



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : MICROBIOLOGIE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Microbiologie générale et biologie moléculaire
des microorganismes**

Intitulé :

Criblage de souches d'actinomycètes solubilisant le phosphate
Identification moléculaire de deux souches du genre
Streptomyces

Présenté et soutenu par : BIDI Abir et OUAMEKH Meryem Le : 30/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENHIZIA Y. (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : KITOUNI M. (Professeur- UFM Constantine).

Examineur : BOUDEMAGH A. (MCA- UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier « **Allah** » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Nos sincères remerciements à monsieur **KITOUNI M.** Professeur au département de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université des frères Mentouri Constantine, qui a accepté d'encadrer et évaluer notre travail tout au long des mois antérieurs en ayant un cool esprit et surtout d'avoir gradé patience, pour ses précieux conseils et directives, nous disons grand merci.

Nous tenons à remercier monsieur **BENHIZIA Y.** Professeur au département de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université des frères Mentouri Constantine, qui a accepté de présider le jury de notre soutenance.

Un grand merci également à monsieur **BOUDEMAGH A.** Maître de Conférences au département de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université des frères Mentouri Constantine, d'avoir bien voulu examiner notre travail.

Nous pensons avec plaisir aux bons moments passés à Université des Frères Mentouri Constantine.

Dédicaces

Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins
Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent
Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout
Je dédie ce mémoire à...

Mon très cher père Mohamed

En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'il a fait pour mon éducation ainsi que ma formation, que Dieu te préserve.

Ma très chère mère Rachida

Affable, honorable, amiable :

Tu représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi
Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puisse Dieu, le tout Puissant, te préserve et t'accorde santé, longue vie et bonheur.

Mes très chères frères et sœurs

Billel, Amine, Sara, Hadjar et Salah-eddine,

Pour leur affection, compréhension et patience et pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Ma belle-sœur Siham, Mes nièces Hiba et Nourhane, Mes neveux Imed-eddine, Mohamed, Abd el moaiz, Mon grand-père Tahar et à la mémoire de ma tante Houria

Mes meilleures amies Safia et Meryem, mes amis, collègues et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce mémoire.

Dédicaces

À mes chers parents

Je vous remercie pour tout votre soutien tout au long de mes études, pour l'amour que vous me portez depuis mon enfance, et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À mon cher époux

Imad Eddine ma joie, mon bonheur, mon profond amour, et ma raison de vivre.

À mes chers frères

A. el moumene et A.erraouf.

À ma petite sœur

NOUR EL YAKINE.

À ma chère grand-mère

À ma belle famille

À tout ce qui m'enseigne

À mes meilleures amies

ABIR, LOULI et MERYAM.

À toute personne qui m'aime

Je dédie ce mémoire.

MERYEM

Résumé

Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente (70 à 90%) des actinomycètes. L'importance de leur présence dans le sol est en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables tels que le phosphate insoluble afin de le rendre disponible pour la croissance des plantes dans le cadre du développement de l'agriculture. Vingt et une souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* ont été criblées pour leur aptitude à solubiliser le phosphate sur quatre milieux de culture différents. L'étude des caractères morphologiques après observation macroscopique: a montré que la majorité des colonies sont petites, régulière ou non, aplaties ou bombées, pigmentées, sporulées et poudreuses avec une odeur terreuse. Après coloration simple et coloration de Gram l'observation microscopique a montré que ces souches sont formées de filaments, ramifiés et de coloration Gram positive. La plupart des souches sont capables de solubiliser le phosphate mais à des degrés différents. Les souches S02 et S015 ont montré les pouvoirs de solubilisation (0,6 et 0,8 cm de diamètre de solubilisation) les plus importants elles ont été sélectionnées. L'analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S de ses dernières a révélé leur appartenance au genre *Streptomyces* avec de degrés de similitude de 0,99% et 0,98 % pour les souches S02 et S015 respectivement. Sur l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ARN 16S les souches S02 et S015 occupent une ligne phylogénétique indépendante avec de faibles pourcentages de Bootstrap (S02 :18% et S015: 41%), ce qui nous permet de dire qu'il s'agit probablement de deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces*. Cette confirmation est d'ailleurs consolidée par les valeurs importantes des distances séparant les souches S02 et S015 des autres espèces du genre. Par ailleurs ces deux souches occupent le même clade avec un haut pourcentage de Bootstrap 99 % ce qui nous permet d'affirmer que ces deux souches représentent la même espèce.

Mots clés : *Streptomyces*, Solubilisation du phosphate, PGPR, Phylogénie.

Abstract

The genus *Streptomyces* is widespread in the soil where it represents (70-90%) of actinomycetes. The importance of their presence in the soil is due to their ability to degrade non-biodegradable organic substances such as insoluble phosphate in order to make it available for plant growth through the development of agriculture. Twenty-one of actinomycetes strains of the genus *Streptomyces* were screened for their ability to solubilize phosphate on four different culture media. The study of morphological characters after macroscopic observation showed that most colonies are small, regular or irregular, flat or curved, pigmented, sporulated and dusty with an earthy smell. After single staining Gram stain, microscopic observation showed that these strains are formed of branched filaments and Gram positive staining. Most strains are able to solubilize phosphate but to different degrees. Strains S02 and S015 shown by the most important solubilizing power (0.6 to 0.8 cm diameter solubilizing) they were selected. Phylogenetic analysis of the sequences of the 16S rRNA of its latest revealed that they belong to the genus *Streptomyces* with degrees of similarity of 0.99% and 0.98% for strains S02 and S015 respectively. On the phylogenetic tree constructed from sequences of the strains ARN16S, S02 and S015 are placed on an independent phylogenetic line with low percentages of Bootstrap (S02:18% and S015:41%), which allows us to say that is probably two new species of the genus *Streptomyces*. This confirmation is also strengthened by the important values of distances between S02 and S015 strains of other species of the genus. Besides these two strains occupy the same clade with high bootstrap percentage of 99% which allows us to affirm that these two strains represent the same species.

Key words: *Streptomyces*, phosphate solubilization, PGPR, Phylogeny.

الملخص

Streptomyces هو جنس يوجد على نطاق واسع في التربة حيث أنه يمثل (70-90%) من البكتيريا الخيطية. تتمثل أهمية وجودها في التربة من خلال قدرتها على تحليل المواد العضوية غير القابلة للتحلل مثل الفوسفات غير قابل للذوبان لجعله متاح لنمو النبات بغرض تطوير الزراعة لهذا تم فحص كفاءة واحد وعشرون سلالة من هذا الجنس لتحليل الفوسفات في أربعة أوساط زراعية مختلفة. دراسة الصفات المورفولوجية بعد الملاحظة العينية أظهر أن معظم المستعمرات صغيرة، منتظمة أو غير منتظمة، مسطحة أو منحنية، مصطبغة، منتجة للسبورات مع رائحة ترابية. بعد الصبغ البسيط وصبغة الغرام الملاحظة المجهرية أظهرت أن هذه السلالات تتشكل من خيوط منتشعبة، وغرام موجب. معظم السلالات قادرة على إذابة الفوسفات ولكن بدرجات مختلفة. السلالتان لهما أكبر قدرة على تحليل الفوسفات ويتضح ذلك من خلال وجودهما داخل أكبر هالتين بقطري تحليل S015 و S02 0,6 و 0,8 سم على التوالي ولهذا تم تحديدهما. الدراسة الفيلوجينية لسلسلة الـ S16 ARNr لهذين الأخيرتين أظهرت انتمائهما للجنس المذكور أعلاه بدرجات تشابه تتراوح بين نسبي 98% و 99% و لكل من S015 و S02 على التوالي. كما لوحظ أن كلتا السلالتين تحتلان فرعا مستقلا على شجرة النشوء والتطور التي شيدت باستعمال التسلسل النيوكليوتيدي لمورثة الـ S16 ARNr لكل منهما وذلك إلى جانب نسب ضعيفة من Bootstrap والذي يسمح لنا أن نقول أنهما عبارة عن نوعين جديدين من جنس *Streptomyces* (S02) : 18% و S015 : 41%) ويعزز هذا التأكيد أيضا بالقيم الهامة للمسافات التي تفصل بين تلك السلالتين و السلالات الأخرى من نفس الجنس *Streptomyces*. إن هاتين السلالتين تحتلان نفس الكليد مع نسبة عالية من Bootstrap تقدر بـ 99% الذي يمكننا تأكيد أنهما نوع واحد لجنس *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyces*, الفوسفات, تحليل , PGPR, الدراسة الفيلوجينية.

Table des Matières

REMERCIEMENT

Dédicaces

Résumé

Introduction générale 1

Revue bibliographique

1. Les <i>Streptomyces</i>	2
1.1. Définition et caractéristiques principales	2
1.2. Cycle de développement	3
1.2.1. Croissance en milieu solide	3
1.2.2. Croissance en milieu liquide	4
1.3. Génétique	5
1.4. Taxonomie	6
1.5. Écologie	7
1.6. Le rôle des <i>Streptomyces</i> dans le sol	8
1.7. L'interaction <i>Streptomyces</i> -plante	8
2. Les bactéries plant growth promoting rhizobacteria	9
2.1. Généralité	9
2.2. Le Rôle des PGPR	9
2.3. Interaction PGPR-plantes	9
2.4. Utilisation des PGPR	10
3. Le sol	11
3.1. Structuration et stabilité du sol	11
3.2. La rhizosphère	11
3.3. Le rhizoplan	12
3.4. Le phosphore dans le sol	12
4. La solubilisation du phosphate	14
5. La plante	15

5.1. La phyllosphère	15
5.2. Rhizodéposition	16
5.3. Contribution des microorganismes solubilisant le phosphore à la croissance des Plantes	17

Partie expérimentale

Matériels et méthodes utilisées

1. Culture des souches étudiées	19
2. Caractères cultureux	19
2.1. Aspect macroscopique	19
2.2. Aspect microscopique	19
3. Mise en évidence de la solubilisation du phosphate	20
3.1. Les milieux de culture	20
4. Identification moléculaire des souches S02 et S015	21
4.1. Séquences utilisées	21
4.2. Le format FASTA	21
4.3. Analyse phylogénétique	21
4.4.1. Logiciels utilisés	21
A). CLUSTALX	21
B). MEGA (version 6.0)	22
4.5.2. Alignement	22
4.6.3. Construction d'arbre phylogénétique	22
A). La méthode de Neighbor-Joining (NJ)	22
B). La méthode de Kimura	23
C). La méthode du Bootstrap	23

Résultats et Discussion

1. Caractéristiques morphologique et culturelles des souches de étudiées	25
1.1. Croissance sur le milieu ISP2	25

1.2. Caractères micro-morphologiques	25
2. Études de la solubilisation du phosphate	29
3- Résultats et discussion de l'étude phylogénétique	31
Conclusion générale	40
Références bibliographiques	42
Annexes	

Liste des figures

Figure 01 : Cycle de croissance des <i>Streptomyces</i> en milieu solide	4
Figure 02 : Morphologies rencontrées au cours des cultures liquides	5
Figure 03: Interactions entre plantes et les bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère	10
Figure 04: la technique d'ensemencement par touche	20
Figure 05 : Aspect des colonies des <i>Streptomyces</i> sp. sur le milieu ISP2 après 7 jours d'incubation	24
Figure 06 : Aspect des colonies des <i>Streptomyces</i> sp. sur le milieu ISP2 après 21 jours d'incubation	24
Figure 07 : photographie des souches S04, S06, S07 et S18 obtenu par le photo-microscope après coloration de Gram (×100)	26
Figure 08 : photographie des souches 04, 05,07 et 09 obtenu par le photo-microscope après coloration simple (×100)	27
Figure 09: la solubilisation du phosphate sur le milieu NBRIP par les souches S14, S15, S17 et S18	29
Figure 10: la Solubilisation du phosphate par différentes souches du genre <i>Streptomyces</i> sur les milieux solides: PVK; NBRIP; ISP.....	30
Figure 11: Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes ARNr16S montrant la position de la souche S02 parmi les espèces du genre <i>Streptomyces</i>	34
Figure 12 : Arbre phylogénétique base sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S015 parmi les espèces du genre <i>Streptomyces</i> (logiciel MEGA 6).....	36
Figure 13 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes ARNr16S montrant la position des deux souches (S02 et S15) parmi les espèces du genre <i>Streptomyces</i>	38

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes formes des PGPR et leur action sur les mécanismes de croissance des plantes	18
Tableau 02: Aspect macroscopique des souches pures de <i>Streptomyces</i> sp. après 21 jours d'incubation.....	28
Tableau 03: Aspect microscopique des souches S04, S06, S07, S18 après coloration de Gram.....	25
Tableau 04 : degrés de similitude selon les résultats du BLAST entre la souche 02 et les espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>	31
Tableau 05 : degrés de similitude selon les résultats du BLAST entre la souche 15 et les espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>	32
Tableau 06 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA 6).....	35
Tableau 07: Matrice des distances calculée à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA6)	37

Introduction générale

Introduction générale

Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente souvent 70 à 90 % des actinomycètes. Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroît dans les sols submergés (Goodfellow et Williams, 1983). Leur présence dans les sols est très importante en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries (Crawford, 1993), et à produire des substances prébiotiques et antibiotiques (Kieser et al., 2000).

Le contenu de phosphore dans le sol varie de 0,02 à 0,5% cependant seule une très faible proportion des phosphates est disponible aux plantes, la majeure partie est complexée par l'aluminium, le calcium et le magnésium (Kumar et al., 1999). Il n'est pas requis en grandes quantités mais peut être un important facteur limitant de la croissance. Ce substrat est susceptible d'être solubilisé par l'action de microorganismes (Arcand et Schneider, 2006).

Les plantes absorbent le phosphore sous forme d'ions phosphate PO_4^{3-} . Ces ions proviennent du très lent lessivage des roches contenant du phosphate de calcium $\text{Ca}^{3+} (\text{PO}_4)_2$.

La présente étude a été réalisée, avec des objectifs de mettre en évidence la solubilisation du phosphate par des souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* et une étude phylogénétique des souches les plus performantes.

Ce travail se divise en trois parties :

Une première partie présente une revue bibliographique, dans laquelle nous allons décrire les bactéries du genre *Streptomyces*, leur cycle de vie, leur rôle dans le sol et leur interaction avec les plantes, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), leurs rôles et leurs mécanismes. Le sol et ses différentes couches ainsi que la solubilisation du phosphate dans ce dernier.

Une deuxième partie porte une description des techniques expérimentales utilisées dans ce travail.

Une troisième partie traite les résultats obtenus au cours de cette expérimentation et leur interprétation.

Enfin, une conclusion.

Revue bibliographique

1- Les *Streptomyces*

1-1- Définition et caractéristiques principales

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production des métabolites secondaires. Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse. Du Grec Strepto. myces : Streptos : tordu ou courbé et myces : champignons (Williams et al., 1989). À cause de leur structure filamenteuse, les actinomycètes y compris les *Streptomyces* ont longtemps été sujets à controverse à propos de leur nature : certains les considérant comme des bactéries filamenteuses, d'autres comme des champignons.

Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe est définitivement classé parmi les bactéries. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de l'acide diaminopimélique (Lechevalier et Lechevalier, 1981), en plus les *Streptomyces* n'ont pas de membrane nucléaire et sont sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens. Le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (Mariat et Sebald, 1990).

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997). Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69 et 78% (Korn-Wendisch et Kutzner, 1992 ; Hodgson, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2006). La présence de l'acide LL-diaminopimélique et de glycine et l'absence de sucres caractéristiques est typique pour ce type de paroi cellulaire (Uchida et Seino, 1997 ; Stackebrandt et Schumann, 2006).

Elles tendent à croître lentement en formant des filaments ramifiés de 0,5 à 2 µm de diamètre qui se fragmentent rarement c'est le mycélium végétatif ou mycélium de substrat.

Le mycélium aérien forme par contre à sa maturité des chaînes de spores non mobiles. Leur croissance donne naissance à des colonies assez lisses au début qui deviennent poudreuses, floconneuses ou compactes après développement du mycélium aérien.

Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles. Leur température optimale est située entre 25°C et 35°C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8 (Stackebrandt et Schumann, 2006).

1-2- Cycle de développement

Les *Streptomyces* peuvent utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La croissance peut se conduire en milieu liquide ou solide ; cependant, l'étude d'un cycle complet de différenciation se réalise préférentiellement en milieu solide.

1-2-1- Croissance en milieu solide

Placées dans des conditions favorables, les spores vont produire un tube germinatif qui va croître et donner des hyphes qui vont se ramifier (figure 1). Il s'agit du mycélium primaire également appelé mycélium végétatif ou de substrat, qui se développe en surface et à l'intérieur du support. Il est visible à l'œil nu au bout de 2 à 3 jours. Un mycélium secondaire, aérien va ensuite se développer sur la colonie. Ces hyphes sont peu ramifiés et pourvues d'une enveloppe hydrophobe, elles peuvent être colorées. Ce mycélium aérien va s'enrouler en spirales aux extrémités puis par cloisonnement et épaissement des cloisons, des spores vont être produites. Ce mycélium secondaire va donner un aspect morphologique poudreux typique à ces colonies. Le développement du mycélium aérien portant des spores peut prendre une à deux semaines. Pour favoriser la production de spores il faut cultiver la souche sur un milieu pauvre puisque les spores sont une forme de résistance aux conditions défavorables (Chater et Merrick, 1979).

