جامعة سيدي محمد بن عبد الله – فاس
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fès

FST FES

Année Universitaire : 2020 - 2021

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Screening des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques de deux plantes médicinales relevant de la région Beni Mellal-Khénifra

Présenté par :

Irouane Ziati

Encadré par :

Prf. Majida El Hassni

Soutenu le : 13 Juillet 2021 devant le jury composé de :

- Présidente: Pr. Sanae Guissi, Faculté des Sciences et Techniques-Fès.
- Encadrante: Pr. Majida El Hassni, Faculté Polydisciplinaire-Béni Mellal.
- Co-encadrant: Pr. Mohamed Farissi, Faculté Polydisciplinaire-Béni Mellal.
- Examinatrice: Pr. Kawtar Fikri Benbrahim, Faculté des Sciences et Techniques-Fès.
- Examinateur: Pr. Samir Ananou, Faculté des Sciences et Techniques-Fès.

Avant propos

- **Nom et Prénom :**

  Irouane Ziati

- **Intitulé du travail :**

  Screening des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques de deux plantes médicinales relevant de la région Beni Mellal-Khénifra

- **Nom et Prénom de l'Encadrante:**

  Pr. Majida El Hassni : Professeur à la Faculté Polydisciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal

- **Nom et Prénom de Co-encadrant:**

  Pr. Mohamed Farissi : Professeur à la Faculté Polydisciplinaire, Université Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal

- **Cadre financement :**

  Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet financé par l'Agence Nationale des Plantes Aromatiques et Médicinales CNRST et USMS

- **Le porteur du projet :**

  Laboratoire B2DRN, Faculté Polydisciplinaire de Béni-Mellal

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Bon Dieu le tout Puissant qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les juste réflexes.

Au terme de mon Projet de Fin d'Etudes, j'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Président de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdallah et Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour l'intérêt qu'ils portent à la recherche scientifique au sein de l'établissement.

Je dois remercier particulièrement Madame Majida El Hassni et Monsieur Mohamed Farissi, Professeurs à l'université Sultan Moulay Slimane, Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal pour avoir accepté de diriger ce mémoire et pour leur appui, leurs conseils et leurs orientations tout au long de ce travail. Merci d'avoir accepté m'accueillir au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Développement Durable des Ressources Naturelles.

Mes plus sincères remerciements vont également à mon encadrante interne Pr. Sanae Guissi, pour son encadrement pédagogique ainsi que pour ses conseils efficients.

Je remercie très sincèrement les membres de jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à notre coordonateur de Master « Biotechnologie microbienne », le Professeur Abdellatif Haggoud pour la haute qualité de l'enseignement et sa disponibilité.

Je tiens à remercier très vivement les membres du laboratoire B2DRN; Ahmed, Nadia, Aziz et Imad pour leur aide et leurs encouragements.

« Dédicace »

Je dédis ce mémoire

A mon défunt père

A ma chère mère ma raison d'être

A mon frère Mohammed amine

Et mes sœurs Amlal et Sara

A ma famille

A tous mes chères amis (es) : Soufian, Sanae et Carolina

J'adresse à tous un grand merci tout

Irouane

Liste des figures

Figure 1: Aspect circulaire des colonies d'actinomycètes. 6
Figure 2 : Cycle de développement du genre Streptomyces sur milieu solide 6
Figure 3 : Croissance d'une colonie d'actinomycète sur milieu gélosé, montrant le mycélium substrat et aérien avec des chaînes de conidiospores. 7
Figure 4 : Classification phylogénétique des actinobactéries, basée sur les séquences des gènes codant l'ARNr16s 9
Figure 5 : Modes d'action des actinobactéries 11
Figure 6 : Photo du spécimen *T. saturoïdes* 14
Figure 7 : Photo du spécimen *L. multifida* 15
Figure 8 : Position géographique du site d'isolement 17
Figure 9 : Plantes médicinales collectées, A: *L. multifida*, B: *T. saturoïdes* 18
Figure 10 : Répartition des explants sur le milieu SCA, A: Tiges, B: Racines, C: Feuilles. 19
Figure 11 : Procédé de dilution de la solution du sol 20
Figure 12 : Les milieux d'identification des actinomycètes (A : ISP4, B : ISP2, C : ISP5). 22
Figure 13 : Aspect filamenteux des colonies d'actinobactéries. 29
Figure 14 : Isolats d'actinomycètes (LRP1 et LRP2') obtenus sur le milieu Amidon-Caséine après purification 30
Figure 15 : Isolats de PGPR (SLM4 et SLM12) obtenus sur le milieu YEM après la purification. 31
Figure 16 : Aspect macroscopique sur les milieux ISP de quelques isolats d'actinomycètes isolés, A: LTP2' sur ISP4; B: LRP2 sur ISP2; C: LRP2'' sur ISP2; D: LRP2 sur ISP5; E : LTP2 sur ISP4 ; F : LRP2 sur ISP4. 364
Figure 17 : Observation des isolats d'actinomycètes par le photomicroscope après coloration de Gram, A : LRP1 ; B : LRP2' 37
Figure 18 : Solubilisation du phosphate par différents isolats d'actinomycètes. 40
Figure 19 : Apparition d'un halo clair sur le milieu PVK autour des colonies. TSRP2 ne forme aucun halo. 40
Figure 20 : Solubilisation du phosphate par différents isolats de PGPR. 39
Figure 21 : Activité de solubilisation du phosphate des PGPR (SLM1, STS3, SLM9 et SLM12) sur le milieu PVK sous la forme d'une zone claire entourant les colonies. 39
Figure 22 : Estimation quantitative du phosphate soluble chez les isolats d'actinomycètes. 42
Figure 23 : Estimation quantitative du phosphate soluble chez les PGPR. 43
Figure 24 : Détection qualitative de la production de l'AIA montrant un changement de coloration du jaune au rose. 44
Figure 25 : Croissance des isolats d'actinomycètes endophytes sur le milieu AFM. 45
Figure 26 : Mise en évidence de l'activité amylolytique des actinomycètes endophytes (LRP1, LRP2'', LRP1'', LRP2') sur milieu solide par le test au lugol. 46
Figure 27 : Index d'activité amylolytique des isolats d'actinomycètes. 47
Figure 28 : Screening de la production d'amylase par les PGPR rhizosphériques (SLM12, SLM7) 47
Figure 29 : Index d'activité amylolytique des isolats de PGPR. 48
Figure 30 : Screening de la cellulase avec coloration au rouge Congo. 48
Figure 31 : Index d'activité cellulosique d'actinomycètes. 49
Figure 32 : Index d'activité cellulosique des isolats de PGPR rhizosphériques 49

Figure 33 : Zones d'inhibition de la croissance du mycélium fongique sur le milieu PDA après 7j d'incubation, A : champignon avec les isolats d'actinomycètes, B : control. 51

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquence de quelques genres d'actinomycètes dans le sol.....9
Tableau 2 : Certaines actinobactéries endophytes des plantes médicinales rapportées dans la littérature 12
Tableau 3 : Classification de *T.satuoïdes*.....13
Tableau 4 : Classification de *L. multifida*. 14
Tableau 5 : Tests de tolérance au stress physique. 23
Tableau 6 : Répartition des actinomycètes endophytes dans les tissus végétaux.....29
Tableau 7 : Nombre des isolats de PGPR isolés et leurs espèces de plantes hôtes. 30
Tableau 8 : Caractéristiques potentiels des isolats d'actinomycètes endophytes. 32
Tableau 9 : Effet de pH acide et alcalin sur la croissance des actinomycètes endophytes. 38
Tableau 10 : Effet de pH acide et alcalin sur la croissance des PGPR rhizosphériques. 39
Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition du mycélium fongique (Foa) par les isolats d'actinomycètes. 51

Liste des abréviations

$(NH_4)_2SO_4$	**Sulfate d'Ammonium**
AFM	**Azote Free Medium**
AIA	**Acide indole-3-acétique**
BIOVAR	**Biotechnologie et Valorisation des ressources naturelles**
Ca_3HPO_4	**Tricalcium Phosphate**
$CaCO_3$	**Carbonate de Calcium**
ED	**Eau Distillée**
Fe_3SO_4	**Sulfate de Fer**
FeCl	**Chlorure de Fer**
GC	**Guanine/Cytosine**
H_2SO_4	**Acide Sulfurique**
ISP	**International Streptomyces Project**
ISR	**Résistance Systémique Induite**
K_2HPO_4	**Hydrogénophosphate de Potassium**
KCl	**Chlorure de Potassium**
KH_2PO_4	**Dihydrogènophosphate de Potassium**
KNO_3	**Nitrate de Potassium**
MA	**Mycélium Aérien**
$MgSO_4$	**Sulfate de Magnésium**
$MnCl_2$	**Chlorure de Manganèse**
$MnSO_4$	**Sulfate de Manganèse**
MS	**Mycélium de Substrat**
$Na_2S_2O_3$	**Thiosulfate de Sodium**
NaCl	**Chlorure de Sodium**
$NaHCO_3$	**Bicarbonate de Sodium**
NaOCl	**Hypochlorite de Sodium**
PDA	**Potato Dextrose Agar**
PGPR	**Plant Growth Promoting Rizobacteria**
PVK	**Pikovskaya**

SCA	**Starch Casein Agar**
YEM	**Yeast Extract Mannitol**
$ZnSO_4$	**Sulfate de Zinc**

Table des matières

Introduction

Etude bibliographique

I-Les bactéries bénéfiques dans l'interaction plante - sol……..…3

I-1-Les bactéries endophytes…… ……3

I-2-Les bactéries rhizosphériques……...……3

II-Généralités sur les bactéries promotrices de la croissance « PGPR »……...4

III-Aperçu général sur les actinomycètes…….5

III-1-Définition et caractérisation biologique……..….5

III-2-Taxonomie et critères de classification……6

III-2-1-Classification morphologique……6

III-2-2-Classification chimiotaxonomique.....…7

III-3-3-Classification physiologique.....…7

III-3-4-Classification moléculaire……..…7

III-3-Distribution dans la nature……..….8

IV-Importance des actinomycètes dans l'agriculture……..…....9

V-Diversité des actinomycètes endophytes des plantes médicinales……...10

VI-Représentation des plantes médicinales étudiées……....11

VI-1-Description de l'espèce *Thymus saturoïdes*……..…12

VI-2-Description de l'espèce *Lavandula multifida*……....13

Matériel et méthodes

I-Isolement des souches bactériennes……...……..…..14

I-1-Collection des échantillons……..14

I-2- Isolement des actinomycètes endophytes……..….16

I-2-1-Préparation et stérilisation des échantillons……16

I-2-2-Inoculation du milieu……..17

I-3- Isolement des PGPR rhizosphériques……...17

I-3-1-Préparation des dilutions décimales et inoculation du milieu…....17

I-4- Repiquage et conservation des isolats……..….18

II-Caractérisation et identification des actinomycètes……..19

II-1-Caractérisation morphologique……....19

II-2-Morphologie microscopique……...……..20
III-Test de tolérance au stress pour les actinomycètes et les PGPR……..……20
IV-Détermination des activités promotrices de la croissance des plantes…….21
IV-1-Mise en évidence de la solubilisation du phosphate inorganique……...….21
IV-2-Production de l'acide indole acétique (AIA)…….22
IV-3-Fixation libre d'azote N_2…….....22
V-Production des enzymes hydrolytiques……...22
V-1-Les amylases……22
V-2- Les cellulases…….23
VI-Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique d'isolats d'actinomycètes……24
VII-Analyse statistique……..27
Résultats et discussion
I-Isolement et purification des actinomycètes endophytes……..…26
II-Isolement et purification des PGPR rhizosphériques …….….28
III-Caractérisation et identification des actinomycètes……...….29
III-1-Caractérisation morphologique……..…..29
III-2-Morphologie microscopique……35
VI-Test de tolérance au stress pour les actinomycètes endophytes et les PGPR rhizosphériques……..35
V-Détermination des activités promotrices de la croissance des plantes……..…...37
V-1-Mise en évidence de la solubilisation du phosphate inorganique……37
V-2-Production de l'acide indole acétique (AIA)……42
V-3-Fixation libre d'azote N_2……..43
VI-Production des enzymes hydrolytiques…….44
VI-1-Les amylases……44
VI-2-Les cellulases……..46
VII-Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*……....48
Conclusion et perspectives……51
Références bibliographiques……..…52
Annexes
Résumé

INTRODUCTION

Les plantes présentent une relation intrinsèque avec un large éventail de populations microbiennes qui colonisent la Rhizosphère (rhizobactéries), la Phyllosphère (bactéries épiphytes) et les tissus végétaux (endophytes) (Qin et al., 2011). Les endophytes sont des microorganismes qui résident à l'intérieur des tissus des plantes sans avoir d'effets négatifs sur la plante hôte ou l'environnement (Gaiero et al., 2013). Ils sont ubiquitaires dans la nature et sont présents dans toutes les espèces végétales de la planète, et leur relation avec les plantes n'est pas bien comprise et restent dans la phase initiale de l'exploration (Thomas et Soly, 2009).

La composition des microorganismes endophytes dépend du génotype, des conditions environnementales, du type du sol et du stade de croissance de la plante (Bonito et al., 2014; Donn et al., 2015; Agler et al., 2016; Wagner et al., 2016).

Les Rhizobactéries sont des bactéries compétentes pour la rhizosphère qui habitent agressivement les racines des plantes, elles sont capables de se multiplier et de coloniser toutes les niches écologiques présentes sur les racines à tous les stades de la croissance de la plante (Muleta, 2007). Selon les rapports publiés et les hypothèses, les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) affectent principalement la croissance des plantes à travers plusieurs mécanismes : (i) Synthèse de phytohormones, qui peuvent être absorbés par les plantes, (ii) Fixation de l'azote atmosphérique, (iii) Mobilisation des composés du sol, (iv) Protection des plantes dans des conditions de stress et (v) Défense contre les agents pathogènes des plantes.

Plusieurs bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPB) (Rhizobactéries, actinomycètes endophytes) ont été utilisées dans le monde entier comme Bioinoculants, et qui sont Eco-Freindly, toxiques pour les agents pathogènes et non pour l'Homme afin d'améliorer le rendement et la fertilité des sols et contribuer à une agriculture durable. Ainsi, l'inoculation des plantes par ces microorganismes au lieu d'utiliser des produits chimiques toxiques pour l'environnement module la synthèse de composés bioactifs aux propriétés biologiques élevées, tout en favorisant la croissance des plantes.

Les plantes médicinales sont connues par leur richesse en composés bioactifs et sont exploitées largement dans le domaine thérapeutique (Joy et al., 1998). Au Maroc, ce secteur occupe une place importante dans la médecine traditionnelle et joue un grand rôle dans l'économie nationale. En effet, plus de 4 200 espèces qui ont été identifiées dont 800 endémiques et 400 classées comme produit à usage médicinale et/ou aromatique (Hamamouchi, 2001). Néanmoins, les plantes médicinales constituent aussi une source importante d'isolement des actinobactéries endophytes (Golinska et al., 2015). Elles sont reconnus comme une source potentielle de production de divers métabolites secondaires capables de tolérer le stress et de réduire les symptômes des maladies causés par les agents pathogènes des plantes (Rai et al., 2014).

Dans cette étude, on vise à l'isolement des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques à partir de deux plantes médicinales (*Lavandula multifida* et *Thymus saturoïdes*) collectées dans la région de Béni Mellal-Khénifra (Parc M'Goun). Les isolats d'actinomycètes seront caractérisés morphologiquement (macromorphologie et micromorphologie), physiologiquement (pH, NaCl, solubilisation du phosphate inorganique, production de l'acide indole-3-acétique, fixation libre d'azote, production d'amylases et cellulases, ensuite testés pour leur activité antifongique). Tandis que, les PGPR seront caractérisés physiologiquement.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les bactéries bénéfiques dans l'interaction plante-sol

I-1-Les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes, pendant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent localement (racine, tiges, feuilles, organes producteurs…) ou de façon généralisé les tissus des végétaux sans causer de dommages apparents à l'hôte (Swamy et Sandhu, 2021). Elles forment différentes relations en fournissant plusieurs avantages pour les plantes (Daulagala, 2021).

Les bactéries endophytes sont impliquées dans différents domaines à savoir la production d'antibiotiques dans le secteur médical, la production des produits antimicrobiens pour le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes (Segaran et al., 2017). Elles présentent aussi un intérêt dans la bioremédiation des sols pollués (Hayat et al., 2020).

I-2-Les bactéries rhizosphériques

La rhizosphère est la zone du sol entourant les racines des plantes où les caractéristiques physiques et chimiques du sol sont influencées par les racines (Prasad, 2019). C'est une zone très favorable aux développement des microorganismes et qui peuvent voir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes (Kumar et al., 2015b). Les plantes absorbent l'eau et les nutriments par la rhizosphère *via* les microorganismes qui interagissent avec les exsudats racinaires (glucides, sucres, acides organiques, vitamines, flavonoïdes,….ect). Ces derniers agissent comme des messagers qui stimulent les interactions entre les racines et les microorganismes du sol.

Les microorganismes de la rhizosphère sont composés des bactéries, des champignons, des protozoaires et des algues (Prasad, 2019). Parmi eux, les bactéries promotrices de croissance

« PGPR » pour « Plant Growth Promoting Bacteria » qui sont les plus abondantes parmi toutes les autres (Antoun et Kloepper, 2001).

II-Généralités sur les bactéries promotrices de la croissance « PGPR »

Les PGPRs sont des bactéries capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper la zone rhizosphérique riche en éléments nutritifs et qui joue un rôle important dans la croissance des plantes (Beauchamp, 2005). La promotion de la croissance des plantes par PGPR se manifeste par la prolifération, la déformation et la ramification des poils absorbants, la nodulation précoce, l'amélioration de la surface foliaire, la biomasse, l'augmentation des niveaux d'hormones végétales, l'absorption des minéraux et d'eau, etc (Podile et Kishore, 2006). La sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale comme: la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et de phytohormones, la capacité à fixer l'azote et la lutte biologique contre les maladies des plantes (Cattelan et al., 1999).

Les PGPRs peuvent être classées en deux groupes; les PGPRs extracellulaires (ePGPR), existant dans la rhizosphère ou dans l'espace intercellulaire du cortex racinaire et des PGPRs intracellulaires (iPGPR) qui pénètrent dans les cellules racinaires, généralement sont spécialisés dans la nodulation (Gray et Smith, 2004; Prasad, 2019).

Les genres connus comme ePGPR sont: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Psendomonas* et *Serratia* (Gray et Smith, 2005). Les souches bactériennes identifiées comme étant iPGPR appartiennent aux genres *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium* ainsi que l'espèce *Frankia* (Verma et al., 2010). Aussi, les actinomycètes représentent une classe importante de PGPR rhizosphèriques. Ces bactéries filamenteuses sont connues par leur effet améliorateur et promoteur de la croissance des plantes et leur activité protectrice contre les bio-agresseurs (Sousa et Olivares, 2016).

III-Aperçu général sur les actinomycètes

III-1-Définition et caractérisation biologique

Les actinomycètes sont connus sous le nom d'actinobactéries, étymologiquement, le mot actinomycète a été dérivé du mot grec «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignons, «champignons à rayons » ou « champignons rayonnants », car leur croissance donne lieu à des colonies circulaires (Figure 1) constituées d'hyphes (filaments) qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Les actinomycètes possèdent une structure procaryote, mais leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons (Ouhdouch, 2003).

Les actinomycètes sont des bactéries Gram positif, ayant la capacité de former des spores asexuées (Conidiospores ou Sporangiospores), chimio-organotrophes, possèdent un coefficient de chargaff (GC%) élevé compris entre 57-75% (Gayathri et al., 2017). Ils ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyen est environ 2 à 3 heures, une croissance relative aux espèces et aux conditions de culture (Beckers et Van Der Hoeven, 1982). Ils présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les bactéries (Figure 2) (Loqman, 2009).

