria (Bactéries Gram-positive ramifiées) contenant l'ordre des Actinomycetales (**Alauzet, 2009**). La classification des actinomycètes a évolué en fonction du développement des connaissances durant ces 30 dernières années. Elle fut marquée par quatre périodes dont, chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

- Premier période

C'est la période classique, où seuls les critères macro et micro morphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux. Les caractères morphologiques décrits dans la clé d'identification par **Nonomura (1974)** sont très utiles dans l'identification des espèces de streptomycètes (**Thenmozhi et Kannabiran 2010**).

- Seconde période

C'est la période d'utilisation de la chimio-taxonomie. Selon **Goodfellow et Minnikin**, la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Selon les travaux de **Becker *et al.*, (1964) ; Lechevalier et Lechevalier (1970)**, certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinomycètes. Ces constituants sont retrouvés généralement soit dans la paroi soit dans la cellule entière (**Sabaou, 1988**).

- **Troisième période**

Durant la troisième période naissait la taxonomie numérique, qui a débuté dans les années 1970, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles. **Smaoui, 2010** est défini la taxinomie numérique comme le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères (**Prescott et al., 2003**). Le phylum des actinobactéries comprend maintenant cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles (Tableau 1).

Les genres sont caractérisés par une importante diversité morphologique, allant de la simple cocci (ex : *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées ou non. Ainsi, la position taxonomique des actinobactéries.

Tableau 1 : Classification des actinobactéries (**Goodfellow et al., 2012**).

Classe	Ordres	Familles
Actinobactéria	Actinomycetales	Actinomycetaceae
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae
	Bifidobactériales	Actinopolysporaceae
	Catenulisporales	Catenulisporaceae, actinospicaceae
	Corynebactériales	Corynebactériaceae, dietziaceae, mycobacteraceae, nocardia, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae
	Frankiales	Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae
	Glyconycetales	Glyconycetaceae
	Jiangellales	Jiangellaceae
	Kineosporales	Kineosporaceae
	Micrococcales	Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabactériaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Instrosporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae.
	Micromonosporales	Micromonosporaceae
	Propionibactériaes	Propionibacteriaceae, Nocardidoidaceae
	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaaceae
	Streptomycetales	Streptomycetaceae
Streptosporangiales	Streptosporangiaceae, Nocardioipoceae, Thermomonosporaceae	

8. Le genre *Streptomyces*

C'est un des plus grands genres du monde bactérien, avec environ 574 espèces décrites (**Euzéby, 2010**). Il appartient à la famille des Streptomycetaceae et au sous-ordre des Streptomycineae. Morphologiquement, il possède un mycélium du substrat abondamment ramifié, généralement non sporulé, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores (jusqu'à 50 ou plus) de formes variées: droites (*Rectus Flexibilis*), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*) ou spiralées (*Spira*). Les spores (ou conidies) ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue. Les Streptomycètes jouent un rôle majeur dans la minéralisation. Ils sont très souples au niveau nutritionnel et ils peuvent dégrader en aérobiose, des substances complexes telles que la pectine, la lignine, la chitine, la kératine, le latex et des composés aromatiques.

En biotechnologie, ce genre est responsable de la production de 70% des antibiotiques, produits par les actinomycètes (**Perry et al., 2004**). Ces derniers temps, ce groupe de bactéries a aussi fait l'objet de beaucoup de recherche sur les enzymes, produites par ces bactéries, telle que la tyrosinase.

9. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes colonisent une large variété d'habitats naturels comme le montre le tableau N°01. Elles sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Elles sont présentes dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés. (**Kitouni, 2007**).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et dans divers autres substrats. Ils représentent 80 à 95% du total des actinomycètes après le *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora*. Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares (**Boucheffa, 2011**).

Tableau 2: Distribution des actinomycètes dans la nature (**Larpen, 1989**).

<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

10. Cycle de développement d'actinobactérie

Les actinobactéries possèdent un cycle de vie complexe, qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (**Danilenko et al., 2005**).

Les *Streptomyces* ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Sur milieu solide (figure 4), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire (**Smaoui, 2010**). En effet, ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni nucléés. Ces spores sont des agents de dissémination (**Smaoui, 2010**).

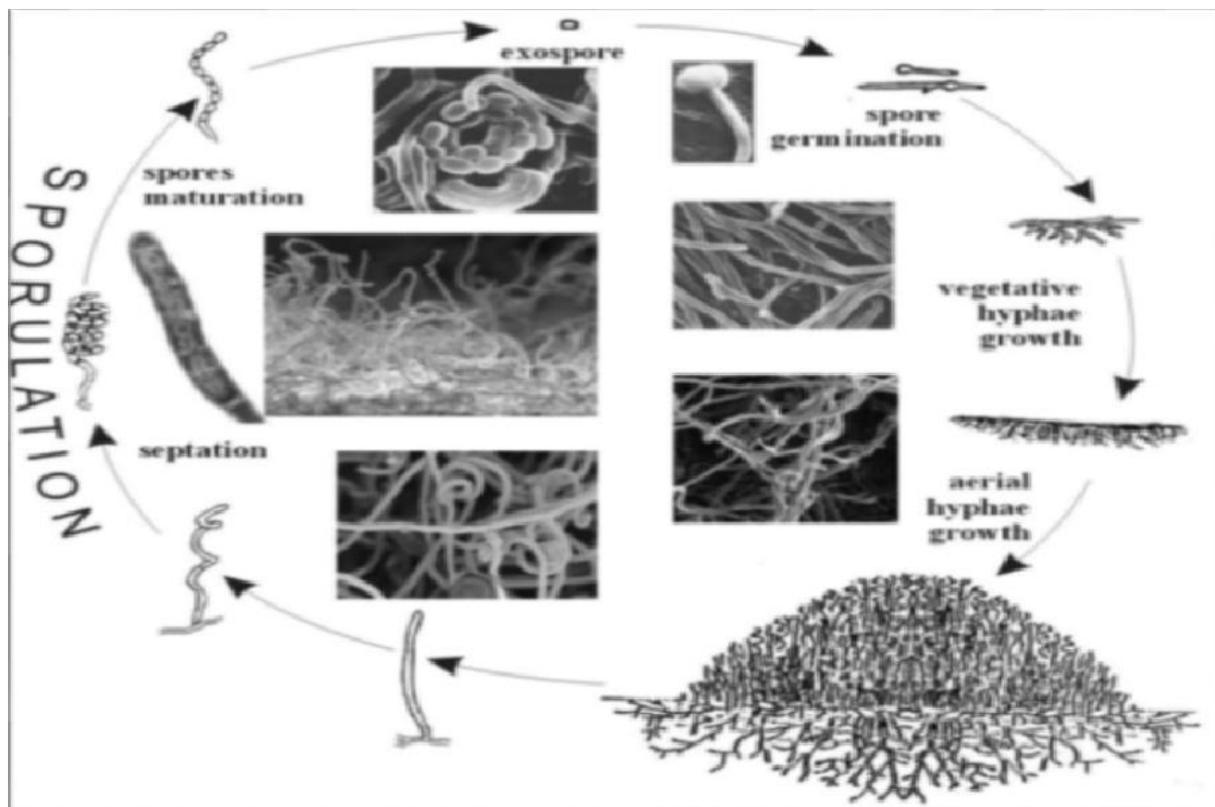


Figure 4: Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (**Jakimowicz, 2007**).

11. Formation des spores par les actinobactéries

Les divers types de spores d'actinobactéries peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : les exo-spores et les endospores (**Theilleux, 1993**). Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (**Saffroy, 2006**). Les exo-spores sont le type le plus fréquent et les moins résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, alors que les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités (**Kitouni, 2007**).

12. Applications des actinobactéries

Les actinobactéries représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactifs entre autre les antibiotiques et des enzymes extracellulaires (Loucif, 2011).

Les actinomycètes sont également utilisés comme agents favorisant la croissance des plantes en produisant l'hormone de croissance végétale (indole-3-acétique), des outils de bio contrôle, des bio pesticides, des composés antifongiques, et des bio corrosions.

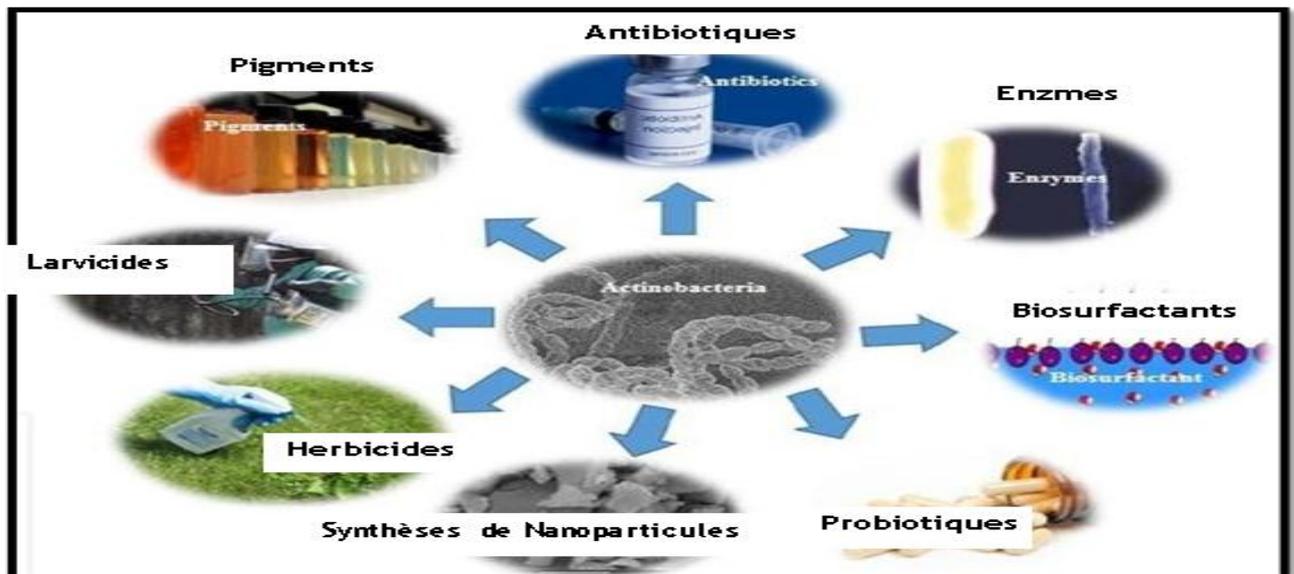


Figure 5 : Applications biotechnologiques des actinobactéries (Anandan, 2016).

13. Sol aride et semi-aride

Le sol demeure l'habitat le plus important pour les actinobactéries dont les streptomycètes existant en tant que composante majeure de leur population. Selon de nombreuses études, les espèces du genre *Streptomyces* ont été signalées pour être les plus abondants et les plus isolées dans chaque étude. Les actinobactéries terrestres présentent divers potentiels antimicrobiens intéressants (Oskey *et al.*, 2005). Le sol de désert est également considéré comme un environnement terrestre extrême où seules certaines espèces microbiennes, en particulier les actinobactéries, utilisent souvent une espèce de cyanobactéries, tel que le *Microcoleus chthonopastes* comme source de nutriment. D'ailleurs, il existe plusieurs rapports montrant la distribution des actinobactéries dans divers écosystèmes, tels que le sol sablonneux, le sol alcalin noir, le sol limoneux sablonneux, le sol de désert alcalin et le sol de désert subtropical. Dans ces différents sols, le genre *Streptomyces* sp. Était dominant suivi par d'autres genres, tels que *Nocardia*, *Nocardiosis* et *Actinomycetes* (Cundell et Piechoski, 2016). Dans une étude réalisée par (Nithya *et al.*, 2015), 134 isolats d'actinobactéries cultivables sur milieu synthétique et morphologiquement distinctes, provenant de 10 échantillons de sol de désert différents. Ces isolats avaient un degré variable d'activité antibactérienne vis-à-vis des agents bactériens pathogènes.

Matériel et méthodes

La lutte contre *Verticillium dahliae* passe par la parfaite connaissance de ce dernier notamment sa biologie, sa symptomatologie et son pouvoir pathogène. Notre travail se veut ainsi une contribution à l'étude de ce champignon. Il se base sur la caractérisation du parasite sur le plan morphologique, cultural et pathogénique, en vue d'apporter des connaissances sur la biologie et le comportement du parasite.

I. Origine de la souche fongique de *Verticillium dahliae*

La souche de *V. dahliae* a été isolée et identifiée par Mlle Benouza S., doctorante au laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Université de Ahmed Ben Bella - Oran. Cette souche nous a aimablement fournie pour tester son comportement vis-à-vis de quelques isolats d'actinomycètes connus par leur propriété antagoniste. L'état de pureté de la souche de *V. dahliae* a été vérifié ensuite régénérée sur milieu gélosé en boîte de Petri. Elle est conservée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) en tube à essai (Annexe1).

1. Etude des caractéristiques culturales et morphologiques de *Verticillium dahliae*

1.1. Etude macroscopique de la colonie fongique

Cette étude consiste à observer à l'œil nu ou à la loupe binoculaire, les caractères culturaux des colonies sur milieu (PDA) ; il s'agit de l'aspect des colonies ainsi que la pigmentation et la couleur de la colonie mycélienne. Le développement du mycélium (aérien, subaérien ou ras) a été également étudié.

1.2. Etude microscopique (méthode de scotch)

L'étude microscopique est réalisée à l'aide de la méthode de scotch dont le principe est de préparer un morceau de ruban adhésif de 1,5 cm de longueur et le déposer à la surface d'une colonie fongique. Pour cela et afin de ne pas laisser ses empreintes sur la face adhésive, le morceau de scotch est déposé au-dessus de la colonie fongique à l'aide d'une pince stérile puis écraser légèrement. Le morceau de scotch est ensuite transféré sur une lame en verre propre contenant une goutte de bleu de méthylène. La préparation est observée à l'aide d'un microscope optique à différentes grossissements. L'étude microscopique permet d'apprécier :

- l'aspect du mycélium (septé /non septé ; ramifié/non ramifié).
- la forme de conidiophores.
- la forme des conidies.
- la présence de microsclérotés.

II. Etude des agents antagonistes (les actinomycètes)

1. Caractéristiques des régions de prélèvements de sol

1.1. Wilaya de BECHAR

Les prélèvements de sol ont été effectués dans trois régions. La wilaya de Béchar située à 1 150 km au sud-ouest de la capitale – Alger et à 852 km au nord-est de Tindouf. Elle se situe à environ 80 km à l'est de la frontière marocaine. La région se caractérise par un climat aride. Le sol de la région se caractérise par un faible taux d'humidité et un faible pourcentage en matière organique. La figure 6 illustre la position géographique de la wilaya.