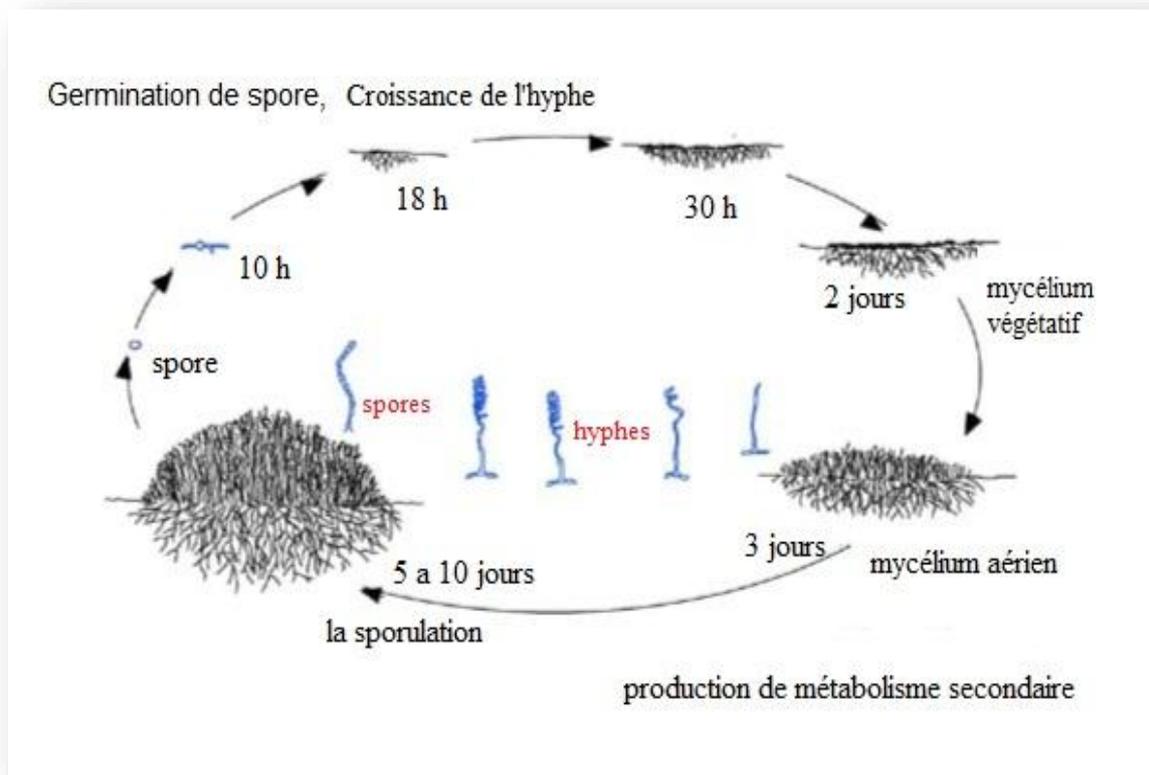


Figure 01 : Cycle de croissance en milieu solide de *Streptomyces*.

1-2-2- Croissance en milieu liquide

La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Les *Streptomyces*, dans ces conditions, croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter trois types de morphologie (figure 2) : les hyphe, branchées ou non, sous forme de mycélium dispersé ; un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements ou encore des pelotes (figure 2) denses dont la taille peut varier de 0,1 μm à plusieurs millimètres (Bushell, 1988 ; Hobbs et al., 1989 ; Drouin, 1996 ; Amanullah et al., 2000). Ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelote (Papagianni, 2004). Les pelotes se forment soit par agrégation des spores qui, lorsqu'elles vont germer, formeront une pelote, soit par enchevêtrement des hyphe au cours de la croissance et de la ramification.

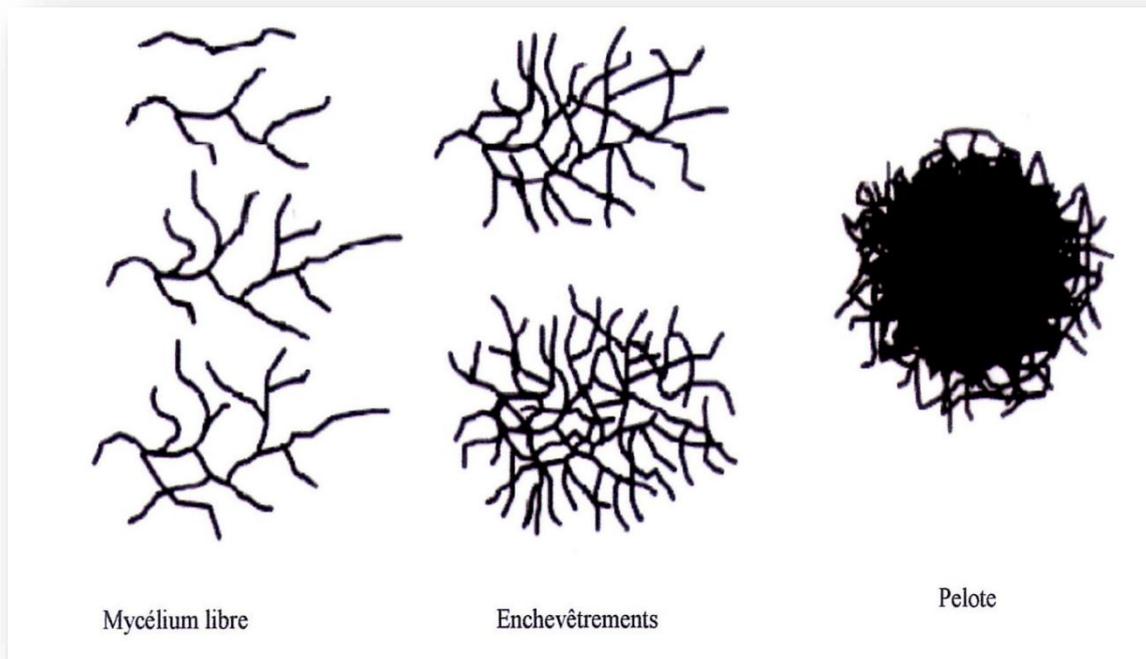


Figure 02 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah et *al.*, 2000).

La sporulation en milieu liquide est rare mais possible. Chez *Streptomyces griseus* la sporulation a pu être induite dans des conditions de carence en azote ou en phosphore (Kendrick et Ensign, 1983 ; Daza et *al.*, 1989). Selon la source d'azote employée, *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 est également capable de produire des spores en milieu liquide (Novella et *al.*, 1992). Les spores produites dans ces conditions sont similaires à celles obtenues en milieu solide, mais dans le cas de *S. antibioticus* ETHZ 7451, elles présentent une moins bonne thermorésistance (Daza et *al.*, 1989 ; Novella et *al.*, 1992).

1-3- Génétique

Le génome des *Streptomyces* est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui représente en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires. Une revue sur la génétique des *Streptomyces* a été publiée par Hopwood en 1999.

1-4- Taxonomie

Le genre *Streptomyces* a été décrit pour la première fois par Waksman et Henrici en 1943. Il est classé dans la famille des *Streptomycetaceae* en se basant sur la morphologie et la composition de la paroi cellulaire. Le développement de la classification numérique a permis la reclassification de six autres genres de cette famille (*Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* et *Microellobosporia*) dans le genre *Streptomyces*. Ces anciens systèmes numériques utilisant les caractères phénotypiques sont fondamentalement changés par l'introduction des caractères génotypiques grâce à la biologie moléculaire dans les systèmes de classification (Stackebrandt et al., 1997). Les genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* étaient deux genres distincts possédant des caractères morphologiques différents, en 1990, Witt et Stackebrandt, ont conclu à partir des comparaisons des séquences d'ARNr 16S et 23S que le genre *Streptoverticillium* doit être considéré comme un synonyme de *Streptomyces*.

- **Détermination des espèces du genre *Streptomyces***

Le nombre d'espèces du genre *Streptomyces* a augmenté de 40 à plus de 3000, mais certaines d'entre elles étaient considérées comme synonymes. En 1964, le projet international des *Streptomyces* (ISP) a essayé de standardiser les critères de détermination de l'espèce. Shirling et Gottlieb (1968a, b, 1969, 1972) ont décrit des critères standards clés pour la détermination des espèces :

- la forme des chaînes de spores (réctiflexible pour les chaînes droites ou flexueuses, spirale pour les chaînes hélicoïdales) ;
- la couleur du mycélium aérien sporulé avec sept classes de couleur (blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet) ;
- la production de pigments mélanoides bruns à noirs ;
- l'ornementation de la paroi sporale (lisse, verruqueuses, ou chevelue) ;
- la présence ou non de pigments solubles ;
- la capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer (le glucose, le xylose, le galactose, le raffinose, le mannitol, le fructose, l'arabinose, le rhamnose, l'inositol et le saccharose).

1-5- Écologie

Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout (Lacey, 1997). Le sol à partir duquel ils peuvent coloniser de nombreux biotopes en est le réservoir le plus riche (Xu et al., 1996 ; Katsifas et al., 1999 ; Dhanasekaran et al., 2009). Ils représentent une partie significative de la population microbienne du sol dont le nombre diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (Waksman, 1963). Comme beaucoup de microorganismes du sol, la plupart des *Streptomyces* se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température variant entre 25°C et 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 à 9 avec un maximum autour de la neutralité) (Madigan et Martinko, 2007). Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 colonisant ainsi les sols acides, ils ont la particularité de produire des hydrolases et des chitinases acides (Alexander, 1977).

Les *Streptomyces* colonisent les eaux douces, ils produisent des composés volatiles responsables des goûts et des odeurs terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de consommation tels que la géosmine et la 2-méthyle-isobornéol (Zaitlin et al., 2003 ; Madigan et Martinko, 2007), selon Cavala et Eberlin (1994), la production de ces substances est plus importante chez les espèces possédant un mycélium végétatif abondant. Les *Streptomyces* ont également été détecté dans les eaux marines mais à de faibles concentrations en comparaison avec les eaux douces (Xu et al., 1996) et dans l'air ou généralement ils sont présents sous forme de spores (Reponen et al., 1998).

Les *Streptomyces* sont capables de se développer sur une large gamme de substrats, selon (Andreyuk et al., 1990), Ils possèdent un grand pouvoir d'adaptation aux conditions de l'environnement et peuvent en même temps l'influencer, ainsi on les retrouve dans les eaux polaires gelées en permanence tout comme dans les sols chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols alcalins, les sols hautement contaminés par les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (Goodfellow et Williams, 1983 ; Lechevalier, 1988 ; Sanglier et Trujillo, 1997 ; Hasavada et al., 2006 ; Lakshmiathy et Kanabiran, 2009).

Ils sont mêmes présents, comme espèces non pathogènes à la surface des feuilles d'arbres fruitiers comme les feuilles de vigne (Vercesi et al., 1990) et dans les racines de blé

(Coombs et Franco, 2003) mais d'autres provoquent des dégâts considérables sur la pomme de terre (*S. scabies* et *S. acidiscabies* responsables de la gale de pomme de terre) (Loria et al., 1997). Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Xu et al., 1996 ; Hwang et al., 2001).

1-6- Le rôle des *Streptomyces* dans le sol

Dans le sol, les *Streptomyces* sécrètent des enzymes dégradant les polymères insolubles tels que les protéines, l'amidon, la cellulose et la lignine provenant des plantes et consomment les produits issus de la réaction de ces enzymes, en plus de la dégradation de la pectine, la kératine et la chitine. Ces produits apparaissent naturellement dans les litières en décomposition et dans les sols pour former l'humus. Leurs actions se situent également dans la dégradation des composts et des polluants dues à l'activité de l'homme (Lacey, 1997). Certaines espèces peuvent même dégrader les hydrocarbures et le caoutchouc (Madigan et Martinko, 2007).

Dans la rhizosphère, elles jouent un rôle important dans la protection des racines des plantes par inhibition du développement des champignons potentiellement pathogènes par leur sécrétion d'antifongiques (Doumbou et al., 2001 ; Samac et al., 2003 ; Prapagdee et al., 2008 ; Bouizgarne et al., 2009 ; Oskay, 2009). Elles sont aussi capables de solubiliser naturellement le phosphate de sol insoluble afin de le rendre disponible pour la croissance des plantes.

1-7- L'interaction *Streptomyces*/plante

Les plantes ont une variété de défenses chimiques et anatomiques, dont les forces dépendent de facteurs biotiques et environnementaux. Les bactéries du genre *Streptomyces* peuvent induire des réactions de défense des plantes. Ces réponses des plantes induites peuvent survenir au niveau des racines, mais aussi hors-sol, dans les feuilles. Les *Streptomyces* ont également développé des mécanismes pour faciliter les symbioses racinaires des plantes, des mycorhizes et la nodulation des racines. En favorisant la croissance fongique et en diminuant les réponses de défense des plantes, ces bactéries favorisent la formation de mycorhizes. Cette mini-revue couvre l'actuel de nos connaissances sur les interactions complexes qui ont lieu entre les streptomyces, les plantes et les microbes rhizosphère.

2- Les bactéries plant growth promoting rhizobacteria

2-1- Généralité

Les PGPR sont les bactéries de la rhizosphère qui peuvent améliorer la croissance des plantes par une grande variété de mécanismes tel que la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores, la fixation biologique de l'azote, la production de la rhizosphère désaminase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), la production des phytohormone, présentant une activité antifongique, la production de composés organiques volatils (COV) (Weller et *al.*, 2002; Vessey, 2003).

2-2- Le Rôle des PGPR

Les bactéries PGPR colonisent la rhizosphère et utilisent les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes. Cet effet bénéfique peut être direct, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plant-hôte), ou indirect, lorsqu'elle contrôle les organismes phytoparasites (antagonisme) (figure 3). Au niveau appliqué, l'effet PGPR offre de plus en plus de possibilités intéressantes en agronomie (accroissement du rendement, diminution des intrants azotés polluants grâce à la phytostimulation, lutte biologique et santé des plantes) (Dobbelaere et *al.*, 2003). (tableau 01).

2-3- Interactions PGPR/plante

La rhizosphère, se caractérise par la présence des exsudats racinaires (rhizodépôts). Ces exsudats sont utilisés par la microflore endémique en tant que signaux chimiques en plus d'être un substrat nutritif disponible pour la croissance et le développement des microorganismes du sol. Parmi ces microorganismes, les PGPR sont capables de coloniser les racines ou bien encore la rhizosphère, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante.

La colonisation des racines des plantes par les PGPR commence par un chimiotactisme positif des bactéries vers les racines pour plusieurs raisons : sources de carbone nécessaires pour la croissance et la fixation d'azote atmosphérique (Okon et *al.*, 1980).

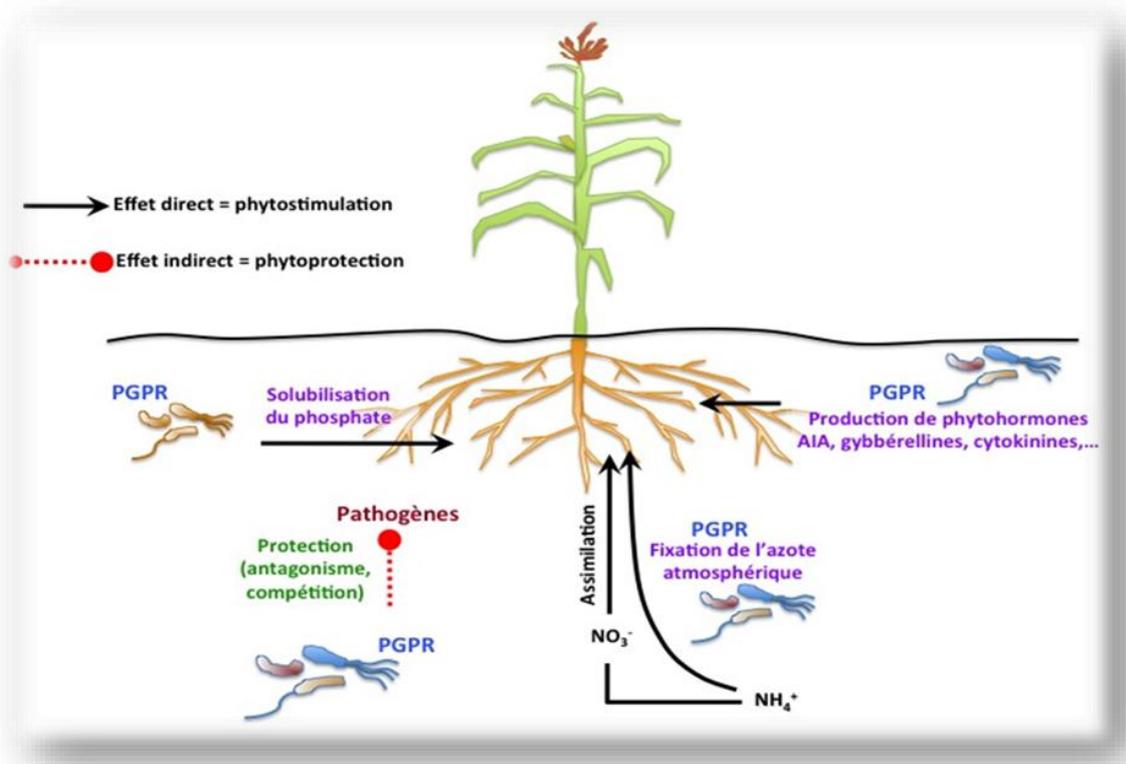


Figure 03 : Interactions entre plantes et les bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère

2-4- Utilisation des PGPR

Certaines bactéries de la rhizosphère (PGPR, rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes et stimulent les mécanismes de défenses chez l'hôte, la plupart des souches bactériennes exploitées comme bio pesticides appartiennent aux genres, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago, 2005).