Le phylum actinobacteria est connu par son importance économique car il produit divers substances biologiques actives comme les vitamines, les antibiotiques et les enzymes. On estime que près de 23 000 substances bioactives sont produites par de nombreux microorganismes et près de 45% sont produites par les actinomycètes (Hayat et al., 2020).

Figure 1: Aspect circulaire des colonies d'actinomycètes (www.astrosurf.com, consulté le 07/06/2021).

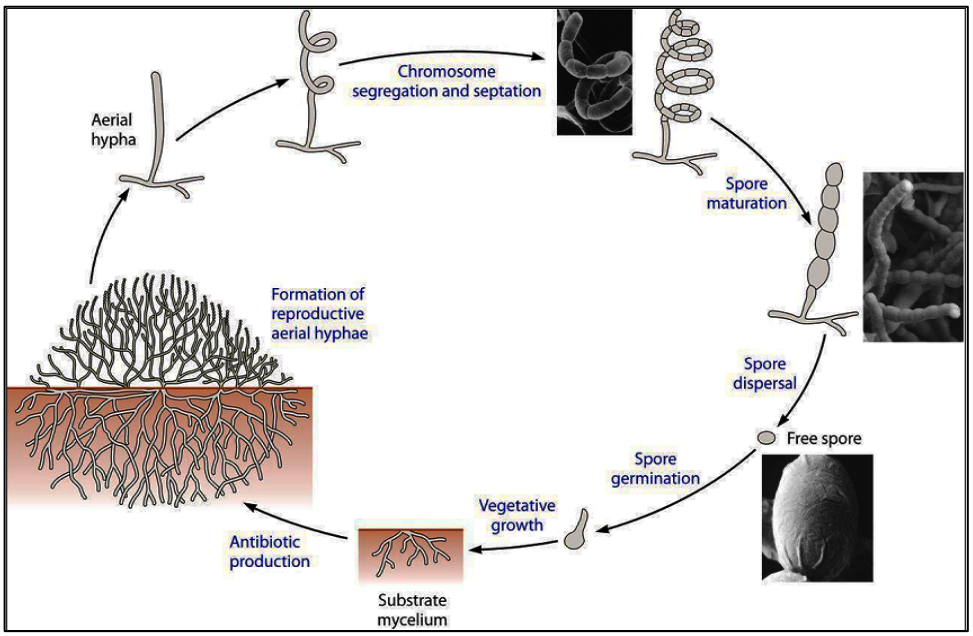

Figure 2 : Cycle de développement du genre Streptomyces sur milieu solide (Ait Barka et al., 2016).

III-2-Taxonomie et critères de classification

III-2-1-Classification morphologique

L'étude morphologique des actinomycètes se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium du substrat et le mycélium aérien (Figure 3), la couleur du mycélium, la production et la couleur de pigments diffusibles, la production de pigments mélanoïdes, la structure et la forme des spores (Loqman, 2009; Li et al., 2016). Certains actinomycètes peuvent former des structures compliquées, des chaînes de spores, des sporanges et sporangiospores. Les modes de croissance, la position de la spore, le nombre de spore, les structures de surface de la spore, la forme des sporanges et si les sporangiospores ont des flagelles ou non sont tous des caractères morphologiques importants caractéristiques de la classification des actinobactéries (Li et al., 2016).

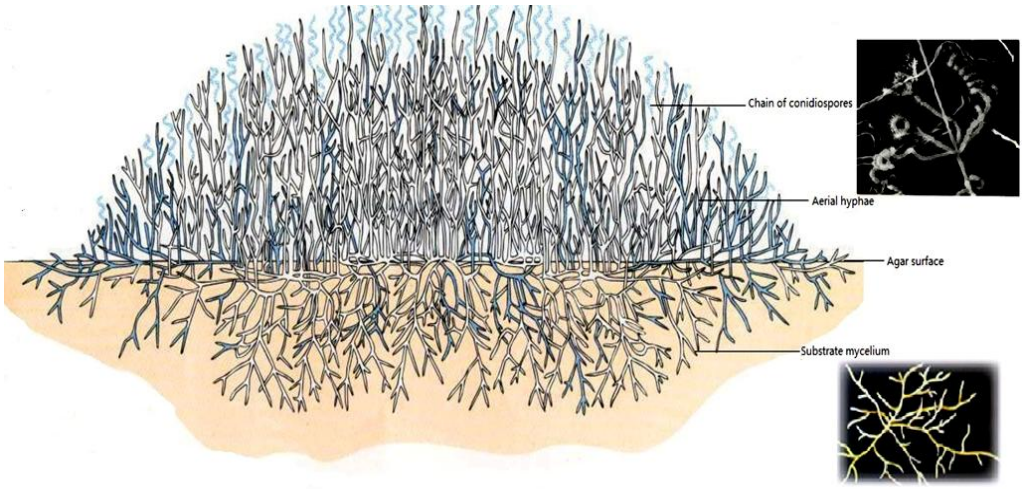

Figure 3 : Croissance d'une colonie d'actinomycète sur milieu gélosé, montrant le mycélium substrat et aérien avec des chaînes de conidiospores (Li et al., 2016).

III-2-2-Classification chimiotaxonomique

Les critères chimiques sont surtout limités à certains composés des parois cellulaires: les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires (O'Donnell, 1988).

III-3-3-Classification physiologique

Les caractères physiologiques concernent des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques. D'autres tests interviennent aussi comme la résistance à des composés chimiques (ex, antibiotiques) ou physiques (pH, température, salinité…) (Athalye et al., 1985).

III-3-4-Classification moléculaire

La classification moléculaire se traduit par la détermination du pourcentage de GC et séquençage des gènes de l'ARNr16S (Zhi et al., 2009). La classification phylogénétique des actinobactéries est représentée dans la Figure 4 :

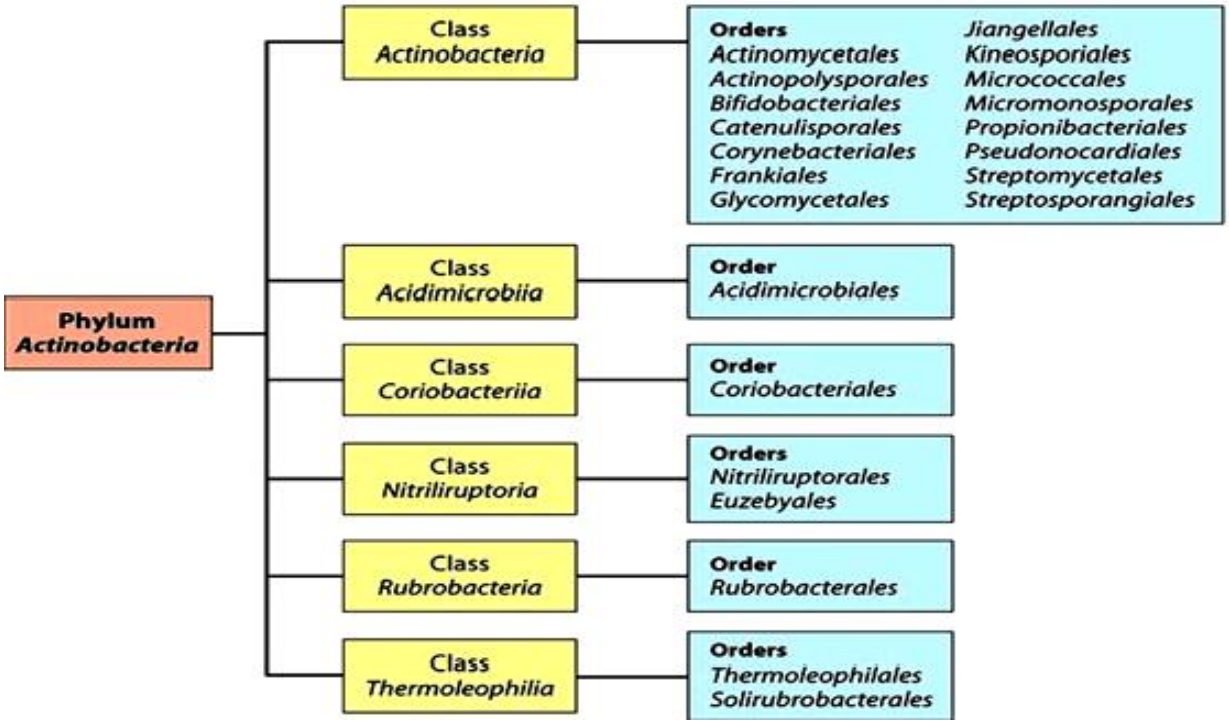

Figure 4 : Classification phylogénétique des actinobactéries, basée sur les séquences des gènes codant l'ARNr16s (Ludwig et al., 2012).

III-3-Distribution dans la nature

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques et colonisent une large variété d'habitats naturels (sol, eau, litière, fumier et plante) (William et al., 1983). Néanmoins, le sol reste le réservoir principal des actinomycètes. En effet, ils sont capable de dégrader plusieurs molécules comme la pectine, la kératine ou encore certaines molécules aromatiques, ils contribuent ainsi à la minéralisation et la fertilisation des sols (Tableau 1) (Leveau et Bouix 1993; Prescott et al., 2003).

Tableau 1 : Fréquence de quelques genres d'actinomycètes dans le sol (Leveau et Bouix, 1993).

Genre	Pourcentage %
Streptomyces	95,34
Nocardia	1,98
Micromonospora	1,40
Thermospora	0,22

Certains actinomycètes sont endophytes des plantes, colonisant les tissus végétaux (Khamna et al., 2010). Généralement, les bactéries pénètrent les tissus végétaux *via* les stomates, les blessures, les lenticelles, ect. Il a été rapporté que *Streptomyces scabies* produit un réseau d'hyphes à la surface des tubercules de pomme de terre. Les hyphes pénètrent dans les tubercules par les lenticelles et des blessures mécaniques qui surviennent souvent lorsque les tubercules s'élargissent rapidement (Loria et al., 1997). Sardi et al. (1992) ont observé par microscopie électronique à balayage des hyphes de *Streptomyces* sp. dans les tissus corticaux racinaires de la tomate. De même, El-Tarabily et al. (2009) ont démontré la localisation des sporanges d'*Actinoplanes campanulatus* dans les cellules du cortex racinaire du concombre.

IV- Importance des actinomycètes dans l'agriculture

Plusieurs espèces d'actinomycètes favorisent la croissance des plantes par divers mécanismes tels que la fixation de l'azote, la production des phytohormones, la solubilisation du phosphore, la production de sidérophores et les composés organiques volatils (Figure 5) (Shivlata et Satyanarayana, 2017; Hayat et al., 2020).

De plus, les actinobactéries synthétisent différentes enzymes hydrolytiques extracellulaires incluant les chitinases, les xylanases, les amylases, les lipases, les pectinases, les protéases, les cellulases, les glucanases, les ligninases et les keratinases. Ces enzymes hydrolysent la paroi cellulaire des bactéries et des champignons pathogènes ce qui contribue à la lutte contre les maladies des plantes (Figure 5) (Hayat et al., 2020).

En outre, il s'est avéré que les actinobactéries endophytes sont aussi capables de déclencher la résistance systémique induite (ISR). La souche endophyte *Streptomyces galbus* R-5 a non seulement libéré de la cellulase et de la pectinase, elle produit de l'actinomycine X2 et de la fungichromine pour induire une résistance chez les plantules de rhododendrons, mais aussi a déclenché des réponses de défense associées au jasmonate (Qin *et* al., 2011).

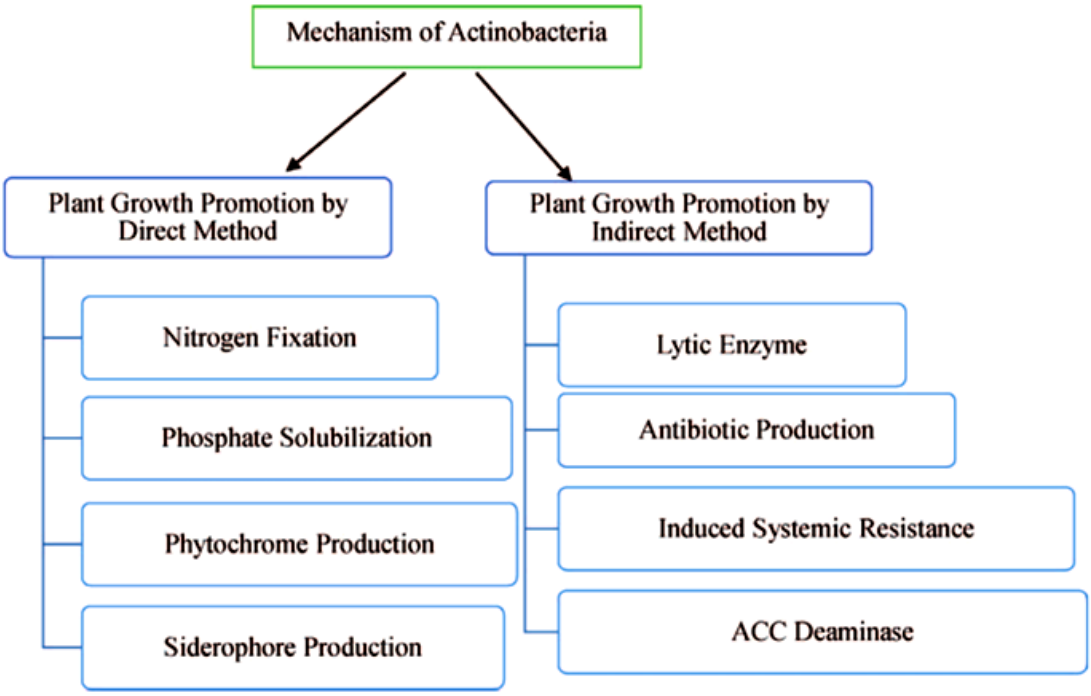

Figure 5 : Modes d'action des actinobactéries (Hayat et al., 2020).

V- Diversité des actinomycètes endophytes des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont connues par leur richesse en composés bioactifs et sont exploitées dans le domaine thérapeutique, comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Joy et al., 1998). Néanmoins, les plantes médicinales constituent aussi une source importante d'isolement des actinobactéries endophytes (Golinska et al., 2015; Tanvir et al., 2018).

Le tableau ci-dessous regroupe certaines actinobactéries endophytes des plantes médicinales rapportées dans la littérature:

Tableau 2 : Certaines actinobactéries endophytes des plantes médicinales rapportés dans la littérature (Golinska et al., 2015 ; Tanvir et al., 2018).

Plante hôte	Partie de la plante	Espèce d'actinomycète	Références
Bruguiera gymnorrhiza	Feuilles	*Streptomyces albidoflavus*	Li et al. (2012)
***Portulaca* oleracea L.**	Tige	*Streptomyces kebangsaanensis* sp. nov.	Tan et al., (2013), Remali et al. (2017)
Aloe vera, ***Mentha arvensis*** ***Ocimum sanctum***	Racines, tige et feuilles	*Micromonospora* sp. *Streptomyces viridis*, *Streptomyces albosporus*, *Streptomyces cinereus*, *Micromonospora* sp. *Streptomyces cinereus*, *Saccharopolyspora* sp. *Streptomyces albosporus*	Gangwar et al. (2014)
Curcuma phaeocaulis	Racines	*Streptomyces phytohabitans*	Bian et al. (2012)
***Citrus reticulata* L.**	Racines, tige et feuilles	*Streptomyces* sp. *Nocardia* sp. *Micromonospora* sp. *Microbispora* sp. *Nocardiopsis* sp.	Shutsrirung et al. (2013)
Musa acuminata	Racines et feuilles	*Streptomyces albosporus*, *Streptomyces griseorubroviolaceous*, *Streptomyces cinereus*, *Streptomyces aureus*, *Micromonospora* sp.	Gangwar et al. (2013)
Phyllanthus niruri	Racines	*Actinomadura* sp.	Priya (2012)
Mentha longifolia	Feuilles, tiges	*Streptomyces sp.*	Golinska *et* al., 2015
Ballota undulate	Feuilles, tiges	*Streptomyces sp.*	Golinska *et* al., 2015
Artemissia annua L	Racines	*Pseudonocardia artemisiae* sp. nov.	Golinska *et* al., 2015

VI- Représentation des plantes médicinales étudiées

La filière des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au Maroc regorge de potentiel grâce à la diversité des espèces. Ces plantes sont utilisées à plusieurs fins: médecine traditionnelle, herbes, cosmétiques, conservations des aliments et exportations des plantes brutes et d'huiles essentielles. Plus de 4 200 espèces qui ont été identifiées dont 800 endémiques et 400 classées comme produit à usage médicinale et/ou aromatique (Hamamouchi, 2001).

Dans la région Béni Mellal-Khénifra, les écosystèmes montagnards ont une diversité biologique riche et variée. De plus, cette région est une source riche en plantes médicinales. Cette richesse et diversité de la flore médicinale s'accompagne de l'acquisition de connaissances importantes sur le traitement des maladies par les plantes (El Alami et al., 2020). Les différentes études ethnobotaniques et analyses floristiques menées dans la région ont révélé la dominance de la famille des Lamiacées (Hachi et al., 2015; El Alami et Chait, 2017; El-Hadri, 2019).

Les feuilles séchées de *Thymus satureioides* sont utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine pour traiter la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme. Des effets antimicrobiens et antispasmodiques ont été rapportés. Tandis que *Lavandula multifida* est utilisé dans le traitement des affections broncho-pulmonaires (Bachiri et al., 2015).

VI-1-Description de l'espèce *Thymus saturoïdes*

Au Maroc, le genre *Thymus* est représenté par 21 espèces dont 12 sont endémiques y compris *Thymus saturoïdes* (Zaater, ZZiitra, Azoukenni, Tazoukennit) (Benabida, 2000).
La taxonomie de *T. saturoïdes* est la suivante :

Tableau 3 : Classification de *T.satuoïdes* (Benabida, 2000).

Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Magnoliopsida	Lamiales	Lamiacea	Thymus	*Thymus saturoïdes*

T. saturoïdes est un arbrisseau, pouvant atteindre 60cm de hauteur, avec des feuilles spatulées et inflorescence en glomérules lâche, la corolle rose ou rose pale (Figure 6). *Thymus satureioides* est endémique du Maroc. Géographiquement on le retrouve dans la série Inframéditerranéen et Mésoméditérranéen, au niveau des clairières des forêts, des broussailles, des matorrals et au niveau des basses et moyennes montagnes jusqu'à des altitudes de 2200m (www.fellah-trade.com, consulté le 07/06/2021).

Figure 6 : Photo du spécimen *T. saturoïdes* (Benabida, 2000).

VI-2-Description de l'espèce *Lavandula multifida*

Le mot *Lavandula* dérive du latin : Lavare, qui signifie : laver (Chu et Kemper, 2001). La position systématique de *Lavandula* (khezama, Kohila) est la suivante :

Tableau 4 : Classification de *L. multifida* (Quezel et Santa, 1963).

Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Dicotylédons	Lamiales	Lamiacea	*Lavandula*	*Lavandula multifida*

Lavandula multifida peuvent atteindre 1m de hauteur. Les feuilles sont linéaires, très multifides composés de plusieurs petites feuilles, et de couleur gris vert. Les pédoncules sont longues, non ramifiées et terminées par des épis dont la couleur variée du mauve pale au violet (Figure 7) (LisBalchin, 2002).

Figure 7 : Photo du spécimen *L. multifida* (www.teline.fr, consulté le 07/06/21)

MATERIEL E T METHODES

Objectif

Le présent travail a pour objectif l'isolement des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques à partir des deux plantes médicinales endémiques de la région de Béni Mellal-Khénifra. Les isolats d'actinomycètes purifiés seront caractérisés morphologiquement et physiologiquement ensuite testés pour leur activité antifongique, tandis que les isolats de PGPR font l'objet uniquement à une caractérisation physiologique.