1.2. Région de Béni Abbés

La deuxième région de prélèvement est la région de Béni Abbés. C'est une des communes de la wilaya de Béchar. Elle est située à 250 km au sud-ouest de la wilaya et à 1 200 km au sud-ouest d'Alger. Béni Abbés bénéficie d'un climat désertique chaud typique du Sahara avec des étés très longs et extrêmement chauds et des hivers courts et très doux. Le climat est hyper-aride et extrêmement sec presque toute l'année. Le sol de cette région se caractérise par un faible taux d'humidité et un très faible pourcentage en matière organique (figure 6)

1.3. La wilaya de Naâma

La troisième région de prélèvement comprend la wilaya de Naâma, située à l'ouest d'Algérie. Elle est voisine au nord avec les wilayas de Tlemcen et Sidi-Bel-Abbès, à l'est celle d'El-Bayadh et au sud celle de Béchar. Le sol de cette région est un sol calcaire et sableux (figure 6)

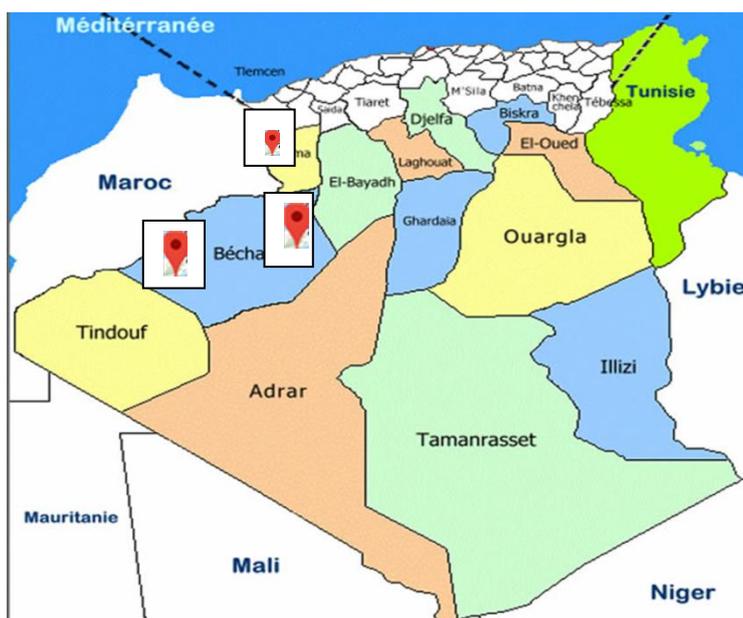


Figure 6 : Localisation géographique des sites de prélèvement des échantillons de sol (Carte Algérie)

2. Prélèvement des échantillons de sol

Les prélèvements ont été effectués pendant les mois de janvier et mars de l'année 2019 à partir des régions précédemment citées. Dans des conditions stériles, une quantité suffisante de terre (environ 100 g) est prélevée à l'aide d'une spatule stérile dans une profondeur allant de 10 à 15 cm. Les échantillons de terre sont mis dans des sacs en papier puis transportés au laboratoire et conservés à 4°C jusqu'à leur analyse (Figure 7).



Figure 7: Vue générale de la zone de prélèvement – ville de Béchar (Dziri Magazine)

3. Isolement des actinobactéries

Les échantillons ont été séchés dans des boîtes de Pétri stérile à température ambiante pendant 3 à 5 jours puis broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre et faciliter l'isolement des actinomycètes.

3.1. L'enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO_3)

Nous avons utilisé la méthode décrite par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**. Elle consiste à peser 10 g de chaque échantillon de sol et les mélanger avec 1 g de CaCO_3 . Le tout est incubé pendant 7 à 9 jours à la température ambiante et dans une atmosphère saturée d'humidité. Ce prétraitement a pour effet la réduction de la flore fongique ainsi que la stimulation et l'augmentation du nombre d'actinomycètes.

3.2. Les milieux de cultures utilisés

Parmi les milieux de culture sélectifs des actinobactéries ; Deux milieux sont utilisés pour l'isolement, il s'agit de :

- **Milieu GLM** (gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt) (**Kitouni et al. 2005**).
- **Milieu ISP2** (International Streptomyces Project) (**Ara et al. 2012**).

La composition de chaque milieu de culture est donnée dans (l'annexe1.)

3.3. Méthode d'isolement des actinomycètes

La méthode d'isolement utilisée est celle des suspension-dilutions (**Rapilly, 1968**). Cette technique consiste à prélever 1g de sol et les introduire dans 9 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette suspension, une série de dilution décimale (jusqu'à 10^{-5}) est réalisée, où 1 ml de chaque suspension mère est ajouté à 9 ml d'eau distillée stérile. Deux méthodes d'ensemencement ont été effectuées ;

- La première consiste à déposer 0,1 ml de chaque échantillon correspondant aux deux dernières dilutions (10^{-4} et 10^{-5}) à la surface dans des boites de Pétri contenant le milieu d'isolement puis l'étaler à l'aide d'un étaloir stérile.
- La deuxième méthode consiste à déposer tout d'abord 0,1 ml de chaque échantillon correspondant aux deux dernières dilutions (10^{-4} et 10^{-5}) dans des boites de Pétri stériles ; ensuite couler le milieu ISP2 gélosé, maintenu en surfusion à 45°C. Afin d'homogénéiser le milieu, les boites sont agitées par un mouvement circulaire lent.

Deux boites de Pétri par dilutions et par milieu de culture sont ensemencées et incubées à 28°C durant 21 jours. Après croissance sur ces milieux de culture, les boites dont les colonies bactériennes sont bien distinctes et dont les caractères cultureux comme l'aspect, la taille et la couleur, correspondent aux caractéristiques des actinobactéries sont isolées en vue d'une purification.

4. Purification des actinobactéries

Après incubation, les actinobactéries ont été isolées selon leurs critères morphologiques et macroscopiques qui sont en général, la morphologie et la couleur des spores, le mycélium des substrats, la présence de pigments, l'aspect microscopique des colonies par observation microscopique. La réalisation de la purification sur les actinobactéries sélectionnées est réalisée par des repiquages successifs des colonies soupçonnées. Elle consiste à prélever délicatement à l'aide d'une anse stérile un frottis bactérien et l'ensemencer en stries sur milieu GLM ou ISP2.

5. Examen macroscopique et microscopique des actinomycètes

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques sont observées au microscope optique. L'observation microscopique au bleu de méthylène et par coloration différentielle (coloration de Gram) nous permet de distinguer le type de Gram et la morphologie des bactéries.

6. Principe de coloration de Gram

Les colorations constituent un complément indispensable aux examens à l'état frais ; en effet, celles-ci permettent de mieux observer les détails morphologiques des cellules bactériennes et d'orienter le diagnostic. La coloration de Gram est une coloration ancienne, mais qui demeure fondamentale en bactériologie d'analyse. Elle est toujours réalisée en routine lors des premiers examens des produits pathologiques, des produits alimentaires et certaines solutions, Elle contribue aussi à l'appréciation de la pureté des souches bactériennes.

6.1. Technique de coloration de Gram

A partir de chaque colonie répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinobactéries, un frottis bactérien est préparé entre lame-lamelle afin d'effectuer la coloration de Gram. Le principe de cette coloration consiste à préparer un frottis d'une culture bactérienne pure sur une lame et le recouvrir de violet de gentiane, le laisser agir pendant 1 minute puis rincer la lame à l'eau distillée. Le frottis est ensuite recouvert de Lugol et laisser agir pendant 1 minute puis rincer à l'eau distillée. Le frottis est décoloré à l'alcool pendant 30 secondes puis rincer à l'eau distillée. Il est ensuite recoloré avec un colorant basique, de la safranine ou la fuchsine puis laisser agir pendant 30 secondes. Le frottis est enfin rincé à l'eau distillée puis séché au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen. La lame est observée au microscope optique à l'objectif à immersion (Gx100).

7. Conservation des souches d'actinobactéries

Seules les colonies à coloration Gram positif présentant les aspects caractéristiques des actinobactéries sont retenus et sont ensuite ensemencées dans des tubes à essai contenant le même milieu de culture incliné. Les tubes sont incubés pendant sept jours à 28°C puis placés à 4°C durant plusieurs semaines.

8. Etude des caractères physiologiques des actinobactéries

8.1. Hydrolyse de l'amidon

Ce test représente un des critères d'identification des espèces d'actinobactéries et permet de mettre en évidence la dégradation de ce polyholoside par certaines espèces bactériennes. Pour cela, une souche bactérienne est ensemencée en points ou en stries sur un milieu nutritif

gélifié contenant 1 % (P/V) d'amidon de pomme de terre ou de riz soluble. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration (zone claire) autour des colonies. En revanche, la présence de zones bleues, témoigne l'absence d'une hydrolyse d'amidon (**Geraldine et al. 1981**).

8.2. Hydrolyse de la caséine

Ce test permet de caractériser les bactéries capables d'hydrolyser la caséine. La caséine est une protéine du lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes. L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. Les boîtes ensemencées sont observées après 14 jours d'incubation à 28°C. La clarification de la gélose autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

8.3. Hydrolyse de la gélatine (recherche de la gélatinase)

Cette propriété est détectée en utilisant un milieu contenant de la gélatine. Plusieurs méthodes existent pour la recherche de la gélatinase, dont la méthode lente sur milieu gélose nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine. Le principe de ce test consiste à ensemencer chaque isolat bactérien sur le milieu précédemment cité. Les boîtes sont incubées à 28± 2°C pendant 7 à 14 jours. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure de mercurique est ajoutée (**Geraldine et al., 1981**).

8.4. Pouvoir hémolytique

L'étude de l'activité hémolytique des actinobactéries est réalisée sur milieu gélose nutritive contenant du sang. Pour effectuer ce test, 200 ml de gélose nutritive stérile sont préparés puis maintenus en surfusion (à 45°C), ensuite une quantité de sang avoisinant 5% est introduite au milieu. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont agitées délicatement afin de ne pas éclater les cellules sanguines. Après homogénéisation et refroidissement du milieu, les actinobactéries sont ensemencées sous forme d'un trait au centre de chaque boîte de Pétri. La lecture des résultats consiste à observer les zones claires au tour de la colonie d'actinobactérie, représentant la zone d'hémolyse.

9. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone

Les actinobactéries possèdent la capacité de dégrader différentes sources de carbone constituant ainsi un critère indispensable pour leurs identifications. Le test consiste à apprécier la croissance de l'actinobactérie en présence de composés glucidiques à raison de 10g /l, comme seules sources de carbone, additionnés au milieu de culture (**Shirling et Gottlieb 1966**). Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu gélosé en boîte de Pétri. Après incubation à 28°C, pendant 8 à 10 jours, le

test est considéré comme positif lorsque la croissance est meilleure et nettement supérieure à celle du témoin sans sucre. Les composés glucidiques et dérivés testés sont les suivants : le lévulose, maltose, D.fructose, D.glucose, Sucrose, D.galactose, Xylose.

10. Croissance en présence d'inhibiteurs

10.1. Croissance à différentes concentrations de Na Cl

La majorité des bactéries, à l'exception de celles qui vivent dans des biotopes salés se développent en présence de faibles concentrations en sel. En effet, ce test permet de savoir si les espèces d'actinobactéries isolées sont capables de croître dans un milieu hypersalé. Les cultures bactériennes sous forme des spores âgées de 14 jours sont ensemencées dans le milieu ISP2 solide contenant des concentrations croissantes en Na Cl (3, 5, 7, 9 et 10%) (P/V) Après incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 14 jours, la capacité à croître dans ces milieux est appréciée selon une échelle de croissance : (croissance faible, moyenne, bonne et très bonne).

10.2. Croissance à différentes températures

Chaque bactérie a une température pour laquelle sa croissance est optimale, ainsi que des températures extrêmes au-dessous et au-dessus des quelles elle ne se développe pas. Ce test consiste donc à évaluer la croissance des souches d'actinobactéries à différentes températures sur le milieu ISP2 en boîtes de Pétri. Après ensemencement des cultures d'actinobactéries isolées et purifiées dans ce milieu. Les boîtes sont incubées aux températures de (5, 15, 20, 30 et 37°C) pendant 7 jours. La croissance des actinobactéries est appréciée par une croissance sur milieu ensemencé. (Meklat, 2012).

11. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

Les antibiotiques antibactériens sont des substances dont l'action anti-bactérienne s'exprime :

- Soit en inhibant la multiplication des bactéries : c'est l'effet bactériostatique ou bactériostase.
- Soit en les détruisant : c'est l'effet bactéricide ou bactéricidie.

Nous avons expérimenté la méthode par diffusion sur gélose. Cette dernière permet d'étudier la sensibilité d'une espèce bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

11. 1. Méthode par diffusion sur gélose

11.1.1. Antibiogramme par la méthode des disques

Lorsqu'on dépose un antibiotique sur un milieu de culture gélosé en boîte de Pétri, celui-ci diffuse suivant un gradient de concentration. La bactérie ensemencée ne se développera pas pour les concentrations supérieures ou égales à la CMI. On observera alors une zone d'inhibition concentrique autour de l'antibiotique, dont le diamètre est lié à la plus ou moins grande sensibilité de cette souche bactérienne. Le principe de cette méthode consiste à inoculer le milieu gélose de Mueller-Hinton.

Ce milieu solide est utilisé le plus souvent pour tester la sensibilité des germes aux antibiotiques. L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur le milieu BHIB (Brain Heart Infusion Broth)

Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un densitomètre fixé à la longueur d'onde de 620 nm de manière à obtenir une absorbance entre 0.08 à 0.1 correspondant à une charge cellulaire de 10^8 cellules/ ml ou UFC/ml. L'espèce bactérienne est ensemencée par strie sur toute la surface du milieu.

Les disques d'antibiotiques à tester sont déposés aseptiquement à environ 10 mm de la périphérie de la boîte, à l'aide d'une pince stérilisée par flambage, en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Les boîtes sont placées dans un réfrigérateur à $6 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2 h puis mises à incuber à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré après 72 h d'incubation (**Chun *et al.*, 1998; Monciardini *et al.*, 2003**). Le Tableau 3 présente la liste des antibiotiques testés.

Le test d'antibiogramme permet de classer les bactéries en trois catégories, selon le diamètre de la zone d'inhibition, une souche résistante, sensible et intermédiaire.

Tableau 3 : Différents antibiotiques utilisés dans le test d'antibiogramme

Antibiotiques	Charge (μg /disque)
Ciprofloxacine	5
Pénicilline	10
Gentamicine	10
Cefazoline	30
Ampicilline	10
Oxacilline	1
Erythromycine	15
Triméthomycine	15
colistine sulfate	10
Tirméthoprin	25

12. Essai d'antagonisme

L'un des critères de sélection des actinobactéries destinés à leur utilisation comme agents de lutte biologique vis-à-vis des agents phytopathogènes est leur capacité à synthétiser des substances antimicrobiennes. Parmi les modes d'action étudiés chez ce groupe de bactérie, nous citons à titre d'exemple, l'antibiose, le parasitisme, la compétition pour des sources nutritives ou l'espace. Afin de mettre en évidence l'action antagoniste des actinobactéries isolées vis-à-vis de *Verticillium dahliae*, nous avons testé les deux méthodes présentées ci-dessous :

12.1. Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri

Le principe de la technique de confrontation directe consiste à prélever un disque d'une culture de champignon (*Verticillium dahliae*) de 08 mm de diamètre puis le déposer à l'aide d'un emporte-pièce stérile sur une boîte de Petri contenant le milieu PDA à une distance d'environ 02 cm de la pastille du *Verticillium dahliae*, une souche d'actinomycète est ensemencée en trait.

