



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 عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie générale

قسم : الميكروبيولوجيا العامة

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 :**

---

**Isolement d'actinomycètes à partir de deux échantillons de sol et la mise en évidence de quelques activités enzymatiques.**

---

Présenté et soutenu par :

Le : 01/07/2018

SEGOUAT Amira

BOUKHALFA Rayhan Katar Ennada

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme Oulmi-L. Maître de conférences B (UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme Reghioa -S. Maître-assistante A (UFM Constantine).

**Examineurs :** Melle Abdlaziz-W. Maître-assistante A (UFM Constantine).

*Année universitaire*  
*2017 – 2018*

# Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce travail :

A mon très cher père Achour mon exemple dans cette vie, qui m'a toujours encouragé et qui m'a soutenu en toutes circonstances, à qui je dois toutes mes réussites et tous mes succès.

A ma très chère mère Sihem, la femme la plus chère au monde celle qui m'as toujours montré affection, et qui m'a toujours encouragé durant mes études. Que dieu vous protège et vous donne une longue vie.

A ma belle sœur Kawter, à mes chères frères Ahsen, Samir et mon petit cœur Abd Arrahmen.

A mon cher fiancé Ahmed.

A toutes chères amies : Manel, Sarra, Halla, Manel, Kenza et chaima.

A tout membre de ma famille surtout mes chères tantes Samia et Fatiha et ma grande mère adorable.

A tous mes enseignants de département de Microbiologie et particulièrement mon encadreur Mme Reghioua.S.

Amira.

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mon grand père Saïd ,Ma grand mère Om El Khair ,le simple fait de leurs présences me donne la force d'avancer*

*Mes petites sœurs Dorsaf & Sahar ,les bijoux de la famille*

*Mes frères Ahmed & Acil qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mes tontes Samira ,Ahlem,Achouak*

*Toute la famille ,toute personne proche à mon cœur je vous dédie ce travail ,sans vous, sans votre aide ça n'aurait jamais aboutie, quoi que je fasse vous êtes la pour moi ,soyez fière de moi ,que dieu vous bénisse vous protège et vous garde.*

**Rayhan Katar Ennada.**

# *Remerciements*

*Nous remercions en premier Dieu, ALLAH qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Nous remercions particulièrement et très sincèrement notre encadreur Mme Reghioa. S pour l'aide et le temps qu'elle nous a consacré, aussi pour sa patience.*

*Nous remercions les responsables membres de jury Mme Oulmi. L et Melle Abdlaziz. W d'avoir accepté de discuter et juger notre travail.*

*Nous remercions les ingénieurs de laboratoire Melle Fergani. M et Mme Laila pou leurs aide durant notre travail*

*Nous tenons d'autre part à remercier tous nos enseignants de la faculté de la Biologie pour leur dévouement et leur assistance tout au long de nos études universitaire*

*Enfin, nous ne pouvons achever ce mémoire sans remercier tous ce qu'ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

## Tables des matières

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Liste des figures.....      | i   |
| Liste des tableaux.....     | ii  |
| Liste des abréviations..... | iii |
| Résumé                      |     |
| Abstract                    |     |
| المخلص                      |     |
| Introduction.....           | 1   |