I- Isolement des souches bactériennes

I-1-Collection des échantillons

La région d'isolement c'est le GEO PARC M'GOUN (Figure 8), exactement à Ouaouizeght (R32°12'03, 8''N6°44, 5''W).

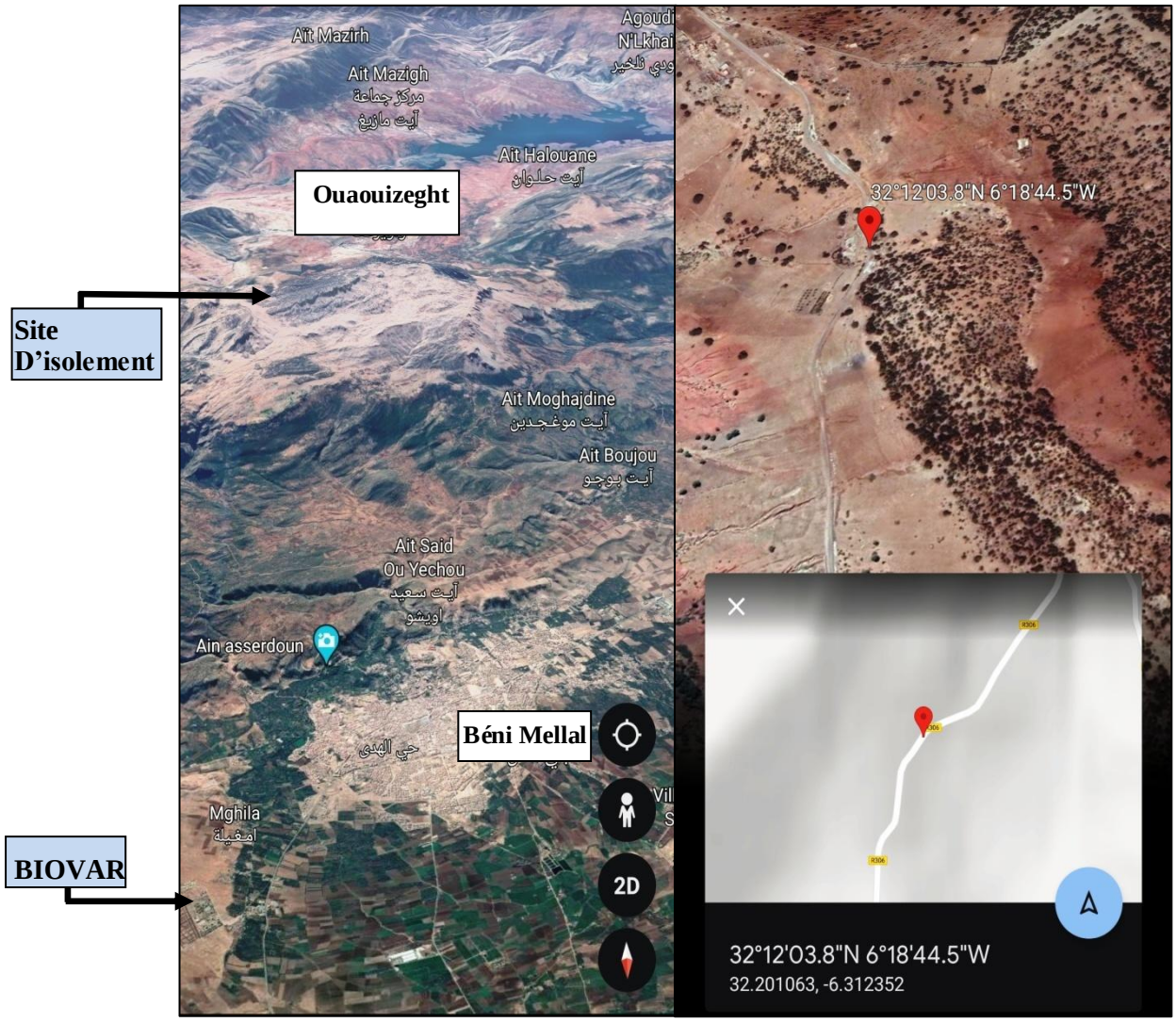

Figure 8 : Position géographique du site d'isolement

Les échantillons entiers de *Thymus saturoïdes* et *Lavandula multifida* ont été récupérés et placés dans des sacs en papier (Figure 9), transportés immédiatement dans une glacière au laboratoire, puis placés à 4°C pendant 48h.

Figure 9 : Plantes médicinales collectées, A: *L. multifida*, B: *T. saturoïdes*

I-2- Isolement des actinomycètes à partir des plantes

I-2-1-Préparation et stérilisation en surface des échantillons

Les échantillons sont lavés avec de l'eau du robinet pour éliminer le sol de surface, la matière organique et les épiphytes adhérents. Après séchage, les tissus (Tiges, Racines et Feuilles) de chaque plante sont soumis à une procédure de stérilisation en surface comprenant les étapes suivantes (Qin et al., 2009) :

- Lavage de 3 minutes dans l'éthanol à 70% (désinfectant)
- Lavage de 4 ou 5 minutes dans NaOCl à 3% (désinfectant)
- Lavage de 10 minutes dans $Na_2S_2O_3$ à 2,5% (Agent neutralisant du Chlore)
- Lavage de 1 minute dans l'éthanol à 70%
- Lavage de 5 fois dans de l'eau distillée stérile
- Rinçage final avec 10% de $NaHCO_3$ (crée un environnement alcalin pour retarder la croissance des champignons)

I-2-2-Inoculation du milieu

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinomycètes sont des milieux sélectifs qui favorisent la croissance des microorganismes particuliers en excluant celle des autres, par addition d'un agent sélectif (Delarras, 2014).

L'isolement des actinomycètes est réalisé sur milieu Amidon-Caséine (SCA) (Annexe1), le pH du milieu est ajusté à 7,2 et stérilisé à 120°C pendant 21 minutes. Après refroidissement, le milieu à été additionné d'un antifongique, le cycloheximide à raison de 50 µg/ml afin d'inhiber le développement des champignons (Kuster et Williams, 1964; Jean et Guy, 2014).

La méthode d'ensemencement employée c'est la technique des morceaux. Les échantillons ont été émiettés de manière aseptique en petits fragments de 0,5 cm (cinq fragment de chaque tissu pour chaque boite) (Figure 10) qui sont directement placés sur le milieu d'isolement. Les boites de pétri portant les indications nécessaires (origine de souche, la date) sont ensuite incubées à 28°C pendant 2 à 3 semaines (Qin et al., 2009).

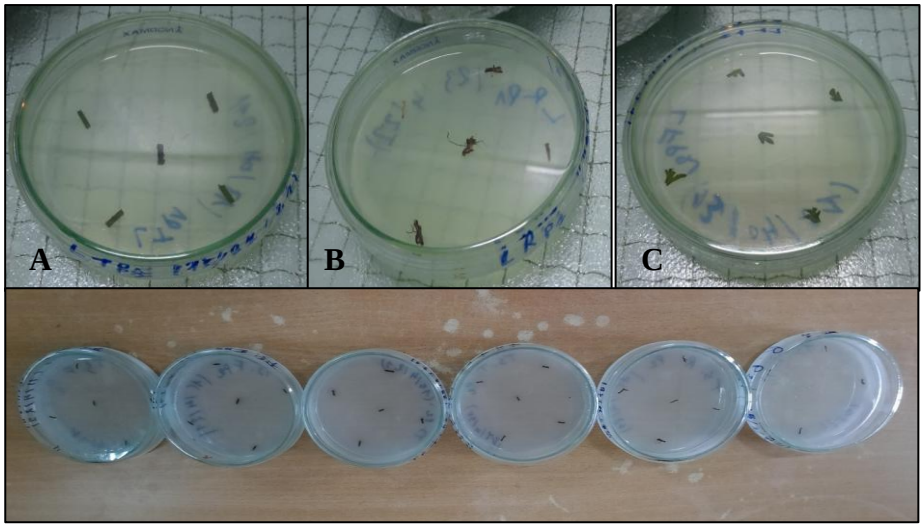

Figure 10 : Répartition des explants sur le milieu SCA, A: Tiges, B: Racines, C: Feuilles.

I-3- Isolement des PGPR rhizosphériques

I-3-1-Préparation des dilutions décimales et inoculation du milieu

Les isolats ont été obtenus à partir des échantillons de rhizosphère par la méthode des suspensions dilutions (Figure 11).

Pour chaque échantillon (*T. saturoïdes* et *L .multifida*), 1 gramme de rhizosphère est introduit dans un tube contenant 10ml d'eau distillée stérile. Après une bonne agitation à l'aide d'un vortex, cette solution mère est utilisée pour préparer des dilutions décimales (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}). 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur des boites de pétri contenant le milieu YEM (Annexe1), avec un nombre de répétions de trois. Les boites sont scellées par du parafilm et incubées 28°C pendant 48h.

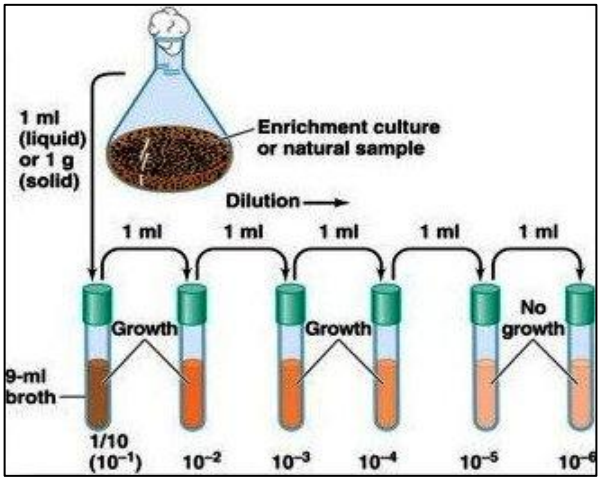

Figure 11 : Procédé de dilution de la solution du sol (Al-Dhabaan et Bakhali, 2017)

I-4- Repiquage et conservation des isolats

La purification des isolats est une étape essentielle dans notre travail, elle permet d'obtenir des colonies bien isolées et pures.

Pour les actinomycètes, les colonies poudreuses et filamenteuses suspectées d'être des actinobactéries ont été repérées, ensuite repiquées d'une façon successive sur milieu SCA exempt d'antibiotique jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Il en est de même pour les isolats de PGPR, pour lesquels au lieu d'utiliser le milieu SCA, on utilise le milieu YEM.

Les isolats purifiés ont été conservés à 4°C dans des boites de pétri en plastique contenant le même milieu en vue d'études ultérieures.

II- Caractérisation et identification des actinomycètes

II-1-Caractérisation morphologiques

L'étude macromorphologique permet de déterminer les différents caractères de mycélium de substrat (MS) et de mycélium aérien (MA). Après incubation, les colonies d'actinomycètes qui apparaissent ont été examinés à l'œil nu et à l'aide d'une loupe optique binoculaire.

La forme, la taille, le développement du mycélium aérien et du substrat, la pigmentation des mycéliums et la présence de pigments diffusibles dans la gélose sont observés et notés après incubation de 7 à 21 jours, à 28°C.

L'aspect macroscopique des souches d'actinobactéries endophytes isolées sont déterminés sur les milieux International Streptomyces Project : ISP_2, ISP_3, ISP_4 et ISP_5 (Annexe1) (Figure 12) (Shirling et Gottlieb, 1966).

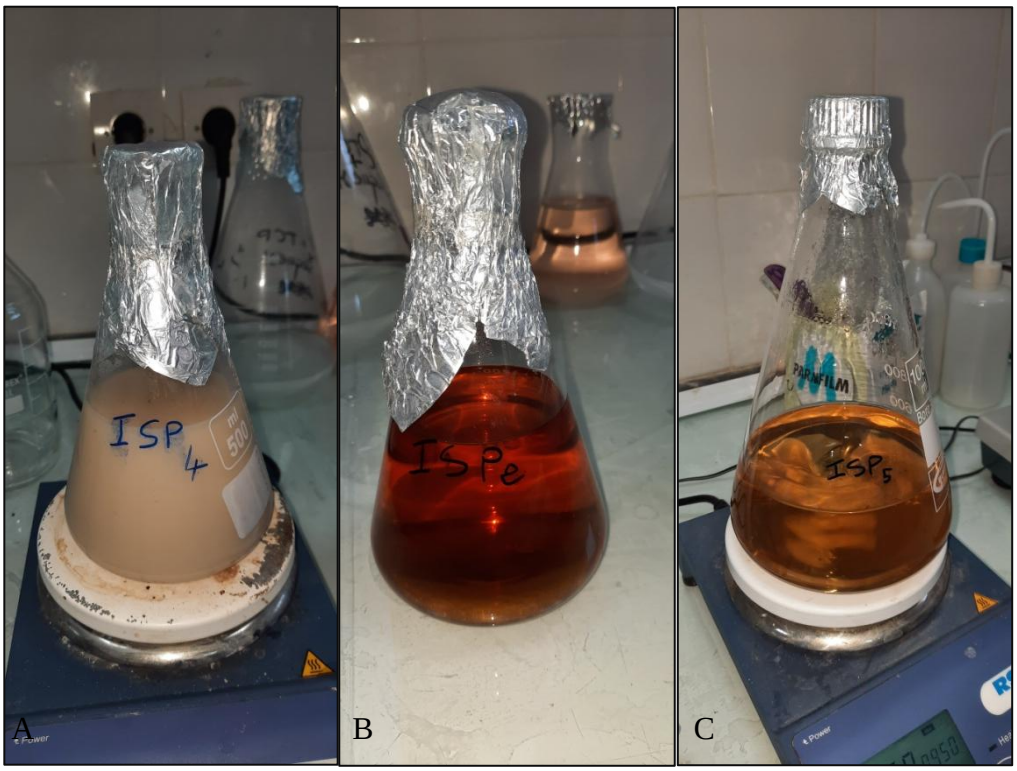

Figure 12 : Les milieux d'identification des actinomycètes (A : ISP4, B : ISP2, C : ISP5)

II-2-Examen microscopique

Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu sur le milieu caséine amidon. Ces frottis sont colorés, après observation à l'aide d'un microscope optique à grossissement x1000.

Les principales étapes de cette coloration sont :

- Coloration par le violet de gentianes (1 min).
- Mordançage par le lugol (1 min).
- Décoloration par l'alcool (10 sec).
- Recoloration par la fushine (1 min).
- Séchage.
- Observation microscopique.

III-Test de tolérance au stress pour les actinomycètes et les PGPR

Tous les isolats ont été soumis à une étude de tolérance au stress abiotique contre une gamme différente de pH (4 et 8) et de salinité (8%) (Tableau 5).

Tableau 5 : Tests de tolérance au stress physique.

Isolat	Test de tolérance au stress	Concentration ou différence utilisé	Milieu de culture	Incubation	Méthode de détection
Actinomycètes	Concentration de NaCl	8%	SCA (Saurav et Kannabiran 2009)	28°C, 7-15j	Croissance
	Différent pH	8, 4	SCA (Saurav et Kannabiran 2009)	28°C, 7-15j	Croissance
PGPR	Concentration de NaCl	8%	YEM	28°C, 48h	Croissance
	Différent pH	8, 4	YEM	28°C, 48h	Croissance

IV-Détermination des activités promotrices de la croissance des plantes

IV-1-Mise en évidence de la solubilisation du phosphate inorganique

La solubilisation qualitative du phosphate a été analysée sur le milieu gélosé PVK (Pikovskaya) (Annexe1). Le milieu PVK est ensemencé par spot, et la capacité des isolats à solubiliser le phosphate dans le milieu est déterminé par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie correspondante après incubation à 28°C pendant 15 jours pour les actinomycètes endophytes et 7 jours pour les PGPR rhizosphériques (Passari, 2015).

La mesure de l'efficacité de solubilisation en % est effectuée selon la formule suivante :

$$\textbf{L'efficacité de solubilisation en \%} = \frac{\textbf{Diamètre d'Halo}}{\textbf{Diamètre de la colonie}} \times 100$$

Avec, **diamètre de l'Halo = Diamètre Total – Diamètre de la colonie**

L'estimation quantitative du phosphate soluble a été déterminée sur le milieu PVK liquide, 25ml de ce dernier a été inoculé par les souches isolées. La culture a été incubée à 30°C sous agitation à 125rpm pendant 15 jours pour les actinomycètes endophytes et 10 jours pour les PGPR rhizosphériques (Figure 15) (Nautiyal, 1999). Après incubation, 2ml de la culture a été prélevé, puis centrifugé à 6000 rpm, pendant 10 min, à 4°C. La quantité de phosphate soluble dans le surnageant a été estimé par l'utilisation d'un réactif spécial:

- Solution A : Solution de Molybdate de sodium 2,5% (2,5g dans 100ml d'acide sulfurique 10N).
- Solution B : Solution de sulfate d'hydrazine 0,15% (0,15g dans 100ml d'eau distillée).
- Solution AB : 25 ml de solution A est mélangé avec 10 ml de la solution B et le mélange dilué à 100ml avec de l'eau distillée.

0,5 ml de surnageant est mélangé avec 2ml d'eau distillée et 2,5ml de la solution AB, puis les tubes sont placés dans un bain marrie à 95°C pendant 10min. L'absorbance a été mesurée à 820 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et comparée à la courbe standard de KH_2PO_4. La quantité de KH_2PO_4 a été exprimée en µg/ml.

IV-2-Production de l'acide indole acétique (AIA)

Les isolats sont mis en culture pendant 15 jours dans le milieu SCA liquide contenant 2g/l du tryptophane pour les actinomycètes et le milieu YEM liquide contenant 1,5 g/l du tryptophane pour les PGPR. La croissance est assurée à température ambiante sous agitation (125rpm). Après incubation, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm pendant 15 min et le surnageant est récupéré (Gordon, 1951).

Après récupération du surnageant, 1ml de celui-ci est mélangé avec 2ml du réactif Salkowski (Annexe2). Les préparations sont ensuite mises à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la couleur rose résultante qui indique la production de l'AIA a été lue à 530 nm avec un spectrophotomètre, puis comparée avec la courbe standard d'AIA et la quantité d'auxine est exprimée en µg/ml (Gordon, 1951).

IV-3-Fixation libre d'azote N_2

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique est effectuée après ensemencement de chacune des souches dans des milieux de cultures (AFM) (Annexe1) dépourvus de toute source de l'azote (Okazaki et al., 1995). Les boites sont incubées entre 7 et 14 jours pour les actinomycètes, et 5 jours pour les PGPR à 28°C.

V-Production des enzymes hydrolytiques

V-1- Les amylases

Ce test est réalisé sur le milieu amidon agar (Annexe1) additionné d'une concentration d'amidon de 1%. L'ensemencement est fait par spot de la souche à tester, puis le milieu est incubé à 28°C pendant 5-7 jours (Gordon et Smith, 1953). Après incubation, l'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'inondation des boites avec une solution de lugol. L'absence de la coloration autour des colonies indique que l'amidon a été hydrolysé et confirme la production d'α-amylase. Les zones contenant l'amidon se colorent en brun (Dos Santos et al., 2012).

L'index d'activité amylolytique des souches productrices des amylases a été calculé pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Gordon et Smith, 1953).

$$\textbf{Index d'activité amylolytique} = \frac{\textbf{Diamètre de l'Halo-Diamètre de la colonie (mm)}}{\textbf{Diamètre de l'Halo}}$$

V-2- Les cellulases

Cette activité a été testée sur le milieu ISP_9 (Annexe1) additionné de cellulose à 1%. Le milieu est ensemencé par spot de la souche à tester et incubé à 28°C. Après 14 jours, l'addition d'une solution aqueuse de rouge Congo à 1% (Annexe2) pendant 15 à 20 min permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (Preeti et al., 2016). L'index de l'activité cellulosique à été calculé de la même manière.