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997). L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plantes hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants. Des lipopeptides des familles de la surfactine, de

l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.*, 1999; Bonmatin *et al.*, 2003) et des enzymes hydrolytiques (β - 1,3- gluacanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques. Par exemple, certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontré par (Whipps, 2001).

3-Le sol

3-1- structuration et stabilité du sol

Le sol est constitué d'agrégats (combinaisons de composés organiques et minéraux) classés selon leur taille, en macro (diamètre > 250 μ m) et microagrégats (diamètre < 250 μ m). Les racines et les filaments mycéliens participent aux macroagrégats ; les résidus organiques, les bactéries et les polysaccharides participent aux microagrégats (Ranjard et Richaum, 2001).

L'ensemble des interactions entre les microorganismes, les racines, le sol et l'eau provoquent des modifications physicochimiques sur la structure et la stabilité (agrégation) du sol (Haynes et Swift 1990). Les racines secrètent au niveau de l'apex un mucilage constitué de polymères glucidiques dont la fonction première est d'assurer une protection contre la dessiccation (Bais *et al.*, 2006). La principale contribution des microorganismes rhizosphériques à la stabilité du sol est associée à la production de sécrétions, dont les exopolysaccharides (EPS). Ces derniers se présentent sous forme de gels hydratés autour des cellules. Ils constituent l'interface entre les microorganismes et leur environnement immédiat. Les EPS participent à la formation des agrégats bactériens et par conséquent ils aboutissent à l'amélioration de l'aération du sol, à l'infiltration de l'eau et à la progression de la racine (Sandhya *et al.*, 2009).

3-2- La rhizosphère

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "rhizo" ou "rhiza" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou

d'influence. (Hiltner, 1904) a décrit la rhizosphère comme le lieu d'activités microbiennes autour des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes.

Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Dans la rhizosphère sensu stricto il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe et al., 2007).

3-3- Le rhizoplan

Le rhizoplan est formé de l'épiderme racinaire et le cortex externe où les particules du sol, les bactéries et les hyphes fongiques adhèrent (Singer, 2006 ; Sylvia, 2005). Alors que sa définition fonctionnelle est : « les micro-organismes restants et les particules du sol après que les racines ont été secouées vigoureusement dans l'eau ». Il y a plus de microbes dans le rhizoplan que dans la rhizosphère. Elle est déterminée en comptant le nombre de colonies formant des unités (UFC), qui sont déterminées par la diffusion des microorganismes extrait du sol sur une gélose et compter le nombre de groupes indépendants de micro-organismes. Les microbes sont plus abondant où l'intégrité de la racine est compromise. Pour cette raison, les micro-organismes de rhizoplan ont tendance à se trouver sur anciennes racines plutôt que de jeunes. Les bactéries et les champignons qui vivent dans les cellules de la racine ne sont pas considérés comme une partie de la rhizosphère, mais plutôt appelés endophytes (Sylvia, 2005).

3-4- Le phosphore dans le sol

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Dans les sols, son contenu varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% pour une moyenne de 600 ppm (Lindsay, 1979). Le phosphore constitue le deuxième élément en importance pour la nutrition végétale. Cependant, la majorité des sols

cultivables en sont pauvres. Pour améliorer la production des plantes, on apporte le phosphore sous forme d'engrais soluble. Cependant, l'enrichissement en phosphore du sol suite à des applications de fertilisants dépend des caractéristiques chimiques et de la nature pédologique du sol. En effet, la plus grande partie du phosphore ajouté sous forme soluble est soit adsorbé par le calcium présent sur le complexe d'échange, soit précipité par les formes libres de fer ou d'aluminium qui se retrouvent en quantités importantes dans les sols 0,2 à 0,7 % soit plusieurs tonnes par hectares (Giroux, 2002).

La capacité des sols à fixer le phosphore, est influencée par leurs contenus en aluminium libre, ce qui explique les différentes réactions, des engrais phosphatés appliqués qui deviennent moins disponibles aux plantes (Camara *et al.*, 1987). Ces réactions varient selon la nature et le contenu en oxydes d'aluminium, le plus de fixation sous forme d'aluminium-phosphore étant observé dans les sols acides, faisant apparaître des niveaux d'application, du phosphore, variables pour enrichir les sols (Vezina *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 1995). La teneur initiale d'un sol en phosphore est un autre facteur très important à considérer lors de la fertilisation. En effet, plus la teneur en phosphore d'un sol est élevée, plus la dose de phosphore nécessaire au maintien de la fertilité est élevée (Webb *et al.*, 1992). En plus, les cultures ne prélevant pas toutes les mêmes quantités de phosphore, l'évolution de la teneur en phosphore des sols va aussi dépendre des systèmes culturaux.

Selon Tisdale *et al.* (1985), les phosphates précipités par le fer et l'aluminium sont transformés en minéraux très stables, tandis qu'avec le calcium, les phosphates vont évoluer, au cours du temps, vers des formes de plus en plus stables pour donner les phosphates octocalciques puis les phosphates di ou tricalciques et les apatites (hydroxyapatite et fluoroapatite). Ce phénomène appelé rétroversion des phosphates est à l'origine de dépôts importants de phosphates naturels de plus en plus exploités et utilisés comme fertilisant. Cependant, la mise en disponibilité du phosphore des phosphates naturels dépend de plusieurs facteurs dont la réactivité de la roche. En effet, les réactions et les transformations biologiques des phosphates naturels dans les sols sont très complexes.

4- La solubilisation du phosphate

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol (Tardieux-Roche, 1966a et 1966b ; Richardson, 2001). En effet, on trouve dans les sols un nombre important de microorganismes du sol, incluant des bactéries, des champignons et des algues (Berthelin et *al.*, 1991; Goldstein, 1986; Kim et *al.*, 1997 ; Oehl et *al.*, 2001 ; Sundara et *al.*, 2002). Bien que ces microorganismes soient généralement liés à la surface des particules de sol, c'est surtout au niveau de la rhizosphère que leur activité est la plus élevée (Andrade et *al.*, 1998 ; Kluepfel, 1993 ; Marschner et *al.*, 1997). En effet, au niveau de la rhizosphère, les exsudats racinaires, tels que les acides organiques, constituent d'excellentes sources d'éléments nutritifs pouvant supporter la croissance des microorganismes, ce qui explique leur densité plus forte au niveau du sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique (Hinsinger, 2001 ; Singh et Amberger, 1998). Le nombre de bactéries et de champignons dissolvant les phosphates varie de 0,5%-0,1% (Kucey, 1989) à 26%-39% (Sperber, 1958) de la microflore totale, et il existe une grande corrélation entre le nombre de champignons totaux et solubilisant les phosphates et la teneur en phosphate total du sol. Les champignons solubilisent plus efficacement les phosphates que les bactéries, en plus, une grande partie des champignons conservent cette propriété tandis que la majorité des bactéries la perdent après plusieurs repiquages successifs (Kucey et *al.*, 1989).

Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley et *al.*, 1990 ; Hinsinger, 2001). En effet, certaines souches bactériennes chimioautrophes tirent leur énergie de croissance de l'oxydation de certains éléments chimiques avec production d'acides (Pelmont, 1993 ; Swaby et Fedel, 1973).

Les acides produits vont faire baisser le pH du milieu et dissoudre ainsi les phosphates naturels, entraînant en quelque sorte une production biologique du superphosphate (Narsian et Patel, 2000). La quantité d'acide produite par l'oxydation microbiologique et la baisse de pH varient en fonction du genre et de l'espèce microbienne considérée. Ainsi, nous avons une dissolution du phosphate de fer à un pH inférieur à 2,1 suivie du phosphate d'aluminium à pH 3 et enfin le phosphate de calcium est dissout à pH 4,8. De plus, une autre voie de dissolution

par acidification faisant suite à une extrusion d'ions H^+ lors de l'assimilation de l'ammonium a été décrite (Bolan et *al.*, 1997).

Illmer et Schinner (1992) ont montré que la dissolution des phosphates naturels n'est pas uniquement liée à une baisse de pH. Certains microorganismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore (Milagres et *al.*, 1999; Sayer et *al.*, 1995; Vasquez et *al.*, 2000) et libérant ainsi le phosphore lié aux argiles et aux oxydes de fer et d'aluminium (Violante et *al.*, 1996). Goldstein (1986), a montré que l'acidification de l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose en acide gluconique, est le processus majeur utilisé par les bactéries à coloration de Gram négatives pendant la dissolution des phosphates minéraux. Le pouvoir chélateur d'un acide organique donné par rapport à un métal donné, varie avec le pH. Par exemple Cline et *al.* (1982) ont montré que l'acide citrique chélate préférentiellement le fer à pH 6,0 alors qu'à un pH au-dessus de 6,0, apparaît une compétition entre le calcium et le fer. De même, l'acidification artificielle du milieu de culture par ajout d'acide minéral industriel, a provoqué une dissolution inférieure à celle obtenue en utilisant les microorganismes, ce qui suggère que les acides organiques sont plus efficaces dans la dissolution des phosphates inorganiques que les acides minéraux et permettent par conséquent une meilleure nutrition phosphatée des plantes à partir des phosphates inorganiques. Les acides organiques produits au niveau de la rhizosphère, sont produits essentiellement par les microorganismes rhizosphériques et les racines de certaines plantes. Ainsi, tous les facteurs agissant sur les microorganismes rhizosphériques occasionnent des variations de la solubilisation des phosphates inorganiques.

5-La plante

5-1- phyllosphère

La phyllosphère est l'ensemble des parties des plantes situées au-dessus du niveau du sol est considérée comme habitat pour les micro-organismes. Elle peut être subdivisée en caulosphère (tiges), phylloplan (feuilles), anthosphère (fleurs) et carposphère (fruits). Les habitats microbiens situés au-dessous du niveau du sol (c'est-à-dire le mince volume de sol

enveloppant la surface des racines et des tiges souterraines) sont considérés comme la rhizosphère.

5-2- Rhizodépositions

Une grande variété de composés organiques libérés par les plantes est trouvée dans la rhizosphère. Elle peut être divisée en :

- Exsudats

Les exsudats sont des composés hydrosolubles de faible poids moléculaire tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores, les flavonoïdes, les hormones et les vitamines.

- Substances sécrétées

Les substances sécrétées sont des composés de poids moléculaire le plus souvent élevé. Elles sont représentées par les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes. Elles jouent un rôle très important dans le maintien de la stabilité du sol (Kennedy et de Luna, 2004).

- Lysats

Les lysats sont libérés quand les cellules des tissus corticaux des racines s'autolysent, ils incluent aussi les cellules desquamées de la coiffe et les membranes cellulaires (Bell -Perkins et Lynch, 2002).

- Gaz

Les gaz comme l'éthylène, le CO₂ et d'autres composés volatiles sont exportés vers le sol par respiration.

Les rhizodépôts impliquent un effet qualitatif et quantitatif sur la microflore de la rhizosphère (Walker et *al.*, 2003).

5-3- Contribution des microorganismes solubilisant le phosphore à la croissance des plantes

Les travaux de plusieurs chercheurs ont montré que, les microorganismes dissolvant le phosphore et améliorant la croissance des plantes constituent deux groupes : ceux qui vivent à l'état libre non loin des racines et souvent même sur la racine sans y être liés et ceux qui vivent en symbiose avec les plantes (Gerretsen, 1948 ; Frommel et *al.*, 1991; Leggett et *al.*, 2001). Les microorganismes symbiotiques ont été largement étudiés et utilisés pour augmenter la production de plusieurs cultures (Frey-Klett et *al.*, 1999 ; Chabot, 1996; Toro, 1996).

En effet, plusieurs expériences réalisées en serres et aux champs, ont montré une forte croissance et une augmentation intéressante de la production des plantes inoculées avec les microorganismes solubilisant le phosphore.

Tableau 01 : Les différentes formes des PGPR et leur action sur les mécanismes de croissance des plantes.

Les formes des PGPR	Définition	Mécanisme d'action	Références
Biofertilisant	Une substance qui contient des microorganismes vivants, lorsqu'elle est appliquée sur la surface de la plante des semences ou le sol, colonisent la rhizosphère et promeuvent la croissance des plantes en augmentant le nombre des éléments fertilisants primaires de la plante hôte.	-La fixation biologique d'azote. -Utilisation du phosphore insoluble.	(Vessey, 2003) (Somers et al., 2004)
Phytobénéfique	Micor-organisme, capable de produire des phytohormones indole tels que l'action acétiques, l'acide gibbérellique les cytokinines et de l'éthylène.	Production des phytohormones	(Lugtenberg et al., 2002) (Somers et al., 2004) (Vessey, 2003)
Biopesticides	Les micro-organismes qui favorisent la croissance des plantes en contrôlant les agents phytopathogènes.	Production d'antibiotiques, sidérophores, d'enzymes, hydrolytiques acquis et systémique induite la résistance	(Somers et al., 2004) (Chandler et al., 2008)

Matériels et méthodes

1- Culture des souches étudiées

Vingt et une souches appartenant aux actinomycètes ont été isolées, purifiées et aimablement fourni par la doctorante GASMI Meriem. Les souches sont ensemencées par des stries séries à partir d'une colonie de chaque souche sur le milieu ISP2 qui est recommandé pour l'isolement des actinomycètes (Ara et *al.*, 2012), l'incubation dure une semaine à 30⁰C.

2- Caractères cultureux

2-1- Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique (couleur, forme, ... etc.) des colonies est observé après vingt-un jours d'incubation à 30⁰C (Shirling et Gottlieb, 1966).

2-2- Aspect microscopique

Il est réalisé selon la méthode classique. Des frottis de colonies répondant aux caractères macroscopiques et microscopiques des souches étudiées sont préparés, colorés puis observés sous un photo-microscope (Optech Optical Technology) coupler d'une caméra (Canon).

La coloration simple au bleu de méthylène permet d'observer et de déterminer la morphologie des cellules bactériennes. Les frottis sont examinés à l'objectif à immersion pour apprécier la présence et la pureté des souches étudiées.

La coloration différentielle de Gram d'un prélèvement multibactérien permet de déceler les formes morphologiques et la coloration de Gram positive ou négative de différentes bactéries. Cet examen est fait sur des frottis mince préparés à partir des prélèvements, colorés puis séchés est examinés avec un objectif à immersion (×100) (Tendolkar et *al.*, 1998). L'examen microscopique à une importance majeure lors de la purification, car une lame homogène suppose une bonne purification des souches.

3- Mise en évidence de la solubilisation du phosphate

3-1- Les milieux de culture

Quatre milieux de culture recommandés pour étudier la solubilisation du phosphate (Annexe 01), ont été utilisés il s'agit :

- Milieu LB (Luria-Bertani) (Bertani, 1951);
- Milieu NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) (Nautiyal, 1999);
- Milieu PVK (Pikovskayas, 1948);
- Milieu ISP2 (International Streptomyces Project) (Ara *et al.*, 2012); additionné de phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Chaque milieu estensemencé par touche ou par spot (Nautiyal, 1999). La capacité des souches à solubiliser le phosphate dans le milieu est déterminé par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie correspondante après incubation à 30°C pendant une semaine. La mesure des diamètres des halos est réalisée par l'équation suivante :

Diamètre total = Diamètre de la colonie + Diamètre du halo,

Donc : Diamètre de l'halo = Diamètre total - Diamètre de la colonie



Figure 4 : photographie de la technique d'ensemencement par touche

4- Identification moléculaire des souches S02 et S015

4-1- Séquences utilisées

Les séquences du gène ARNr 16S des souches S02 et S015 nous ont été fournies par la doctorante Gasmi Meriem (Annexe 02). Elles ont fait l'objet d'une comparaison avec les autres séquences disponibles au niveau de la banque de données "Genbank" (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (Benson *et al.*, 1997) à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Alignment Search Tool) Altschul *et al.*, (1990) afin de déterminer leur affiliation phylogénétique. Les séquences homologues sont téléchargées sous format FASTA et sauvegardées dans des fichiers séparés. Le tableau 04 et 05 donne la liste des espèces retenues avec leurs numéros d'accèsion.