## Synthèse bibliographique

|  |   |
|--|---|
| 1. Les actinomycètes .....                                     | 2 |
| 1.1. Généralités.....  | 2 |
| 1.2. Caractères cultureux.....                                 | 2 |
| 1.3. Caractère morphologique.....                              | 2 |
| 1.4. Taxonomie et critères de classification.....              | 3 |
| 1.4.1. Critères de classification.....                         | 3 |
| 1.4.2. Taxonomie.....  | 5 |
| 1.5. Ecologie et distribution dans la nature.....              | 7 |
| 1.5.1. Le sol.....   | 7 |
| 1.5.2. L'eau.....  | 7 |
| 1.5.3. L'air.....  | 7 |
| 1.5.4. Les composts et les végétaux.....                       | 8 |
| 1.6. Facteurs influençant la croissance des actinomycètes..... | 8 |
| 1.6.1 L'oxygène.....   | 8 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.6.2 pH.....                                     | 8         |
| 1.6.3 Température.....                            | 8         |
| 1.6.4 Activité de l'eau.....                      | 8         |
| 1.6.5 Matière organique.....                      | 9         |
| 1.7. Cycle de vie.....                            | 9         |
| 1.8. Métabolisme des actinomycètes.....           | 10        |
| 1.8.1. Métabolites primaire.....                  | 10        |
| 1.8.2 Métabolites secondaire.....                 | 11        |
| 1.9. Importance des actinomycètes.....            | 11        |
| <b>2. Les enzymes.....</b>                        | <b>13</b> |
| 2.1. Définition.....                              | 13        |
| 2.2. Classification.....                          | 13        |
| 2.3. Enzymes produites par les actinomycètes..... | 15        |

## **MATERIEL ET METHODES**

|  |    |
|--|----|
| 1. Prélèvement des échantillons.....     | 17 |
| 2. Isolement d'actinomycètes.....        | 17 |
| 2.1. Prétraitement des échantillons..... | 18 |
| 2.2. Dilution et ensemencement.....      | 18 |
| 3. Purification des souches.....         | 18 |
| 4. Conservation des souches.....         | 18 |
| 5. Caractères cultureux.....             | 19 |

|   |    |
|---|----|
| 6. Caractères morphologique : technique des lamelles..... | 19 |
| 7. La recherche de quelques activités enzymatiques.....   | 19 |
| 7.1. Recherche de l'amylase.....                          | 19 |
| 7.2. Recherche de la caséinase.....                       | 19 |
| 7.3. Recherche de la gélatinase.....                      | 20 |
| 7.4. Recherche de la tyrosinase.....                      | 20 |

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

|  |    |
|--|----|
| 1. Dénombrement des souches d'actinomycètes isolées.....     | 21 |
| 2. Description des isolats.....                              | 24 |
| 2.1. Caractères culturaux.....                               | 24 |
| 2.2. Caractères morphologique.....                           | 30 |
| 3. Mise en évidence de quelques activités enzymatiques ..... | 33 |
| 3.1. Test d'amylase.....                                     | 33 |
| 3.2. Test de la caséinase.....                               | 34 |
| 3.3. Test de la gélatinase.....                              | 34 |
| 3.4. Test de la tyrosinase .....                             | 35 |
| Conclusion.....  | 36 |
| Références bibliographiques.....                             | 37 |

Annexes

## ***LISTE DES FIGURES***

- Figure 01** : cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide...10
- Figure 02** : lieu de prélèvement du premier échantillon (région Chaab Erassas de Constantine).....17
- Figure 03** : nombre d'actinomycètes isolé à partir de chaque échantillon....22
- Figure 04** : effet du prétraitement sur l'isolement.....22
- Figure 05** : nombre d'actinomycètes isolé sur milieux de culture.....22
- Figure 06** : photographie présentant quelques colonies d'actinomycètes cultivées sur le milieu amidon caséine.....26
- Figure 07** : photographie présentant des couleurs du mycélium du substrat et aérien des isolats.....27
- Figure 08** : photographie présentant les pigments diffusibles produits par les souches d'actinomycètes.....29
- Figure 09** : photographies des différents aspects microscopiques de quelques souches actinomycètes.....30
- Figure 10** : photographie présentant l'activité amylolytique de quelques souches d'actinomycètes.....33
- Figure 11** : photographie présentant l'activité caséinolytique.....34
- Figure 12** : phototgraphie présentant l'activité gélatinolytique.....34
- Figure 13** : photographie présentant l'activité tyrosinolytique.....35
- Figure 14** : diagrammes schématique représentant le mycélium aérien (orange) et végétatif (noir) des principaux genres d'actinomycètes.