VI- Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique d'isolats d'actinomycètes

L'utilisation d'isolats d'actinomycètes comme moyen de lutte contre les agents phytopathogènes permet d'apprécier l'aptitude de ces isolats à inhiber ou réduire la croissance du champignon phytopathogène : *Fusarium oxysporum*.

La souche fongique utilisée est *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolat AMR fournie par l'équipe « Protection et Valorisation des Végétaux », Faculté des sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech.

L'activité antifongique des souches d'actinobactéries est mise en évidence par la méthode de disque d'agar (Aghighi et al., 2004). Les souches d'actinobactéries ont été ensemencées sur milieu SCA, les cultures sont incubées pendant 14 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés puis placés aux extrémités de la boite de pétri contenant le milieu (Annexe1). Les boites sont incubées à 28°C pendant 3 jours. Un fragment de mycélium fongique (d=6mm) âgé de 7 jours est prélevé, puis déposé au centre de la boite contenant les disques des isolats à tester.

Le témoin est incubé avec de *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis* en absence des souches d'actinomycètes. L'ensemble est placé dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures ensuite les boites sont incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours. Le test est positif lorsqu'il y a une inhibition de la croissance de mycélium autour des cylindres d'actinomycètes.

Le taux d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\textbf{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\gamma_0 - \gamma}{\gamma_0} \times 100$$

Sachant que :

γ_0 : diamètre du mycélium control.

γ : diamètre du mycélium en présence de la bactérie (mesuré sur l'axe champignon-bactérie, en mm).

VII-Analyses statistiques

Les données ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel SPSS Version 25 (IBM Corporation). Il s'agissait d'une analyse de variance à deux variables (ANOVA II).

RESULTATS ET D ISCUSSION

I-Isolement et purification des actinomycètes endophytes

Un protocole spécifique pour l'isolement des actinomycètes d'une plante donnée est important, car l'isolement représente l'étape la plus cruciale du processus d'obtention de cultures pures. La stratégie d'échantillonnage, le type des tissus, les conditions de culture, la stérilisation de surface pour éviter toute contamination avec des microorganismes épiphytes indésirables et les milieux sélectifs influencent toute détection des endophytes (Zhang et al., 2006; Shimizu, 2011).

La recherche des actinomycètes endophytes a été effectuée pour deux plantes médicinales: *T. saturoïdes* et *L. multifida*, sur le milieu de culture Amidon-Caséine (SCA). C'est le milieu le plus approprié pour l'isolement des actinomycètes endophytes, ce milieu favorise la croissance des actinomycètes, car il contient de l'amidon comme principale source de carbone. En effet, l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (amidon, caséine) rend le milieu de culture moins favorable au développement d'autres bactéries (Cavalla et Eberlin, 1994).

Les résultats montrent que les deux plantes utilisées ont permis l'isolement d'actinobactéries endophytes. Apres purification, 11 isolats ont été obtenus: 6 isolats dérivés des racines et 3 isolats dérivés des tiges de *L. multifida* désignés respectivement comme suit : LRP1', LRP1, LRP2, LRP1'', LRP2', LRP2'', LTP2, LTP2', LTP1'. 2 isolats (TSRP1 et TSRP2) ont été repérés à partir des racines de *T. saturoïdes* (Tableau 5) (Figure 13 et 14). Ce qui révèle que les actinobactéries sont plus prévalent dans les tissus racinaires de la plante hôte. Ceci corrobore avec Pratiwi et al., (2017) qui n'arrivent pas à isoler des actinomycètes endophytes à partir des feuilles de *Neesia altissina*. Priya (2012) a rapporté que la plupart des isolats ont été obtenus à partir des tiges et des racines, et n'a obtenu aucun actinomycète endophyte à partir d'échantillons de feuilles. En effet, le maximum d'actinobactéries endophytes a été récupéré dans les racines, puis dans les tiges, et moins dans les feuilles (Qin et al., 2009).

Tableau 6 : Répartition des actinomycètes endophytes dans les tissus végétaux.

Espèce	Tiges	Racines	Feuilles
L. multifida	3	**6**	**0**
T. saturoïdes	**0**	**2**	**0**

L'absence de colonies sur les échantillons de feuilles peut être due à la pénétration de l'éthanol et de l'hypochlorite de sodium dans le tissu mince de la feuille lors du processus de stérilisation en surface (Sunaryanto et Herliyani Mahsunah, 2013).

Le résultat obtenu est probablement du au fait que les racines sont un bon habitat pour divers microorganismes, y compris les actinomycètes endophytes (Taechowisan et al., 2003). En effet, les actinomycètes résident en abondance dans la rhizosphère, pénètrent dans les tissus végétaux par le système racinaire et se propagent dans les espaces intercellulaires et le système vasculaire (Sardi et al., 1992; Shimizu, 2011).

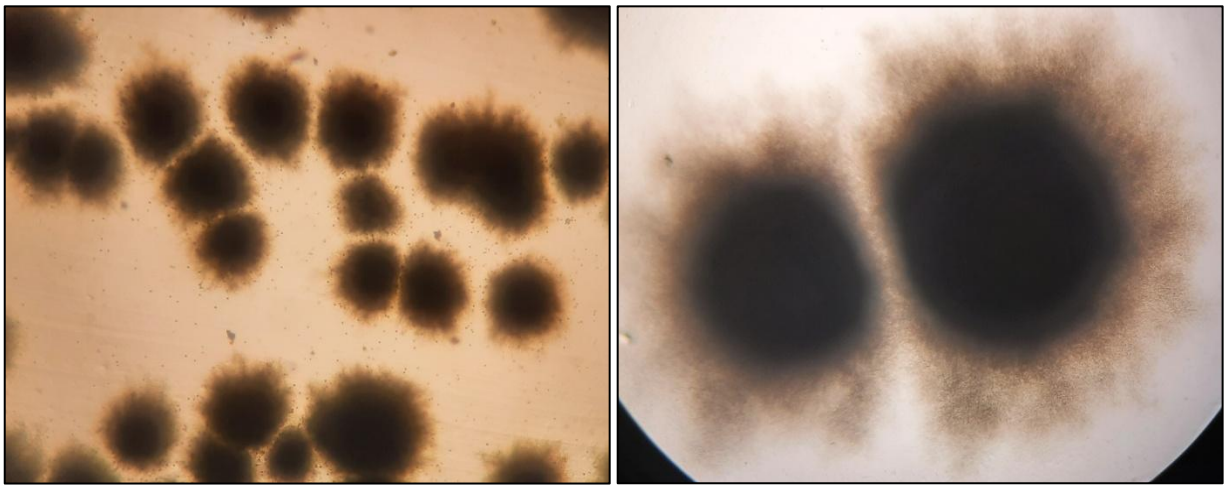

Figure 13 : Aspect filamenteux des colonies d'actinobactéries.

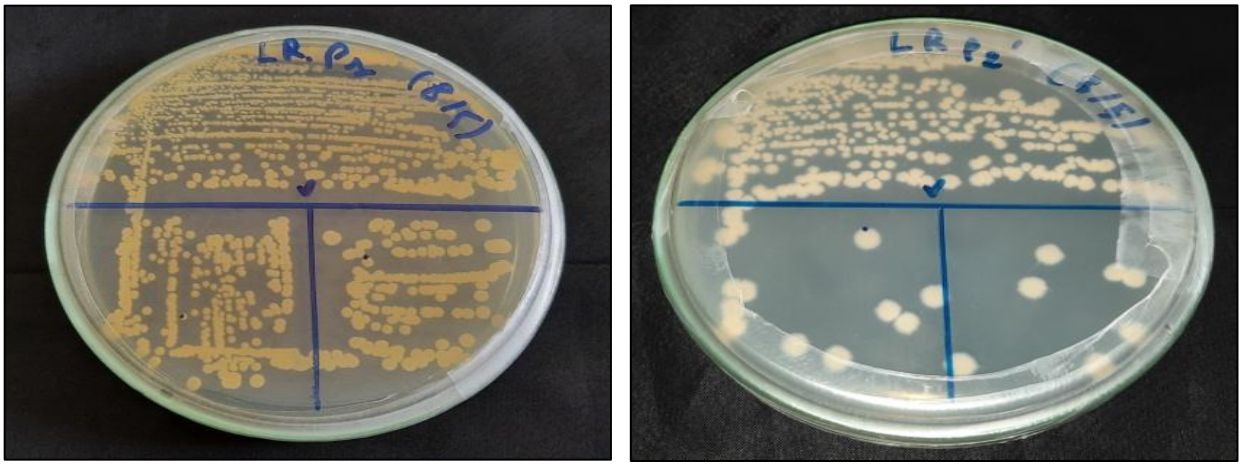

Figure 14 : Isolats d'actinomycètes (LRP1 et LRP2') obtenus sur le milieu Amidon-Caséine après purification

II- Isolement et purification des PGPR rhizosphériques

Concernant les PGPR rhizosphériques, le nombre le plus élevé d'isolats bactériens collectés, étant de 7 isolats, suivi de 3 isolats, qui ont été détectés dans les échantillons de la rhizosphère de *L. multifida* et *T. saturoïdes* respectivement (Tableau 7, Figure 15).

Tableau 7 : Nombre des isolats de PGPR isolés et leurs espèces de plantes hôtes.

Espèce	Code	Nombre d'isolat
L.multifida	SLM12, SLM4, SLM3, SLM9, SLM10, SLM7, SLM13	7
T. saturoïdes	STS3, STS4, STS1	3

Tamilarasi et al. (2009), ont rapporté que le degré variable de populations observés dans les racines des plantes est du à l'effet de la composition chimique de l'exsudat racinaire des plantes sur les microorganismes.

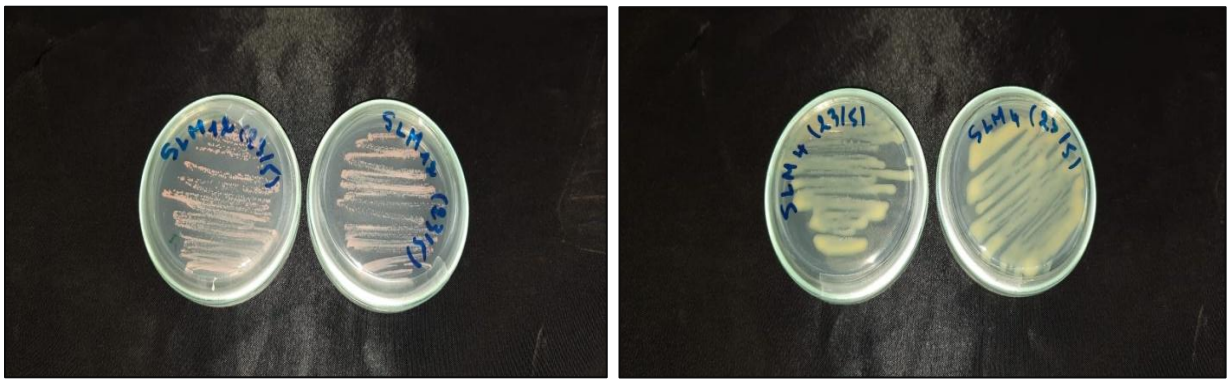

Figure 15 : Isolats de PGPR (SLM4 et SLM12) obtenus sur le milieu YEM après la purification.

III-Caractérisation et identification des actinomycètes

III-1-Caractérisation morphologique

La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique des isolats d'actinomycètes après culture sur les milieux d'identification ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5 figure dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Caractéristiques potentiels des isolats d'actinomycètes endophytes.

Isolat	Milieu de culture	Croissance	Aspect macroscopique de la colonie	Couleur du recto de la colonie	Couleur du revers de la colonie	Pigments diffusibles
LTP2	ISP2	++	Circulaire, bords irréguliers, rugueux, dentelées, consistance sèche, élévation convexe	Blanc perlé	Beige	Beige brun
	ISP3	++	Aplatis, irréguliers, sèches	Blanc gris	Ivoire clair	Absence de production
	ISP4	++	Très poudreux, aplati, bords irrégulier, rugueux, granulées	/	Orangé nacré	Orangé nacré
	ISP5	++	Poudreux, circulaires, irréguliers, rugueux	Gris clair	Jaune sable	Absence de production
LRP2'	ISP2	++	Rugueux, aplatis, dentelées, convexes	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
	ISP3	++	Aplatis, lisse, irréguliers, sèches	Blanc gris	Ivoire clair	Absence de production
	ISP4	++	Irréguliers, aplatis, lisses, sèches	Ivoire clair	Ivoire clair	Blanc perlé
	ISP5	++	Rugueux, Aplatis, dentelées	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
LRP2	ISP2	++	Bords réguliers, circulaire, poudreux, brillants, grand, convexe, sèches	Blanc gris	Jaune miel	Absence de production
	ISP3	++	Rugueux, granulées, irréguliers	Blanc gris	Jaune soleil	Absence de production
	ISP4	+	Arrondi, réguliers, grand taille, aplatis, lisses	Jaune trafic	Jaune pastel	Rose bébé
	ISP5	++	Circulaire, convexe, régulier, rugueux	Brun vert	Brun noir	Brun vert/olive
TSRP1	ISP2	++	Irréguliers, aplatis, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production
	ISP3	++	Irréguliers, aplatis, lisse	Blanc perlé	Blanc perlé	Absence de production
	ISP4	++	Aplatis, irréguliers, ramifiées, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production

	ISP5	++	Irréguliers, aplatis, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production
LTP2’	ISP2	++	Circulaire, bords irréguliers, rugueux, dentelées, consistance sèche, élévation convexe	Blanc perlé	Beige	Beige brun
	ISP3	++	Sèches, semi bombés, granuleux, rugueux	Blanc perlé	Ivoire	Absence de production
	ISP4	++	Très poudreux, aplatis, irréguliers, rugueux, granulées	/	Orangé nacré	Orangé nacré
	ISP5	++	Poudreux, circulaire, réguliers, rugueux	Gris clair	Jaune sable	Absence de production
LRP1’	ISP2	++	Circulaires, convexes, sèches, poudreux, dentelées, rugueux	Beige	Jaune melon	Absence de production
	ISP3	++	Irréguliers, rugueux, granuleux, semi bombés	Blanc gris	Ivoire	Absence de production
	ISP4	++	Semi bombés, rugueux, poudreux, surface granulées	Gris soie	Ivoire	Absence de production
	ISP5	++	Circulaires, bords réguliers, convexes, dentelées	Ivoire	Jaune melon	Absence de production
LRP2’’	ISP2	++	Convexes, dentelées, irréguliers, rugueux,	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
	ISP3	++	Aplatis, lisse, irréguliers, sèches	Blanc gris	Ivoire clair	Absence de production
	ISP4	++	Irréguliers, aplatis, lisses, sèches	Ivoire clair	Ivoire clair	Blanc perlé
	ISP5	++	dentelées, circulaires, irréguliers, rugueux,	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
	ISP2	++	Convexes, dentelées, irréguliers, rugueux,	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
	ISP3	++	Semi bombés, circulaire, irréguliers,	Ivoire clair	Ivoire	Absence de production
LRP1’’	ISP4	++	Semi bombés, rondes,	Blanc	Jaune citron	Absence de production

	ISP5	++	Circulaire, réguliers, attachées à la surface de la gélose	Ivoire clair	/	Absence de production
LRP1	ISP2	++	Circulaires, convexes, sèches, poudreux, dentelées, rugueux	Beige	Jaune melon	Absence de production
	ISP3	++	Poudreux, sèches, avec un point noir au centre, irréguliers, rugueux, semi bombés	Blanc gris	Ivoire	Absence de production
	ISP4	++	Semi bombés, rugueux, poudreux, surface granulées	Gris soie	ivoire	Absence de production
	ISP5	++	Bombé, circulaires, réguliers,	Blanc gris	Jaune melon	Absence de production
TSRP2	ISP2	+	Colonies attachés à la surface de la gélose, irrégulier, bombés, rugueux	Jaune	/	Absence de production
	ISP3	++	Aplatis, irréguliers, surface rugueux, poudreux, sèches	Blanc gris	Ivoire	Absence de production
	ISP4	++	Aplatis, irréguliers, surface rugueux, poudreux	Blanc	Jaune safran	Absence de production
	ISP5	++	Circulaires, convexes, dentelées, réguliers	Ivoire claire	Jaune melon	Absence de production
LTP1'	ISP2	++	Irréguliers, aplatis, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production
	ISP3	++	Aplati, ramifiés, irréguliers	Blanc perlé	Ivoire claire	Absence de production
	ISP4	++	Aplatis, irréguliers, très ramifiés, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production
	ISP5	++	Irréguliers, aplatis, lisse	/	Ivoire claire	Absence de production

+ : Croissance modérée ; ++ : Croissance importante ; / : Absence de croissance

Selon les résultats obtenus dans le tableau 8, la plupart des isolats présentent une croissance abondante sur les différents milieux d'identification (sauf l'isolat LRP2 sur le milieu ISP4 et l'isolat TSRP2 sur le milieu ISP2 qui présentent une croissance modérée), et des formes, des couleurs et des aspects différents (Figure 16). La majorité des isolats donnent des colonies poudreuses de différentes couleurs de mycélium. L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat qui peut être beige, jaune, brun, ivoire, blanc ou gris. Les colonies sont opaques et adhérent fermement à la gélose sauf les isolats TSRP2 sur le milieu ISP2 et LRP1'' sur ISP5.

L'élaboration de pigments diffusibles a été remarquablement observée sur le milieu ISP2 et ISP4 pour l'isolat LTP2, et sur le milieu ISP4 et ISP5 pour les isolats LRP2, ISP4 pour l'isolat LTP2' et LRP2''et LRP2', et le milieu ISP2 et ISP4 pour l'isolat LTP2. Les autres isolats n'ont élaboré aucun pigment.