Le témoin consiste en une boîte contenant uniquement une pastille du champignon de 08 mm de diamètre (Dennis et Webster, 1971; Inam-ul-Haq *et al.*, 2003). L'incubation des boîtes est faite à 28°C pendant 10 jours. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance parcourue par le champignon en direction de l'antagoniste bactérien. Nous évaluons ensuite le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *V. dahliae* selon la formule suivante (Wang *et al.*, 2002) :

$$(\%) \text{ inhibition} = (R \text{ témoin} - R \text{ test}) / R \text{ témoin} \times 100$$

R témoin : distance radiale maximale de croissance du champignon.

R test : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste.

Il est à noter qu'à partir de 20%, on peut parler d'inhibition.

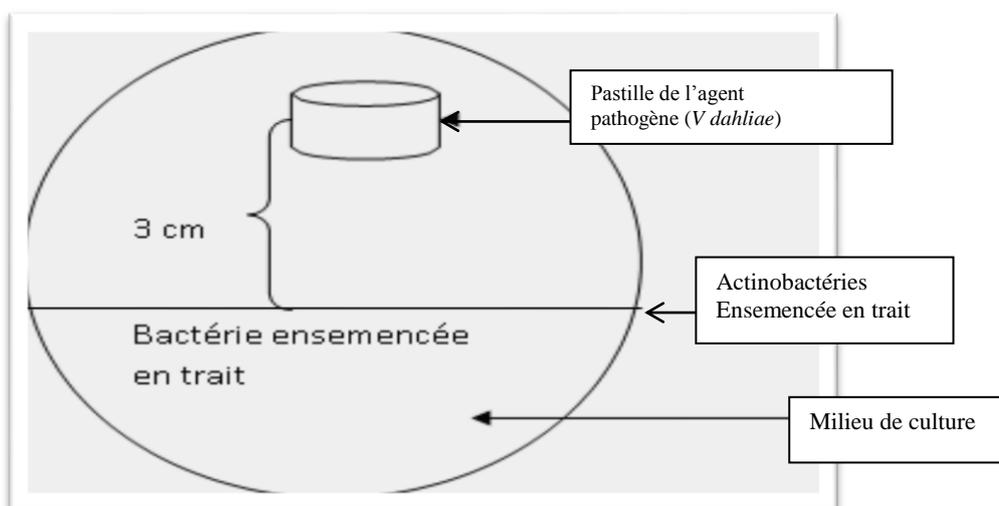


Figure 8: Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri entre la souche d'actinomycète et l'agent l'agphytopathogène.

12.2. Action du filtrat sur la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène

12.2.1. Préparation des filtrats de culture

Le but de ce test est de sélectionner les souches dont les métabolites sécrétés sont les moins favorables à la croissance mycélienne de *Verticillium dahliae*. Cette méthode consiste à ensemencher les souches d'actinomycètes pré - sélectionnées suite à la première méthode dans des tubes contenant le milieu ISP2 liquide. Les tubes sont incubés à 30°C. Après 8 jours d'incubation, les cultures bactériennes sont centrifugées pendant 10 min à 4000 t/min. Le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue stérile puis filtré par passage sur une membrane millipore stérile de 0,20 µm de diamètre. Le filtrat ainsi obtenu est testé vis-à-vis de *Verticillium dahliae*.

Pour cette étude, nous avons incorporé (v/v) le filtrat de culture au milieu PDA à double concentration de gélose dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont agitées délicatement afin d'homogénéiser le milieu. Après homogénéisation, des pastilles de 08 mm de diamètre sont prélevées à la périphérie d'une culture fongique de *V. dahliae*, âgée de 7 jours, puis déposées au centre des boîtes de Pétri. La croissance mycélienne de l'agent pathogène est évaluée par la mesure du diamètre moyen des colonies après 5 à 8 jours d'incubation à 28°C (Sedra et Maslouhy, 1995).

Résultats et discussion

I. Caractéristiques morphologiques et culturelles de l'isolat de *Verticillium dahliae*

1. Etude macroscopique de *Verticillium dahliae*

L'étude morphologique de la souche de *V. dahliae* a porté sur les caractères morphologiques et culturels. La colonie de *V. dahliae* en culture sur milieu PDA a un aspect cotonneux, de couleur plus ou moins blanchâtre passant après 5 à 6 jours de culture à une couleur noirâtre due à la production en abondance de micro-sclérotés (amas de cellules), appelés organes de résistance du champignon. A travers cette étude trois morphotypes se sont distingués :

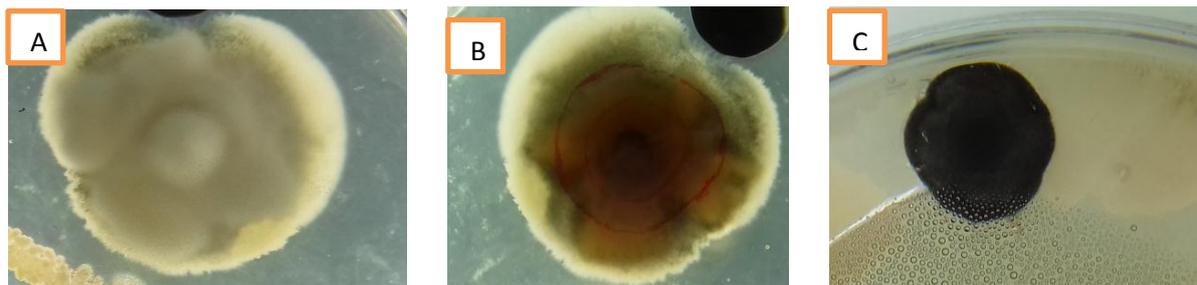


Figure 9 : Aspect macroscopique des thalles de *Verticillium dahliae*

A : Morphotype présentant un thalle cotonneux blanchâtre.

B : Morphotype intermédiaire.

C : Morphotype de couleur noirâtre dû à la présence des microsclérotés.

2. Etude microscopique de *Verticillium dahliae*

Les observations microscopiques montrent la présence d'hyphes mycéliens ramifiées et des conidiophores portant des phialides verticillées, à leur extrémité desquelles se distinguent des conidies plus ou moins arrondies (Figure 10). Des amas de micro-sclérotés sont observés. L'identification de l'espèce est réalisée selon les critères décrits par de nombreux auteurs (Jabnoun-Khiearddine *et al.*, 2010 ; Lola *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2012).

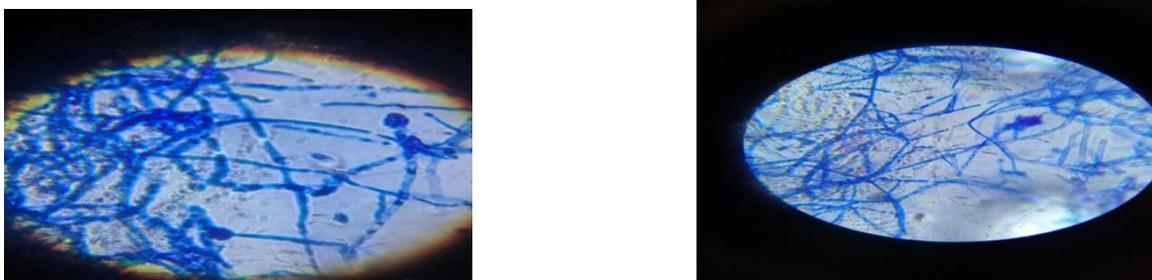


Figure 10 : Aspect microscopique de *V.dahliae*, après coloration au bleu de méthylène (Gx100)

3. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol

Selon la littérature, l'ensemble des échantillons analysés représente des écosystèmes pauvres en débris végétaux et en matières organiques. Ils se caractérisent par des pH neutres ou légèrement alcalin.

4. Isolement des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à coloration Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. Ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes etc... (Loqman, 2009). Depuis la découverte de ces bactéries, des travaux de recherche se sont intensifiés à ce sujet. Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Ces actinomycètes se développent lentement sur les deux milieux d'isolements utilisés (GLM, ISP2). Elles apparaissent sous forme de colonies dures incrustées, sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérentes à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Au total, 06 isolats d'actinobactéries ont été obtenus à partir des sols arides des trois régions d'étude. Les résultats de l'isolement des actinomycètes sont illustrés dans le tableau 4 et la figure 11. D'après les résultats, nous constatons que le milieu ISP2 s'est révélé le plus favorable à l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sols. De même, les résultats indiquent que le nombre des colonies d'actinobactéries était très faiblement présent dans l'ensemble des échantillons alors qu'il était nul dans d'autres. Il ressort de cette étude que le sol de Naama représente un écosystème plus ou moins favorable au développement des actinomycètes. Ce résultat peut être expliqué par les caractères physico-chimiques de l'échantillon. Il est à signaler que de nombreux travaux s'intéressaient à l'isolement et à la caractérisation de nouvelles souches de *Streptomyces* produisant de nouveaux antibiotiques ou bien de nouvelles molécules bioactives (Bouras *et al.*, 2013).

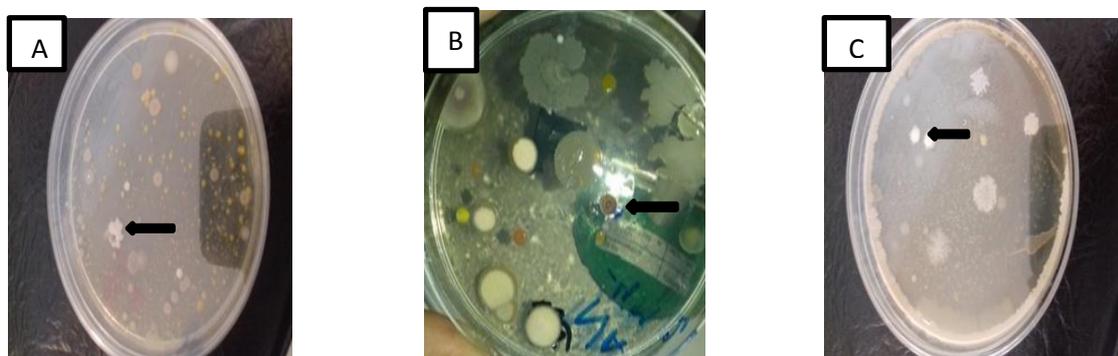


Figure 11: Isolements des actinomycètes à partir du sol sur milieu ISP2 (dilution 10^{-4})

— Colonies d'actinomycètes

Tableau 4: Résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des différents échantillons de sol sur les deux milieux de culture.

Milieux de culture	sols de Bechar		sols de Béni Abbés		Sols de Naama	
	Ech ₁	Ech ₂	Ech ₁	Ech ₂	Ech ₁	Ech ₂
GLM	0	0	0	0	1	0
ISP ₂	1	0	0	1	2	1

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinobactéries n'existe pas. De ce fait, il est recommandé de varier les méthodes et les milieux d'isolement

➤ Discussion

Dans un objectif de réussir à un isolement important de la flore d'actinomycétale (**Boudemagh, 2007**). Plusieurs techniques de prétraitement des échantillons du sol ont été appliquées. Ils ont tous comme objectifs à faciliter l'isolement sélectif des actinomycètes qui se caractérisent par une croissance assez lente par rapport aux bactéries et aux champignons. Le problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes reste le développement des bactéries à coloration de Gram positive dont la croissance est envahissante, comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile, voire même impossible. La raison pour laquelle nous avons utilisé deux prétraitements, l'un est physique, le séchage et l'autre, chimique, il s'agit de l'enrichissement de l'échantillon par le bicarbonate de calcium (CaCO₃). Le séchage des échantillons du sol à l'air libre pendant sept jours a pour but la réduction de la flore bactérienne contaminant. D'ailleurs, les travaux de **Fan et al., (2010)** indiquent qu'un séchage des échantillons du sol pendant 7 à 21 jours réduit considérablement le nombre de microorganismes indésirables (champignons et bactéries). L'autre technique est chimique, il s'agit de l'enrichissement de l'échantillon par le bicarbonate de calcium (CaCO₃). Selon **Sudhanshu (2011)**, l'utilisation de bicarbonate de calcium comme prétraitement des échantillons facilite l'isolement des actinomycètes à partir de leur habitat et augmente les chances d'obtention de différentes espèces. Ce prétraitement réduit surtout les bactéries à coloration Gram négative.

Parmi les facteurs écologiques les plus importants qui influent la diversité des actinobactéries dans le sol: le pH, la matière organique et le taux d'humidité. D'autres facteurs sont aussi important comme la température du sol, la nature du sol, la végétation et l'emplacement géographique (**Adegboye et al., 2012**). Les conditions abiotiques contribuent elles aussi à l'obtention de ce groupe de bactérie; la température adéquate pour les actinobactéries est de 28 à 30°C. Ce paramètre permet une meilleure croissance des actinobactéries. La durée d'incubation est également importante car la synthèse des métabolites secondaires par les actinobactéries suit la phase de croissance active qui dure 7 jours. De ce fait, il est recommandé de prolonger le temps d'incubation jusqu'à 21 jours pour que les micro-organismes puissent synthétiser les métabolites secondaires.

5. Identification de souches d'actinomycètes

L'identification morphologique, physiologique et biochimique permet d'orienter notre caractérisation et de connaître l'identité des isolats.

5.1 Caractères cultureux

Après ensemencement sur milieu ISP2, les colonies d'actinomycètes apparaissent au bout de 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Après, deux semaines d'incubation, les isolats donnent des colonies de tailles et de formes variables, poudreuses ou granuleuses de différentes couleurs de mycélium aérien (blanc, orange, beige, jaune, noir). L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être beige, orangé, jaune, marron ou brun. Les colonies sont rondes à contours irréguliers, opaques, d'aspect corné et de surface poudreuse. Le mycélium aérien a pris progressivement une couleur beige foncé à marron clair. Ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens. Les colonies adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension. La figure 12 illustre les caractères cultureux des actinomycètes.