## ***LISTE DES TABLEAUX***

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : Principaux critères utilisés pour la taxonomie des actinomycètes.....                                       | 4  |
| <b>Tableau 02</b> : classification des actinomycètes selon le <i>Bergey's manual of Systématique Bactériology, (2012)</i> ..... | 6  |
| <b>Tableau 03</b> : quelques exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes.....                              | 12 |
| <b>Tableau 04</b> : classification des enzymes.....   | 14 |
| <b>Tableau 05</b> : les principaux enzymes produites par les actinomycètes.....   | 16 |
| <b>Tableau 06</b> : nombres des souches d'actinomycètes isolé.....  | 21 |
| <b>Tableau 07</b> : caractères cultureux de quelques colonies isolées à partir des deux échantillons de sol.....                | 25 |

## ***LISTE DES ABRÉVIATIONS***

**CaCO<sub>3</sub>** : bicarbonate de calcium

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : phosphate dipotassium

**KCl** : chlorure de potassium

**FeSO<sub>4</sub>** : Sulfate de fer

**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de magnésium

**NaCl** : chlorure de sodium

**KNO<sub>3</sub>** : nitrate de potassium

**EC** : Enzyme Commission

**(G+C)%**: coefficient de Chargaff

**G** : grossissement

**MA** : mycélium aérien

**MS** : mycélium de substrat

# Résumés

## **Résumé**

Notre travail s'est intéressé en premier lieu, à l'isolement d'actinomycètes à partir de deux sols différents (un sol forestier situé dans la région de Chaabe Erassas et un sol semi-aride environnant une source thermale de Tleghma Mila). Les échantillons prélevés ont subi différents traitements avant être ensemencés sur quatre milieux de culture différents qui sont l'Olson modifié, amidon-caseine, Czapek et Gause supplémentés par deux substances antimicrobiennes. Les résultats montrent que le traitement par le CaCO<sub>3</sub> favorise l'isolement de ces microorganismes beaucoup plus que le chauffage à 100°C. Les milieux amidon-caséine et Olson se sont montrés les plus favorables au développement d'actinomycètes.

La deuxième étape a été consacrée à la mise en évidence de l'aptitude des 21 souches sélectionnées parmi les 75 isolées à produire quatre enzymes qui sont, l'amylase ; la caséinase ; la gélatinase ; la tyrosinase. La plupart des souches a donné des résultats positifs ce qui démontre leur importance. La tyrosinase est l'enzyme la plus produite par nos souches suivie par l'amylase puis la gélatinase et la caséinase.

**Mots clés :** actinomycètes, isolement, activité enzymatique, amylase, caséinase, gélatinase, tyrosinase.

## **Abstract:**

Our work was primarily concerned with the isolation of actinomycetes from two different soils (soil forest locate in the region of Chaab Erssas and soil thermal locate dan the region of Tlaghma Mila). The samples taken underwent different treatments before being sequestered on four different culture media which are Olson modified, starch-casein, Czapek and Causse supplemented with two antimicrobial substances. The results show that treatment with CaCO<sub>3</sub> promotes isolation of these microorganisms much more than heating at 100 ° C. The starch-casein and Olson media proved to be the most favorable for the development of actinomycetes.

The second step was devoted to highlighting the ability of the 21strains selected among 75 isolated to produce four enzymes which are amylase; caseinase; gelatinase; tyrosinase. Most of the strains gave positive results which demonstrate their importance. Tyrosinase is the most enzyme produced by our strains followed by amylase and then gelatinase and caseinase.