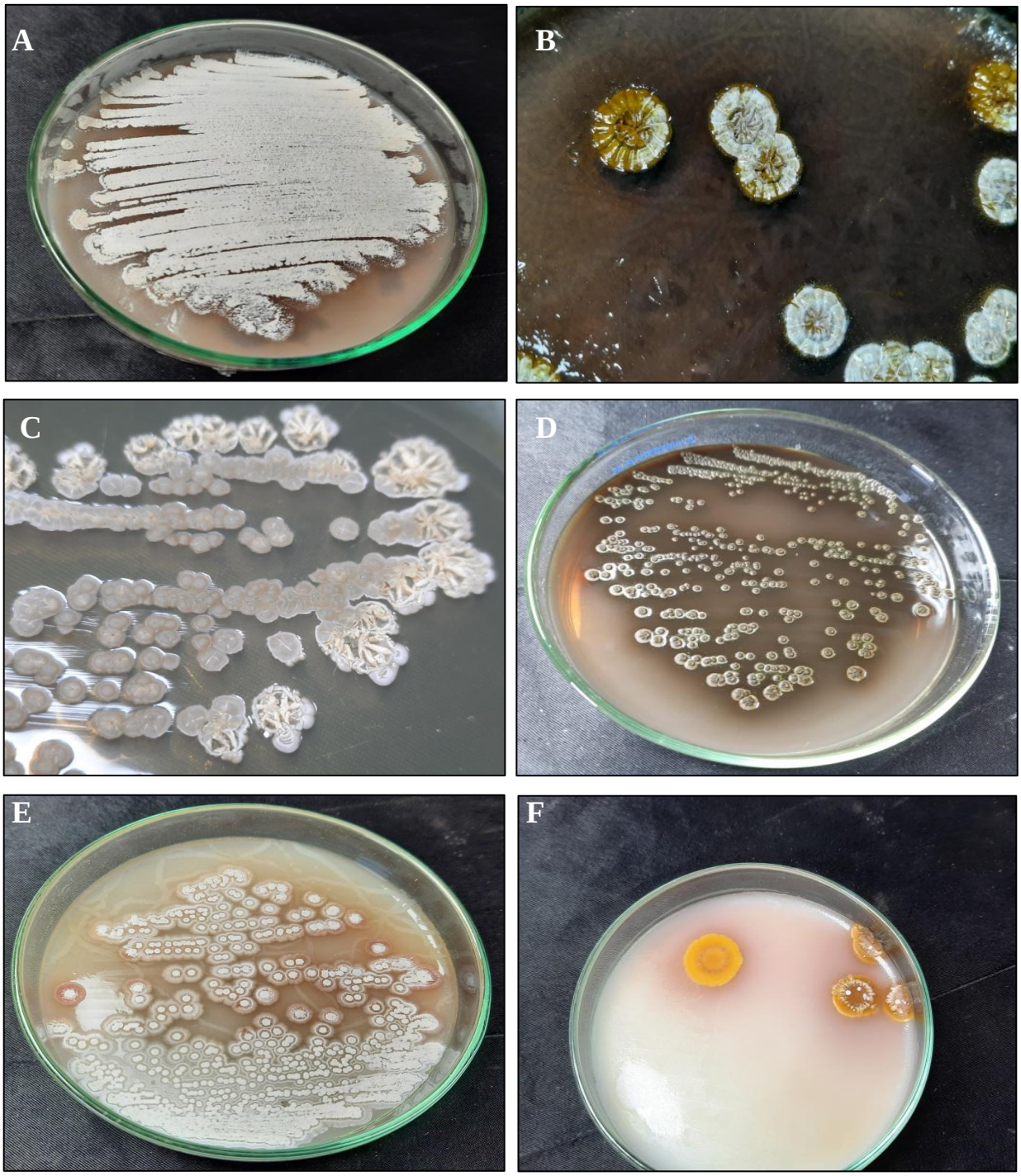

Figure 16 : Aspect macroscopique sur les milieux ISP de quelques isolats d'actinomycètes isolés, A: LTP2' sur ISP4; B: LRP2 sur ISP2; C: LRP2'' sur ISP2; D: LRP2 sur ISP5; E : LTP2 sur ISP4 ; F : LRP2 sur ISP4.

III-2-Morphologie microscopique

Tous les isolats testés sont Gram positives (couleur violette) comme le montre les photos ci-dessous. Les observations microscopiques des isolats mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés.

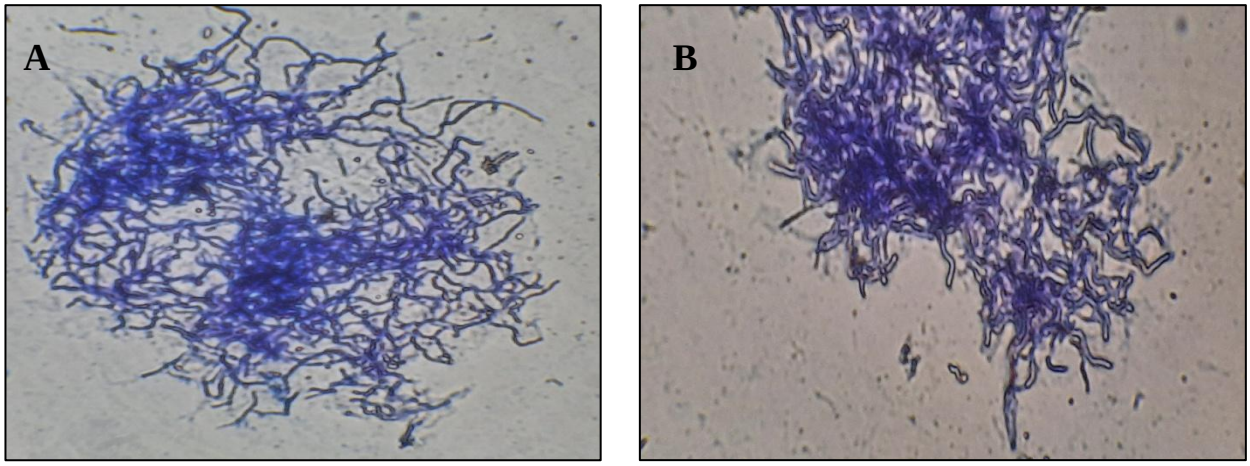

Figure 17 : Observation des isolats d'actinomycètes par le photo microscope après coloration de Gram, A : LRP1 ; B : LRP2'.

VI-Test de tolérance au stress pour les actinomycètes endophytes et les PGPR rhizosphériques

Concernant les actinomycètes endophytes, seuls les isolats LTP2, LTP2' et LTP1' tolèrent 8% de NaCl. Cependant, tous les isolats des PGPR rhizosphériques ont été inhibés à cette concentration de sel. La capacité des isolats d'actinomycètes à se développer sur SCA avec une concentration de NaCl de 8% signifie que ces isolats ont une tolérance élevée au sel (Shariffah-Muzaimah et al., 2018).

De plus, la majorité des isolats d'actinomycètes sont capables de se développer dans un pH légèrement acide (pH4) et légèrement alcalin (pH8), sauf les isolats LRP1, TSRP2 sont incapables de tolérer un pH acide. L'isolat LTP1' ne se développe pas dans un pH alcalin, tandis

que les isolats LRP2 et TSRP2 sont incapables de se développer ni à pH acide ni alcalin (Tableau 9).

Tableau 9 : Effet de pH acide et alcalin sur la croissance des actinomycètes endophytes.

Isolat	pH8	pH4
LRP2'	++	++
LRP1'	++	++
LTP2'	++	++
LRP1	-	++
TSRP2	-	+
LRP1''	++	++
LRP2 ''	+	++
LRP2	-	-
LTP1'	+	-
TSRP1	-	-
LTP2	++	++

- : pas de croissance ; + : croissance modérée ; ++ : croissance importante

La capacité des isolats à tolérer des gammes de pH et de salinité peut favoriser leur compétitivité dans la rhizosphère et devrait leur permettre de jouer un rôle dans la protection des plantes dans divers conditions environnementales (Da Silva Sousa et al., 2008). Par conséquent, la tolérance à la salinité et au pH élevés devrait être le critère de sélection des microorganismes (Drozdowic, 2016).

Pour les PGPR rhizosphériques isolées, la plupart des isolats sont capables de se développer dans un pH légèrement alcalin (pH8), à l'exception des isolats STS1 et STS3. Dans un pH légèrement acide (pH4), seuls les isolats SLM4 et SLM13 sont capables de croître à cette valeur de pH (Tableau 10).

Tableau 10 : Effet de pH acide et alcalin sur la croissance des PGPR rhizosphériques.

Isolat	pH8	pH4
SLM4	++	++
SLM7	+	-
SLM3	++	-
STS1	-	-
STS3	-	-
STS4	++	-
SLM9	+	-
SLM12	++	-
SLM13	++	++
SLM10	++	-

- : pas de croissance ; + : croissance modérée ; ++ : croissance importante

V-Détermination des activités promotrices de la croissance des plantes

V-1-Mise en évidence de la solubilisation du phosphate inorganique

Le test statistique montre qu'il y a une différence significative entre les isolats. Sur les 11 isolats d'actinomycètes, 7 isolats (63,63%) (LRP1', LRP1, LRP2', LRP1'', LRP2'', LTP2' et LTP2) ont montré une capacité significative de solubilisation du phosphate dans des conditions *in vitro* en produisant des zones de halo transparent autour des colonies cultivées sur des milieux en gélose de Pikovskayas (PVK). L'isolat LRP1' présentait une efficacité de solubilisation du phosphate la plus élevée (458%) (Diamètre moyen de l'halo : 9,6mm), suivi de l'isolat LTP2 (efficacité de solubilisation : 118%, Diamètre moyen de l'halo : 4,3mm) et l'isolat LRP2' (efficacité de solubilisation : 71%, Diamètre moyen de l'halo : 2,2mm) (Figures 18 et 19). Ceci est en accord avec les résultats de Passari et al. (2015) qui ont mentionné que la plupart des isolats d'actinomycètes présentent une activité de solubilisation du phosphate, alors parmi les 22 isolats, 14 (63,6%) étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique sur la base de la présence d'une zone claire autour de la colonie.

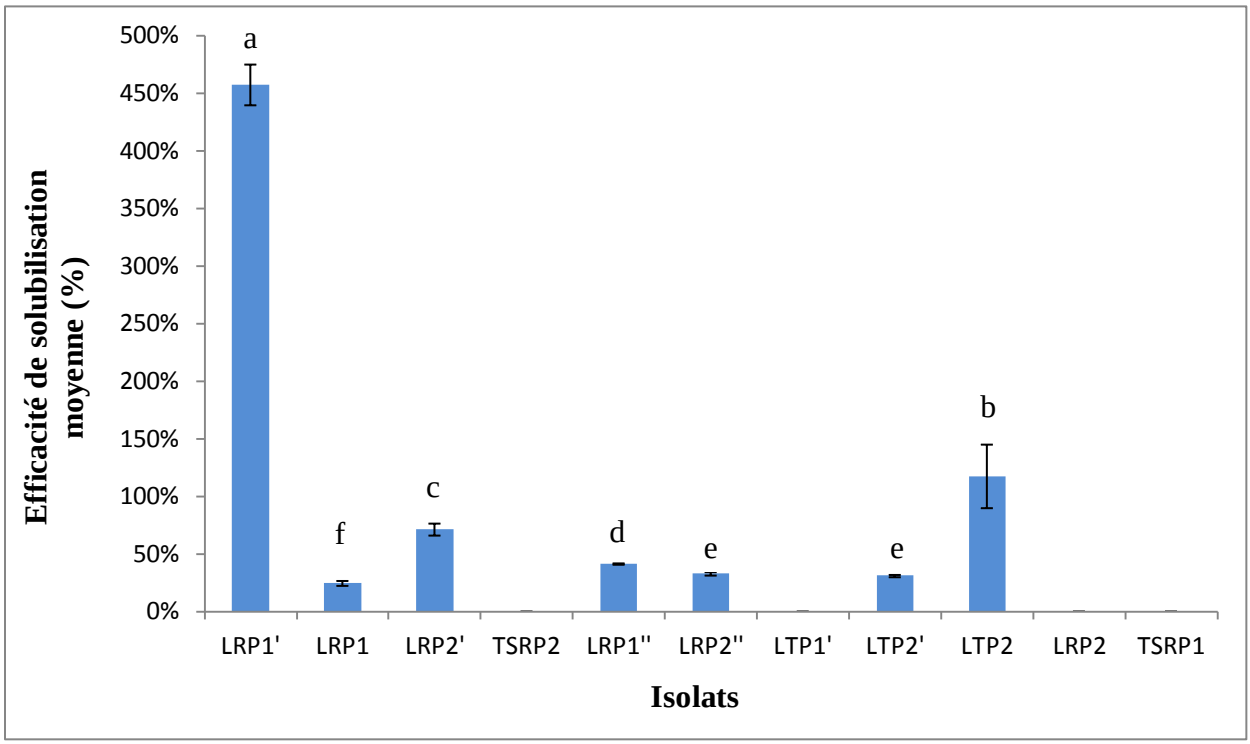

Figure 18 : Solubilisation du phosphate par différents isolats d'actinomycètes.

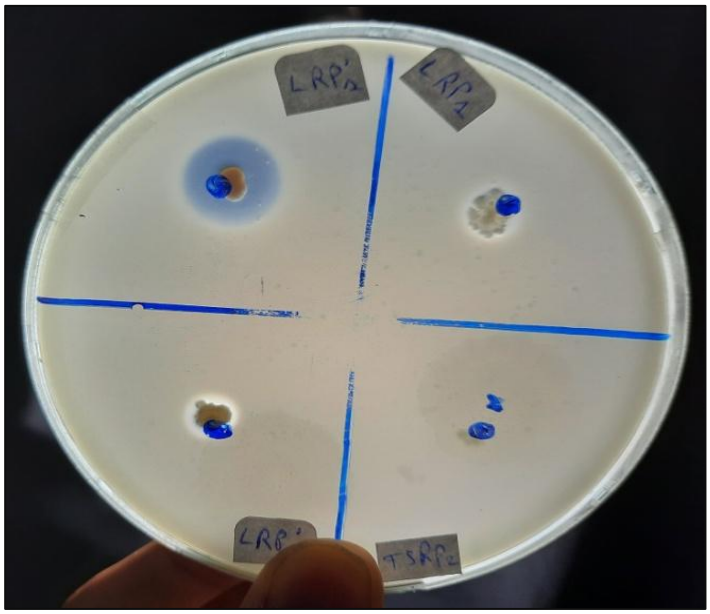

Figure 19 : Apparition d'un halo clair sur le milieu PVK autour des colonies. TSRP2 ne forme aucun halo.

En ce qui concerne les PGPR rhizosphériques, la solubilisation du phosphate inorganique chez les isolats SLM13, SLM9 et SLM7 a montré une efficacité de solubilisation de 55,45%, 30,51% et 20,29% respectivement (Figures 20 et 21). Eman et al. (2014) notent que parmi 112 isolats de PGPR, 39 (34,89%) ont montré une activité de solubilisation du phosphate. La différence entre les isolats est statistiquement significative.

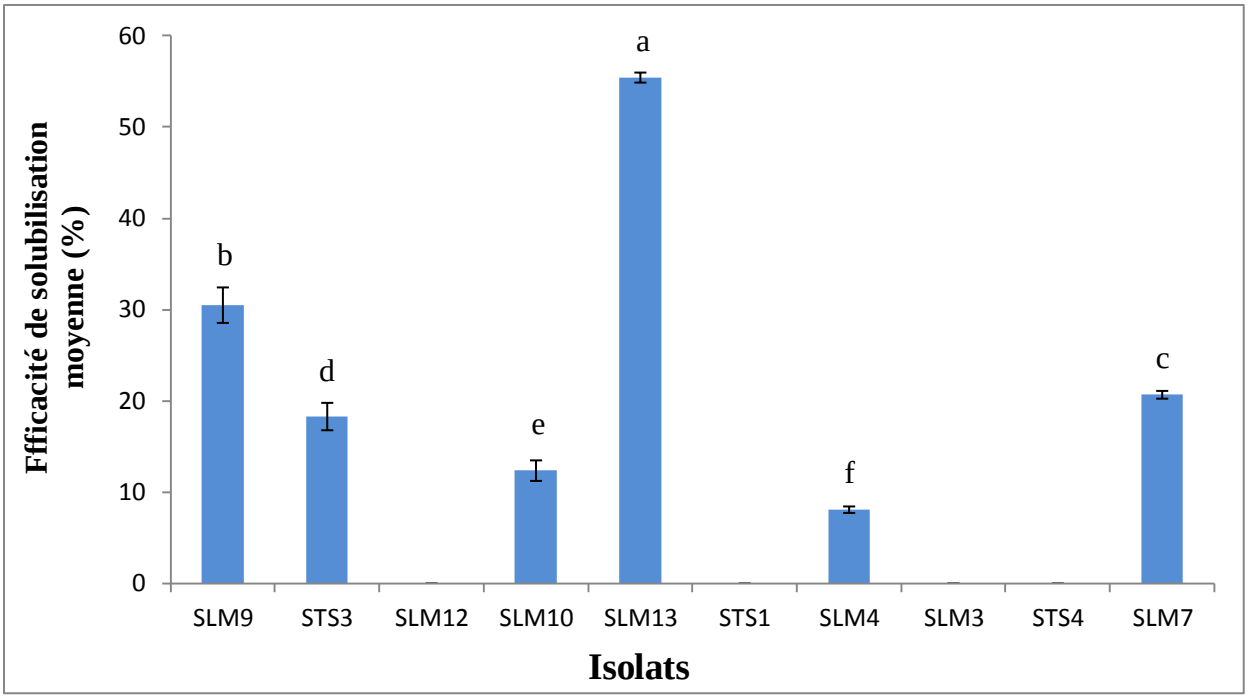

Figure 20 : Solubilisation du phosphate par différents isolats de PGPR.

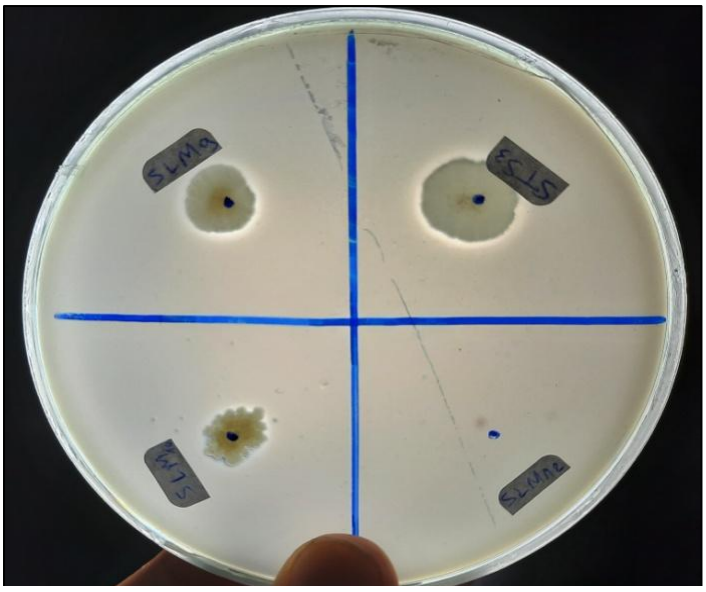

Figure 21 : Activité de solubilisation du phosphate des PGPR (SLM1, STS3, SLM9 et SLM12) sur le milieu PVK sous la forme d'une zone claire entourant les colonies.

La quantité de phosphate solubilisé par les isolats d'actinomycètes obtenue à partir de plantes médicinales est comprise entre 730,81 µg/ml et 163,81 µg/ml. L'isolat TSRP2 présentait la concentration du phosphate soluble la plus élevée (730,81 µg/ml), suivi de LTP2' (656,82 µg/ml), LTP2 (617,47 µg/ml) et LTP1' (486,92 µg/ml) (Figure 22). Passari et al. (2015) ont mentionné que l'estimation quantitative du phosphate soluble par les isolats d'actinomycètes endophytes des plantes médicinales (*Eupatorium odoratum, Musa superba, Mirabilis jalapa, Curcuma longa, Clerodendrum colebrookianum, Alstonia scholaris* et *Centella asiatica*) varie de 32 à 326 µg/ml, avec la plus grande concentration est représentée par *Streptomyces sp.* (326 µg/ml) suivi par *Leisfonia xyli* (315 µg/ml). Le test montre qu'il y a une différence significative entre TSRP2 et LTP1'.