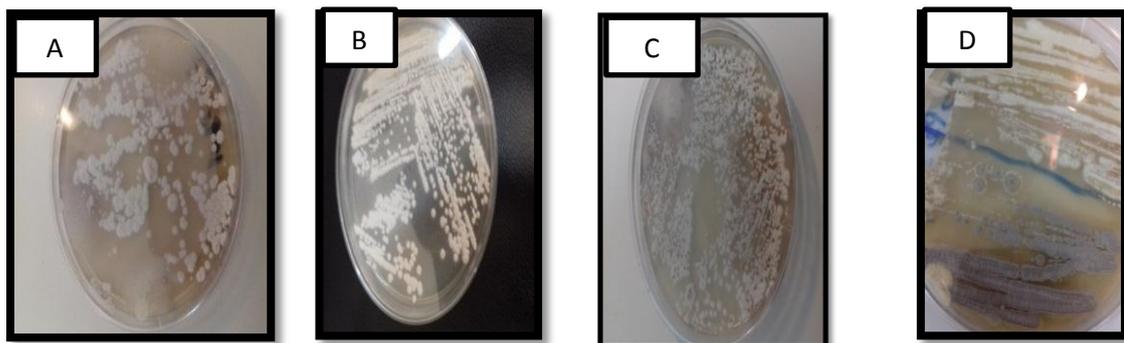


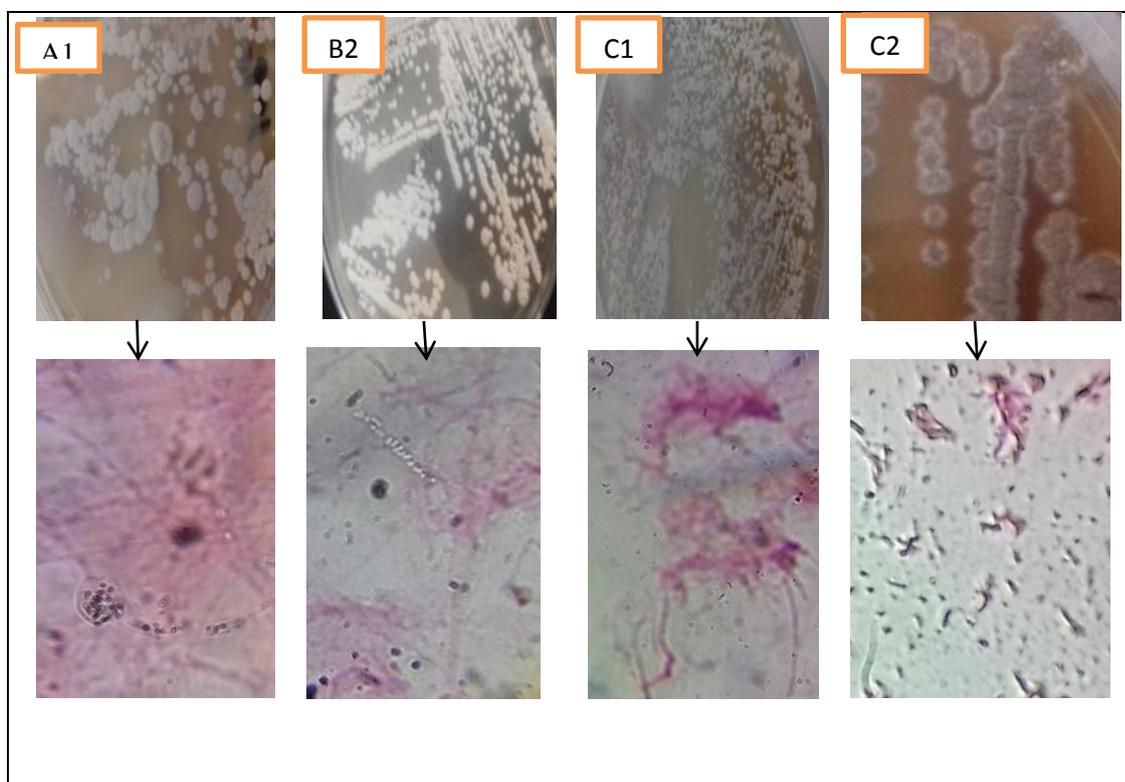
Figure 12 : Caractères cultureux des actinomycètes.

5.2. Caractères morphologique

Les observations microscopiques des mycéliums aériens des isolats mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés. L'examen microscopique après coloration Gram montre que tous les isolats sont Gram positifs. Les spores portées à l'extrémité des hyphes sont droites et ne présentent aucune mobilité. Le mycélium végétatif est long, arborescent, non fragmenté et ne portant pas de spores. Le tableau 5 et la figure 13 illustrent les caractères morphologiques des actinomycètes.

Tableau 5 : Caractères morphologiques des actinomycètes.

isolats	Macro morphologies	Micro morphologies	Diamètre des colonies (mm)
A1	Colonies blanchâtre à contour irrégulier sous forme de chou-fleur	Cocci en chaîne	2 à 7
B2	Blanc cassé. Colonies de grande taille avec un contour arrondi.	Bacilles en chaîne	2 à 4
C1	Blanc cassé, gris, jaune Orangé. colonies grises foncées, adhérent entre elles, poudreuses	Bacilles en chaîne	1 à 3
C2	Colonies grise, blanc cassé, gris. adhérent entre elles.	Bacilles en chaîne	2 à 4

**Figure 13:** Caractères morphologiques et microscopiques des quatre isolats d'actinomycètes.

5. Conservation des isolats

Les isolats obtenus sont conservés soit à 4 °C sur des géloses inclinées avec un repiquage tous les deux mois (**Hilali *et al.*, 2002**) soit à -20°C en suspension en présence de glycérol à 20% (v/v) (**Kitouni, 2007**). La Figure 14 montre la conservation des isolats d'actinobactéries dans les tubes contenant le milieu ISP2 gélosé incliné après 14 jours d'incubation.



Figure 14 : Conservation des isolats d'actinobactéries dans des tubes contenant le milieu ISP2.

7. Résultats de l'étude physiologique et biochimiques de isolas

7.1. Hydrolyse de l'amidon

L' α -amylase comme toutes enzymes, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. L' α -amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie (**Scriban, 1993**). Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les cultures sont recouvertes avec 5 à 10 ml de solution de lugol. Nous observons des zones de lyse de différente dimension. Les zones claires sont les témoins de la dégradation de l'amidon. Nos résultats montrent que les quatre isolats d'actinobactéries hydrolysent l'amidon en glucose (Figure 15).

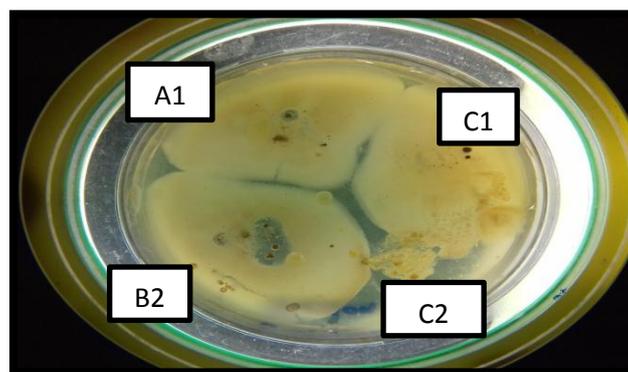


Figure 15 : Résultats de la dégradation de l'amidon.

7.2. Hydrolyse de la caséine

La caséine est une protéine du lait, peut-être hydrolysée par certaines espèces bactériennes. La présence d'halo d'éclaircissement autour de la culture signifie que les résultats sont positifs. Les résultats présentés par la Figure 16 montrent que tous les isolats testés hydrolysent la caséine et possèdent donc une caséinase.

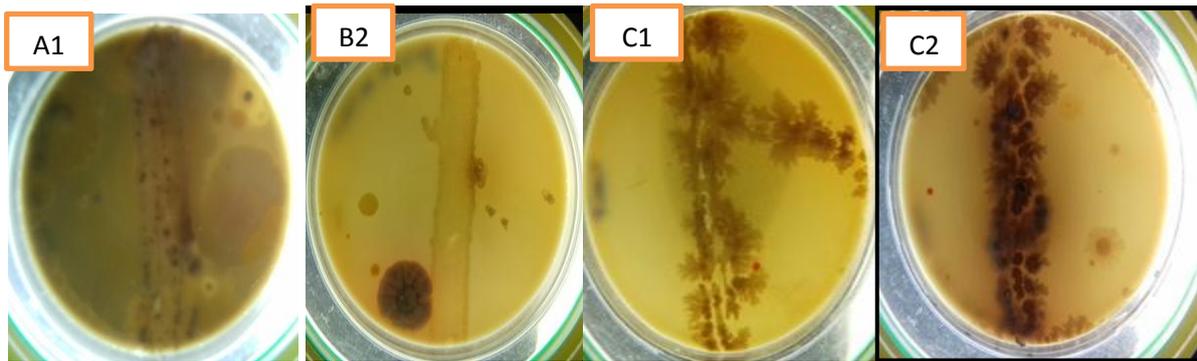


Figure 16 : Résultats de l'hydrolyse de la caséine pour les quatre isolats bactériens

7.3. Hydrolyse de la gélatine

Ce test constitue une technique simple utile dans l'identification des actinomycètes. Il peut être réalisé soit sur gélatine solidifiée en culot en tube à essai est ensemencée par piqûre centrale, soit en boîte de Pétri. Les résultats illustrés par la Figure 17 montrent des zones claires autour des cultures bactériennes permettant de conclure que le germe est gélatinase +. Ce résultat positif a été enregistré chez l'ensemble des isolats testés. Notons aussi que les diamètres des zones varient selon l'espèce bactérienne, et que l'isolat A1 présente une importante activité.

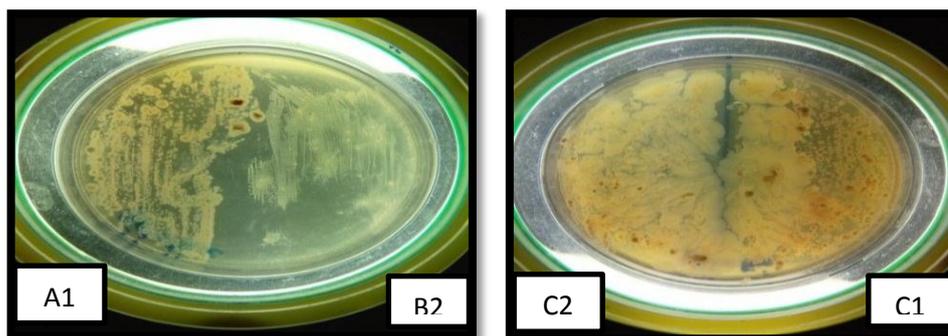


Figure 17 : Résultats de l'hydrolyse de la gélatine.

7.4. Pouvoir hémolytique

Ce test sert aussi à l'identification des actinomycètes. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h, nous avons constaté une absence de zone claire autour des colonies chez l'ensemble isolats testés, cela signifie que ces germes ne présentent aucun pouvoir hémolytique (Figure 18).

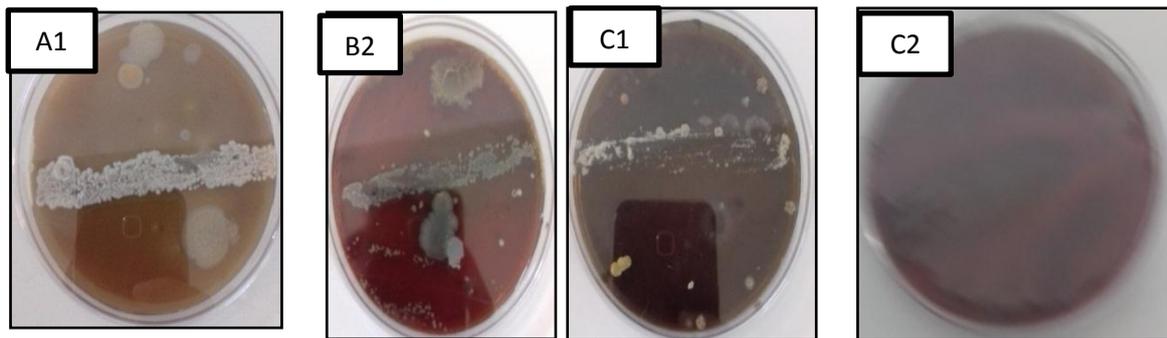


Figure 18 : Résultats du test de pouvoir hémolytique des isolats.

7.5. Résultats du métabolisme glucidique (source de carbone)

L'étude de l'assimilation des hydrates de carbone par les actinobactéries est fondamentale dans l'identification des bactéries (Bouras *et al.*, 2013 ; Suneetha *et al.*, 2011; Dehnad *et al.*, 2010). Or, la plupart des études taxonomiques ou de criblage d'actinomycètes performants utilisent ce test pour connaître le métabolisme glucidique des isolats afin de les caractériser pour des études ultérieures. Les résultats de ce test illustrés par la Figure 19 ont permis de constater que les isolats d'actinomycètes cultivés se développent sur les différentes sources de carbones étudiés. Il est à noter que les résultats de l'assimilation des sucres par les deux isolats d'actinomycète sont représentés en annexe 2.

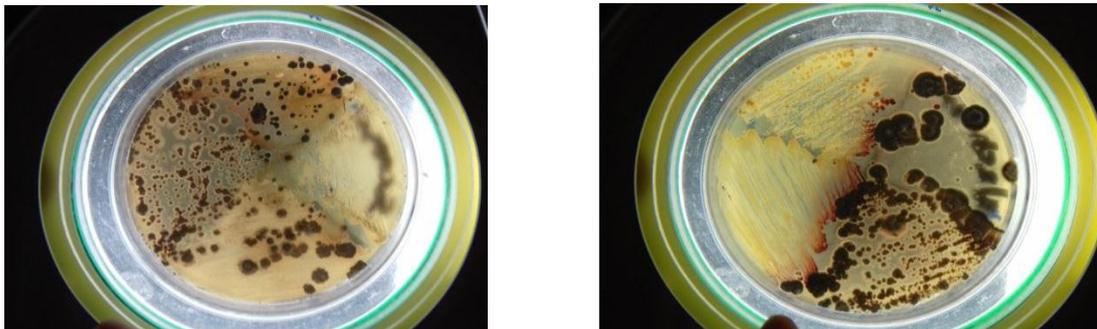


Figure 19: Résultats de l'assimilation des sucres par les actinobactéries

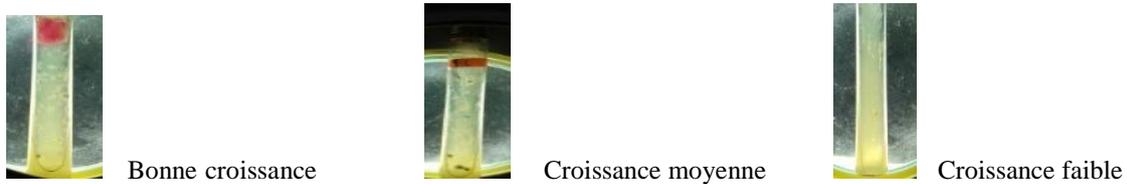
7.6. Résultats de la tolérance au chlorure de sodium (Na Cl)

La majorité des bactéries, à l'exception de celles qui vivent dans des biotopes salés se développent en présence de faibles concentrations en sel. Les résultats de la croissance des isolats d'actinomycètes en présence de Na Cl montrent que les quatre isolats tolèrent les différentes concentrations testées jusqu'à 10 % de Na Cl. Cette croissance est exprimée par un développement au sein du milieu ensemencé. Cependant, seulement l'isolat A1 qui semble croître très faiblement aux deux concentrations extrêmes 3 et 10 %. En revanche, l'optimum de croissance des isolats est enregistré à la concentration de 7%. Le tableau 6 et la Figure 20 illustrent les résultats de la tolérance des isolats aux différentes concentrations de Na Cl. Les résultats sont représentés en annexe 3.

Tableau 6 : Résultats de la tolérance aux différentes concentrations de Na Cl %.