**Key words:** actinomycetes, isolation, enzymatic activity, amylase, caseinase, gelatinase, tyrosinase.

## ملخص :

كان عملنا معنيًا بشكل أساسي بعزل الأكتينومييسيتات من تربتين مختلفتين (تربة الغابات تقع في منطقة شعاب الرصاص و تربة شبه قاحلة بالقرب من منابع ساخنة بتلاغمة ميلة). أخذت العينات المأخوذة من معالجات مختلفة قبل أن يتم زرعها على أربعة أنواع من الأوساط المختلفة التي تستكمل بمادتين مضادتين للميكروبات. أظهرت النتائج أن العلاج باستخدام  $CaCO_3$  يعزز عزل هذه الكائنات الدقيقة أكثر بكثير من التسخين عند 100 درجة مئوية. وقد تبين أن Amidon- caseine, Gausse و Olson هي الأوساط الأكثر ملائمة .

وخصت الخطوة الثانية من العمل لإبراز قدرة السلالات المختارة البالغ عددها 21 من بين 75 سلالة معزولة لدراسة أربعة إنزيمات محددة. أعطت معظم السلالات نتائج إيجابية توضح أهميتها ، إن النيغوزين هي الانزيم الاكثر انتاجا بواسطة سلالاتنا يليه الاميلاز ثم الجيلاتينازة الكازيناز

**الكلمات المفتاحية:** الأكتينومييسيتات ، انزيم ، عزل ، الأميليز ، الكازيناز ، الجيلاتينا ، الوظيفة الانزيمية.

# Introduction

## **Introduction**

Les microorganismes sont omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses de structure analogue à celle des champignons auxquels elles étaient autrefois assimilées. Mais malgré leur aspect morphologique de type fongique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryote et confirment leur classification parmi les bactéries (**Bousseboua, 2002**).

Dans le sol, ces microorganismes sont généralement plus nombreux que les champignons mais moins abondants que les autres bactéries (**Boudmagh, 2007**). Ils sont d'importants décomposeurs de la matière organique, ce qui rend le sol fertile et par conséquent améliore les récoltes. (**Kitouni et al., 2005**) Ces bactéries sont capables de métaboliser plusieurs et différents composés comme les sucres (Polysaccharides), les alcools, les acides aminés et les composés organiques difficilement métabolisés tels que la chitine et la pectine par la production d'enzymes extracellulaires. Leur aptitude à dégrader les pesticides, les herbicides avait également été signalée (**Benimeli et al, 2003**).

L'exploitation croissante des enzymes dans les domaines industriels fait appel à un besoin continu pour avoir des conditions de production intéressantes de point de vue quantitatif et qualitatif, ce qui pousse les chercheurs à continuer leurs travaux de screening.

La première partie de notre travail consiste en l'isolement d'actinomycètes à partir de deux échantillons de sols différents. Les échantillons prélevés ont subi différents prétraitements avant d'êtreensemencés sur quatre milieux de culture différents supplémentés de deux substances antimicrobiennes. Le screening secondaire concerne la recherche de quelques enzymes appartenant à la classe des hydrolases qui sont : les amylases, les caséinases, les gélatinases et les tyrosinases en faisant appel à différents milieux de culture et techniques.

# Synthèse bibliographique

# 1. Les actinomycètes

## 1.1. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positif, avec un taux élevés de (G+C)% compris entre 60et70%, formant des filaments mince et ramifiés. (**Dgigal, 2003 ; Pelmont, 2005**).

Elles ont souvent été confondues avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'elles provoquent et aussi de leurs morphologies fongoïdes. Leur appartenance aux procaryotes est due au faite que leurs matériel génétique est dépourvu de noyau contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. (**Otto, 1998 ; Lefebvre, 2008 ; Messoudi, 2014**).

Sur milieu solide, ces bactéries forment des colonies souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc.) constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour de germe qui leur a donné naissance. Le diamètre des hyphes varie habituellement de 0,5 à 1µm (deux à dix fois plus petit que celui des champignons qui est de 2-5µm) (**Gottlieb, 1973 ; Eunice, 1983 ; Rastogi et Kishore, 1997 ; Perry et al., 2004**).