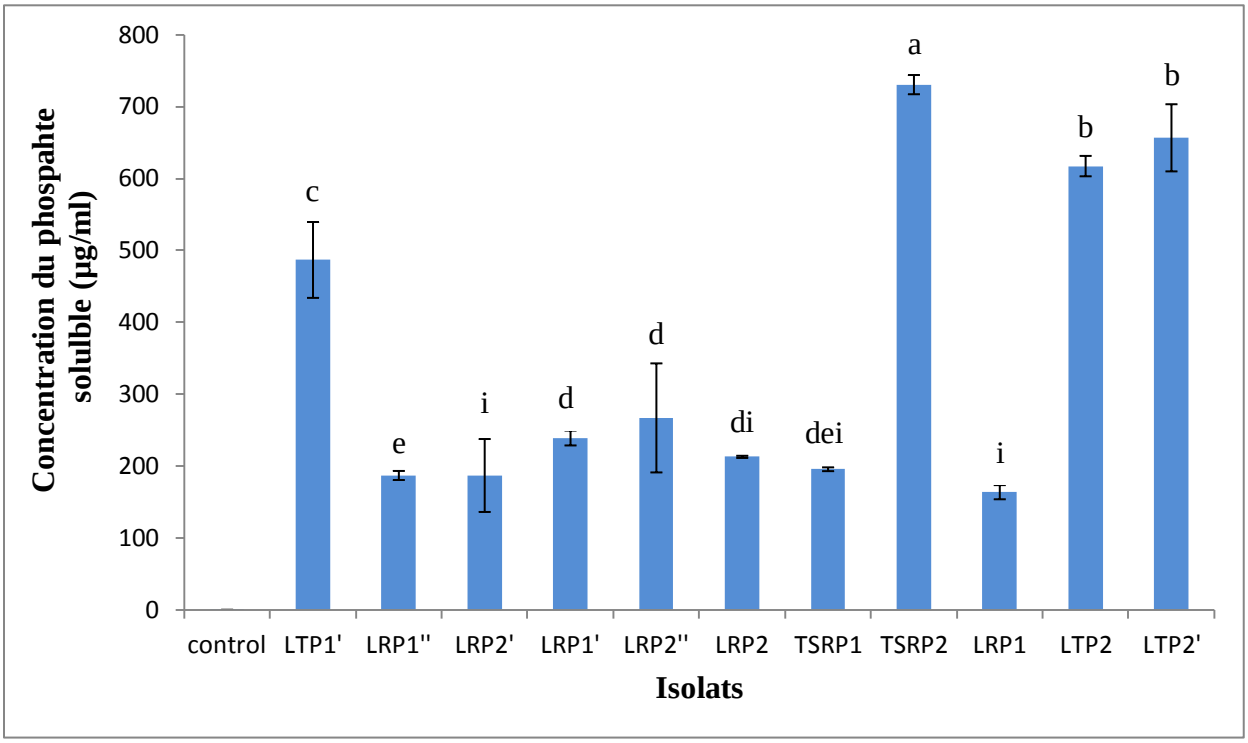

Figure 22 : Estimation quantitative du phosphate soluble chez les isolats d'actinomycètes.

L'estimation quantitative de la solubilisation du phosphate par les PGPR rhizosphériques montre qu'elle varie de 12,68 µg/ml à 246,45 µg/ml, avec la valeur la plus élevée pour l'isolat SLM7 (246,45 µg/ml), suivi par STS4 (143,45 µg/ml) et SLM9 (122,16 µg/ml) (Figure 23). Ceci est en accord avec les résultats de Anjali et al. (2016) qui ont sélectionné un isolat désigné

CKMV1 isolé du rhizosphère de la plante médicinale *Valeriana jatamansi* qui possède plusieurs caractéristiques favorisant la croissance des plantes, dont, la solubilisation du phosphate, avec une concentration du phosphate soluble de 260 µg/ml, valeur proche de celle de SLM7 (246,45 µg/ml). Le test montre qu'il y a une différence non significative entre SLM9 et SLM3, entre SLM12, SLM13, STS3 et entre STS1 et STS3.

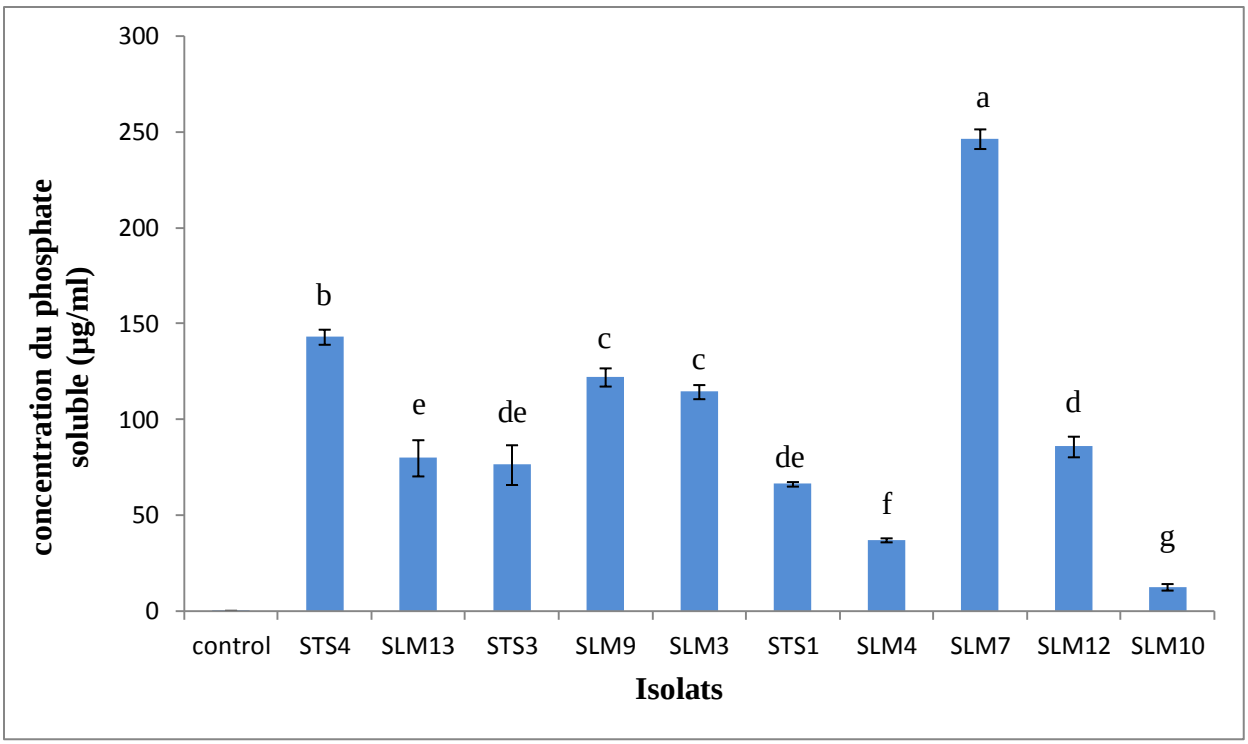

Figure 23 : Estimation quantitative du phosphate soluble chez les PGPR.

Le phosphate est l'un des éléments nutritifs le plus importants nécessaires à la croissance et au développement des plantes. Dans le sol, il est principalement disponible sous forme de phosphore insoluble et devient un facteur limitant pour la croissance des plantes (Pradhan et Sukla, 2006).

La solubilisation microbienne du phosphate minéral peut être due soit à l'acidification du milieu extérieur par la production d'acides organiques de faibles poids moléculaire comme l'acide gluconique (Oteino et al., 2015) soit à la production de substances chélatrices qui augmentent la solubilisation du phosphate (Whitelaw, 1999; Welch et al., 2002).

Par conséquent, les actinomycètes endophytes ayant une efficacité de solubilisation du phosphate jouent un rôle important dans l'amélioration de la croissance des plantes.

V-2-Production de l'acide indole acétique (AIA)

Les phytohormones jouent un rôle important dans la promotion et la régulation de la croissance des plantes. Ribeiro et al. (2012) suggèrent que la production de l'auxine (AIA) aide les plantes à développer les racines, ce qui augmente l'absorption de nutriments par les plantes.

Dans notre étude, sur les 11 isolats d'actinomycètes, 8 isolats (72,72%) se sont révélés positifs pour la production de l'AIA avec une concentration qui variait de 1,70 µg/ml à 14,13 µg/ml en présence de L-tryptophane. Le rendement maximal en AIA a été observé pour l'isolat LTP2' (14,13 µg/ml), suivi de TSRP2 (12,94 µg/ml) et LRP1 (10,83 µg/ml) (Figure 24). Ce résultat est en accord avec les travaux de Passari et al. (2017) qui ont rapporté que les niveaux de production de l'AIA allaient de 7,4 à 52,3 µg/ml en présence de L-tryptophane. Les isolats LRP2 LTP2 et LTP1' montrent une différence non significative.

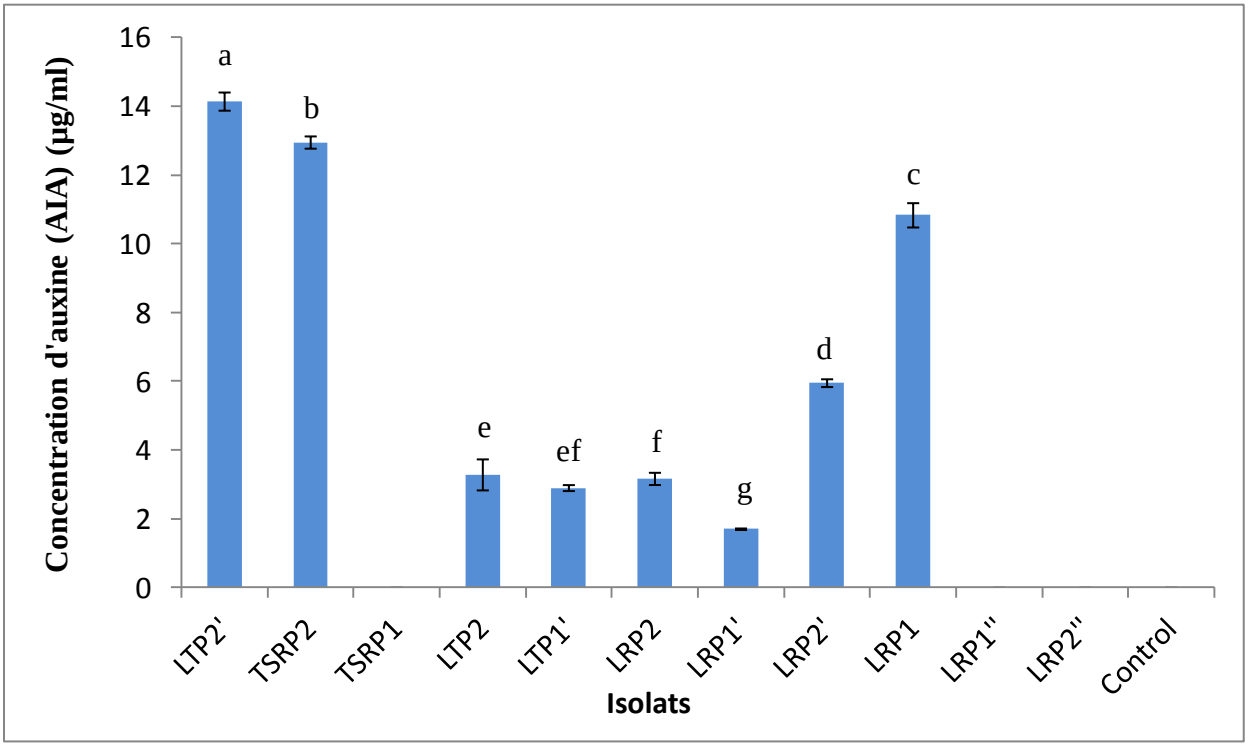

Figure 24 : Détection qualitative de la production de l'AIA montrant un changement de coloration du jaune au rose.

D’autre part, aucun isolat de PGPR n’a été capable de synthétiser l’AIA, contrairement à l’isolat CKMV1 isolé par Anjali et al. (2016) qui montre une production d’auxine avec une concentration de 8,1 µg/ml.

Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane ce qui favorise la biosynthèse de l’auxine dans la rhizosphère (Ahmadloo et al., 2014).

V-3-Fixation libre d’azote N_2

L’azote est un élément essentiel et vital pour la croissance et le développement normal des plantes (Khan et al., 2020).

La capacité de croissance des 11 isolats d’actinomycètes endophytes et des 10 isolats de PGPR rhizosphériques sur le milieu sans source d’azote est évidente. 8 isolats (72,72%) d’actinomycètes (LRP2, LRP2’’, LRP2’, TSRP2, LRP1’, LRP1’’, LTP2’ et LTP2) et 5 isolats (50%) de PGPR (SLM7, STS3, SLM9, SLM13 et SLM3) ont été capables de se développer dans ce milieu déficient en azote, ce qui suggère qu’il pourrait s’agir de bactéries fixatrices d’azote. Ce résultat était semblable à ceux rapportés par Tsegaye (2019) qui a révélé que les isolats de PGPR comme Sol13 et RW30 se bien développés sur le milieu gélosé sans azote, ce qui confirme leur potentiel de fixation d’azote atmosphérique. Donc les isolats obtenus peuvent être des diazotrophes en raison de leur capacité à se développer dans le milieu AFM (Figure 25). La capacité de fixation de l’azote est un critère pour la sélection des PGPR potentiels (Tsegaye, 2019).

Figure 25 : Croissance des isolats d’actinomycètes endophytes sur le milieu AFM.

VI-Production des enzymes hydrolytiques

VI-1- Les amylases

Concernant le criblage des amylases, 6 isolats d'actinomycètes (54,54%) étaient positifs pour la production d'amylase avec un index d'activité amylolytique allant de 0,98 à 0,79. Les résultats obtenus sont positifs et se manifestent par l'apparition des zones d'hydrolyses claires autour des cultures (Figure 26). Une valeur maximale de l'index de l'activité amylolytique de 0,98 est enregistrée pour l'isolat LRP2, caractérisé par un potentiel de production des amylases très élevé par rapport aux autres isolats (Figure 27). Des résultats similaires ont été rapportés par Passari et al. (2017) qui ont révélé que 39 isolats (48,1%) avaient la capacité de produire de l'amylase. Les isolats montrent une différence non significative.

Les données bibliographiques ont mentionné que « l'α-amylase » est le type d'enzyme amylolytique le plus produit par les actinomycètes, il est élaboré par différents genres tels que; *Streptomyces, Nocardiopsis et Streptosporangium* (Daza et al., 1991; Stamford et al., 2001 et 2002).

Figure 26 : Mise en évidence de l'activité amylolytique des actinomycètes endophytes (LRP1, LRP2'', LRP1'', LRP2') sur milieu solide par le test au lugol.

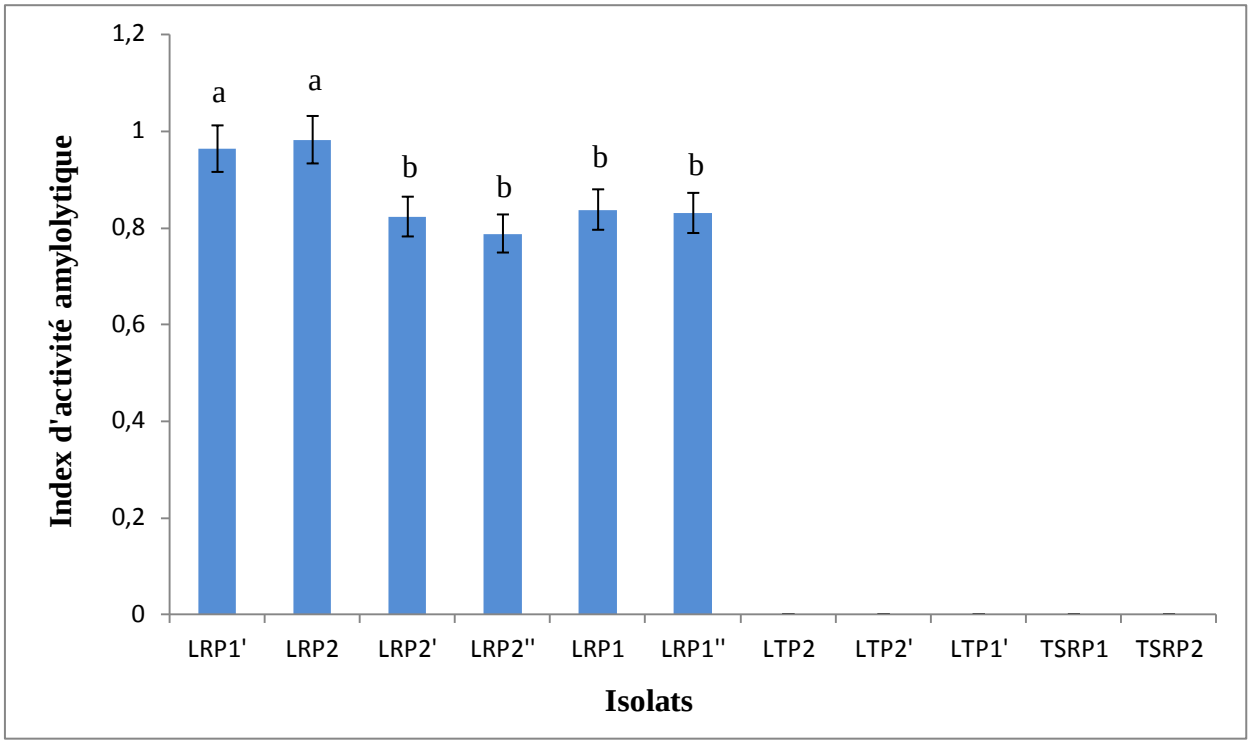

Figure 27 : Index d'activité amylolytique des isolats d'actinomycètes.

Parmi les 10 isolats de PGPR rhizosphériques, 4 isolats : SLM12, SLM7, SLM9 et STS3 ont pu produire l'enzyme amylase (figure 28 et 29). Les résultats ont été corroborés par des résultats similaires de Oo et al. (2020), qui ont rapporté que seuls trois isolats sur sept testés ont produits cette enzyme. Les isolats SLM7, SLM9 et STS3 montrent une différence significative.

Figure 28 : Screening de la production d'amylase par les PGPR rhizosphériques (SLM12, SLM7)

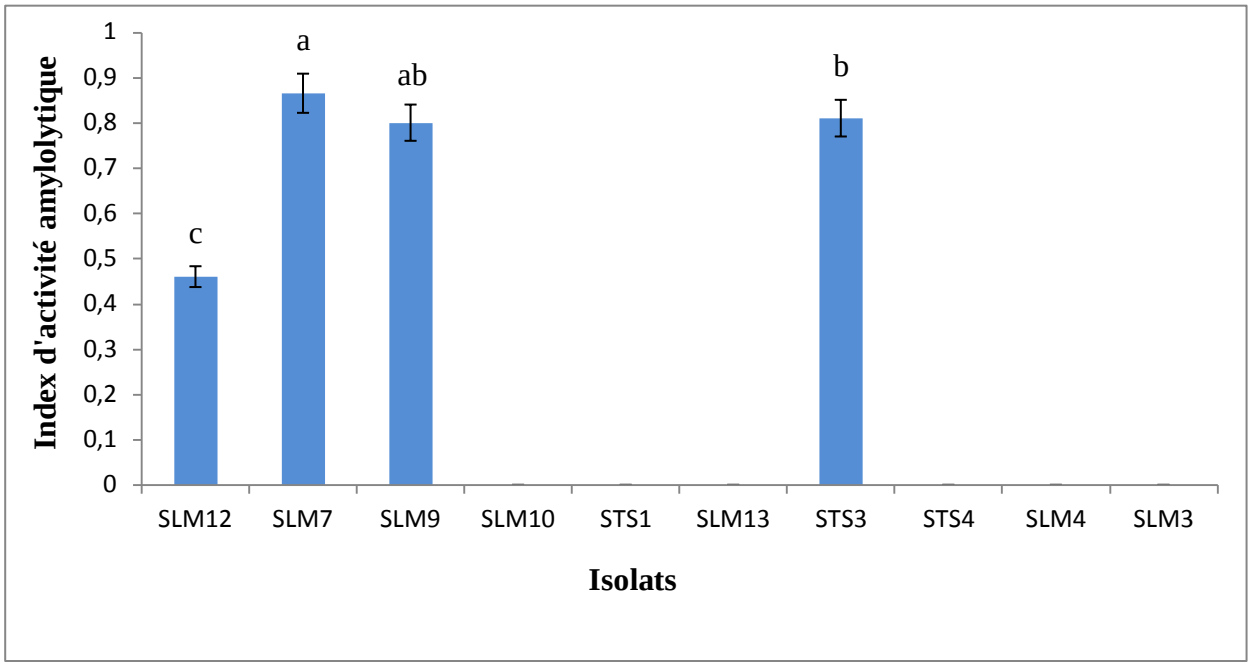

Figure 29 : Index d'activité amylolytique des isolats de PGPR.