	Croissance à différentes concentrations de Na Cl (%)				
	3	5	7	9	10
A1	-/+	+	+	+	-/+
B2	+	+	+	+	+
C1	+	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+

(+) : bonne croissance ; (-/+) : croissance moyenne

**Figure 20** : Croissance des isolats d'actinomycètes à différentes concentrations de Na Cl.

7.7. Résultats de la croissance des isolats à différentes températures

En général, les actinomycètes sont des bactéries mésophiles, se développent dans une gamme de température allant de 15 à 37°C, avec un optimum de 28°C. Cependant, un grand nombre d'entre elles tolèrent des variations de températures. Le tableau 7 et la Figure 21 présentent les résultats de la croissance des isolats d'actinobactéries à différentes températures expérimentées. A travers ces résultats, nous constatons que la température de croissance des quatre isolats se situe entre 15 et 30°C, avec un optimum d'environ 28 °C. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (**Kroppenstedt et Evtushenko ,2006**). Par ailleurs d'autres études ont signalé que certaines espèces d'actinobactéries ont la capacité de croître même à une température supérieure à 40 °C (**Petrosyan et al., 2003**). De même, ces isolats sont inhibés à 5°C. En revanche, une faible croissance des isolats a été observée à la température de 37°C.

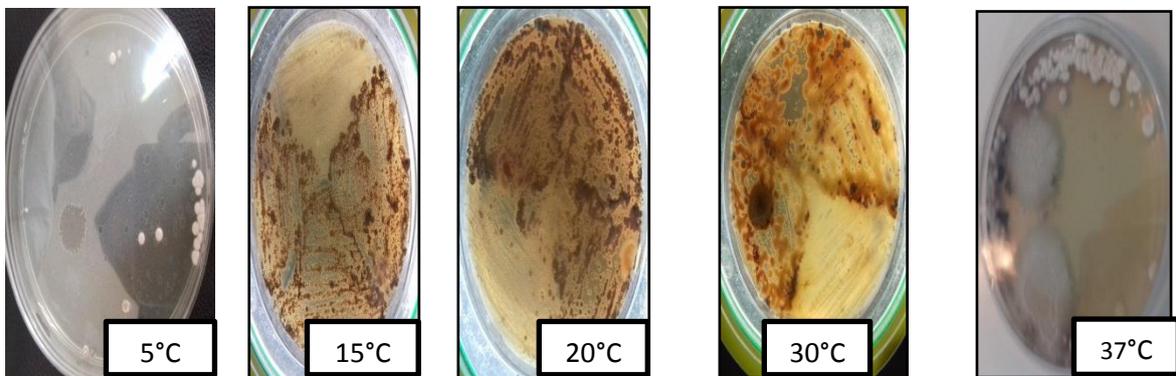
**Figure 21** : Résultats de la croissance des actinobactéries à différentes températures.

Tableau 7 : Résultats de la tolérance des isolats à différentes températures

Actinobactéries	Croissance à différentes températures (°C)				
	5	15	20	30	37
<i>A1</i>	-	+	+	+	-/+
<i>B2</i>	-	-/+	+	+	-/+
<i>C1</i>	-	-/+	+	+	-/+
<i>C2</i>	-	+	+	+	-/+

(-) : absence de croissance ; (+) : bonne croissance ; (-/+) : faible (légère) croissance

7.8. Résultat du test de sensibilité aux antibiotiques

Les antibiotiques antibactériens sont des substances dont l'action antibactérienne s'exprime : soit en inhibant la multiplication des bactéries, c'est l'effet bactériostatique ou bactériostase, soit en les détruisant, c'est l'effet bactéricide ou bactéricidie. La sensibilité et la résistance des isolats ont été évaluées selon les critères suivants :

Diamètre de la zone d'inhibition \geq à 15 mm = isolat sensible ; diamètre \leq à 14 mm = isolat intermédiaire ; absence de zone d'inhibition = isolat résistant.

D'après les résultats, les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques apparaissent claires avec des bordures distinctes. L'analyse des résultats obtenus du test de la sensibilité aux antibiotiques a montré que les quatre isolats d'actinomycètes se sont révélés résistants à la majorité des antibiotiques étudiés. Ces mêmes isolats se sont montrés sensibles à Ciprofloxacine (CIP) et Cefazoline avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 28 à 50 mm. En présence de l'érythromycine, les isolats A1 et C1 se sont révélés sensibles avec des diamètres de zones d'inhibition de 23 et 25 mm respectivement. En revanche, les deux autres isolats B2 et C2 se sont montrés résistants au même antibiotique précité. Il est à noter que les quatre isolats d'actinomycètes présentaient une sensibilité élevée en présence de la ciprofloxacine dont le diamètre des zones d'inhibition se situe entre 35 et 40 mm, Les résultats du test de la sensibilité aux antibiotiques sont illustrés par la figure 22 et décrits par le tableau 8.

Tableau 8 : Sensibilité des isolats d'actinobactéries aux différents antibiotiques testés.

Antibiotiques	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	A1	B2	C1	C2
Tirmethoprin	R	R	R	R
colistine sulfate	R	13	R	R
Erythromycine	23 (S)	R	25 (S)	R
Oxacilline	R	R	R	R
Ampicilline	R	R	R	R
Trimethnomycin	R	R	R	R
Pénicilline (P)	R	25	R	R
Ciprofloxacine	50 (S)	35 (S)	40 (S)	45 (S)
Gentamicine	R	R	R	R
Cefazoline	35 (S)	28 (S)	35 (S)	45 (S)

R: Isolot résistant; S: Isolot sensible

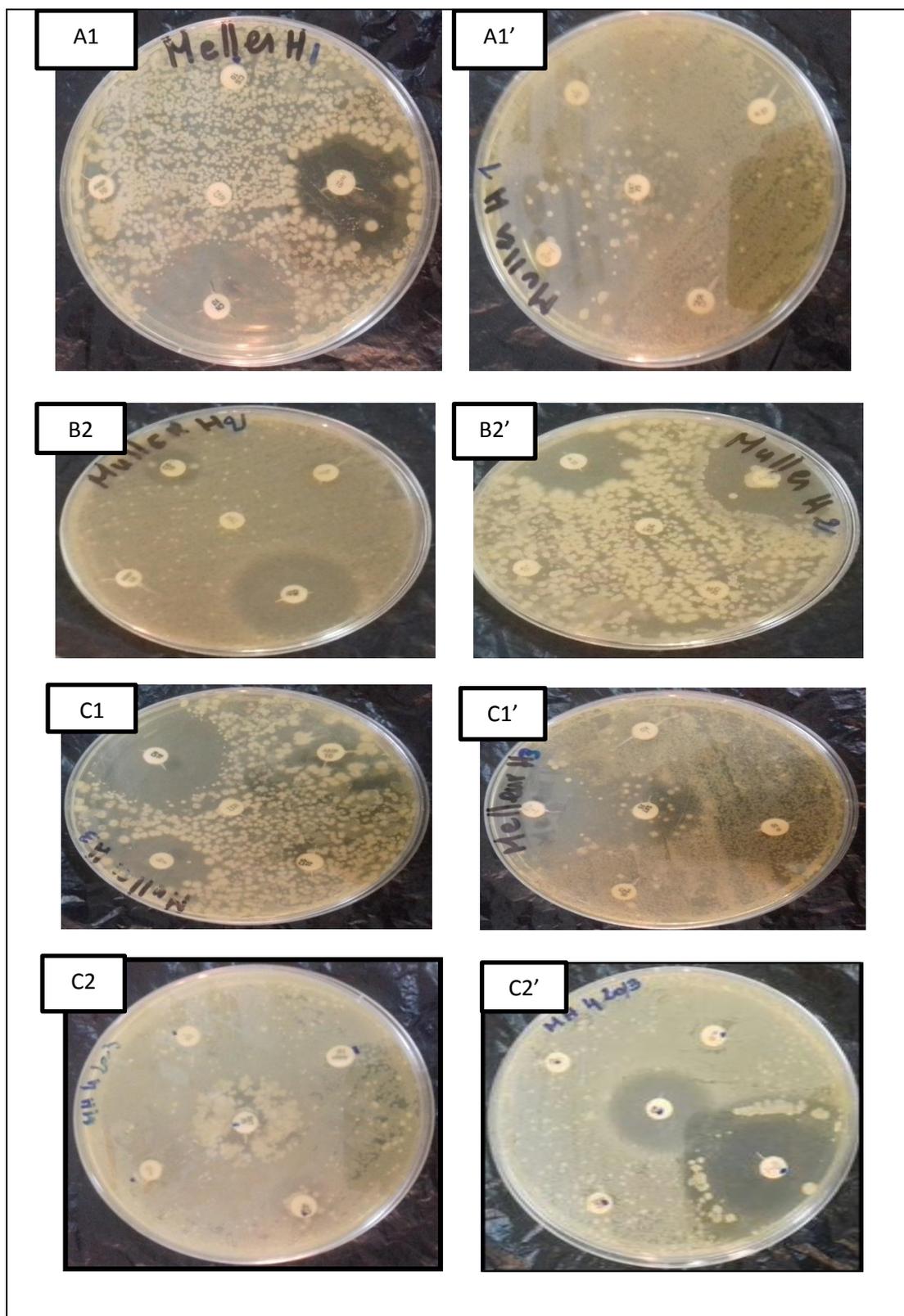


Figure 22 : Résultats de l'antibiogramme sur le milieu Muller Hinton

Les tests biochimiques et physiologiques effectués au cours de cette étude sont utiles et nous fournissent des éléments essentiels pour l'identification des actinomycètes. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques précitées des isolats étudiés, le profil de dégradation de certains carbohydrates et l'antibiogramme laissent supposer que les quatre isolats peuvent appartenir au genre *Streptomyces*. Le tableau 9 résume les résultats de ces tests.

Tableau 9 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats bactériens.

Caractéristiques	A1	B2	C1	C2
<u>Source de carbone</u>				
Glucose	+	+		
Fructose	+	+		
Xylose	+	+		
Lévulose	+	+		
Sucrose	+	+		
maltose	+	+		
galactose	-	+		
Hydrolyse de la caséine	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+	+
Pouvoir hémolytique	-	-	-	-
Croissance en présence du Na Cl				
0 %	- / +	+	+	- / +
3 %	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+
7 %	+	+	+	+
9 %	+	+	+	+
10 %	+	+	+	+
Croissance à différentes températures				
5°C	-	-	-	-
15°C	+	- / +	- / +	+
20°C	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+
37°C	- / +	- / +	- / +	- / +

➤ **Discussion**

L'étude des caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques des isolats d'actinomycètes est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. La plupart des isolats développent des colonies après 48 à 72 h d'incubation. D'après les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques réalisés, les quatre isolats obtenus à partir des échantillons de sol se rapprochent au genre *Streptomyces*.

8. Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinomycètes

8.1. Résultats des essais de confrontation directe

Les tests de confrontation directe entre les deux protagonistes (actinomycètes / champignon) et aussi l'incorporation des filtrats de culture des souches d'actinomycètes représentent des critères de sélection des isolats bactériens performants.

La confrontation directe des 04 isolats d'actinomycètes avec le *V. dahliae* sur le milieu de culture PDA, nous a permis de mettre en évidence l'aptitude de ces isolats à inhiber la croissance mycélienne du pathogène (Figure 23). L'action antagoniste se traduit par une faible croissance mycélienne de l'agent pathogène durant les 03 premiers jours d'incubation, suivi d'un arrêt du thalle de *V. dahliae* du côté de la confrontation par rapport au témoin. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *V. dahliae*, varie d'une souche d'actinomycète à une autre. Les souches (B2 et C2), représentent respectivement les pourcentages les plus élevés, 68 % et 72 %. Les deux autres isolats présentent des pourcentages d'inhibition légèrement moyens (Figure 24).

La colonie de *V. dahliae* correspondant au témoin a atteint environ 45 mm de diamètre après une semaine d'incubation, alors qu'en présence des quatre isolats d'actinomycètes précédemment citées, le diamètre de *V. dahliae* ne dépassait pas 16 mm. En tenant compte des résultats de ce test, les quatre bactéries ont été retenues pour le test des filtrats de culture.

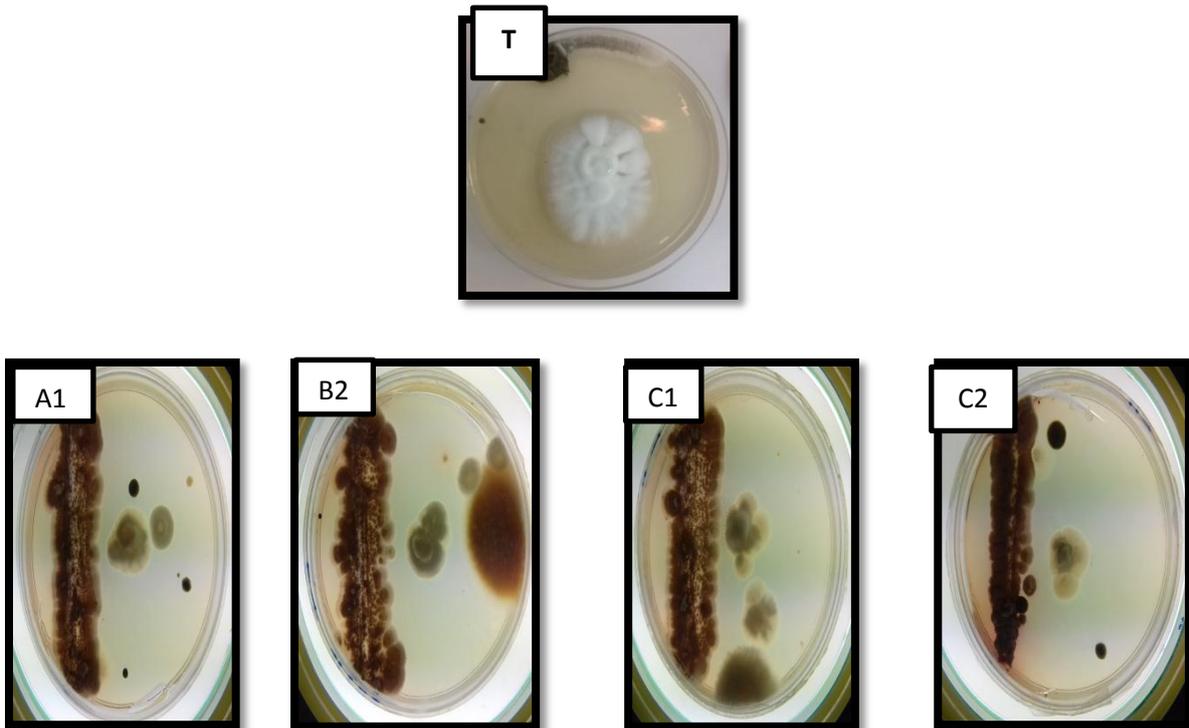
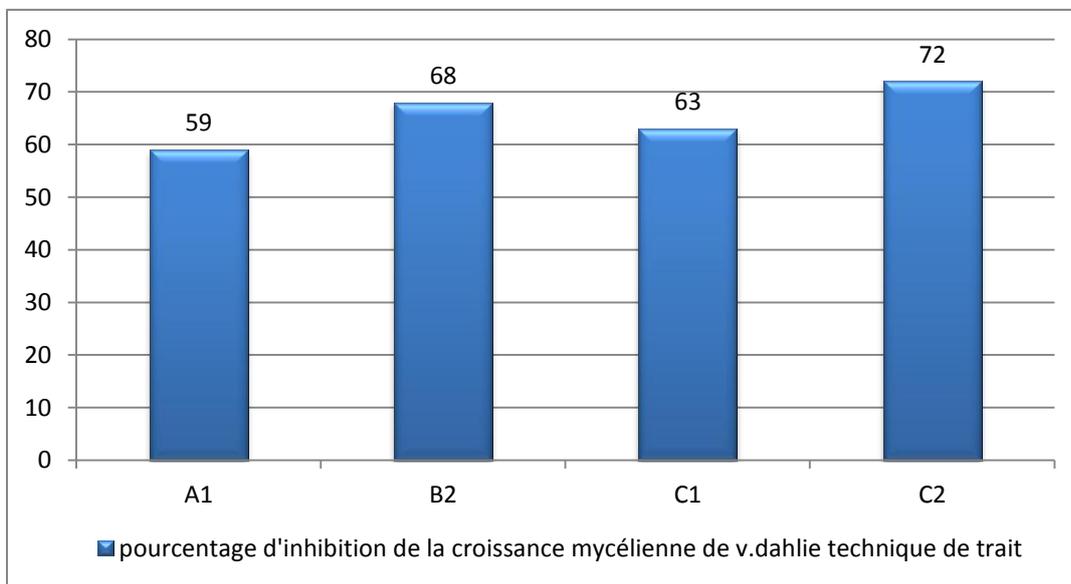


Figure 23: Résultats des essais de confrontation directe

Figure 24 : Diagramme représentant les pourcentages moyens d'inhibition de la croissance de *V. dahliae* par la technique de confrontation directe.