4-3- Le format FASTA

Pour l'analyse des séquences nucléotidiques ou d'acides aminés par les différents programmes d'alignement, ceux-ci doivent être écrits selon le format FASTA. Une séquence au format FASTA commence par une ligne de titre (nom, définition, ...), suivie par la séquence répartie sur plusieurs lignes. La ligne de titre est précédée par le symbole ">".

4-4- Analyse phylogénétique

4-4-1- Logiciels utilisés

A)- CLUSTALX

CLUSTALX (Annexe 03) est une nouvelle interface de Windows pour le programme d'alignement multiple progressive de séquences largement utilisé CLUSTALW. Le nouveau système est facile à utiliser, fournissant un système intégré pour réaliser des profils d'alignements multiples des séquences et l'analyse des résultats (Annexe 04). CLUSTALX affiche l'alignement de séquences en une fenêtre sur l'écran. Une coloration de séquence polyvalente permet à l'utilisateur de mettre en évidence les caractéristiques conservées dans l'alignement. Un menu déroulant fournit toutes les options nécessaires pour le profil d'alignement multiple traditionnel de séquences (Thompson *et al.*, 1994).

B)- MEGA (version 6.0)

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Annexe 05) est un outil intégré pour effectuer l'alignement de séquences, inférer des arbres phylogénétiques, les taux d'estimation de l'évolution moléculaire, la déduction des séquences ancestrales, et tester des hypothèses évolutives. MEGA est utilisée par les biologistes dans un grand nombre de laboratoires pour reconstruire l'histoire évolutive des espèces et déduire l'ampleur et la nature des forces sélectives façonner l'évolution des gènes et des espèces. Il est spécifiquement conçu pour réduire le temps nécessaire pour les tâches courantes d'analyses de données et de fournir des méthodes statistiques d'analyse génétique moléculaire évolutive dans un calcul établi faciles à utiliser (Tamura et *al.*, 2007).

4-4-2- Alignement

L'inférence phylogénétique est basée sur la comparaison de caractères entre différentes espèces. Dans le cas des phylogénies moléculaires, ces caractères sont les états possibles de séquences d'ADN ou de protéines. Les caractères sont comparés colonne par colonne et l'alignement des séquences pour former les colonnes est donc fondamental.

4-4-3- Construction des arbres phylogénétiques

Un arbre phylogénétique est une représentation graphique des relations de parenté entre des espèces, supposées ayant un ancêtre commun. Chaque nœud de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants.

Plusieurs arbres phylogénétiques sont construits à partir des séquences nucléotidiques de chaque gène ARNr 16S, par la méthode de neighbor-joining (NJ) (Sneath, 1957) et la méthode de kimura (Kimura, 1980). La fiabilité de tous les arbres est évaluée par le programme "Bootstrap" (Efron et *al.*, 1993),(Annexes 06,07 et 08).

A)- La méthode de Neighbor-Joining (NJ)

NJ est une méthode rapide, même pour des centaines de séquences développés par Saito et Nei (1987) tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation

différent sur les branches.

La méthode NJ consiste à construire des arbres phylogénétiques sans racine à partir d'un indice d'écart (par exemple distance ou dissimilarités entre les séquences). Elle est basée sur la recherche d'une paire d'OUT " Opérationnel Taxonomie Units " qui minimise la longueur totale des branches de l'arbre à chaque étape de regroupement. Lorsque deux séquences sont liées, le nœud représentant l'ancêtre commun est ajouté à l'arbre et les deux feuilles sont enlevées. Ce processus convertit l'ancêtre en un nœud terminal dans un arbre de taille réduite.

B)- La modèle de Kimura

Kimura (1980) a proposé un modèle à deux paramètres où la probabilité des transitions est différente des transversions, ce qui permet d'estimer les distances évolutives en termes de nombre de substitutions de nucléotides. Le modèle de Kimura fut rapidement adopté par la communauté scientifique. La complexité additionnelle apportée par l'ajout d'un paramètre supplémentaire est largement compensée par une nette amélioration de la cohérence entre les modèles de substitutions et les données réelles.

C)- La méthode du Bootstrap

Le Bootstrap (Efron et *al.*, 1993) est une méthode souvent utilisée pour tester la fiabilité des branches internes des arbres phylogénétiques. Elle consiste à effectuer un tirage au hasard avec remise des caractères. Dans chaque réplique de "Bootstrap", certains caractères peuvent être présents plusieurs fois, tandis que d'autres peuvent être absents.

Chaque réplique produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiel" contenant cette branche. On considère généralement que les branches définies par une valeur de "Bootstrap" supérieure à 95% sont fiables. Il faut 1000 répliques de "Bootstrap" pour que cette méthode soit statistiquement valable.

Résultats et discussion

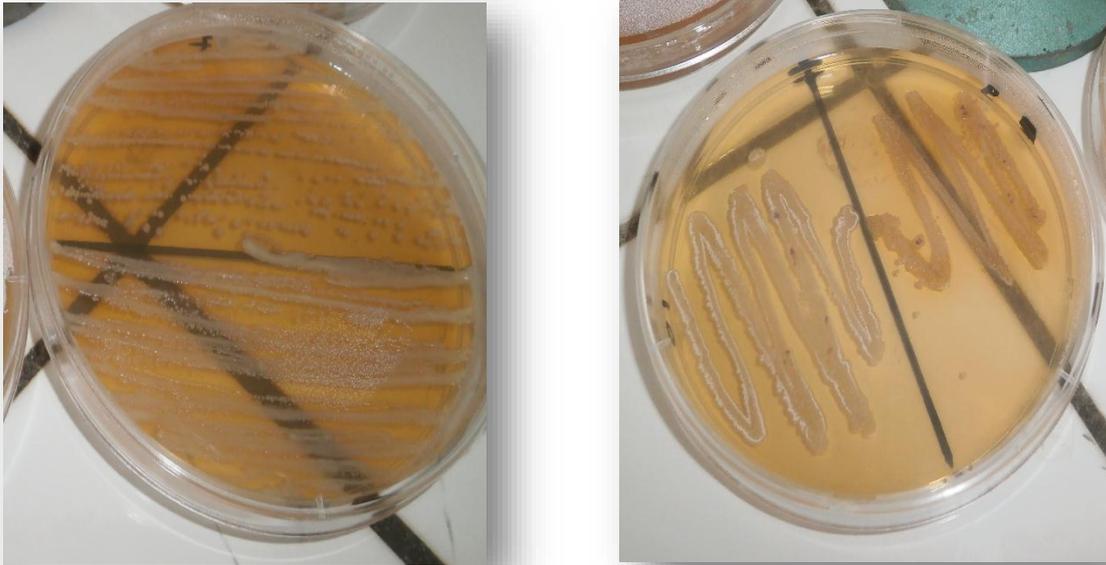


Figure 05 : Photographies d'Aspect des colonies des *Streptomyces* sp. sur le milieu ISP2 après sept jours d'incubation



Figure 06 : Photographies d'Aspect des colonies des *Streptomyces* sp. sur le milieu ISP2 après vingt et un jours d'incubation.

1- Caractéristiques morphologique et culturales des souches étudiées

1-1- Croissance sur le milieu ISP2

La majorité des souches donnent une bonne croissance sur ce milieu à l'exception des quatre souches qui n'ont pas poussées. Les observations rassemblées dans le tableau 02 montrent l'aspect macroscopique des dix-sept souches de *Streptomyces* après vingt-un jours d'incubation.

Pour toutes les souches, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition d'un mycélium très ramifié et pâteux. Mais, après sept jours d'incubation l'observation des colonies permet de diviser les souches en deux groupes : le premier regroupe les colonies pâteuses, alors que le second réunit les colonies duveteuses ou légèrement poudreuses, (Figure 05).

Au 21^{ème} jour, la majorité des souches donnent des colonies poudreuses de couleur blanchâtre ou mélangée avec d'autre couleurs (grise, beige) (figure 06), de taille petite régulières ou non, aplaties ou bombées avec une odeur terreuse. Cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien, quelques souches apparaissent pigmentées, c'est la maturation des cultures. Pour quelques souches la masse des spores est importante.

1-2- Caractères micro-morphologiques

L'observation des lames après colorations simple et coloration de Gram sous un microscope optique à immersion, permet de détecter une seule forme filamenteuse à coloration de Gram positive (figure 07 et 08) ce qui confirme la pureté des souches de *Streptomyces*.

Chez quelques souches le mycélium apparaît fragmenté comme les souches S06 et S018. De cette fragmentation, il résulte soit des formes coccoïdes, soit des formes bacillaires. D'autres souches (S04 et S07), se présentent sous forme de mycéliums longs filaments ramifiés dépourvus de septums (figure 07 et 08).

Tableau 03 : Aspect microscopique des souches S04, S06, S07, S018 après coloration de Gram.

Souche	Mycélium	Spore
S04	non fragmenté	absence
S06	fragmenté	absence
S07	Fragmenté et non fragmenté	sac de spore (sporange)
S018	fragmenté	absence

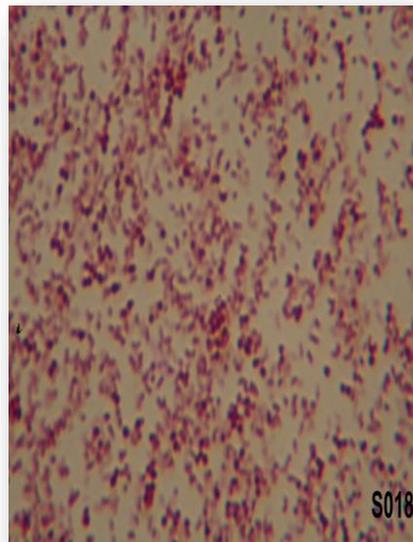
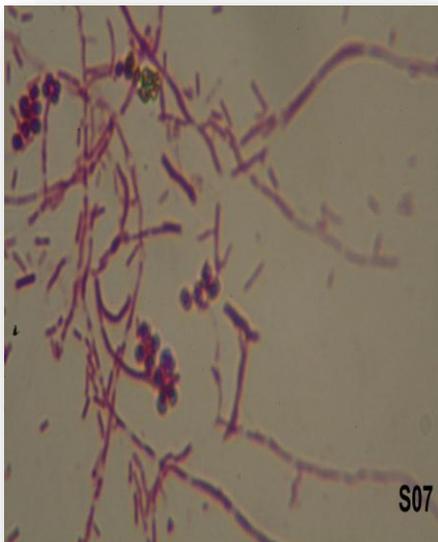
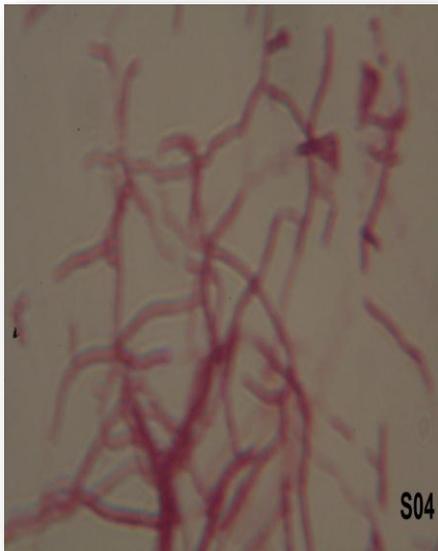


Figure 07 : photographies des souches S04, S06, S07 et S018 obtenues par le photomicroscope après coloration de Gram ($\times 100$).

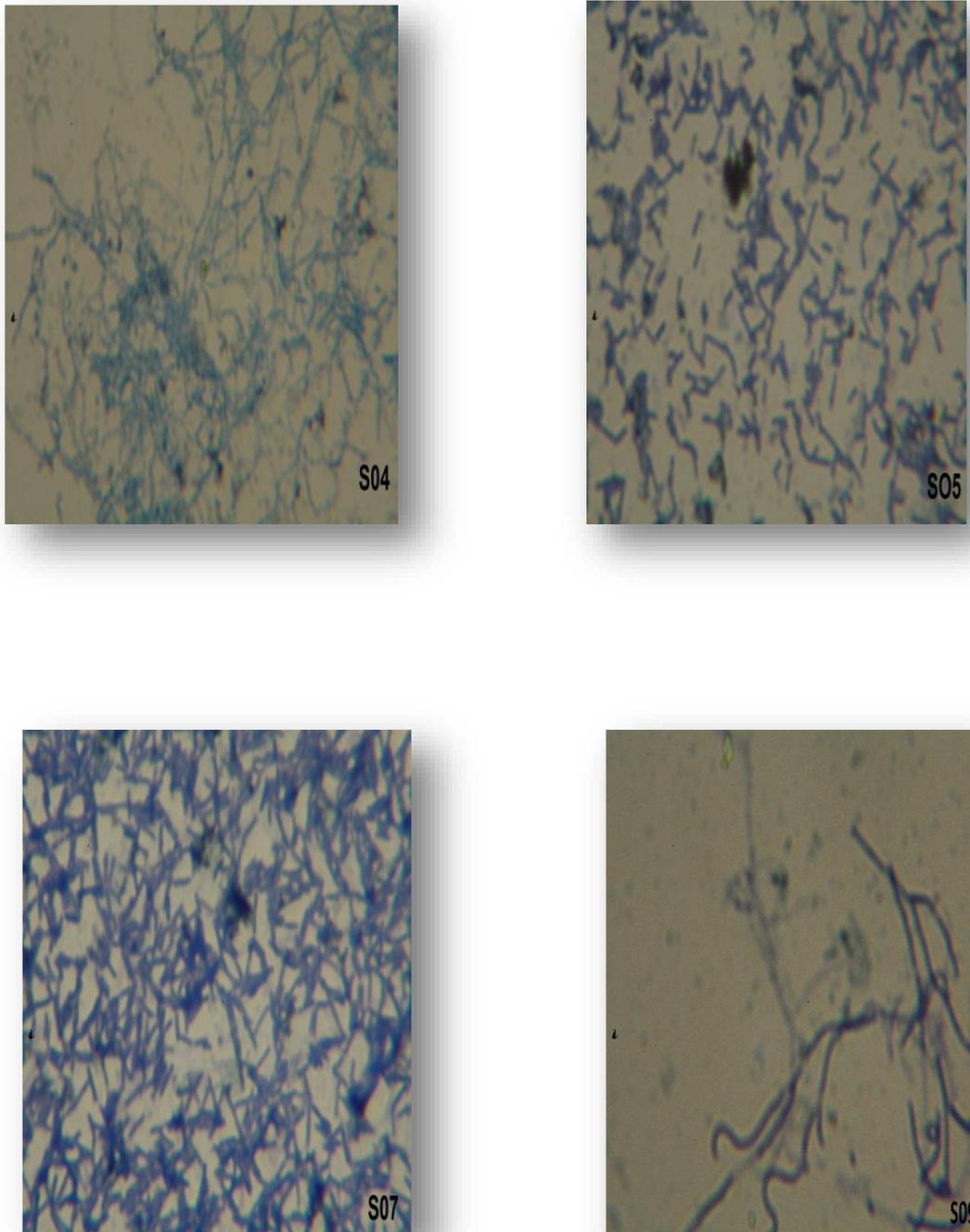


Figure 08 : photographies des souches 04, 05,07 et 09 obtenues par le photomicroscope après coloration simple ($\times 100$).

NB:

- Les souches S04 et S09 se présente sous forme de mycéliums longs filamentés ramifiés dépourvus de septums.
- Les souches S05 et S07 se présentent sous forme de mycéliums ramifiés et fragmentés.