VI-2-Les cellulases

Sur les 11 isolats d'actinomycètes, 10 isolats (90,90%) ont montré une production de cellulase par formation de zones de halos clairs entourant les colonies (Figure 30). Parmi tous les isolats positifs, LRP2 a montré un index d'activité cellulosique maximum de 0,87 suivi de TSRP2 (0,855) et LTP1' (0,845) (Figure 31). Ces résultats étaient semblables à ceux rapportés par Passari et al. (2017) qui ont déclaré que 29,6% des isolats d'actinomycètes produisent de la cellulase. LRP2' montre une différence significative par rapport aux autres isolats.

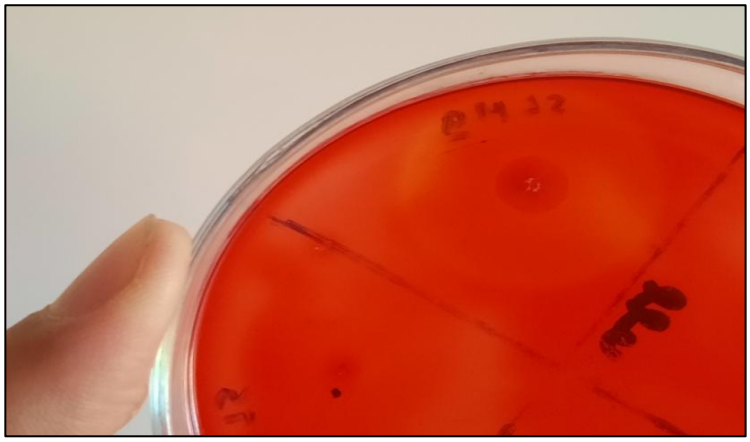

Figure 30 : Screening de la cellulase avec coloration au rouge Congo.

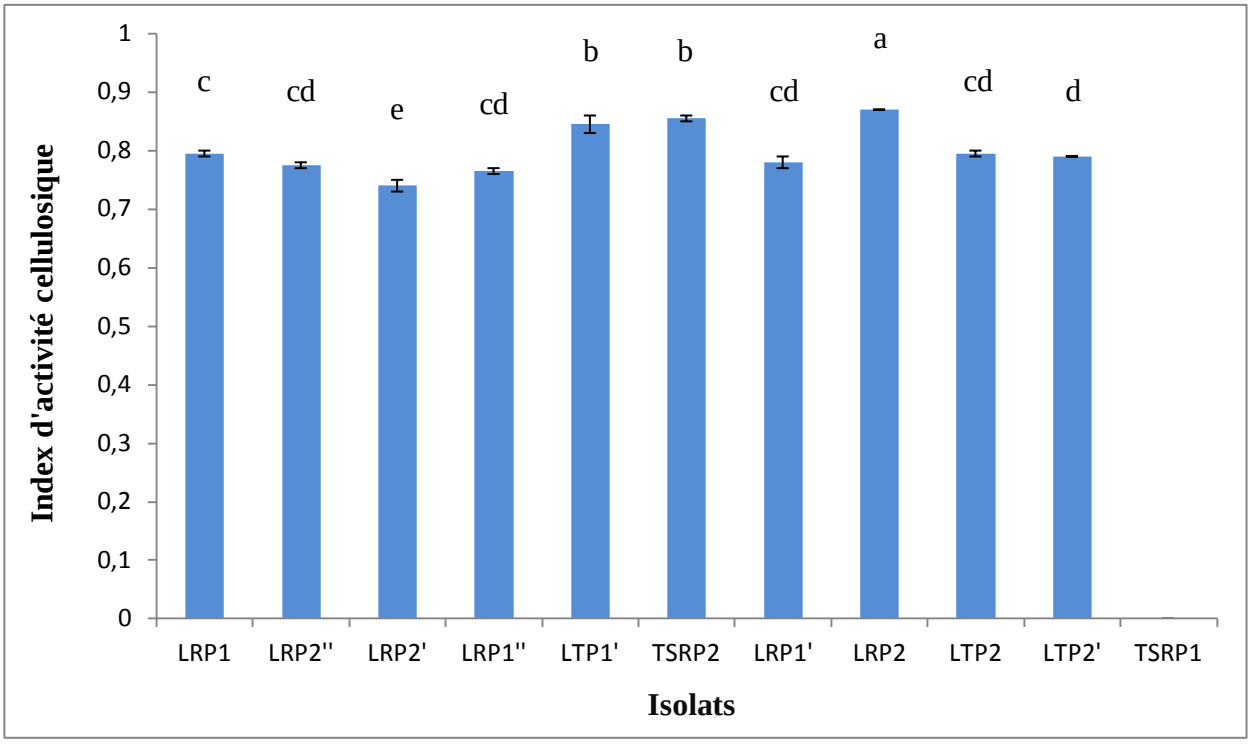

Figure 31 : Index d'activité cellulosique d'actinomycètes.

Concernant les PGPR rhizosphériques, 3 isolats (30%) étaient positifs pour la production de cellulases (Figure 32). Tsegaye (2019) a révélé que, 19 isolats (9,5%) désignés Soil13, RW11, RW22 et RW37 étaient positifs pour la production de cellulase. Le test montre une différence significative entre les isolats.

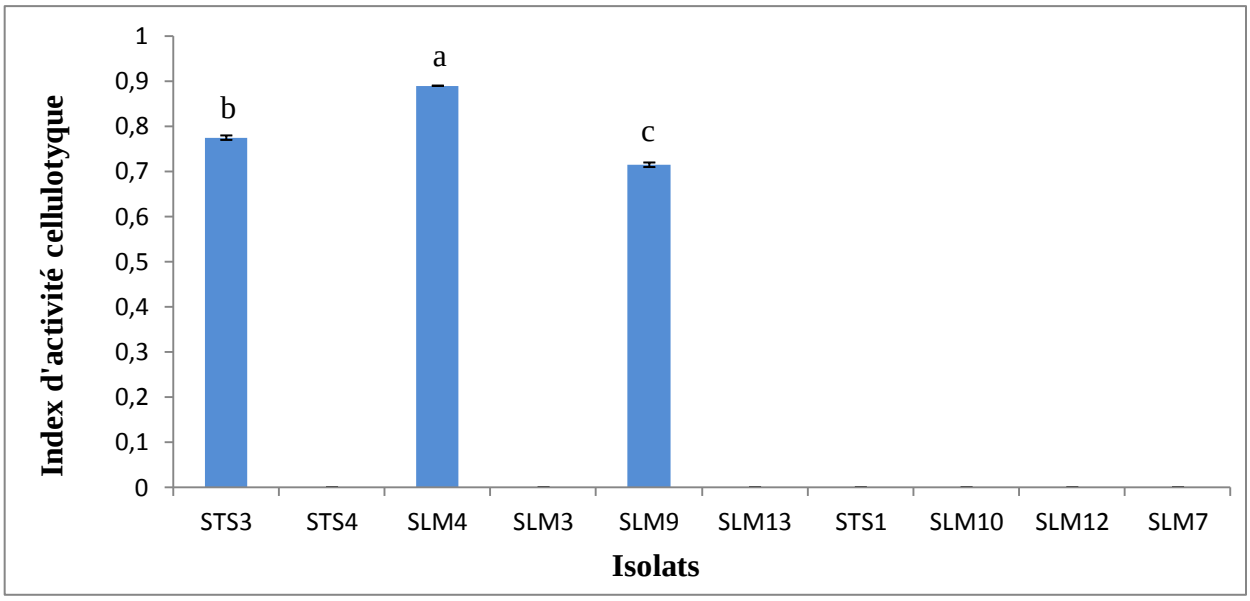

Figure 32 : Index d'activité cellulosique des isolats de PGPR rhizosphériques

Les microorganismes ayant une activité cellulase et amylase ne contribuent pas seulement à la décomposition de la matière organique et à la promotion de la croissance des plantes, mais jouent également un rôle essentiel dans la suppression des maladies en inhibant les agents pathogènes transmis par le sol (Kavamura et al., 2013).

VII-Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*

Sur 11 isolats d'actinomycètes, 6 isolats (54,54%) ont montré une activité positive contre le phytopathogène fongique *F. oxysporum*. f.sp. *albedinis*. Il s'agit des isolats (LRP2, LRP1'', LRP2'', LRP2', LTP2 et LTP2') avec un pourcentage d'inhibition allant de 69,12% à 86,60%. L'action antagoniste se traduit par une faible croissance mycélienne de l'agent pathogène durant les 5 premiers jours d'incubation, suivi de l'arrêt total de la croissance du coté de la confrontation (Antagonistes-Pathogènes) (Figure 33).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne d'agent pathogène varie d'un isolat à l'autre. On a enregistré presque la même activité pour les deux isolats LRP2 et LRP1'' avec au maximum de 86,6% et 86,12% respectivement (Tableau 11). Cependant, les isolats LRP1, TSRP2, TSRP1, LTP1', LRP1' ne présentent aucune activité inhibitrice sur la croissance du champignon.

Selon Passari et al. (2017), sur 81 isolats endophytes des plantes médicinales, 72 isolats ont montré une activité inhibitrice contre *F. oxysporum* avec un taux d'inhibition allant de 32% à 72%.

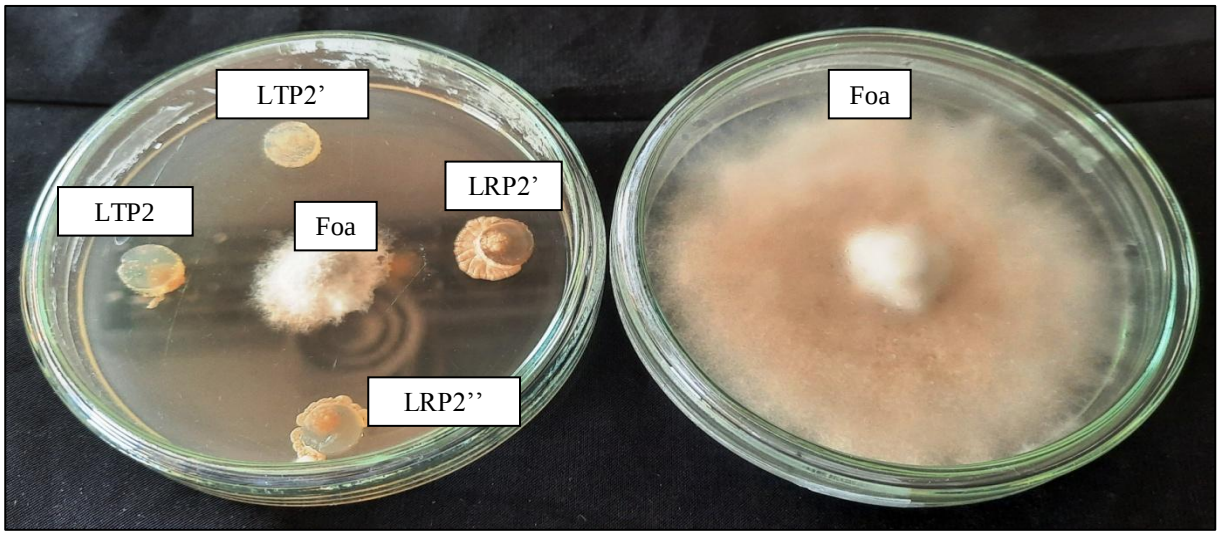

Figure 33 : Zones d'inhibition de la croissance du mycélium fongique sur le milieu PDA après 7j d'incubation, A : champignon avec les isolats d'actinomycètes, B : control.

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition du mycélium fongique (Foa) par les isolats d'actinomycètes.

Isolat	Pourcentage d'inhibition (%)
LRP2'	**71,05%**
LRP1'	**0%**
LTP2'	**69,12%**
LRP1	**0%**
TSRP2	**0%**
LRP1''	**86,12%**
LRP2 ''	**78,94%**
LRP2	**86,6%**
LTP1'	**0%**
TSRP1	**0%**
LTP2	**70,02%**

Les métabolites produits par les microorganismes jouent un rôle actif dans le développement de la résistance en fonctionnant comme des signaux de médiation entre les endophytes et leur hôte. Comme les actinomycètes endophytes isolés de plantes médicinales produisent une grande variété de métabolites bioactifs antifongiques comme les antibiotiques, les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, compétition pour les nutriments…, et régulateurs

de la croissance des plantes, ils peuvent être explorés comme de nouvelles sources de produits naturels ainsi que comme de nouveaux agents de biocontrole.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'échelle mondiale, les effets de l'utilisation de produits agrochimiques pour améliorer la productivité et la production agricole peuvent causer des graves dommages à la santé humaine, animale ainsi à l'environnement.

On peut conclure de la discussion à dessus que les actinomycètes endophytes et les PGPR rhizosphériques sont plus en plus utilisés pour l'amélioration de la production agricole.

Cette étude consiste à l'isolement et la caractérisation des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques à partir de deux plantes médicinales, *Lavandula multifida* et *Thymus saturoïdes*. Après l'isolement nous avons purifié et conservé 11 isolats d'actinomycètes et 10 isolats de PGPR rhizosphériques.

L'étude des caractères culturaux montre une très grande variabilité entre les isolats d'actinomycètes.

Les isolats d'actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques, montrent excellentes caractéristiques PGP à savoir la solubilisation du phosphate, la production de l'acide Indole-3-acétique, la fixation libre d'azote, la production d'enzymes lytiques et la tolérance au stress abiotique.

Le test de l'activité antifongique s'est révélé positif avec 6 isolats (soit 54,54%). Le pourcentage d'inhibition est compris entre 69,12% et 86,60%. L'isolat LRP2 s'est avéré le plus actif.

En perspectives, on propose de :

i) Identifier génétiquement les isolats les plus performants d'actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques.
ii) Tester ces isolats vis-à-vis des bactéries et d'autres champignons phytopathogène.
iii) Extraire et identifier les métabolites bioactifs responsable de l'effet antimicrobien.

iv) Explorer d'autres caractéristiques PGPR à savoir la production de sidérophores, exopolysaccharides, cyanure d'hydrogène (HCN), solubilisation du potassium.

v) Evaluer la production d'autres enzymes lytiques telles que, chitinase, protéase, pectinase, lipase.

vi) Tester *in vivo* les isolats les plus performants comme promoteur de croissance et protecteur contre les phytopathogènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHI QUES

1. **Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Batayneh, S et Saadoun, I. (2004).** First Report of Antifungal Spectra of Activity of Iranian Actinomycetes Strains Against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*, *3*(4), 463–471. https://doi.org/10.3923/ajps.2004.463.471.
2. **Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D et Kemen, E. M. (2016).** Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *Public Library Of Science Biology*, *14*(1), 1-31. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002352.
3. **Ahmadloo, F., Masoud, T., Pejman, A et Aidin, H. (2014).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla Pojark*. seeds. *Scientia Horticulturae*, *172*, 61–67. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.049.
4. **Ahmed, E. A., Hassan, E. A., Tobgy, K. M. K. E et Ramadan, E. M. (2014).** Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. *Annals of Agricultural Sciences*, *59*(2), 273–280. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.11.016.
5. **Ait Barka, E., Vatsa. P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klent H.P., Clément, C., Ouhdouche, Y et Wezel, G. P. Van .(2016).**Taxonomy, physiology and naturalproducts of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 ,1 –43.
6. **Al-Dhabaan, F. A. M et Bakhali, A. H. (2017).** Analysis of the bacterial strains using Biolog plates in the contaminated soil from Riyadh community. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(4), 901–906. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.043.
7. **Beauchamp, C. J. (2005).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*, *74*(1), 19–27. https://doi.org/10.7202/706033ar.

8. **Antoun H et Kloepper JW. (2001).** Plant growth promoting rhizobacteria. In: Brenner S, Miller JH, editors. Encyclopedia of Genetics. Academic; New York: 2001. 1477–1480.
9. **Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., et White, R. P. (1985).** Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *35*(1), 86–98. https://doi.org/10.1099/00207713-35-1-86.
10. **Azad, M. A. K., Bae, J. H., Kim, J. S., Lim, J. K., Song, K. S., Shin, B. S et Kim, H. R. (2009).** Isolation and characterization of a novel thermostable α-amylase from Korean pine seeds. *New Biotechnology*, *26*(3–4), 143–149. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.09.006.
11. **Bachiri, L., Labazi, N., Daoudi, A., Ibijbijien, J., Nassiri, L., Echchegadda, G., et Mokhtari, F. (2015).** Etude ethnobotanique de quelques lavandes marocaines spontanées. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *9*(3), 1308. https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.16.
12. **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*. 35(2), 583-587.
13. **BENABIDA. (2000).** Evaluation et préservation de la biodiversité : Flore et écosystèmes du Maroc. Edition 2000, p360.
14. **Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., Vilgalys, R. (2014).** Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*, *23*(13), 3356–3370. https://doi.org/10.1111/mec.12821.
15. **Cavalla, M et Eberlin, T. (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron, 19,p13-17.
16. **Chu, C. J., Kemper, K. J., (2001).** Lavender (*Lavandula spp*.). Longwood Herbal Task Force. P32.
17. **Da Silva Sousa, C., Fermino Soares, A. C et Da Silva Garrido, M. (2008).** Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*, *65*(1), 50–55. https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000100007.

18. **Daulagala, P. W. H. K. P. (2021).** Chitinolytic Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents for Phytopathogenic Fungi and Nematode Pests : A Review. *Asian Journal of Research in Botany*, 5(3), 14-24.
19. **Daza, A., Martin, J. F., Vigal, T et Gil, J. A. (1991).** Analysis of the promoter region of saf, a *Streptomyces griseus* gene that increases production of extracellular enzymes. *Gene*, *108*(1), 63–71. https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90488-W.
20. **Delarras, C., (2014).**Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle Sanitaire. Technique et Documentation Lavoisier, p492.
21. **Diriba, M., (2007).** Microbial Inputs in Coffee (*Coffea arabica L.*) Production Systems, Southwestern Ethiopia : Implications for Promotion of Biofertilizers and Biocontrol Agents. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences/Uppsala 2007.
22. **Donn, S., Kirkegaard, J. A., Perera, G., Richardson, A. E et Watt, M. (2015).** Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. *Environmental Microbiology*, *17*(3), 610–621. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12452.
23. **Drozdowicz, A.G. (2016).** Microbiologia do solo. Tratado de microbiologia, p. 17-28
24. **El-Hadri, Y. (2019).** Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans la région de Beni Mellal-Khenifra. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie, Université Mohammed 5, Rabat, 17-18. (243).
25. **El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. E. S. J et Sivasithamparam, K. (2009).** Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(1), 13–26. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03926.x
26. **Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S et Dunfield, K. E. (2013).** Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, *100*(9), 1738–1750. https://doi.org/10.3732/ajb.1200572
27. **Gayathri, S., Ranjitha, D. V. S., S, S., Saranya, S., et Mythili, S. (2017).** A Review on Endophytic Actinomycetes and their Applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(10), 152-158.
28. **Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H et Rai, M. (2015).** Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. *Antonie van*

Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7.