8.2. Résultats des essais de filtrats de culture d'actinomycètes sur la croissance de *V. dahliae*

Les résultats de l'action des filtrats de culture des actinobactéries sur la croissance mycélienne de *V. dahliae* sont illustrés par la Figure 25, Ces résultats ont montré que les filtrats de culture se sont révélés très actifs vis-à-vis de *V. dahliae* par rapport au témoin. En présence des filtrats des isolats B2 et C2, nous avons constaté un arrêt de croissance mycélienne de *V. dahliae* après 3 à 4 jours de culture.

L'action des filtrats de culture pourrait être liée à la nature et à la quantité des substances actives et surtout au principe actif, secrétées par les isolats d'actinomycète. Selon certains auteurs, la composition en nutriments a un effet sur la production d'antibiotiques par les actinobactéries (Sivasithamparam et Parker, 1980 ; Whipps., 1987).

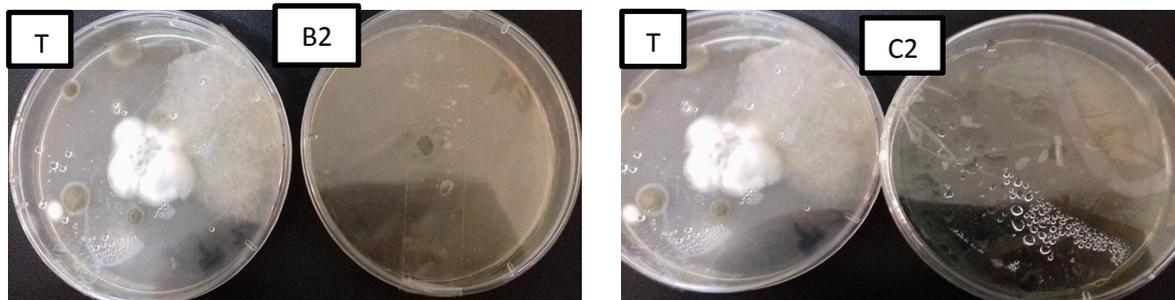


Figure 25 : Résultats des essais d'incorporation des filtrats de cultures d'actinobactéries.

➤ Discussion

D'ailleurs, l'activité antifongique est assez répandue chez les actinobactéries, elle a été déjà montrée vis-à-vis de *Verticillium dahliae* (Harir *et al.*, 2018). La variation des résultats peut être expliquée en partie par le fait qu'une espèce d'actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (Boughachiche *et al.*, 2005). Il est à signaler également que certains champignons possèdent la capacité de synthétiser des enzymes, qui inactivent l'antibiotique de l'actinobactérie en modifiant sa structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973).

CONCLUSION

Conclusion

Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (70 % par le genre *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes. L'objectif de cette contribution a été la sélection d'isolats d'actinomycètes ayant des propriétés antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae*, agent de la verticilliose de l'olivier. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité biologique de quelques isolats vis-à-vis de *V. dahliae*.

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des isolats d'actinomycètes est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. La plupart des isolats développent des colonies caractéristiques après 3 à 4 jours d'incubation. Selon **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérés comme des caractères stables. Après deux semaines d'incubation, le mycélium aérien présente une gamme de couleur assez variée. Ce caractère représente une des clefs de détermination du genre de *Streptomyces*. Ce dernier est considéré comme un des genres les plus dominants des actinomycétales (**Williams et Wallington, 1983**). En effet, **Lechevalier et Lechevalier (1967)** ont montré que la fréquence de *Streptomyces* dans le sol est significativement importante par rapport à d'autres genres. D'autres auteurs ont identifié des genres d'actinomycètes par observation des chaînes de spores au microscope optique.

Généralement, tous les isolats développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. L'ensemble des isolats obtenus sont capables de métaboliser l'amidon et la caséine, pour assurer la source de carbone et d'azote, dégradent aussi la gélatine. Les quatre isolats d'actinomycètes se développent à des températures comprises entre 20 et 30°C et tolèrent les différentes concentrations en sel testées. La majorité des isolats se sont révélées insensibles aux antibiotiques testés. Les résultats des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des actinomycètes étudiés montrent que ces bactéries présentent des caractères communs ; ces résultats laissent penser que ces actinomycètes se rapprochent du genre *Streptomyces*.

Les résultats des essais de confrontation et d'incorporation des filtrats de culture ont montré que les isolats testés présentent une activité antagoniste non négligeable vis-à-vis de *V. dahliae*.

Au terme de ce travail, il est souhaitable de continuer sur cet axe de recherche, relatif aux microorganismes bénéfiques du sol, qui mérite d'être élargi et étalé sur un échantillonnage très varié. Il est donc important d'isoler et de sélectionner une gamme importante d'actinomycètes à partir des écosystèmes originaux, complexes et hostiles ayant des propriétés antagonistes intéressantes pour mieux les utiliser comme biopesticides dans le domaine agricole.

*Référence
bibliographique*

A

- **Adegboye M. F., Babalola O. O. (2012).** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*. 7. N° 15. 2255-2261.
- **Agrios G.N. (1988).** *Plant pathology*. 3^e édition, academic press, New York 529 p
- **Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. (2011).** *écologie microbienne de la grotte lascaux*. 126p.
- **Alauzet C. (2009).** Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse de doctorat: université Nancy. 348p.
- **Alfano G., Lustrato G., Lima G., Vitullo D., Ranalli G. (2011).** Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Boil, Control.*, 58: 199-207
- **Almaris N. Alonso. (2007).** Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytique actinomycetes *Thermobifida fusca*. UMI. Pp: 134.
- **Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P. (2016).** An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D., Jiang Y. (eds) *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Intech, Rijeka, Pp. 3-37.
- **Andriambololona T. (2010).** Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. Thèse de doctorat. Université d'antananarivo, Pp. 5-10.
- **Ara. I, Bukhari. N. A, Wijayanti. D. R. & Bakir. M. A. (2012).** Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11(16). 3849-3857p.
- **Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., Daayf, F., Cherif, M. (2007).** Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 470–479.
- **Arslan M., Dervis S. (2010).** Antifungal activity of essential oils against three vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World J. microbial, Biotechnol.*, 26: 1813-1821
- **Avril, J, L., et al. (1992).** *Bactériologie clinique*. 2^e éd. Paris : ellipses. Pp. 511.

B

- **Baldacci, E. (1962).** Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 4 : 633–646.
- **Becker. B, Lechevalier. M. P, Gordon. R. E & Lechevalier. H. A. (1964).** Rapid Differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole-Cell Hydrolysates. *Applied microbiology*. Vol 12, N ° 5. Pp: 421-423.
- **Beckers. h. J. A. Van Der Hoeven. J. S. (1982).** Growth Rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* During Early Colonization of Tooth Surfaces in. *Gnotobiotic Rats. Infection and immunity*. Vol. 35. N°. 2. Pp: 583-587.
- **Bejarano-Alcázar J., Blanco-López M.A., Melero-Vara J.M., Jiménez-Díaz R.M. (1996).** Etiology, importance, and Plant Soil distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Dis* 80:1233– 1238.
- **Bellahcene M, (2004).** La verticilliose de l'olivier: étude épidémiologique et diversité génétique de *Verticillium dahliae* *Kleb.*, agent de la verticilliose. Thèse de doctorat d'état es Science, Université d'Oran, Algérie, 145 p.

- **Bellahcene M. (2004).** La verticilliose de l'olivier : étude épidémiologique et diversité génétique de *Verticillium dahlia kleb*, Agent de la verticilliose. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Oran (Algerie). 144pp.
- **Benchabane M. (1990).** Observation des cas de verticilliose de l'olivier à Cap-Djinet et Sidi-Aïch. Rapport de mission. ITAF, Algérie. 5 p.
- **Boisson C., Lahlou H. (1982).** Etude du polymorphisme intraclonale chez le *Verticillium albo-atrom*, forme à microscélérotés .III. Morphologie et morphogénèse comparées de deux isolats de phénotypes sauvages et leurs principaux variants. Conseil National du Canada, 188-196.
- **Bollinger O., (1877).** Ueber eine neue Pilzkrankheit beim Rinde. Centralbl. f. med. Wissenschf., 15, 481-485. Paper presented May 16, 1877 before Gesellschf. f. Morph. u. Physiol. zu Muinchen. In The nomenclature of the *Actinomycetaceae*. Breed R. S. and Conn H. J. (1919). J. Bacteriol. 585-602.
- **Boucheffa K. (2011).** Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques nonpolyèniques: Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse MagisterEn microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira Bejaia.90p.
- **Boudemagh A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse doc en microbiologie appliqué : Université Mentouri Constantine.144p.
- **Boudjella. H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach – Alger.
- **Boukenadel F. (2001).** Contribution à l'étude de *Verticillium dahliae* Kleb., agent de la verticilliose de l'olivier. Mém. Magister, Univ. Tlemcen (Algérie), 103p
- **Boukenadel F. (2002).** Contribution à l'étude de *Verticillium dahlia* agent de la verticilliose de l'olivier. Mémoire de Magister, Univ. Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 103p
- **Bouras N., Meklat Toumatia O., Mokrane S., Holtz D.M., Strelkov E., Stephen Sabaou N. (2013).** Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces sp.* PP14 isolated from Canadian soil, African Journal of Microbiology Research, 7 (25), 3199-3208.
- **Burman N.P. (1973).** The occurrence and significance of actinomycetes. In: Actinomycetales. Characteristics and practical importance. Academic Press (Ed).219-230.

C

- **Chaphalkar S.R., Dey S.(1996).** Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. Actinomycete. 7(2): 47-54.
- **Chawla S., Woodward JE., Wheeler T.A. (2012).** Influence of *Verticillium dahliae* Infested Peanut Residue on Wilt Development in Subsequent Cotton. International Journal of Agronomy, Volume 2012, 212075, 5.
- **Chun J., Seang C.N., Lee K. J., Kang S.A., Goodfellow M. et HahV.C. (1998).** *Nocardia flavorosea* sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48(3), 901–905.
- **Cirulli M., Montemurro G. (1976).** A comparaison of pathogenic isolates of *Verticillium dahlia* and sources of resistance in olive. Agr. Conspeustus Scientificus, 39 : 469-476.
- **Civantos L. (1999).** Contrôle des parasites et des maladies de l'olivier. (eds.). Conseil Oleicole International, Madrid, (Espagne). 207p
- **Civantos L., (1999).** Contrôle des parasites et des maladies de l'olivier. COI (Ed.), Madrid, Espagne, pp. 111-144.

- **Costache M., Lactusu V., Tomescu A., Mandricel M., (1979).** Studies on the factors predisposing cucumber plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* and *Verticillium dahliae*. *Probleme de Protectia Plantelor*, 7(1): 51-60.
- **Cundell D.R., Piechoski M.P. (2016).** Potentially novel Actinobacteria derived antibiotic from unique microenvironments. In: *Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds*. (Dhanasekaran et al. 2010, Eds), P.83-98, CRC Press, New York.

D

- **Daayf F. (1993).** La verticilliose de cotonnier, pouvoir pathogène et diversité génétique de *Verticillium dahliae*. Réaction de la plante à l'infection. Thèse de Doctorat, Univ. Montpellier II, Science et Technique du Languedoc, Montpellier, France, 202p.
- **Danilenko V.N., Mironov V.A., Elizarov S.M. (2005).** Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 319–329.
- **Dehnad Alireza, ParsaLalle, BakhshiRouhollah, Soofiani Samad Abdi & Mokhtar zadehAha. (2010).** Investigation of antibacterial activity of Streptomyces isolates from soil samples, West of Iran, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (14): P 1542-1549.
- **Dennis C., Webster J., (1997).** Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57, 25–39.
- **Dervis S., Erten L., Soylu S., Tok F.M., Kurt S., Yildiz M. (2007).** Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in Western Turkey. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 119 : 437–447.
- **Dgigal. D. (2003).** Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérioses : effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp : 157.
- **Djinni I. (2009).** Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaïa. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A. Mira de Bejaïa. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Microbiologie.

E

- **El-Nakeeb, M., Lechevalier, H. (1963).** Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol.* Vol: 11. N°: 2. Pp. 75-77.
- **Euzéby J.P. (2010).** List of bacterial names with standing in nomenclature.

F

- **Fan I., Zheng J., Yang X. (2010).** The effect of natural air-dry time on actinomycetes Isolation from sample soil. *Journal of Hainan Medical University*.
- **Fradin E.F., Thomma B.P.H.J. (2006).** Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant. Pathol.*, 7: 71–86.
- **Fravel D.R., Larkin R.P. (2000).** Effect of sublethal stresses on microsclerotia of *Verticillium dahliae*, In: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R.(eds), *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN, USA. 301-306.

G

- **Garber R.H., Houston B. (1966).** Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in cotton plants. *J. Phytopathol.*, 56:1121–1126.