Tableau 02 : Aspect macroscopique des souches pures de *Streptomyces* sp. après vingt et un jours d'incubation

Caractères souches	Taille	Contour	Surface	Aspect	Couleur et brillance	Opacité	Pigmenté(P) ou Sporulé(SP)
S01	Petite	irrégulier	ramifiée (bombée)	mousseuse	beige	opaque	SP
S02	petite	irrégulier	ramifiée (bombée)	tellurique	grise	opaque	SP
S03	moyenne	irrégulier	ramifiée (plate)	mousseuse	blanche	opaque	SP
S04	petite	Irrégulier	ramifiée (bombée)	crémeuse	grise	opaque	SP
S05	très petite	Régulier	ramifiée (bombée)	filamenteuse	beige	opaque	SP+P
S06	petite	régulier	lisse (bombée)	visqueuse	beige (brillante)	semi- transparente	SP
S07	petite	Irrégulier	ramifiée (bombée)	tellurique	beige	opaque	SP+P
S08	petite	Régulier	lisse (bombée)	visqueuse	beige (brillante)	semi- transparente	SP
S09	petite	Irrégulier	ramifiée (bombée)	poudreuse	grise	opaque	SP+P
SO10	petite	Irrégulier	ramifiée (bombée)	crémeuse	grise	opaque	SP+P
S011	petite	Irrégulier	ramifiée (bombée)	poudreuse	grise	opaque	SP
S012	petite	Irrégulier	ramifiée	tellurique	grise	opaque	SP
S014	petite	Régulier	lisse (bombée)	visqueuse	beige	opaque	SP
S015	petite	Irrégulier	ramifiée (plate)	crémeuse	grise	opaque	SP
S017	petite	Régulier	ramifiée (bombée)	poudreuse	grise	opaque	SP+P
S018	petite	Régulier	lisse (bombée)	visqueuse	beige (brillante)	semi- transparente	SP
S021	petite	Irrégulier	lisse (plate)	visqueuse	beige (brillante)	semi- transparente	SP

2- Étude de la solubilisation du phosphate

L'efficacité de la solubilisation du phosphate par les souches de *Streptomyces* dépend, de la souche et le milieu utilisé. La plupart des colonies forment un halo clair dans les milieux PVK, ISP2 et NBRIP signe de solubilisation du phosphate (figure 9). Le milieu PVK permet d'observer un halo transparent autour de chaque colonie, la souche S02 présente le plus grand diamètre (0,6 cm). Quatorze souches forment un halo clair dans le milieu NBRIP où le plus grand diamètre (0,8 cm) est observé autour de la souche S015 (figure 10), Cependant sur le milieu LB aucun halo n'est formé autour des colonies.

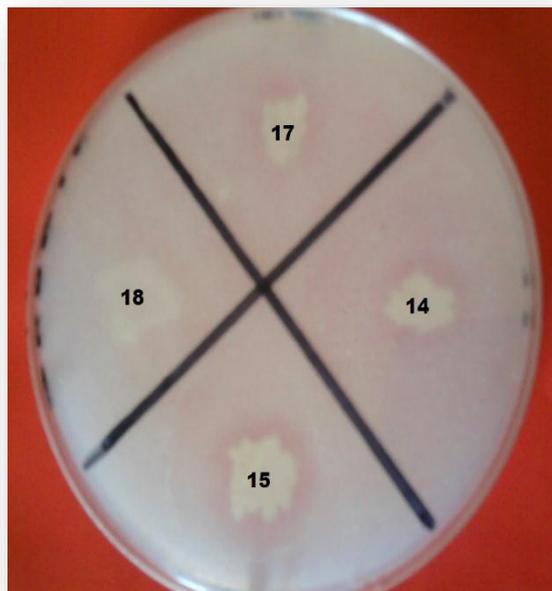


Figure 09 : l'apparition d'un halo clair sur le milieu NBRIP autour des 3 colonies 14, 15 et 17, alors que la colonie 18 ne forme aucun halo.

La plupart des souches de *Streptomyces* étudiées ont pu solubiliser le phosphate. L'étude comparative des trois milieux de culture utilisés pour l'étude de la solubilisation du phosphate par les souches de *Streptomyces* montre que les deux milieux solides PVK et NBRIP préconisés pour ce test donnent des résultats similaires, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Cherif-Silini *et al* ; 2013 contrairement au milieu LB, ce qui est due probablement a sa composition et sa richesse en nutriments (Nautyial, 1999). Il faut signaler que plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de la solubilisation de phosphate, leurs choix dépend des espèces des bactéries étudiées (Banik et Dey, 1982).

Aucun halo de solubilisation n'a été détecté autour des colonies de (S09; S018 ; S021) dans le milieu NBRIP, ainsi que des colonies (S08 ; S09 ; S010 ; S012 ; S015 ; S017 ; S018 ; S021) dans le milieu ISP2, et des colonies (S08 ; S09 ; S017 ; S018 ; S021) dans le milieu PVK, au cours du test de solubilisation effectué sur le milieu solide ce qui peut s'expliquer par la faible diffusion des acides produits par ces bactéries au cours de leur croissance dans le milieu solide ce qui est d'ailleurs confirmé par les travaux de Cherif-Silini *et al.*, en 2013.

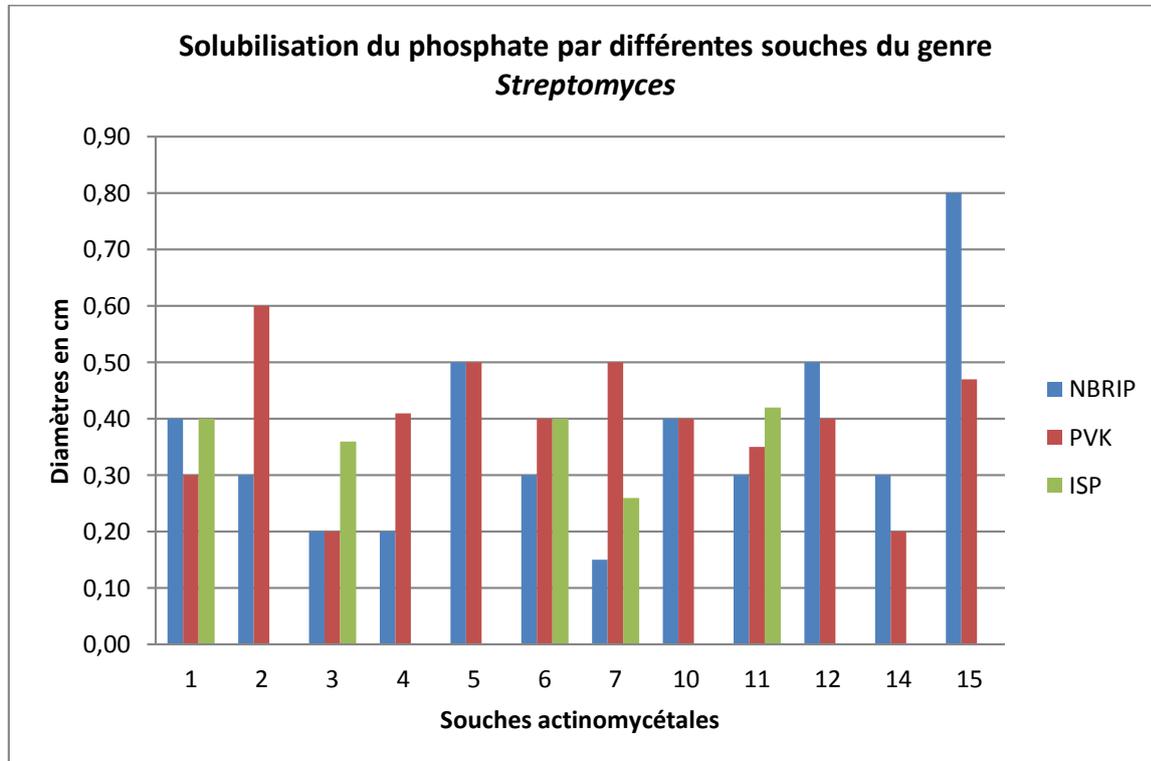


Figure 10: la Solubilisation du phosphate par différentes souches du genre *Streptomyces* Exprimée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies sur les milieux solides: PVK (Pikovskaya) ; NBRIP (National Botanique Research Institute phosphate) ; ISP (International *Streptomyces* Project).

NB : Le milieu LB (Luria-Bertani) n'a pas été représenté parce que la zone de la solubilisation n'était pas observée autour des colonies.

Le processus de solubilisation du phosphate est lié à l'excrétion d'une molécule chélatrice du calcium dans les trois milieux de culture. Ce processus implique vraisemblablement la destruction des liaisons ioniques fortes qui lient le calcium et le phosphate (Hamdali, 2008). cette destruction a lieu lorsque ces bactéries acidifient le milieu par la production des acides organiques (Cherif-Silini *et al* ; 2013).

D'après la figure 10, nous pouvons constater que les souches S02 et S015 présentent le plus grand diamètre d'halo (figure 10), ce qui nous permet de conclure qu'elles sont les plus efficaces dans la solubilisation du phosphate par rapport aux autres souches étudiées. Ce résultat nous a mené à procéder à l'étude phylogénétique des souches S02 et S015.

3-Résultats et discussion de l'étude phylogénétique :

Les séquences des gènes de l'ARN ribosomal 16S des deux souches S02 et S015 fournies par la doctorante GASMI Meriem ont été comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank. Les analyses de similitude (BLAST) effectuées confirment son appartenance au genre *Streptomyces*, dont la souche S02 se rapproche à seulement quinze espèces connues et la souche S015 se rapproche à seulement douze espèces connues (Tableau 04 et tableau 05).

Tableau 04 : Espèces plus proches de la souche 02 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.

Espèces plus proches	Identité en (%)	Numéro d'accension
<i>Streptomycesflaveolus</i> NBRC 3408	99	NR 041206.1
<i>Streptomycesviridochromogenes</i> NBRC 3113	99	NR 112482.1
<i>Streptomycesparadoxus</i> NBRC 14887	99	NR 041167.1
<i>Streptomycesmalachitofuscus</i> NBRC 13059	99	NR 041105.1
<i>Streptomycesalbogriseolus</i> NBRC 3413	99	NR 112487.1
<i>Streptomycesviridodiastaticus</i> NBRC 13106	99	NR 112371.1
<i>Streptomycesatrovirens</i> NBRC 15388	99	NR 112449.1
<i>Streptomycesheliomycini</i> NBRC 15899	99	NR 041197.1
<i>Streptomyces speibonae</i> PK-Blue	99	NR 025212.1
<i>Streptomyces griseoflavus</i> LMG 19344	99	NR 042291.1
<i>Streptomyces griseorubens</i> NBRC 12780	99	NR 041066.1
<i>Streptomyces labedae</i> NBRC 15864	99	NR 041192.1
<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> NBRC 12871	99	NR 112312.1
<i>Streptomyces variabilis</i> NRRL B-3984	99	NR 043840.1
<i>Streptomyces erythrogriseus</i> LMG 19406	99	NR 042294.1

Tableau 05 : Espèces plus proches de la souche S015 et leurs degrés de similitude selon les résultats du BLAST.

Espèces plus proches	Identité en (%)	Numéro d'accension
<i>Streptomyces malachitofuscus</i> NBRC	98	NR 041105.1
<i>Streptomyces mutabilis</i> NRRL ISP-5169	98	NR 044139.1
<i>Streptomyces speibonae</i> PK-Blue	98	NR 025212.1
<i>Streptomyces graminearus</i> LMG 19904	98	NR 042296.1
<i>Streptomyces griseomycini</i> NBRC 12778	98	NR 041065.1
<i>Streptomyces viridiviolaceus</i> NBRC 13359	98	NR 112378.1
<i>Streptomyces fimbriatus</i> NBRC 15411	98	NR 112458.1
<i>Streptomyces labedae</i> NBRC 15864	98	NR 041192.1
<i>Streptomyces werraensis</i> NBRC 13404	98	NR 112390.1
<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> NBRC 12871	98	NR 112312.1
<i>Streptomyces erythrogriseus</i> LMG 19406	98	NR 042294.1
<i>Streptomyces variabilis</i> NRRL B-3984	98	NR 043840.1

Les résultats de l'alignement multiple par le programme CLUSTALX des séquences du gène ARNr16S ont montré que les séquences n'ont pas la même longueur ce qui a nécessité des corrections manuelles avant leurs utilisation par le logiciel MEGA qui utilise l'algorithme d'alignement multiple progressif CLUSTALW.

Il a été démontré que la qualité de l'alignement pouvait avoir un impact sur l'arbre final, aussi important, voire plus, que la méthode de construction employée (Ebihara, 2006).

La préparation d'un alignement de qualité est donc une étape critique de toute analyse phylogénétique.

Les figures 11 et 12 montrent les arbres phylogénétiques obtenus selon la méthode de distances (NJ). Construit d'après l'analyse des séquences de 1493 nucléotides qui codent pour l'ARNr 16S en utilisant le logiciel MEGA version 6. C'est une méthode de distance basée sur

le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux permet de trouver les paires de séquences les plus voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches de chaque étape de regroupement, à l'aide du logiciel MEGA version 6 et en utilisant le test de « Bootstrap » (nombre sur les branches) de 1000 réplifications, c'est-à-dire rééchantillonnage des données 1000 fois ce qui donne enfin le pourcentage obtenu et qui est mentionné au niveau des nœuds de l'arbre. La valeur 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide avec une correction selon le model Kimura à 2 paramètres.

Ces arbres nous ont permis d'évaluer la position taxonomique des souches S02 et S015 parmi les espèces du genre *Streptomyces*.

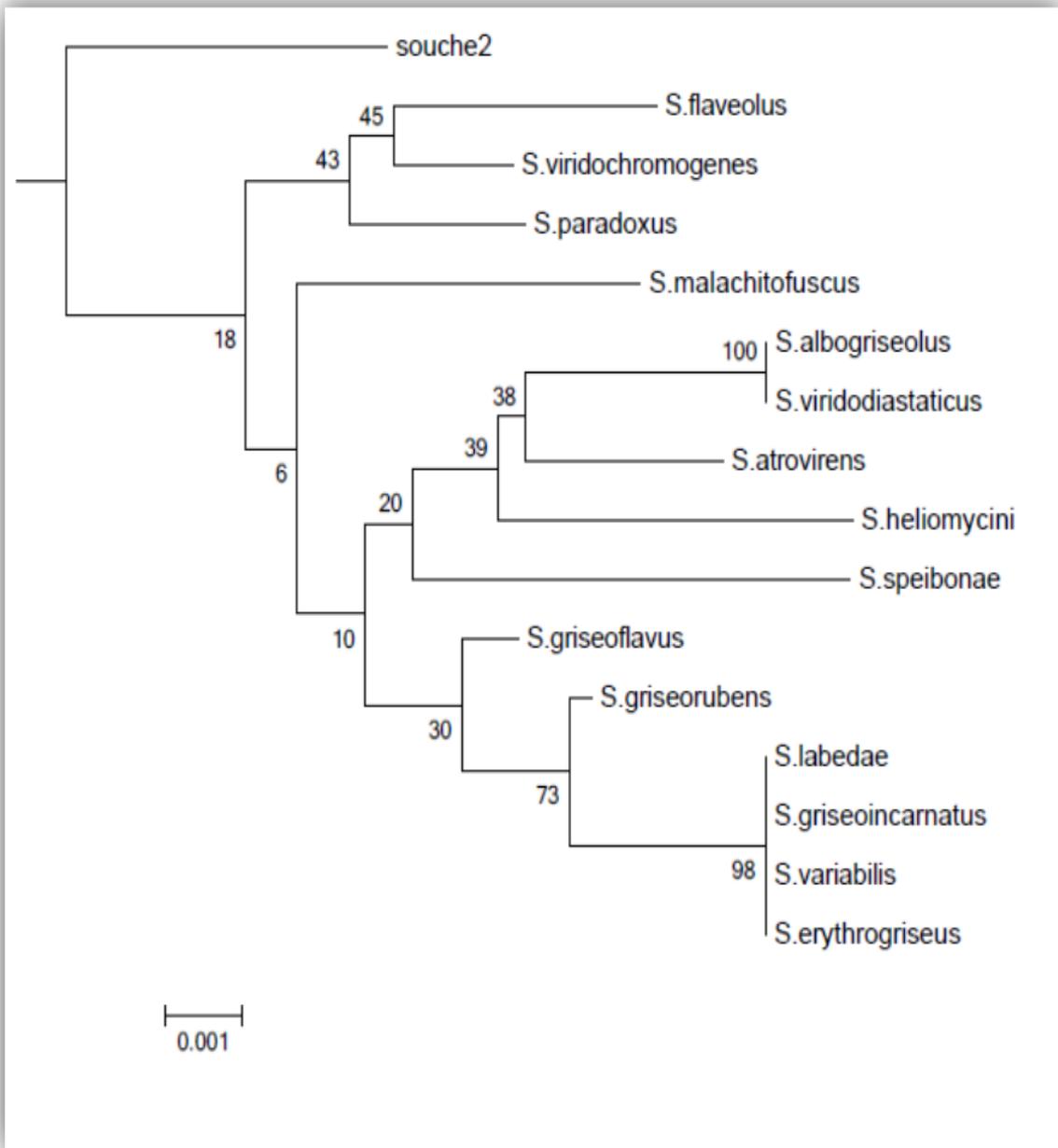


Figure 11: Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S02 parmi les espèces du genre *Streptomyces* (logiciel MEGA 6).

NB :

- la barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.
- les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 Bootstrap.

Selon cet arbre la figure 11, la souche S02 occupe une ligne phylogénétique indépendante des autres espèces avec un pourcentage de Bootstrap très faible (18%), en effet, plus le pourcentage de Bootstrap des souches est élevé plus la probabilité qu'elles appartiennent à la même espèce est élevée.