## 1.2. Les caractères cultureux

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

- la production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (exemple *Actinoplanes, Micromonospora et Rhodococcus*);
- la présence ou non de mycélium du substrat (MS) ;
- la couleur du MA et du MS ;
- la production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

## 1.3. Caractères morphologique

La morphologie des actinomycètes est très variable, on peut rencontrer deux groupes :

Le premier groupe se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium).

Le second groupe : comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier on peut rencontrer des bacilles et aussi des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobactérium* (Lechevalier, 1985 ; Avril et al., 1992).

D'autres structures morphologiques sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir:

- les sclérotés qui sont formés dans le genre *Chainia* est constitué par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés ;
- les synnemata (ou corémies) qui sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales (Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*) ;
- les vésicules appelés sporanges, contenant des spores et peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé (Ils sont présents chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium*) (Theilleux, 1993 ; Neyra, 1992).

## 1.4. Taxonomie et critères de classification des actinomycètes

### 1.4.1. Critères de classification

L'identification des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, fonctionnels, chimiotaxonomiques et génomiques, rassemblés dans le (tableau 01). L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le *Manuel Bergey*, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties regroupant le phylum des *Actinobacteria* (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2012).

**Tableau 01** : Principaux critères utilisés pour la taxonomie des actinomycètes.

| <b>Critères taxonomiques</b>        |   | <b>Références</b>  |
|-------------------------------------|---|--|
| <b>Critères Morphologique</b>       | <p>Mycélium fragmenté ou non.</p> <p>Présence ou non de mycélium aérien.<br/>Couleur des mycélia.</p> <p>Production des spores.</p> <p>La production ou non de structures spéciales comme les sporanges, les sclérotés et les zoospores</p>         | (Bergey's ; 1989)  |
| <b>Critères chimio-taxonomiques</b> | Composition cellulaire en acides aminés, en sucres et en lipides.   |  |
| <b>Critères Physiologique</b>       | <p>Tolérance au chlorure de sodium.</p> <p>Résistance à certains antimicrobiens et tolérance à des différentes valeurs de température, de pH et de salinité</p> <p>Recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et Terminaux.</p> | (Lamari, 2006)   |
| <b>Critères Moléculaires</b>        | <p>Coefficient de Chargaff ou G+C%</p> <p>Séquençage des gènes de l'ARNr 16S.</p> <p>Taux d'hybridation ADN/ADN.</p>  | <p>(Stanckebrandt <i>et al.</i>, 1997)</p> <p>(Smaoui, 2010).</p> <p>(Wayne <i>et al.</i>, 1987)</p> |

### 1.4.2. Taxonomie

La taxonomie est l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux (**Kitouni, 2007**).

Selon le *Bergey's Manual de Systematique Bactériologique* (2012) les actinomycètes sont classés dans le domaine *Bacteria* et le phylum *Actinobacteria* qui est subdivisé à son tour en 06 classes. La plus importante est la classe des *Actinobacteria* qui se divise en 15 ordres. Les plus importants sont ceux des *Actinomycetales* et *Streptomycetales* (**voir tableau 2**). (**Goodfellow et al., 20012**).