29. **Gordon, S. A et Weber, R. P. (1951).** Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physioogyl*, 26, 192–195.
30. **Gordon, R. E et Smith, M. M. (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria Species descriptions of *Mycobacteriimu J. Bacteriology*, 66, 41-48
31. **Gray, E. J., Smith, D. L. (2004).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes, 37 (3), 395-412.
32. **Gray, E. J et Smith, D. L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(3), 395-412. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
33. **Hachi, M., Hachi, T., Belahbib, N., Dahmani, J et Zidane, L. (2015).** Contribution à l'étude floristique et ethnobotanique de la flore médecinale utilisée au niveau de la ville de Khenifra (Maroc). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11 (3), 754-770.
34. **Hayat, S., Ashraf, A., Aslam, B., Asif, R., Muzammil, S., Asif Zahoor, M et Sabir, S. (2021).** Actinobacteria: Potential Candidate as Plant Growth Promoters. In *Plant Stress Physiology*. IntechOpen. 1-17. https://doi.org/10.5772/intechopen.93272.
35. **Hmamouchi, M. (2001)**. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. 2éme. Ed. P389.
36. **Joy, P.P., Thomas, J., Samuel, M et Baby, P. S., (1998).** Medicinal plants. Kerala Agricultural University. *Aromatic and Medicinal Plants Research Station*, 1-211.
37. **Kavamura, V. N., Santos, S. N., Silva, J. L. da, Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A et Melo, I. S. de. (2013).** Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, *168*(4), 183–191. https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002.
38. **Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F et Lumyong, S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp*. isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4, 23-32.
39. **Khan, M. S., Gao, J., Chen, X., Zhang, M., Yang, F., Du, Y et Zhang, X. (2020).** Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria

Paenibacillus polymyxa SK1 from *Lilium lancifolium*. *BioMed Research International*, *2020*, 1-17. https://doi.org/10.1155/2020/8650957

40. **Kumar, A., Vandana, R.S., Singh, M et Pandey, K.D., 2015b.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach for disease management. In: Singh, J.S., Singh, D.P. (Eds.), Microbes and environmental management. Studium Press, New Delhi, 195_209.
41. **Kuster, E et Williams, S. T. (1964).** Selection of media for isolation of Streptomycetes. Nature, 202, 928-929.
42. **Leveau, J .Y., Bouix, M. (1993).** Microbiologie Industrielle. Paris, p424-439
43. **Li, Q., Chen, X., Jiang, Y et Jiang, C. (2016).** Morphological Identification of Actinobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech, 1-29. https://doi.org/10.5772/61461.
44. **LisBalchin, M. (2002).**Lavender The Genus *Lavandula*. *Taylor And Francis*, London,p 155-200.
45. **Loqman, S. (2009).** La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de doctorat en Biologie et physiologie végétales.
46. **Loria, R., Bukhalid, R.A., Fry, B.A et King, R. R. (1997).** Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, 81, 836–46.
47. **Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P et Whitman, W. B. (2012).** Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, 1–28.* Doi:10.1007/978-0-387-68233-4_1.
48. **Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies* Microbiology Letter. 1999, 170: 265–270.
49. **O'Donnell, A. G. (1988).**Recognition of novel actinomycetes. In Goodfellow M. G., Williams S. T., Modarski M. "Actinomycetes in Biotechnology". Ed., London: Academic Press, p360-432.
50. **Okazaki, T. K., Takahashi, M. K et Enokita, R. (1995).** Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. *Annual Reviews Sankyo Research Laboratory*, 47, 97–106.

51. **Oo, K. T., Win, T. T., Khai, A. A et Fu, P. (2020).** Isolation, Screening and Molecular Characterization of Multifunctional Plant Growth Promoting Rhizobacteria for a Sustainable Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, *11*(06), 773–792. https://doi.org/10.4236/ajps.2020.116055.
52. **Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J. et Dowling, D. N. (2015).** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JUL), 1-9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745.
53. **Ouhdouch, Y. (2003).** Actinomycètes in: rapport thématique Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC. Institut Scientifique, p32-41.
54. **Passari, A. K., Mishra, V. K., Gupta, V. K., Yadav, M. K., Saikia, R et Singh, B. P. (2015).** In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *Public Library Of Science ONE*, *10*(9), 1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139468.
55. **Passari, A. K., Mishra, V. K., Singh, G., Singh, P., Kumar, B., Gupta, V. K., … Singh, B. P. (2017).** Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-17. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12235-4.
56. **Podile, A.R et Kishore, G. K. (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) Plant associated bacteria. Springer, Amsterdam, p 195–230.
57. **Pradhan, N et Sukla, L. B. (2006).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, *5*(10), 850–854. https://doi.org/10.4314/ajb.v5i10.42884.
58. **Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M et Jat, L. K. (2019).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Elsevier, 129–157. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815879-1.00007-0.
59. **Pratiwi, R. H., Hidayat, I., Hanafi, M et Mangunwardoyo, W. (2017).** Identification and screening of rare actinomycetes isolated from *Neesia altissima* Bl. In *American Institute of Physics Conference Proceedings*, 1862. American Institute of Physics Inc. 1-6. https://doi.org/10.1063/1.4991203.

60. **Preeti, S., Madhurama, G., Anu, K., Narinder, S3 et Deepti Narang. (2016).** Isolation of endophytic actinomycetes from Syzygium cumini and their antimicrobial activity against human pathogens. *Journal of Applied and Natural Science*, 8 (1), 416 – 422.
61. **Priya, M. (2012).** Endophytic Actinomycetes from Indian Medicinal Plants as Antagonists to Some Phytopathogenic Fungi. *Open access scientific repports*, 1(4). http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.259.
62. **Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Jiang, C. L et Li, W. J. (2009).** Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna China. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(19), 6176–6186. https://doi.org/10.1128/AEM.01034-09.
63. **Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H et Li, W. J. (2011).** Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2923-6.
64. **Quezel, P et Santa, S.(1963).** Nouvelle Flore De L'algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales. Tome Ii. Ed. C.N.R.S. Paris.
65. **Rai, M., Rathod, D., Agarkar, G., Dar, M., Brestic, M., Pastore, G. M et Junior, M. R. M. (2014).** Fungal growth promotor endophytes: A pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. *Symbiosis*, *62*(2), 63–79. https://doi.org/10.1007/s13199-014-0273-3.
66. **Rajagopalan, G et Krishnan, C. (2008).** α-Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, *99*(8), 3044–3050. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.001.
67. **Ribeiro, C. M et Cardoso, E. J. B. N. (2012).** Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, *167*(2), 69–78. https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.03.003.
68. **Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G. E et Merli, S. (1992).** Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 2691-2693. https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2691-2693.1992.

69. **SAURAV, K. et KANNABIRAN, K. (2009).** CHROMIUM HEAVY METAL RESISTANCE ACTIVITY OF MARINE *STREPTOMYCES VITSVK5 Spp*. (GQ848482), *Pharmacologyonline*, 3, 603-613.
70. **Shariffah-Muzaimah, S. A., Idris, A. S., Madihah, A. Z., Dzolkhifli, O., Kamaruzzaman, S et Maizatul-Suriza, M. (2018).** Characterization of *Streptomyces spp*. isolated from the rhizosphere of oil palm and evaluation of their ability to suppress basal stem rot disease in oil palm seedlings when applied as powder formulations in a glasshouse trial. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(1). https://doi.org/10.1007/s11274-017-2396.
71. **Shivlata, L., Satyanarayana, T. (2017).** Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability. In: *AgroEnvironmental Sustainability*. New Delhi, India: Springer, 173-218.
72. **Shirling. E.B., Gottlieb. D., (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. Int. J. Sys. Bacteriol., 16 (3): 313-340.
73. **Sousa, J. A. de J., & Olivares, F. L. (2016).** Plant growth promotion by streptomycetes: Ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1186/s40538-016-0073-5.
74. **Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Coelho, L.C et Araujo, J.M. (2001).** Production and characterization of a thermostable α-amylase from *Nocardiopsis sp*. endophyte of yam bean . *Bioresource Technology*,76(2), 137–141.
75. **Stamford, T.L., Stamford, N.P., Coelho LC et Araujo, J.M. (2002).** Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* endophyte of maize leaves, *Bioresource Technology*, 83, 105–109.
76. **Sunaryanto, R* and Anis Herliyani Mahsunah. (2013).** Isolation, Purification, and Characterization of Antimicrobial Substances from Endophytic Actinomycetes. Makara J. Sci. 17(3), In Press.
77. **Swamy, N et Sandhu, S. S. (2021).** Fungal endophytes: Entry, establishment, diversity, future prospects in agriculture. In *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology*. Elsevier, 97–105. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821394-0.00004-4.

78. **Taechowisan, T., Peberdy, J. F et Lumyong, S. (2003).** Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(4), 381–385. https://doi.org/10.1023/A:1023901107182.
79. **Tamilarasi, S., Nanthakumar, K., Karthikeyan, K et Lakshmanaperu-malsamy, P. (2008).** Diversity of root associated microorganisms of selected medicinal plants and influence of rhizomicroorganisms on the antimicrobial property of *Coriandrum sativum*. *Journal of* Environmental Biology, 29 (1), 127–134.
80. **Thomas, P et Soly, T. A. (2009).** Endophytic Bacteria Associated with Growing Shoot Tips of Banana (*Musa sp*.) cv. Grand Naine and the Affinity of Endophytes to the Host. *Microbial Ecology*, *58*(4), 952–964. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9559-z.
81. **Tsegaye, Z. (2019).** Isolation and Biochemical Characterization of Plant Growth Promoting (PGP) Bacteria Colonizing The Rhizosphere of Tef Crop During the Seedling Stage. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, *14*(2), 1-12. https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.14.002534.
82. **Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N et Lavakush, S.V. (2010).** Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5 (11), 954-983.
83. **Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Del Rio, T. G., Tringe, S. G., Dangl, J. L et Mitchell-Olds, T. (2016).** Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications*, *7*, 1-15. https://doi.org/10.1038/ncomms12151.
84. **Welch, S.A, Taunton, A.E et Banfield J.F. (2002).** Effect of microorganism and microbial metabolites on apatite dissolution. Geomicrobiology Journal, 19,343-367.
85. **Whitelaw, M.A. (1999)**. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advences in Agronomy*. 69, 99-144.
86. **William, S. M.,Goodfellow, G., Alderson, E.M.H et Wellington P.H.A. (1983).** Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology* .129, 1743-1813.
87. **Zhang, H.W., Song Y. C et Tan, R. X. (2006)**. Biology and chemistry of endophytes. *Naturel Product Reports*, 23, 753-771.

88. **Zhi, X.Y., Li, W.J et Stackebrandt, E. (2009).**An update of the structure and 16S rRNA genesequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. International Journal Of Systematic and Evelutionary Microbiologye, 59(3), 589–608.

Sites web utilisés:

La terre et l'humus (astrosurf.com) (consulté le 07/06/2021)

https://www.teline.fr/fr/photos/lamiaceae/thymus-satureioides (consulté le 07/06/2021).

https://www.fellah-trade.com/ressources/pdf/MBPC_Thym_Francais.pdf (consulté le 07/06/2021).

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

- ✓ **Caséine amidon agar (SCA) : pH=7,2**

Composants	Quantité (g/l)
Amidon	5
Caséine	0,3
K_2HPO_4	2
KNO_3	2
NaCl	2
$MgSO_4.7H_20$	0,05
$Fe_3SO_4.7H_20$	0,01
$CaCO_3$	0,02
Agar	15
ED	1000ml

- ✓ **Extrait de levure-Mannitol (YEM) : pH=6,8-7**

Composants	Quantité (g/l)
Mannitol	10
Extrait de levure	1
$MgSO_4$	0,2
NaCl	0,1
KH_2PO_4	5
Agar	15
ED	1000ml

- ✓ **Extrait de levure - Extrait de Malt (ISP2) : pH=7,3**

Composants	Quantité (g/l)
Extrait de levure	4
Extrait de Malt	10
Glucose	4
$CaCO_3$	2
Agar	20
EDS	1000ml

- ✓ **Farine d'Avoine Agar (ISP3) : pH=7,2**

Composants	Quantité (g/l)
Farine d'avoine	20
Agar	20
solution d'oligo éléments	1ml
ED	1000ml

- ✓ **Amidon Sels minéraux Agar (ISP4) : pH=7-7,4**

Composants	Quantité (g/l)
Amidon soluble	10
K_2HPO_4	1
$MgSO_4;7H_2O$	1
NaCl	1
$(NH_4)_2SO_4$	2
$CaCO_3$	2
Agar	20
ED	1000ml
solution d'oligo éléments	1ml

- ✓ **Glycérol Asparagine Agar : pH=7-7,4**

Composants	Quantité (g/l)
L-asparagine	1
Glycérol	10
K_2HPO_4	1
Agar	20
Solution d'oligo éléments	1ml
ED	1000ml

- ✓ **Milieu Pikovskaya : pH=6,8-7**

Composants	Quantité (g/l)
Ca_3HPO_4	5
Glucose	10
NaCl	0,2
KCl	0,2
$FeSO_4$	0,002
$MnSO_4$	0,002
$NH_4(SO_4)$	0,5
$MgSO_4$	0,1
Extraits de levures	0,5
Agar	20
ED	1000ml

- ✓ **Azote Free Medium (AFM): pH=7,4**

Composants	Quantité (g/l)
Glucose	20
$CaCO_3$	20
KH_2PO_4	1
$MgSO_4$	0,5
ED	1000ml

- ✓ **Milieu Amidon Agar: pH=7**

Composants	Quantité (g/l)
Peptone	10
Extrait de viande	5
NaCl	5
Amidon	10
ED	1000ml

- ✓ **Milieu inorganique ISP9 avec 1% de Cellulose : pH=6,8-7**

Composants	Quantité (g/l)
$(NH_4)_2SO_4$	2,64
KH_2PO_4	2,38
K_2HPO_4	5,65
$MgSO_4$	1
Solution d'oligo éléments	1ml
Agar	20
ED	1000ml

Annexe 2

Composition de solutions utilisées

- ✓ **Solution d'oligo éléments**

Composants	Quantité
$FeSO_4.7H_2O$	0,1g
$MnCl_2.4H_2O$	0,1g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,1g
ED	100ml

- ✓ **Solution Salkowski**

Composants	Volume (ml)
H_2SO_4	150
FeCl	7,5
ED	250

- ✓ **Solution Rouge Congo 1%**

Composants	Quantité
Rouge Congo	1g
ED	100ml

- ✓ **Solution d'oligoéléments pour le milieu ISP9**

Composants	Quantité
$FeSO_4.7H_2O$	0,11g
$MnCl_2.4H_2O$	0,79g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,15g
$CuSO_4$ ED	0,64ml 1000ml

RESUME

Dans la présente étude, deux plantes médicinales *Thymus saturoïdes* et *Lavandula multifida* on fait l'objet d'isolement d'actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques. Ainsi, 11 isolats d'actinomycètes endophytes sont isolées en utilisant le milieu SCA par la méthode des morceaux, et 10 isolats de PGPR sont isolés par la méthode de suspension dilution en utilisant le milieu YEM. L'étude des caractères morphologiques des actinomycètes endophytes est réalisée sur les milieux « Internationals Streptomyces Project » (ISP2-5).

Pour le test de tolérance au stress abiotique, 72,72% d'actinomycètes endophytes tolèrent 8% de NaCl, tandis que tous les isolats de PGPR rhizosphériques ont été inhibés à cette concentration. La majorité des isolats d'actinomycètes endophytes sont capables de se développer dans un pH légèrement acide (pH4) et légèrement alcalin (pH8), cependant la plupart des isolats de PGPR rhizosphériques se développent dans un pH légèrement alcalin.

L'efficacité de la solubilisation du phosphate inorganique sur le milieu solide (PVK) est comprise entre 25% et 458% pour les actinomycètes endophytes et entre 8,1% et 55,45% pour les PGPR rhizosphériques. Sur milieu liquide, la quantité du phosphate soluble est comprise entre 163,81 µg/ml et 730 µg/ml pour les actinomycètes endophytes et entre 12,68 µg/ml et 246,45 µg/ml pour les PGPR rhizosphériques. La quantité d'acide Indole-3-Acétique (AIA) est comprise entre 1,70 µg/ml et 14,13 µg/ml pour les actinomycètes endophytes. 72,72% d'actinomycètes endophytes et 50% des PGPR rhizosphériques qui ont été capable de se développer sur un milieu sans source d'azote.

Les isolats d'actinomycètes endophytes et de PGPR rhizosphériques ont montré une capacité remarquable à dégrader certains composés (cellulose, amidon), avec un index d'activité amylolytique varie entre 0,78 et 0,98 pour les actinomycètes endophytes (54,54%) et entre 0,46 et 0,86 pour les PGPR rhizosphériques (40%). L'index de l'activité cellulosique varie entre 0,74 et 0,87 pour les actinomycètes endophytes et entre 0,71 et 0,89 pour les PGPR rhizosphériques (30%). 54,54% des isolats d'actinomycètes endophytes, ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis du champignon *Fusarium oxysporum.* f.sp. *albedinis* avec un pourcentage d'inhibition qui varie entre 69,13% et 86,6%.

Mots clés : actinomycètes endophytes, PGPR rhizosphériques, *Thymus saturoïdes*, *Lavandula multifida*.

ABSTRACT

In the present study, two medicinal plants *Thymus saturoides* and *Lavandula multifida* were used to isolate endophytic actinomycetes and rhizospheric PGPR. Thus, 11 isolates of endophytic actinomycetes were isolated using the SCA medium by the piecewise method, and 10 isolates of PGPR were isolated by the suspension dilution method using the YEM medium. The study of morphological characters of endophytic actinomycetes is carried out on "Internationals Streptomyces Project" media (ISP2-5).

For the abiotic stress tolerance test, 72.72% of endophytic actinomycetes tolerated 8% NaCl, while all rhizospheric PGPR isolates were inhibited at this concentration. The majority of endophytic actinomycetes isolates are able to grow in slightly acidic (pH4) and slightly alkaline (pH8) pH, however most rhizospheric PGPR isolates grow in slightly alkaline pH.

The solubilization efficiency of inorganic phosphate on solid medium (PVK) ranged from 25% to 458% for endophytic actinomycetes and from 8.1% to 55.45% for rhizospheric PGPR. On liquid medium, the amount of soluble phosphate is between 163.81 µg/ml and 730 µg/ml for endophytic actinomycetes and between 12.68 µg/ml and 246.45 µg/ml for rhizospheric PGPR. The amount of Indole-3-Acetic acid (IAA) is between 1.70 µg/ml and 14.13 µg/ml for endophytic actinomycetes. 72.72% of endophytic actinomycetes and 50% of rhizospheric PGPRs were able to grow on a medium without nitrogen source.

Endophytic actinomycetes and rhizospheric PGPR isolates showed a remarkable capacity to degrade some compounds (cellulose, starch), with an amylolytic activity index varying between 0.78 and 0.98 for endophytic actinomycetes (54.54%) and between 0.46 and 0.86 for rhizospheric PGPR (40%). The cellulose activity index varied between 0.74 and 0.87 for endophytic actinomycetes and between 0.71 and 0.89 for rhizospheric PGPR (30%). 54.54% of the endophytic actinomycetes isolates showed a strong inhibitory activity towards the fungus *Fusarium oxysporum. f.sp. albedinis* with a percentage of inhibition that varied between 69.13% and 86.6%.

Keywords: endophytic actinomycetes, rhizospheric PGPR, *Thymus saturoides*, *Lavandula multifida*.

Nom et Prénom	**Date de soutenance**
Irouane Ziati	13-07-2021

Diplôme Master en Biotechnologie Microbienne

Thème

Screening des actinomycètes endophytes et des PGPR rhizosphériques de deux plantes médicinales relevant de la région Beni Mellal-Khenifra

Laboratoire de Biotechnologie et Développement Durable des Ressources Naturelles -B2DRN-

Laboratoire de Biotechnologie & Développement Durable des Ressources Naturelles - B2DRN -

Faculté Polydisciplinaire de Béni-Mellal

Encadrante: Pr. Majida El Hassni **Encadrante interne** : Pr. Sanae Guissi

Co-encadrant : Pr. Mohamed Farissi

Jury : **Pr**. El Hassni, **Pr**. Farissi, **Pr.** Guissi, **Pr.** Benbrahim **Pr.** Ananou

Année universitaire : 2020-2021