Selon la nouvelle classification de Labeda *et al.* (2012), les souches de *Streptomyces* dont le pourcentage de Bootstrap est inférieur à 60% sont classées dans des groupes différents, en plus la distance génétique entre les séquences des gènes de la souche 02 et les espèces proches, indiquée dans la matrice de distance (déterminée par le logiciel MEGA) est entre 0,010 et 0,015 (tableau 06).

D'après les constats cités ci-dessus (pourcentage de Bootstrap faible, distance génétique assez importante) nous pouvons conclure que la souche S02 représente une espèce différente des espèces du genre *Streptomyces* mentionner dans le tableau 04 et ce malgré le degré de similitude élevé de (99%).

Tableau 06 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA 6).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>S. variabilis</i>															
2 souche2	0,012														
3 <i>S. albogriseolus</i>	0,010	0,014													
4 <i>S. erythrogriseus</i>	0,000	0,012	0,010												
5 <i>S. griseorubens</i>	0,003	0,012	0,007	0,003											
6 <i>S. flaveolus</i>	0,010	0,015	0,015	0,010	0,008										
7 <i>S. griseoflavus</i>	0,006	0,010	0,010	0,006	0,003	0,005									
8 <i>S. atrovirens</i>	0,016	0,012	0,006	0,016	0,013	0,015	0,010								
9 <i>S. paradoxus</i>	0,010	0,015	0,014	0,010	0,007	0,008	0,007	0,017							
10 <i>S. viridochromogenes</i>	0,009	0,013	0,013	0,009	0,006	0,006	0,006	0,017	0,004						
11 <i>S. malachitofuscus</i>	0,010	0,014	0,017	0,010	0,010	0,011	0,008	0,017	0,010	0,010					
12 <i>S. speibonae</i>	0,011	0,011	0,010	0,011	0,011	0,016	0,011	0,012	0,017	0,017	0,015				
13 <i>S. heliomycini</i>	0,009	0,015	0,009	0,009	0,006	0,011	0,006	0,008	0,012	0,011	0,013	0,013			
14 <i>S. viridodiastaticus</i>	0,010	0,014	0,000	0,010	0,007	0,015	0,010	0,006	0,014	0,013	0,017	0,010	0,009		
15 <i>S. griseoincarnatus</i>	0,000	0,012	0,010	0,000	0,003	0,010	0,006	0,016	0,010	0,009	0,010	0,011	0,009	0,001	
16 <i>S. labedae</i>	0,000	0,012	0,010	0,000	0,003	0,010	0,006	0,016	0,010	0,009	0,010	0,011	0,009	0,001	0,000

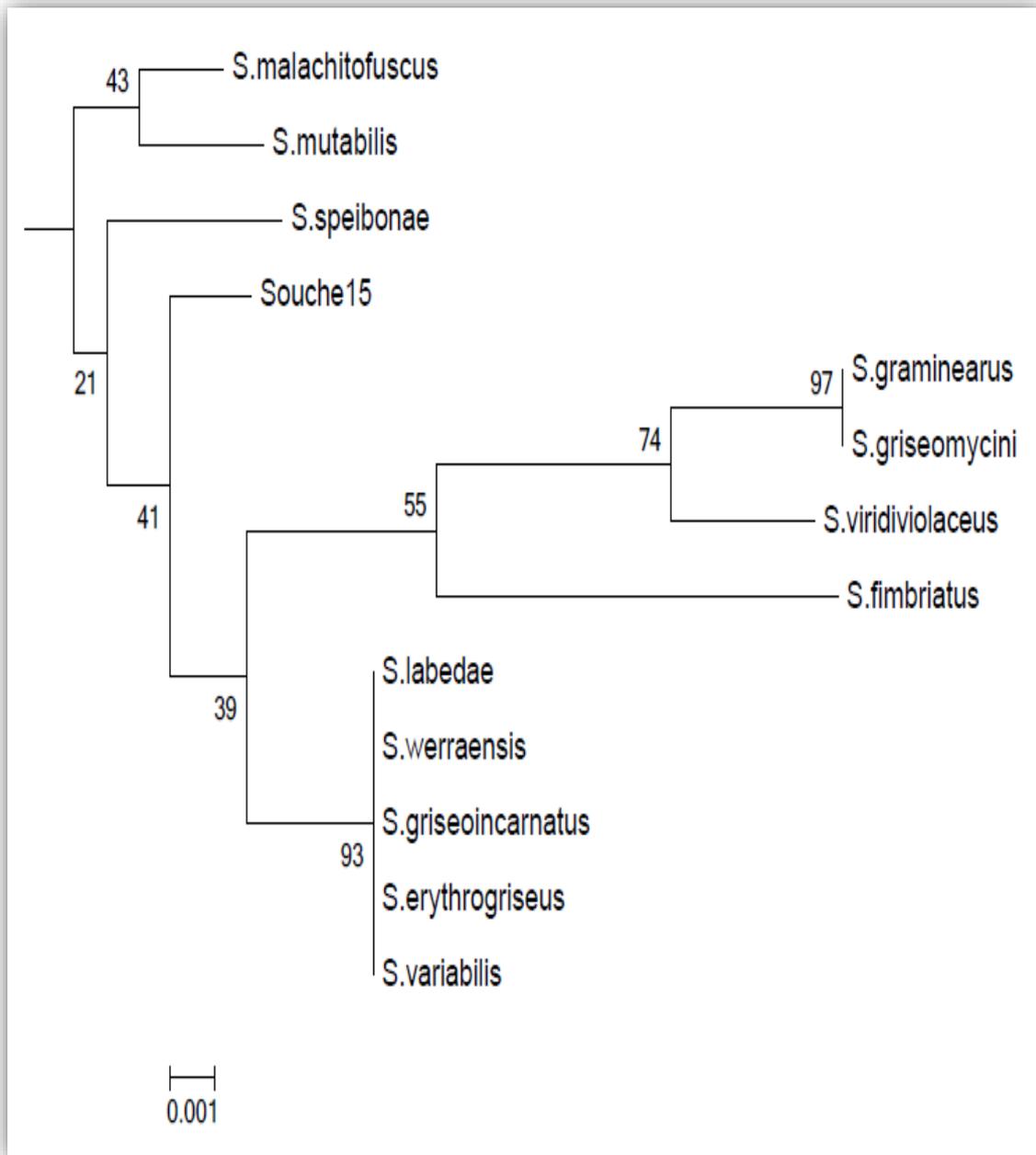


Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S015 parmi les espèces du genre *Streptomyces* (logiciel MEGA 6).

NB :

- la barre représente 1 substitution par 1000 nucléotides.

- les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 Bootstrap.

D'après l'arbre phylogénétique de la figure 12 le même constat peut être fait concernant la souche S015 cette dernière occupe une ligne phylogénétique à part, avec un pourcentage de Bootstrap de 41% et une distance génétique entre 0,013 et 0,018 (Tableau 07), ce qui nous permet de conclure qu'il s'agit probablement d'une nouvelle espèce du genre *Streptomyces* malgré le pourcentage d'identité élevé de 98% avec les espèces du genre (tableau 05).

Tableau 07. Matrice des distances calculée à partir des séquences de l'ARNr 16S (logiciel MEGA6).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Souche S15												
2 <i>S. speibonae</i>	0,013											
3 <i>S. variabilis</i>	0,015	0,012										
4 <i>S. labedae</i>	0,015	0,012	0,000									
5 <i>S. griseoincarnatus</i>	0,015	0,012	0,000	0,000								
6 <i>S. graminearus</i>	0,018	0,022	0,017	0,017	0,017							
7 <i>S. viridiviolaceus</i>	0,017	0,022	0,018	0,018	0,018	0,010						
8 <i>S. malachitofuscus</i>	0,016	0,015	0,010	0,010	0,010	0,012	0,019					
9 <i>S. mutabilis</i>	0,015	0,019	0,016	0,016	0,016	0,017	0,015	0,014				
10 <i>S. griseomycini</i>	0,018	0,022	0,017	0,017	0,017	0,000	0,010	0,012	0,017			
11 <i>S. fimbriatus</i>	0,017	0,022	0,021	0,021	0,021	0,013	0,014	0,016	0,018	0,013		
12 <i>S. werraensis</i>	0,013	0,017	0,013	0,013	0,013	0,013	0,008	0,013	0,013	0,013	0,012	
13 <i>S. erythrogriseus</i>	0,015	0,012	0,000	0,000	0,000	0,017	0,018	0,010	0,016	0,017	0,021	0,013

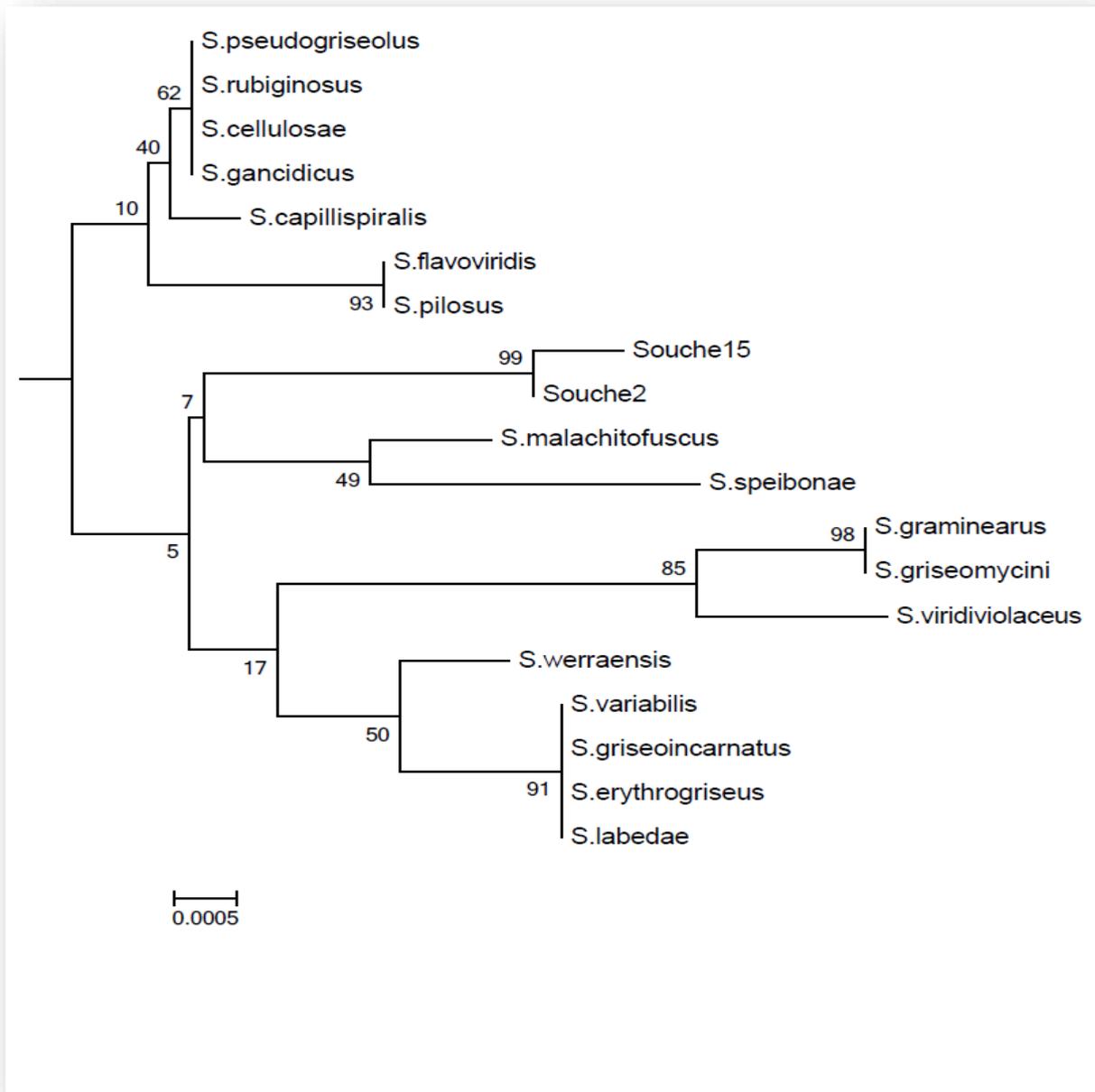


Figure 13 : Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position des deux souches (S02 et S015) parmi les espèces du genre *Streptomyces* (logiciel MEGA 6). NB :

-la barre représente 0,5 substitution par 1000 nucléotides.

-les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 Bootstrap.

Les deux souches S02 et S015 occupent le même clade avec un haut pourcentage de Bootstrap 99 % (figure 13), ce qui implique probablement que ces deux souches représentent la même espèce.

Les souches S02 et S015 sont différentes des espèces citées dans les tableaux 04 et 05 (les espèces les plus proches au niveau de l'arbre phylogénétique), ce qui nous permet de dire qu'il s'agit probablement de nouvelles espèces. En effet, l'origine des souches S02 et S015 laissent supposer que ces espèces sont éventuellement particulières. Cependant, pour confirmer notre hypothèse il faut faire appel à d'autres techniques, utilisées dans de nombreuses études sur les *Streptomyces* qui permettent d'estimer le degré de parenté entre deux souches. Entre autres l'hybridation ADN-ADN, Pour Stackebrandt et Goebel (1994), lorsqu'il existe moins de 97% d'identité entre les séquences des ARNr 16S les souches, appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage d'identité est égal ou supérieur à 97%, l'appartenance ou non de deux souches à une unique espèce doit reposer sur les résultats de l'hybridation ADN-ADN. C'est une méthode qui a montré dans certains cas une bonne corrélation avec l'identification basée sur la morphologie et la physiologie.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité de vingt et une souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* à solubiliser le phosphate et d'élucider la position phylogénétique des souches performantes.

En effet la majorité des souches cultivées en vingt-un jours sur le milieu ISP2, présentent des colonies poudreuses de couleur blanchâtre ou mélangée avec d'autres couleurs de tailles petites régulières ou non, aplaties ou bombées avec une odeur terreuse. Cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien, quelques souches apparaissent pigmentées et sporulées. Nos résultats après coloration confirment que ces souches présentent des filaments ramifiés à coloration de Gram positive.

Nous avons pu au cours de cette étude démontrer que la plupart des souches étudiées ont la capacité de solubiliser le phosphate qui s'est traduite par l'apparition d'halos clairs autour des différentes colonies. D'après certaines études ce processus est lié à la sécrétion des acides organique produits par ces bactéries, qui entraînent la libération du phosphate après destruction complète des liaisons ioniques qui lient le calcium au phosphate. Il s'agit de l'acide gluconique d'après Hamdali, (2008). Dans notre étude, vu le manque de temps et de moyens nous n'avons pas pu déterminer le mécanisme de solubilisation du phosphate par les souches de *Streptomyces* étudiées, ça fera l'objectif de la suite de ce travail dans l'avenir. Les souches étudiées n'ont pas la même capacité de solubiliser le phosphate ce qui explique la différence entre les diamètres mesurés. Les souches S02 et S015 ont engendré les plus grand diamètres donc elles solubilisent plus le phosphate par rapport aux autres bactéries, elles ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique.

Les résultats de l'étude phylogénétique de ces deux souches montrent que ces souches appartiennent au genre *Streptomyces* avec des pourcentages d'identité de 98% et 99%, cependant ces deux dernières occupent un clade avec un fort pourcentage de Bootstrap, indépendant des autres espèces du genre *Streptomyces* dans l'arbre phylogénétique.

Considérant, l'ensemble des caractéristiques des deux souches notamment leurs gènes codant pour l'ARNr 16S, nous pouvons conclure que nous sommes, probablement, en présence de deux nouvelles espèces de *Streptomyces* ou une seule espèce du même genre. Ainsi, pour que cette étude soit complète, un point essentiel devrait être approfondi :

L'identification des souches S02 et S015 par hybridation ADN-ADN avec les espèces proches déterminées durant l'étude des gènes codant l'ARNr 16S, pour confirmer qu'il s'agit bien de deux nouvelles espèces de *Streptomyces* ou qu'il s'agit de deux souches d'une seule espèce.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Alexander M. (1977). Introduction to soil Microbiology. *Krieger Publishing Company, Malabar*: 467-468.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, K W. and Lipmanl, O. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Mol. Biol. Evol* 215: 403-410.
- Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. and Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* 5 (2) : 109-114.
- Andreyuk K . I., Halagurova H.V. and Myatilkova K.A. (1990). Streptomycetes of standy biotopes at various stages of natural overgrowth. *Actinomycetes.* 1(3):75-78.
- Andrade, G., Linderman, R. G. and Bethlenfalvay, G. J. (1998). Bacterial association with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant and soil.* 202: 79-87.
- Ara. I, Bukhari. N. A, Wijayanti. D. R. and Bakir. M. A. (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 11(16). Pp: 3849-3857.
- Arcand, M. M. and Schneider, K.D. (2006). Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 78: 791-807.