- **Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*, 38,375–389.
- **George M., Anjumol A., Mohamed Halta A.A. (2012).** Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African journal of Microbiology Research*, 6(10), 2265-2271.
- **Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*7, 373-390.
- **Geraldine, M., Schofield, M., Schaal, K. P. (1981).** A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J Gen Microbiol*, 127(2): 237–259.
- **Goodfellow M et Minnikin D.E. (1981).** Lipids in the classification of actinomycetes. *Zbl. Bakteriol. Hyg. Suppl. Vol: 11. Pp: 99-109.*
- **Goodfellow M. (2012).** Phylum XXVI. Actinobacteria phyl.nov. In: Goodfellow et al.; (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1–28
- **Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Withman W.B. (2012).** *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria (2ème Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London.p. 2083.*
- **Goodfellows M., Williams S.T. (1983).** Ecology of Actinomycètes. *Annual Review of Microbiology*.37: 189-216.

H

- **Harir. M, Bellahcen Miloud, Baratto MariaCamilla, Pollini Simona, Rossolini Gian Maria, Trabalzini Lorenza, Fatarella Enrico, Pogni Rebecca. (2018).** Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes. *Journal of Biotechnol. jan 10 ; 265:54-64.*
- **Harir. M. (2018).** Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi-arides d'Algérie. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1 - Ahmed Ben Bella – Oran.
- **Hawker. L.E., Linton A.H. (1971).** *Mico-organismes. Pp: 325-333.*
- **Henni J.E. (1982).** Contribution à la lutte contre le Verticilliose : facteurs physico-chimiques et biologiques inhibant la germination des microsclerotes de *Verticillium dahliae* Klebahn. Thèse. Doct. D'Etat. Univ. Paris (France). 150pp
- **Hiemstra J.A., Harris D.C. (1998).** Some general features of *Verticillium* wilts in trees. In: Hiemstra JA, Harris DC (Eds) *A compendium of Verticillium wilts in tree species*. Ponsen and Looijen, Wageningen. 5–11.
- **Hilali L., Khatabi A., Nassrallah N., Malki A. et finance C. (2002).** Isolement des nouvelles souches actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Revue .Biol .Biotech. 2, 49-53.*

I

- **Inam-ul-Haq M., Javed N., Ahmad R., Rehman A. (2003).** Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2(1): 65-74.
- **Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., Ayed F., Jebari H., El- Mahjoub M. (2007).** Incidence of *Verticillium* wilt of melon in Tunisia. *Afr. J. Plant Sci. Biotechnol.*, 56: 726-726.

J

- **Jakimowicz D. (2007).** Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej*. 61: 565-575.
- **Julien J. (2005).** Verticilliose des arbres ; la mort par apoplexie. *PHM-Revu. Horticol.*, 474:44-47.

K

- **Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrême. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état en Microbiologie appliquée. Université des frères Mentouri Constantine. 170p.
- **Kitouni. M., Boudemagh. A., Oulmi. L., Reghioua. S., Boughachiche. F., Zerizer. H., Hamdiken. H., Couble. A., Mouniee. D., Boulahrouf. A., Boiron. P. (2005).** Isolation of actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463
- **Klebahn, 1913.** Beitrage zur kenntnis der fungi imperfecti. I Eine *Verticillium* krankheit auf dahlien. *Mycol. Central blat. B-III. Heft., 2* : 29 – 66.
- **Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao K.V. (2009).** Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47:39–62.
- **Krassilnikov, N.A. 1938.** *Microbiologia (U.S.S.R.)*, 7, 335.
- **Kroppenstedt. R. M., Evtushenko. L. I (2006).** The Family Nocardioseae. In the prokaryotes 3rd edition. Springer: New York. Pp: 754–795.
- **Kumar R., Tapwal A., Kumar Borah R. (2012).** *Verticillium* Wilt infecting *Parkia roxburghii* seedling in manipur india. *Academic Journal Inc.*, 1-6.
- **Kurtbaeke D.I. and Wildman H.G. (1998).** Accessing Australian biodiversity, towards an improved detection of Actinomycetes. 9 (1-2), 10-13.

L

- **Laouane H., Lazrek H.B., Sedra M.H. (2011).** Synthesis and toxicity evaluation of cinnamyl acetate: a new phytotoxin produced by a strain of *Verticillium dahlia* 252 pathogenic on olive tree. *Intl. J. Agr. Biol.*, 13:444-446.
- **Larpent J.P., Larpent G.M., (1990).** Memento technique de Microbiologie. Editions Tec. & Doc. Lavoisier
- **Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Editions Masson. Paris, 481p.
- **Lechevalier H.A., Lechevalier, M.P. 1967.** Biology des actinomyces. *Ann Rev Microbiol*, 21 : 71 – 100
- **Lechevalier., Lechevalier, (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Vol : 20. N°: 4. Pp. 435-443.
- **Lefebvre. T. (2008).** Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leur microflore actinomycétale: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé : Paris. Pp : 168.
- **Lola J., Mehna AM., Abou Chaar M., Selti MN., Adama F. (2011).** Diversité génétique de *Verticillium dahliae* Kleb ; Agent causal de la verticilliose du coton en syrie. *Arab J. Pl. Prot.* Vol. 29, No. 1.8 pages.
- **López-Escudero F.J., Blanco-López M.A., del Río R.C., Caballero Reig J.M. (2007).** Response of olive cultivars to stem puncture inoculation with a defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Hort Science*, 42:294–298.

- **López-Escudero F.J., del Río C., Caballero J.M., Blanco- López M.A. (2004).** Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 110 : 79–85.
- **Loqman S., Barka E.A., Clement C. and Ouhdouch Y. (2009).** Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil
- **Loucif K. (2011).** Recherche des substances antibactériennes à partir d'une collection des souches d'actinomycètes .caractérisation préliminaires de molécules bioactives. Mémoire de magister de microbiologie, Université Mentouri – Constantine, 21p.
- **Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V., Woeng C.A., Thomas F.C. (2003).** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, 153: 503–523.

M

- **Malik S. (2008).** Contribution à l'étude du pouvoir pathogène de *Verticillium dahliae* (Kleb) agent de la verticilliose. Mémoire de Magister en Phytopathologie., C. Univ. Mustapha Stambouli, Mascara, Algérie, 88p
- **Martin-Lapierre A. (2011).** Application de composts et de fumigants pour lutte contre la Verticilliose (*Verticillium dahliae*) du fraisier. Thèse. Doc. D'Etat. Univ. Laval (Canada).108p.
- **McKinney. R.E. (2004).** Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448.
- **Meklat A. (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'Actinopolyspora. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba - Alger, 211p.
- **Mercado-Blanco J., Rodriguez-Jurado D., Hervas A., Jimenez-Diaz R.M. (2004).** Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*. 30: 474-486.
- **Mesian C.M., Lafon R. (1970).** Lesmaladies des plantes maraichères. 2^{ème}(eds.). INRA, France, 441p
- **Messaoudi O. (2012).** Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar). These de doctorat 106 p.
- **Messaoudi O. (2003).** Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar). Thèse de Magistère en Microbiologie Appliquée. Université Abou BakrBelkaid Tlemcen. 78p.10.
- **Messaoudi O. (2013)** .contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolite antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Béchar) Pp.
- **Meyer J.M., Abdallah M.A. (1978).** The fluorescent pigment of *pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen.Microbiol.*, 107: 412-417.
- **Monciardini P., Cavaletti L., Schumann P., Rohde M., et Donadio S. (2003).** *Conexibacter* *Woesei* gen sp. A novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 53(2), 3–10.

N

- **Nanjani. S. G., Soni. H. P. (2011).** Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. *Bioinformatica* .Vol: 1. N°: 1. Pp: 1-15.
- **Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. (1990).** Ecological significance of the biological activity in soil. In: Bollag JM, Stotzky G (Eds) *Soil biochemistry*, vol 6. Marcel Dekker, New York,293-355.

- **Nithya K., Muthukumar C., Duraipandiyan V., Dhanasekaran D., Thajuddin N. (2015).** Diversity and antimicrobial potential of culturable Actinobacteria from desert soils of Saudi Arabia. *Journal of Pharmaceutical Science Research*, 7(3), 117-122.
- **Nonomura H., (1974).** Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in ISP. *J. Frement. Technol.*, 52(2): 78-92.
- **Nonomura H., Hayakawa M., (1988).** New methods for selective isolation of soil actinomycetes, dans « *biology of Actinomycetes* ». Japon Scientific Societies Press. Tokoyo. (Ed). 88-100.
- **Nouredine. L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat - Université de TiziOuzou -Algérie. 186p.

O

- **Okami Y., Hotta K., (1988).** Search and discovery of new antibiotic in: M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordanski (eds) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London. pp. 33 – 67.
- **Okami Y., Hotta K., (1988).** Search and discovery of new antibiotics, In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (Ed). *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, Inc., San Diego, 33-67.
- **Omura S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed: Springer Verlag, New York. Inc. pp 281-303.
- **Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T.C., Cornelis P., Koedam N., Belanger R.R. (1999).** Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent *Pseudomonas*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology*, 48: 66–76. Oran, Algérie, 105 p.
- **Orla – Jensen, S. 1919 (1909).** *The Lactic Acid Bacteria*. Copenhagen : Host and Son.
- **Oskay A., Tamer U. and Azeri C. (2005).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *African Journal of Biotechnology*., 9: 441-446.
- **Otto. H.J.,(1998).** *Écologie forestière*. Institut pour le développement forestier : Paris. Pp : 397.
- **Ouhdouch Y., (1989).** Bactéries actinomycétales rares productrices d'antifongiques. Thèse de Doctorat .Nancy.

P

- **Pegg G.F., Brady B.L. (2002).** *Verticillium wilts*. (Éditeur : CAB International). CABI Publishing, Wallingford, UK. 552p.
- **Pegg G.F., Brady B.L., (2002).** *Verticillium Wilts*. Cromwell Press, Trowbridge, 552p. *Phytopathology*, 26: 75–91.
- **Pelmont. J. (2005).** Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences : Grenoble. Pp : 798 pages.
- **Perry J.J., Staley J.T., et Lory S. (2004).** *Microbiologie*. Paris, Dunod. Pp. 497–498.
- **Petrosyan P, García-Varela M, Luz-Madriral A, Huitrón C, Flores ME. (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. nov, a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* ; 53(Pt 1):269-73.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., (2010).** *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 3eme édition Pp : 1088.
- **Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. (2003).** *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164.

- **Press C.M., Loper J.P., Klopper J.W. (2001).** Role of iron in Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*, 91: 593–598.
- **Pridham T. G., Anderson P., Foley C., Lindenfelser L. A., Hesseine C. W. and Benedict R. G. (1957).** A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. *Antibiotics Ann. 1956-1957* :947-953.

R

- **Rangaswami. G. Bagyaraj. D. J. Bagyaraj D.G. (2004).** *Agricultural Microbiology*. PHI : New Delhi. Pp : 440.
- **Rappily F. (1968).** Les techniques en mycologie en pathologie végétale. *Annuelles des Epiphytes*, vol. Institut National de Recherche Agronomique, Paris (France), 102p
- **Rastogi. B., V Kishore. B. (1997).** *A Complete Course in ISC Biology*. Pitambar Publishing: New Delhi. Pp: 592.
- **Romane G., Vigouroux A. (1999).** Recrudescence de la verticilliose dans les verger oléicole français. *Nouvel Olivier*, Septembre-octobre, pp. 3-6.

S

- **Sabaou. N. (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et ecologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.
- **Saffroy S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. P. 150.
- **Saker R. (2015).** Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. pour obtention de diplôme doctorat. Université Ferhat Abbas.
- **Schnathorst W.C., Mathre D.E. (1966).** Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology*, 56: 1155 – 1161.
- **Scriban R. (1993).** *Biotechnologies*. 4^{ème} édition. Technique et documentation -Lavoisier. 32-39, 59-180, 323-448.
- **Sedra M.H., Maslouhy M.A. (1995).** Fusariose vésiculaire du palmier dattier(bayoud)II-action inhibitrice des filtrats de culture de six microorganismes isolées des sols de palmiers dattiers de Merrakech sur le développement in vitro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*. *Al Awamia*, 90:1-8.
- **Shirling. E. B., Gottlieb. D. (1966).** Methods for characterization of *streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*. Vol. 16. N° 3. Pp : 313-340.
- **Shirling, E.B., Gottlieb, D. 1976.** Retrospective evaluation on International Streptomyces Project taxonomy criteria. In : *Actinomyces the boundary microorganisms*. Ed : Arai T. Tokyo. 9 – 42.
- **Shukla. G. Soil Enzymology. (2010).** Springer: Berlin. Pp: 384.,
- **Sivasithamparam K., Parker C.A. (1980).** Interaction of certain isolates of soil fungi with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on agar media. *Australian Journal of Botany*, 28: 411–419.
- **Smaoui. S. (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doc : Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). Pp : 207.
- **Solecka J.,Zajko J., postek M.and Rajnisz A.(2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of biology* 7.373-390p.

- **Stutz J.C., Copeman R., Martin C.A., Morton J.B. (2000).** Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of south-western Namibia. *Can. J. Bot.*, 78: 237-245.
- **Sudhanshu D., Ravindra., Vijay U., Sanjay K. (2011).** Isolation and Characterization of Actinomycetes Producing Antimicrobial Substance against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmacy Research*.vol 4(11), 4066-4068.
- **Suneetha V., Raj Karthick., Prathusha .K. (2011).** Isolation and identification of Streptomyces ST1 and ST2 strains from Tsunami affected soils: Morphological and biochemical studies, *Journal of Oceanography and Marine Science* Vol. 2(4): P 96- 101.

T

- **Takizawa M., Colwell R.R., Hill R.T. (1993).** Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 997-1002.
- **Thanassoulopoulos C.C., Kistos, G.T. 1971.** Verticillium wilt in Greece. In: Proceeding of 1st of Int. Verticillium Symp., 24 – 27 September, Wye College. London, UK. P.22.
- **Theilleux J. (1993).** Les actinomycètes in *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V, 612- 425 pp.
- **Thenmozhi. M and Kannabiran. K. (2010).** Studies on Isolation, Classification and Phylogenetic Characterization of Novel Antifungal Streptomyces sp. VITSTK7 in India. Vol: 2. N°: 5: 306-312.
- **Thomashow L.S., Weller D.M. (1995).** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey, G., Keen, N.T. (Eds.), *Plant–Microbe Interactions*. Chapman & Hall, New York, NY, USA, pp. 187–235.
- **Tiwari et Gupta. (2011). Zitouni. A. (2005).** Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardioopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix sp SA 103*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (Algérie), 230 p.
- **Tiwari K., Gupta R.K. (2013).** Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39,256–294.
- **Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J., Katinakis P. (2005).** Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene Expression. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 18: 555–561.
- **Tombesi A., Tombesi S., Saavedra M.S., Fernandez-Escobar R., d'Andria R., Lavini A., Jardak T. (2007).** Conseil Oléicole Internationale. Technique de production en oléiculture. Madrid (Espagne). ISBN. 1ère édition, 348p.
- **Triki M.A., Hassaïri A., Mahjoub M. (2006).** Premières observations de *Verticillium dahliae* sur olivier en Tunisie. *Bull EPPO Bull.*, 36 (1): 69–71.

V

- **Vallad G.E., Subbarao K.V. (2008).** Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 98 : 871–885.

W

- **Waksman S.A. 1959.** The actinomycètes : nature, occurrence and activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1 : 29 – 46.