B

- Bais, H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. and Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Banik S. and Dey BK. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 69: 353-364. DOI 10.1007/BF02372456.
- Bell-Perkins, L. J. and Lynch J.M. (2002). Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In* G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Benson O. A., Boguski M. S., Lipman O. J. and Ostell J. (1997). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 25:16.
- Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300.

- Berthelin J., Leyval C., Laheurte F. and De Giudici P. (1991). Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization. *in* plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects. Éditeurs : Keel, C., Koller, B., Défago, G. IOBC-WPRS Bulletin. XIV (8): 359 - 538.
- Bolan N. S., Elliott J., Gregg P.E.H. and Weil S. (1997). Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biology and fertility of soils*. 24(2): 169-174.
- Bonmatin J.M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M.E. and Bengsch E.R. (2003). ALC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.* P 75: 2027-33.
- Bouizgarne B., Lanoot B., Loqman S., Sproer C., Klenk H.P., Swings J. and Ouhdouch Y. (2009). *Streptomyces marokkonensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. *Inter J Syst Evol Microbiol.* 59: 2857-2863.
- Brimecombe M. J., De Leij F.A., and Lynch J.M. (2007). Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. *In* R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. New York.
- Bushell M.E. (1988). Growth, product formation and fermentation technology. *Actinomycetes in biotechnology*. 185-217.

C

- Camara I., Cescas M.P. Karam A. et Parent L.E. (1987). Chimie du phosphore dans quelques sols de rizière de l'Afrique de l'ouest. *Naturaliste Canadien*, 114 : 141-149.
- Chabot R., Antoun H. and Cescas, M. P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil* 184, 311-321.
- Chater K. F. and Merrick M.J. (1979). *Streptomyces*, *in*: *Developmental Biology of prokaryotes*. Crawford, D. L. J. M. Lynch, J. M. Whipps, M. A. Ousley. 1993. Isolation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *App. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.
- Cherif-Silini H., Silini A., Ghoul M., Yahiaoui B. et Arif F. (2013). Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research*. Vol.7, n° 37, p.4571.
- Cline G. R., Powell P. E., Szanizlo P. J. and Reid C. P. P. (1982). Comparison of the abilities of hydroxyamic, synthetic, and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 1158-1164.
- Coombs J.T. and Franco C.M. M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from

surface sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol.* 69(9): 5603-5608.

D

- Daza A., Martin J.F., Dominguez A. and Gil J. A. (1989). Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J. Gen. Microbiol.* 135, 9, 2483-2491.
- Dhanasekaran D., Selvamani S., Panneerselvam A. and Thajuddin N. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary, Annagkoil, Tamil Nadu. *Afr J Biotechnol.* 8 (17): 4159-4162.
- Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C. (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82(3): 85-102.
- Drouin J.-F. (1996). Analyse d'image en biotechnologie. Quantification de la morphologie de micro-organismes filamenteux au cours de fermentations et suivi de la croissance de cellules animales sur microporteurs au cours de cultures. Thèse de doctorat, ENSAIA INPL, Nancy, France.

E

- Ebihara H., Takada A., Kobasa D. *et al.* (2006). Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog.* 2 (7): 73.
- Efron B. and Tibshirani R. J. (1993). An introduction to the Bootstrap. Chapman and Hall, New York. p: 178-201.

F

- Frey-Klett P., Churin J., Pierrat J. and Garbaye J. (1999). Dose effect in the dual inoculation of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1555 - 1562.
- Frommel M. I., Nowak J. and Lazarovits G. (1991). Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928 - 936.

G

- Gerretsen F.C. (1948). The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant and Soil.* 1: 51-81.
- Giroux M., Cantin J., Rivest M. et Tremblay, G. (2002). L'évolution des teneurs en phosphore dans les sols selon leur fertilité, leur richesse en phosphore et les types de sol. Colloque sur le phosphore : une gestion éclairée. Drummonville, 6 Novembre 2002.

- Goldstein A. H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphate: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: 51 - 57.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* 37: 189-216.
- Gray E. J., and Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395- 412.

H

- Haas D. and Defago G. (2005). Biological control of soil-born pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* P 3: 307-319.
- Hamdali H. (2008). Criblage et caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales solubilisatrices du phosphate naturel isolées à partir des gisements. Thèse de doctorat en Sciences biologiques. Microbiologie. Faculté des sciences semlellia, Université de Marrakach.
- Hasavada S. H., Thumar J. T. and Singh S. P. (2006). Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science.* 91(10): 1393-1397.
- Haynes R.J., and R.S. Swift. (1990). Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *J. Soil Sci.* 41: 73–83.
- Hedley M. J., Hussin A. and Bolan N. S. (1990). New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agricultura in Asia and Oceania. Proceedings of a symposium, 6-10 March 1989.: pp. 125-142.
- Hiltne, L. (1904). Uber neuere Erfahrung en und Probleme auf dem Gebiet der Boden baksteriologie und unter besonderer Beriicksichtigung der Griindiingung und Brache. - Arb. Dtsch .Landwirt. Ges. 98: 59-78.
- Hinsinger P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant and soil.* 237: 173-195.
- Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A. and Oliver S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 272-277.
- Hodgson D.A. (2000). Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42:47-238.
- Hopwood D.A. (1999) Forty years of genetic with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* (review article). *Microbiology.* 145: 2183-2202.
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. and Moon S.S. (2001). Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenyl acetate from *Streptomyces*

humidus. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3730-3745.

I

- Illmer, P. and Schinner F. (1992). Solubilisation of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.

K

- Katsifas E. A., Gianoutsou E.P. and Karagouni A.D. (1999) Diversity of Streptomyces among specific greek terrestrial ecosystems. *Let App Microbiol.* 29: 48-51.

- Kendrick K.E. and Ensign J.C. (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.* 155 (1) : 357-366.

- Kennedy A. C., and de Luna L.Z. (2004). Rhizospher, p. 399-409. In D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol03. Columbia University, USA.

- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. and Hopwood D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK* : 613.

- Kim K. Y., Jordan D. and Krishnan H. B. (1997). *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilise hydroxyapatite. *FEMS Microbiology letters.* 153: 273-277.

- Kimura M. (1980). A Simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.

- Kluepfel D. E. (1993). The behaviour and tracking of bacteria in the rhizosphère. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 441 - 472.

- Korn-Wendisch F. and Kutzner H. J. (1992). The family *Streptomycetaceae*, dans: Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W et Schleifer K. H. *The Prokaryotes. Springer Edition New York*: 921-995.

- Kucey R. M. N., Jansen H. H. and Leggett M. E. (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199-223.

- Kumar V., Punia S. S., Lakshminarayana K. and Narula N. (1999). Effect of phosphate solubilising analogue resistant mutants of *Azotobacter chroococcum* on sorghum. *Ind. J. Agric. Sci.* 69: 198-200.

L

- Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M. and Swings J. *et al.* (2012) Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 101:73-104.

- Lacey J. (1997) Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med.* 4: 113-121.
- Lakshmipathy D. T. and Kannabiran K. (2009). A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. isolated from Saltpan environment. *Am J Infect Dis.* 5 (3): 207-213.
- Lechevalier M.P. (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry, *In* : Goodfellows M.P., Williams S.T. et Mordarski M. Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press Edition California*: 327-358.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales, *In* : Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A. et Schlegel H.G. The prokaryote (volume 2). *Springer-Verlag Edition Berlin* : 1915-1922.
- Legett M. E., Gleddie S. C. and Holloway G. (2001). Phosphate solubilizing microorganisms and their use. *In* plant nutrition acquisition : New perspectives (Eds N. Ae, J. Arihara K. Okada and Srinivasan A.), pp.299-318, Springer-Verlag, Tokyo.
- Lemanceau P. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie.* 12: 413-437.
- Lindsay W. L. (1979). Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and Sons, N. Y.
- Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A. and King R.R. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease.* 81(8): 836-846.
- Lugtenberg B. and F. Kamilova. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.

M

- Madigan M. T et Martinko J.M. (2007). Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11e edition : 331-423, 686-718.
- Mariat F. et Sebald M. (1990). Les actinomycetes, dans : Leminor L. Bacteriologie medicale. *Médecine Science Flammarion Edition France*: 54-62.
- Marschner P., Crowley D. E. and Sattelmacher B. (1997). Root colonization and iron nutritional status of a *Pseudomonas fluorescens* in different plant species. *Plant and soil.* 196: 311-316.
- Milagres A. M. F., Machuca A., and Napoleao D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods.* 37: 1-6.

N

- Narsian V. and Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32: 559-565.

- Nautiyal C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol.Lett.* 170(1) : 265–270. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.

- Novella I.S. Barbes C. and Sanchez J. (1992). Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 38 (8) : 769-773.

O

- Oehl F., Oberson A., Fliessbach M. P. A. and Frossard H. R. E. (2001). Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. *Biol. Fertil. Soils.* 34: 31-41.

- Okon Y., Cakmakci L., Nur I. and Chet I., (1980). Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: A note. *Microb. Ecol.* 6: 277-280.

- Oskay M. (2009). Antifungal and antibacterial compound from *Streptomyces* strains. *Afr J Biotechnol.* 8 (13): 3007-3017.

P

- Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22 (3) : 189-259.

- Pelmont, J. (1993). Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble: 899 pages.

- Peypoux F. Bonmatin J. M. and Wallach J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* P 51(5) 553-563.

- Piano S. Neyrotti V. Migheli Q. and Gullino M.L. (1997). Biocontrol capability of Press, New York.

- Pikovskaya R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 7:362–370.

- Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci.* 4(5): 330-337.

R

- Ranjard L., and Richaum A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbio.* 152: 707-716.

- Richardson A. E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28,897-906.

S

- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing

- phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4,406-25.
- Samac D., Willert M., McBride M. and Kinkel L. (2003). Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl Soil Ecol.* 22: 55-66.
 - Sandhya V., Ali S.K.Z., Grover M., Reddy G. and Venkateswarlu B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 17-26.
 - Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et strategie de selection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol.* 12: 13.
 - Sayer J. A., Raggett S. L. and Daad G. M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development in mutagenesis. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 354-364.
 - Shirling E. B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16(3): 313-340.
 - Shirling E. B. and Gottlieb D. (1968a). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18: 69-189.
 - Shirling E. B. and Gottlieb D. (1968b). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18: 279-392.
 - Shirling E. B. and Gottlieb D. (1969). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int J Syst Bacteriol.* 19: 391-512.
 - Shirling E. B. and Gottlieb D. (1972). Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22: 265-394.
 - Singer Michael J. and Donald N. Munns. (2006). *Soils: an Introduction*. Pearson Education Inc. New Jersey.
 - Singh C. P. and Amberger A. (1998). Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Biorource Technology.* 68: 13-16.
 - Sneath P. H. A. (1957). The application of computers to taxonomy. *Gen. Microbiol.* 17: 201-226.
 - Sperber J. I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 782-788.
 - Stackebrandt E., Liesack W., Webb R. and Witt D. (1991a). Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. *Actinomycetologia.* 5: 38-44.

- Stackebrandt E., Witt D., Kemmerling C., Kroppenstedt R. and Liesack W. (1991b). Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 19: 391-512.
- Stackebrandt E. and Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt E., Rainey F. A. and Ward-Rainey N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 479- 491.
- Stackebrandt E. and Schumann P. (2006). Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. Prokaryotes. *Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA*: 297-321.
- Sundara B., Natarajan V. and Hari K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research.* 77: 43-49.
- Swaby, R. J. and Fedel F. (1973). Microbial production of sulphate and sulphide in some Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 5: 773-781.
- Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P. and Zuberer D. (2005). Principles and applications of soil microbiology. Pearson Education Inc. New Jersey.

T

- Tardieux-Roche A. (1966a). Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.* 17 (4) : 403-471.
- Tamura K., Dudley J., Nei M and Kumra S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genitcis Aalysis (MEAGA) souftware version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24: 1596-1599.
- Tendolkar U.M., Varaiya A., Ahuja A.S., Motwane S.A. and Gogate A. S. (1998). Corneal ulcer caused by *Nocardia asteroides* in a patient with leprosy. *J. Clin. Bacteriol.* 36 (4), 1154-1156.
- Thompson, J.D., Higgins D. G., and Gibson T. J (1994).CLUSTALW: improving the sensivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, poitionspecifie gap penalties and wehgt matrice choice. *Nuleie Aeids Res.* 22: 4673-4680.
- Tisdale S. L., Nelson W. L. and Beaton J. D. (1985). Soil and fertlizer phosphorus. *In soil fertility and fertilizers*, 4e ed. Chapitre 8:189-248.
- Toro M., Azcon R. and Herrera, R. (1996). Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and

nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 21(1-2): 23-29.

U

- Uchida A. and Seino A. (1997) Intra and inter generic relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycane examined in glycolate test. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 182-190.

V

- Vazquez P., Holguin G., Puente M. E., Lopez-Cortes A. and Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*. 30: 460-468.

- Vercesi A., Volpi E. and Locci R. (1990). Preliminary investigations of the *Streptomyces* flora of grapevine berries. *Actinomycetes* 1(1): 1-2.

- Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. P 255: 571-586.

- Vezina L., Carrier D., Giroux M. et Rompré M. (2000). Proposition de regroupement des sols du Québec selon leur capacité de fixation du phosphore en relation avec leurs caractéristiques pédologiques. *Agrosol*. 11 (1): 15-39.

- Violante A., Rao M. A., De Chiara A. and Gianfreda, L. (1996). Sorption of phosphate and oxalate by synthetic aluminium hydroxysulphate complex. *Eur. J. Soil Sci.* 47 : 241 – 247.

W

- Walker T. S., Bais H.P., Grotewold E. and J.M. Vivanco. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44-5.

- Waksman S. A. and Henrici A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 46: 337-341.

- Waksman S.A. (1963). Ma vie avec les microbes. *Albin Michel Edition USA*: 280.

- Webb J. R., Malarino A. P. and Blakmer A. M. (1992). Effect of residual and annually applied phosphorus on soil test values and yield of corn and soybean. *J. Proc. Agric.* 5 (1): 148-152.

- Weller D.M, Raajmakers J.M, Gardener B.B. and Thomashow L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phythopathol.* P 40: 309-348.

- Whipps J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizospher. *G. Exp. Bot.* P52:487-511.

X

- Xu L.H., Li Q.R. and Jiang C.L. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol.* 62: 244-248.

Z

- Zaitlin B., Watson S., Dixon J. and Steel D. (2003) Actinomyetes in Elbow River Basin Alberta Canada. *Water Qual Res J Canada.* 38(1): 115-125.

- Zhang T. Q., MacKenzie A. F. and Liang B. C. (1995). Long-term changes in Mehlich-3 extratable P and K in a sandy clay loam soil under continuous corn (*Zea mays* L.). *Can. J. Soil Sci.* 75: 361-367.

Annexes

Annexe 01**Composition des
milieux de culture**

Milieu ISP2

- Extrait de levure.....4g
- Extrait de Malt.....10g
- D-Glucose.....4g
- Carbonate de calcium.....2g
- Agar.....20g
- Eau distillée.....1l
- pH.....7

Milieu PVK

- Glucose.....10g
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$5g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$0.5g
- NaCl.....0.2g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.1g
- KCl.....0.2g
- Extrait de levure.....0.5g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0.002g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.002g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1l
- pH.....7

Milieu NBRIP

- Glucose.....20g
- Ca₃ (PO₄)₂.....5g
- (NH₄)₂SO₄.....0.1g
- MgSO₄-7H₂O.....0.25g
- MgCl₂-6H₂O.....10g
- KCl.....0.2g
- Extrait de levure.....0.1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1l
- pH.....7
-

Milieu LB

- Glucose.....10g
- Ca₃ (PO₄)₂.....5g
- NaCl.....5g
- Extrait de levure.....5g
- Tryptone.....10g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1l
- pH.....7

Annexe 02Les séquences des
souches étudiées

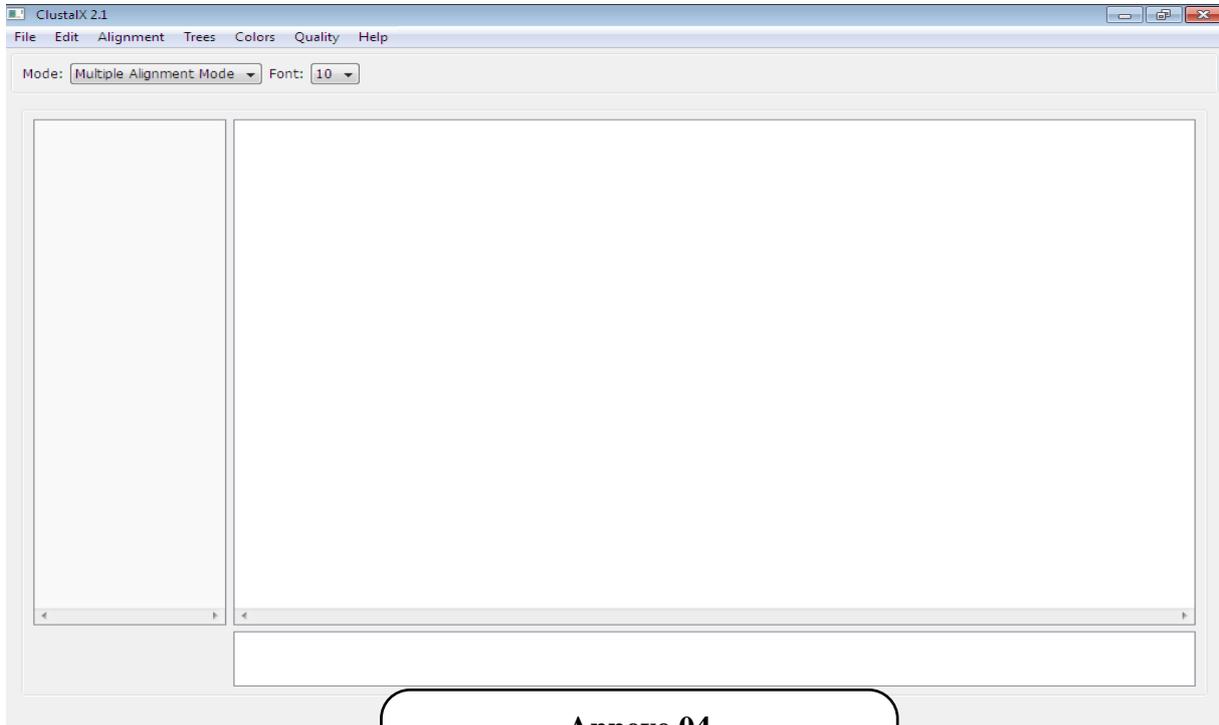
>Souche2

TTAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACCTT
 CGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAA
 CGGGGTCTAATACCGGATATTGAACTGCTTGGGCATCCAGGCGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCC
 GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCCG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
 CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAA
 GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTC
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGT
 CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
 ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
 AACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCCG
 TGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCG
 GAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACT
 CACGGGAGACCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGC
 TGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAA
 CCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

>Souche15

AAGTCGTAACAAGGTAGCCCGTAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA
 GTCGAACGATGAACCACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCAC
 TCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATTGAACTGCTTGGGCATCCAGGCGGTTTCGAAAGCTC
 CGGCGGTGACAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC
 CGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
 ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
 AGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATA
 CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAG
 CCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGG
 GCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCAAGGCTTGACATACCCGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGG
 CCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGACGACGTCAAGTCAT
 CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGC
 GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATC
 GCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTA
 ACACCCCGAAGGCGGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGGACTGGCGATTGGGACGA
 AAGTCGTAACAAGGTAGCCCGTAG

Annexe 03
Fenêtre du programme
CLUSTALX

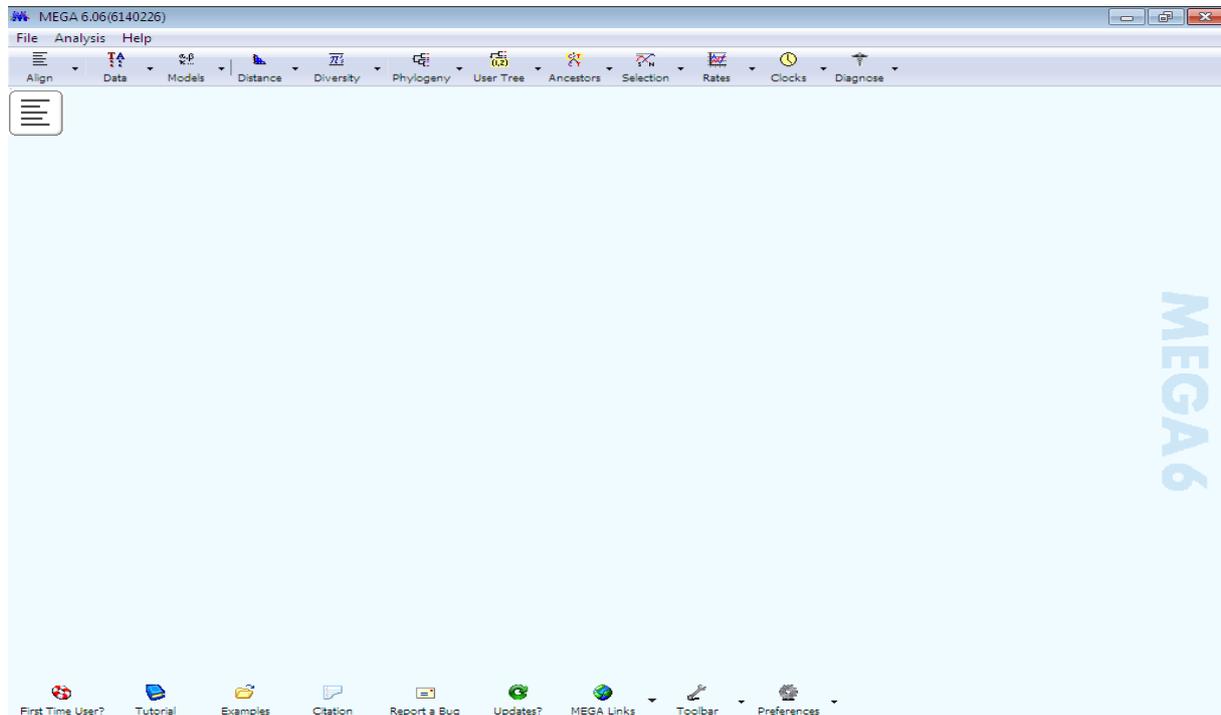


Annexe 04
Résultats de l'alignement multiple
de séquences par CLUSTALX



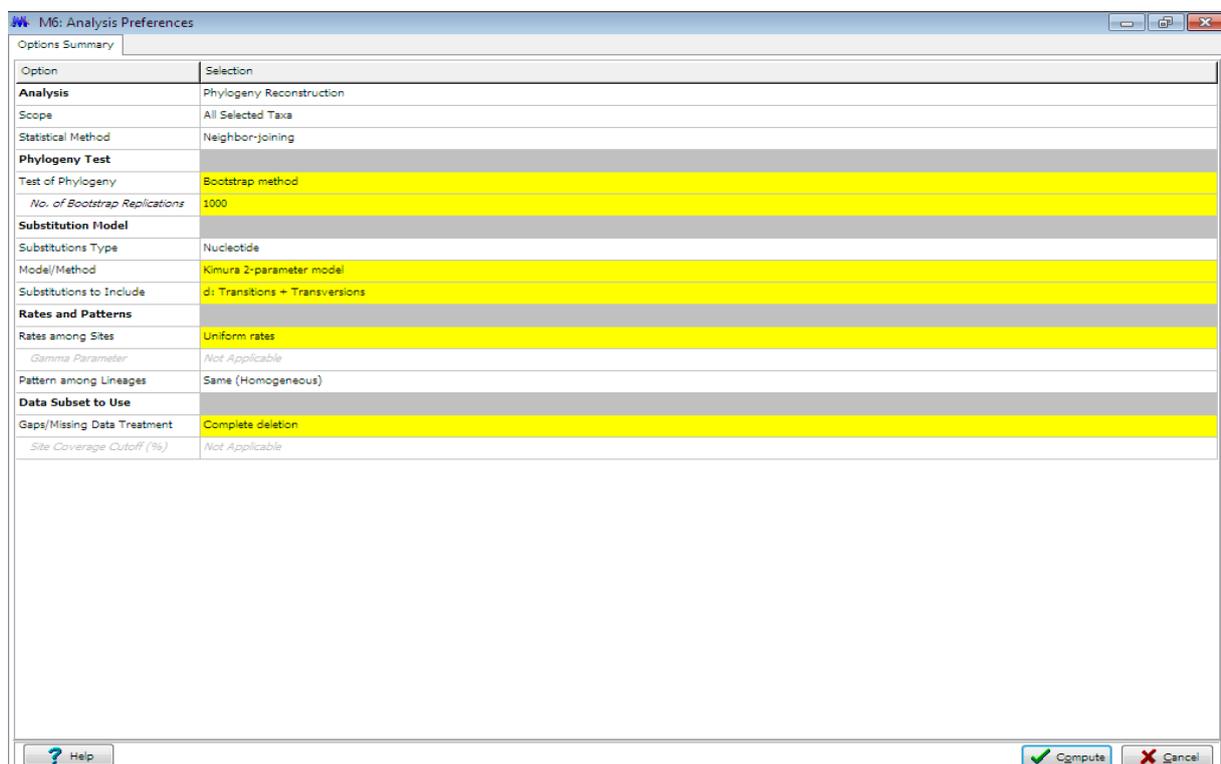
Annexe 05

Fenêtre de programme MEGA6



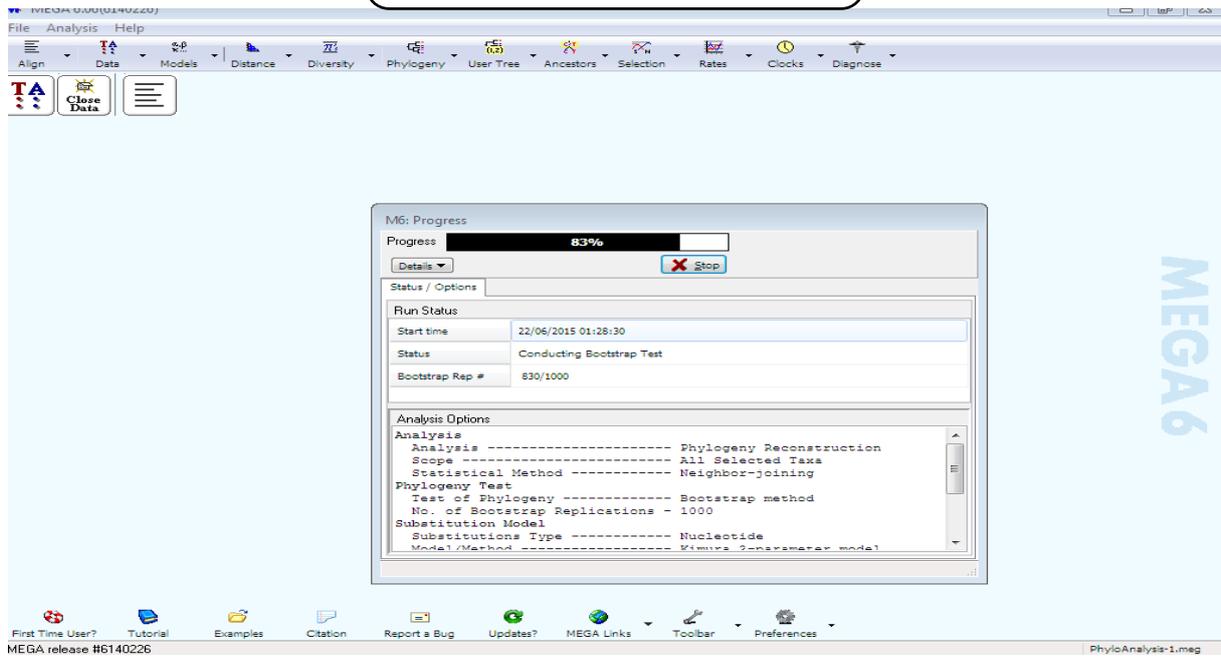
Annexe 06

Phylogénie



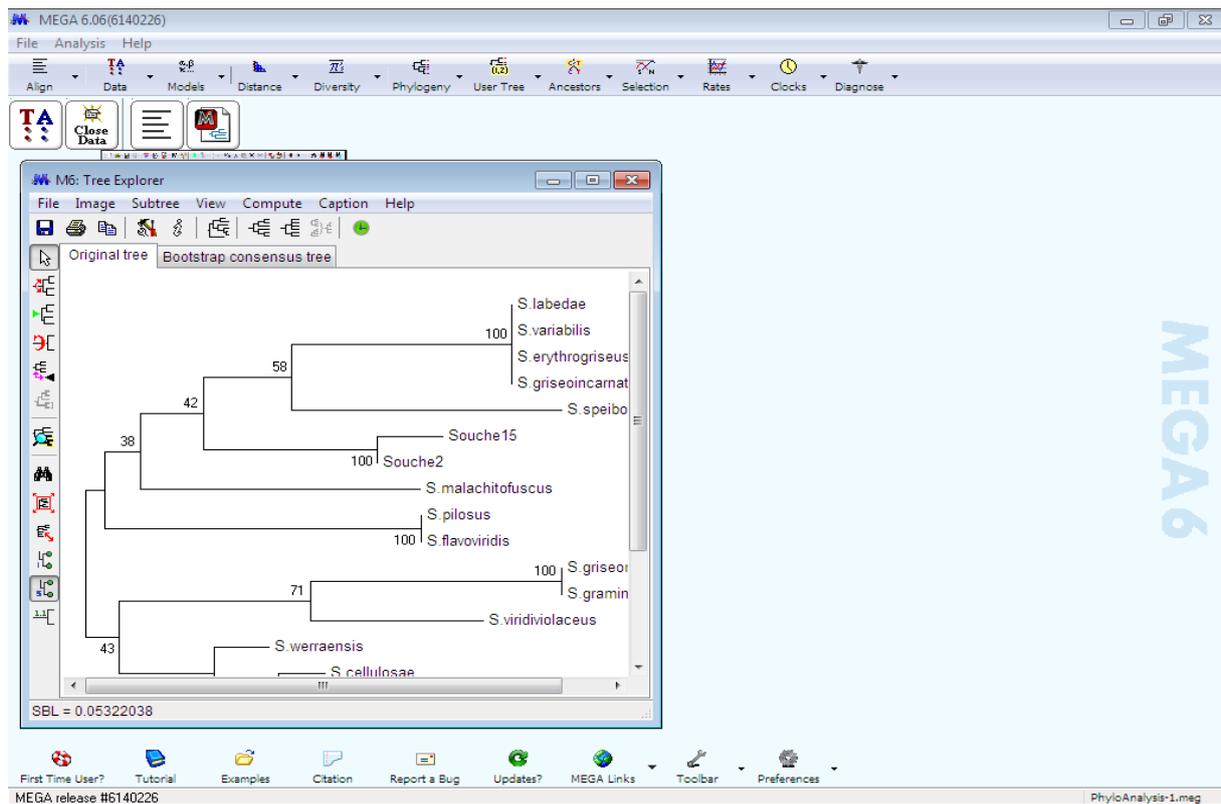
Annexe 07

Progrès d'évolution et d'analyse



Annexe 08

Construction de l'arbre phylogénétique



BIDI Abir

OUAMEKH Meryem

Date de soutenance : 30/06/2015

Nature du diplôme : Master en microbiologie générale et biologie moléculaire des micro-organismes

Thème : Criblage de souches d'actinomycètes solubilisant le phosphate
Identification moléculaire de deux souches du genre *Streptomyces*

Résumé : Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente (70 à 90%) des actinomycètes. L'importance de leur présence dans le sol est en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables tels que le phosphate insoluble afin de le rendre disponible pour la croissance des plantes dans le cadre du développement de l'agriculture. Vingt et une souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* ont été criblées pour leur aptitude à solubiliser le phosphate sur quatre milieux de culture différents. L'étude des caractères morphologiques après observation macroscopique: a montré que la majorité des colonies sont petites, régulière ou non, aplaties ou bombées, pigmentées, sporulées et poudreuses avec une odeur terreuse. Après coloration simple et coloration de Gram l'observation microscopique a montré que ces souches sont formées de filaments, ramifiés et de coloration Gram positive. La plupart des souches sont capables de solubiliser le phosphate mais à des degrés différents. Les souches S02 et S015 ont montré les pouvoirs de solubilisation (0,6 et 0,8 cm de diamètre de solubilisation) les plus importants elles ont été sélectionnées. L'analyse phylogénétique des séquences de l'ARNr 16S de ces dernières a révélé leur appartenance au genre *Streptomyces* avec de degrés de similitude de 0,99% et 0,98 % pour les souches S02 et S015 respectivement. Sur l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ARN 16S les souches S02 et S015 occupent une ligne phylogénétique indépendante avec de faibles pourcentages de Bootstrap (S02 :18% et S015: 41%), ce qui nous permet de dire qu'il s'agit probablement de deux nouvelles espèces du genre *Streptomyces*. Cette confirmation est d'ailleurs consolidée par les valeurs importantes des distances séparant les souches S02 et S015 des autres espèces du genre. Par ailleurs ces deux souches occupent le même clade avec un haut pourcentage de Bootstrap 99 % ce qui nous permet d'affirmer que ces deux souches représentent la même espèce.

Mots clés : *Streptomyces*, Solubilisation du phosphate, PGPR, Phylogénie

Membres de jury :

Président: BENHIZIA Y.

Pr. UFM Constantine

Encadreur: KITOUNI M.

Pr. UFM Constantine

Examineur: BOUDMAGH A.

MCA. UFM Constantine

Année Universitaire 2014/2015