- **Waksman S.A., Henrici A.T. (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46, 337-341.
- **Wang L., Huang. Y., Liu. Z., Goodfellow. M., Rodri guez. C. (2006).** *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. *J. Sys. Ev. Microbiol.* Vol 56. Pp: 1257-1261.
- **Wang S.L., Hsaiao W.J., Chang W.T. et al. (2002).** Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produces by *Monosculus purpureus* CCR 31499 in a shirmp and crab shell powder medium. *J.Aric.Food.Chem.*, U50U: 2249-2255
- **Whipps J.M. (1987).** Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107: 127–142.
- **Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiology*. 144, 653-656.
- **Williams, S.T., Wellington, E.M.H. 1982 (1983).** Principales and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products : search and discovery*. Academic Press, London. 9 – 26. n
- **Winn. W. C, Koneman. E. W. (2006).** *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins: Washington. Pp: 1565.
- **Yangui T., Sayadi S., Gargoubi A., Dhouib A. (2010).** Fungicidal effect of hydroxytyrosolrich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Protection* 29: 1208-1213.



- **Zvyagintsev. D. G., Zenova. G. M., Sudnizin. I. I., Doroshenko. E. A. (2005).** The Ability of Soil

Sites web

- <http://www.andi.dz/PDF/monographies/Bechar.pdf>
- <http://www.dziri-dz.com/?p=6666>
- https://fr.wikipedia.org/wiki/B%C3%A9ni_Abb%C3%A8s
- <http://www.andi.dz/PDF/monographies/NAAMA.pdf>
- <http://www.carte-algerie.com/carte-algerie-departement.html>

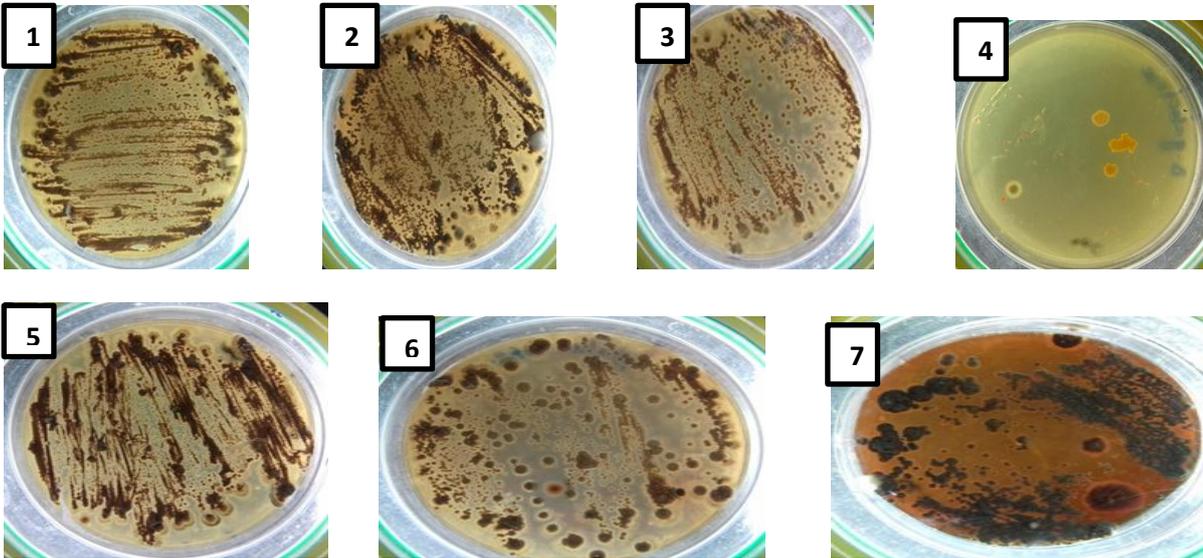
Annexes

Annexe 01

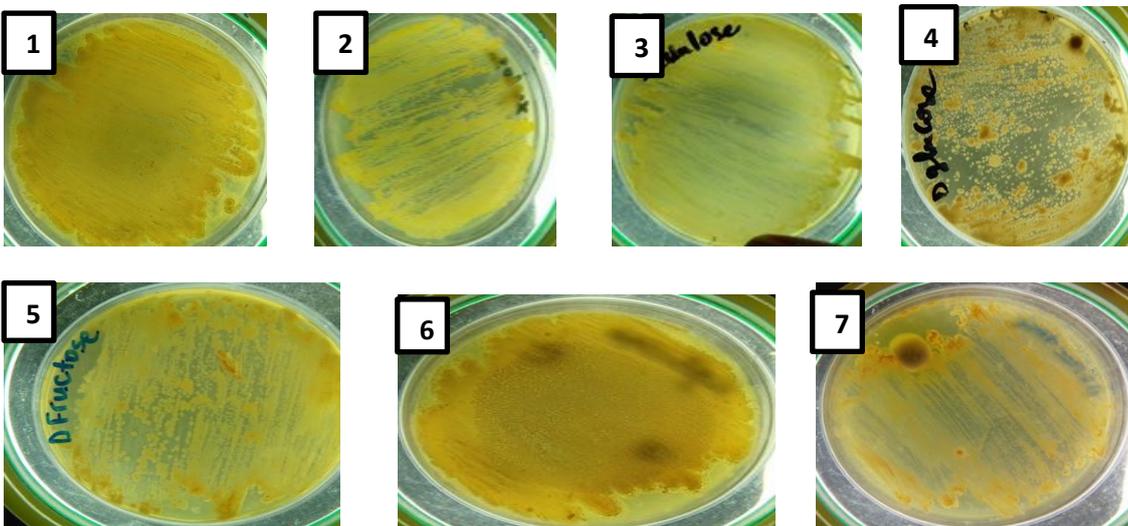
- **Le milieu GLM** : Extrait de levure 3g, extrait de malt 3g, Peptone 5g, Glucose 10g, Agar 15g, Eau distillée 1000ml, pH=7,3.
- **Le milieu ISP2** : ISP 2 Extrait de levure 4 g, Extrait de malt 10 g, Glucose 4 g, Agar 20 g, Eau distillée 1000 ml, ampicilline 2ml, Fungisone 1ml, pH = 7,3.
- **Milieu gélose nutritive (GN)**
Peptone : 5g ; Extrait de levure : 2g ; Extrait de viande : 1g ; NaCl : 5g ; Agar : 15g ; Eau Distillée 1000ml ; .pH 7,5.
- **Mueller Hinton**
Infusion de viande de bœuf 2 g ; Amidon 15 g ; Hydrolysate de caséine 17,5g ; Agar 17 g ; Eau distillée 1000 ml ; pH 7,3.
- **Dégradation de l'amidon** (Marchal et Bourdon, 1987) 10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive. Une solution de Lugol permet de mettre en évidence la dégradation de l'amidon.
- **Dégradation de la gélatine** (Marchal et Bourdon, 1987) 4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.
- **Dégradation de la caséine du lait** (Gordon *et al.*, 1974) 10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.
- **Milieu PDA**
Infusât de pomme de terre 200 ml, Dextrose 20 g Eau distillée 1000 ml Agar 20 g pH 5,4.

Annexe 02

Echantillon 01



Echantillon 02



1 : milieu de culture+ sucrose. 2: milieu de culture+ xylose. 3: milieu de culture+ lévulose. 4 : milieu de culture+ galactose. 5: milieu de culture + fructose. 6 : milieu de culture+ maltose, 7 : milieu de culture+ glucose.

Figure : Résultats de l'assimilation des sucres

Annexe 03

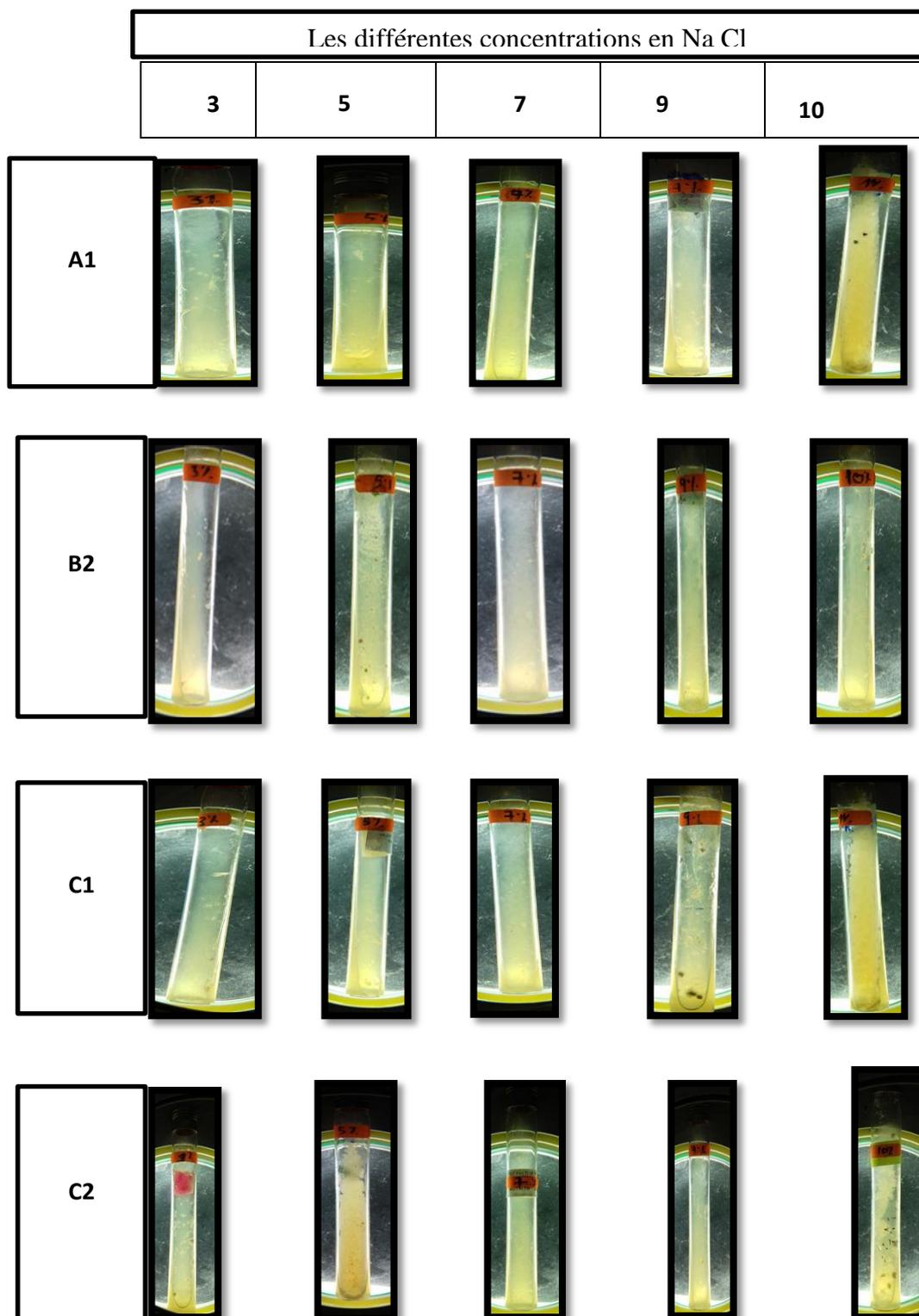


Figure: Croissance des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de différentes concentrations de Na Cl.

Résumé

L'agent pathogène *V. dahliae* peut causer d'importantes pertes en culture de l'olivier. Le rendement peut être significativement diminué suite au phénomène de la verticilliose. Par ailleurs, l'utilisation systématique des fongicides a conduit à l'apparition de souches résistantes et à un déséquilibre biologique et environnemental. C'est pourquoi il devient important de rechercher des méthodes de lutte alternatives à l'usage des produits phytosanitaires. Ces dernières décennies, une alternative s'est imposée par le recours à l'exploitation des potentialités bénéfiques des microorganismes antagonistes. Dans cette optique, nous avons isolé quatre souches d'actinomycètes à partir de différents échantillons de sol de la région de Béchar. Après purification et identification, l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats a permis de confirmer la ressemblance de ces caractères pour l'ensemble des isolats étudiés. Ces caractères laissent supposer que les isolats bactériens appartiennent au genre *Streptomyces*. Sur les quatre isolats d'actinomycètes, deux isolats ont montré une action inhibitrice non négligeable sur la croissance mycélienne de l'agent pathogène, notamment les isolats B2 et C2.

Mots clés : Sol arides et semi arides ; Actinomycètes, *Streptomyces* , olivier, verticilliose, *V. dahliae*, antagonisme, lutte biologique.

Abstract

The pathogen *V. dahliae* can cause significant losses in olive cultivation. The yield can be significantly reduced following the phenomenon of verticillium wilt. In addition, the systematic use of fungicides has led to the appearance of resistant strains and a biological and environmental imbalance. This is why it becomes important to look for alternative control methods to the use of phytosanitary products. In recent decades, an alternative has emerged through the use of the exploitation of the beneficial potential of the antagonistic microorganisms. With this in mind, we isolated four strains of actinomycetes from different soil samples from the Bechar region. After purification and identification, the study of the morphological, physiological and biochemical characters of the isolates confirmed the similarity of these characters for all the isolates studied. These characters suggest that bacterial isolates belong to the genus *Streptomyces*. Of the four isolates of actinomycetes, two isolates showed significant inhibitory action on mycelial growth of the pathogen, including isolates B2 and C2.

Key words: Arid and semi arid soils; Actinomycetes, *Streptomyces*, olive, verticilliose, *V. dahliae*, antagonism, biological control.

ملخص

يمكن أن يتسبب العامل الممرض *V. dahliae* في خسائر كبيرة في زراعة الزيتون. مما يؤدي الى تقليل الغلة بشكل كبير بعد ظاهرة ذبول *verticillium* بالإضافة إلى ذلك ، أدى الاستخدام المتكرر لمبيدات الفطريات إلى ظهور سلالات مقاومة واختلال بيولوجي وبيئي. لهذا السبب اصبح من المهم البحث عن طرق تحكم بديلة لاستخدام منتجات الصحة النباتية. في العقود الأخيرة ، ظهر بديل من خلال استغلال الإمكانيات المفيدة للكائنات الحية الدقيقة العدائية. من هذا المنظور قمنا بعزل أربع سلالات من الأكتينوميست من عينات التربة المختلفة من منطقة بشار. بعد التطهير والتعرف ، أكدت دراسة الخصائص المورفولوجية والفسيلوجية والكيميائية الحيوية للعزلات تشابه هذه الشخصيات لجميع العزلات التي تمت دراستها. تشير هذه الشخصيات إلى أن العزلات البكتيرية تنتمي إلى جنس العقديّة. من بين أربع عزلات من الكريات الحركية ، أظهرت عزلتان عملاً مثبطاً مهمّاً على نمو الخلية الفطرية للعامل الممرض ، بما في ذلك العزلات B2 و C2

الكلمات المفتاحية: التربة القاحلة وشبه القاحلة ؛ الأكتينوميستيس؛ السترptomيسيس ، الزيتون ، الفريتيليوم ، الخلايا الداهلية ، العداء ، المكافحة البيولوجية.