**Tableau 02** : classification des actinomycètes selon le *Bergey's Manual of Systématique Bactériology*, (2012).

|                 |  |                           |                                   |                          |                      |                        |
|-----------------|--|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Domaine</b>  | <i>Bacteria</i>  |                           |                                   |                          |                      |                        |
| <b>Phylum</b>   | <i>Actinobacteria</i>  |                           |                                   |                          |                      |                        |
| <b>Classes</b>  | <i>Nitriliruptoria</i>   | <i>Acidimicrobia</i>      | <i>Actinomicrobia</i>             | <i>Rubrobacteria</i>     | <i>Coriobacteria</i> | <i>Thermoleophilia</i> |
| <b>Ordres</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Actinomycetales</i></li> <li>-<i>Streptomycetales</i></li> <li>-<i>Actinopolysporales</i></li> <li>-<i>Bifidobacteriales</i></li> <li>-<i>Catenulisporales</i></li> <li>-<i>Corynebacteriales</i></li> <li>-<i>Frankiales</i></li> <li>-<i>Glycomycétales</i></li> <li>-<i>Jiangellales</i></li> <li>-<i>Kineosporiales</i></li> <li>-<i>Micrococcales</i></li> <li>-<i>Micromonosporales</i></li> <li>-<i>Propionibacteriales</i></li> <li>-<i>Pseudonocardiales</i></li> <li>-<i>Streptosporangiales</i></li> </ul> |                           |                                   |                          |                      |                        |
| <b>Familles</b> | <i>Actinomycetaceae</i>  |                           |                                   | <i>Streptomycetaceae</i> |                      |                        |
| <b>Genres</b>   | <i>Actinomyces</i>   | <u><i>Mobiluncus</i></u>  | <i>Streptomyces</i>               |                          |                      |                        |
|                 | <u><i>Actinobaculum</i></u>  | <u><i>Trueperella</i></u> | <u><i>Kitasatospora</i></u>       |                          |                      |                        |
|                 | <u><i>Arcanobacterium</i></u>  | <u><i>Varibaculum</i></u> | <u><i>Streptoverticillium</i></u> |                          |                      |                        |

## 1.5. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (**Waksman, 1959 ; Porter, 1971 ; Lacey, 1973 ; Williams *et al.*, 1984**).

### 1.5.1. Le sol

Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl-isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (**Omura, 1992; Zaitlin *et al.*, 2003; Zaitlin et Watson, 2006**).

De nombreux actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, ils sont aussi capables de dégrader certaines toxines produites par des champignons toxigènes et donc de réduire leur teneur dans les produits agro-alimentaires finaux (**Holzappel *et al.*, 2002 ; Belyagoubi, 2014**).

Le genre *Fankia* est extrêmement important pour de nombreux types de plantes. Cette importance réside dans le fait qu'il est capable de noduler les racines de ces plantes et de fixer l'azote atmosphérique. Cette association est appelée : association actinorhizienne (**Prescotte *et al.*, 2007**).

### 1.5.2. L'eau

Ces bactéries ont été également isolées dans de nombreux environnements aquatiques. Elles ont été isolées à partir des eaux de mer et sédiments marins, des eaux douces et dans les marécages salés (**Jensen *et al.*, 1991 ; Ghanem *et al.*, 2000 ; Al-Zarban *et al.*, 2002 ; Boughachiche *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2007**).

### 1.5.3. L'air

L'air constitue pour les actinomycètes un moyen de transport et non pas un habitat (**Gazenko *et al.*, 1998**).

#### 1.5.4. Les composts et les végétaux

Certain genres d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres comme *Thermoactinomyces* qui se trouve fréquemment dans les composts. Ces microorganismes se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on trouve au bord des rivières et des lacs, les champs de riz et les cavernes naturelles beaucoup sont capables de sporuler, ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables telle que la salinité . Cette propriété joue un rôle principal dans leur distribution (Wang *et al.*, 2006 ; Lee, 2006 ; Zaitlin et Watson, 2006 ; Djaballah, 2006).

#### 1.6. Facteurs influençant la croissance des actinomycètes

La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier: l'oxygène, le pH, la température etc (Messoudi, 2014).

##### 1.6.1. L'oxygène

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

- les formes fermentatives anaérobies strictes ou facultatives, représentées par le genre type *Actinomyces*, (Le Minor, 1989) ;
- les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces* (Avril *et al.*, 1992).

##### 1.6.2. pH

Pour le pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7-8, mais on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieurs à 4 (McKinney, 2004).

##### 1.6.3. Température

La température optimale de croissance est entre 25 à 30°C, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures de 55 à 65°C (Rangaswami *et al.*, 2004).

##### 1.6.4. Activité de l'eau

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

### 1.6.5. Matière organique

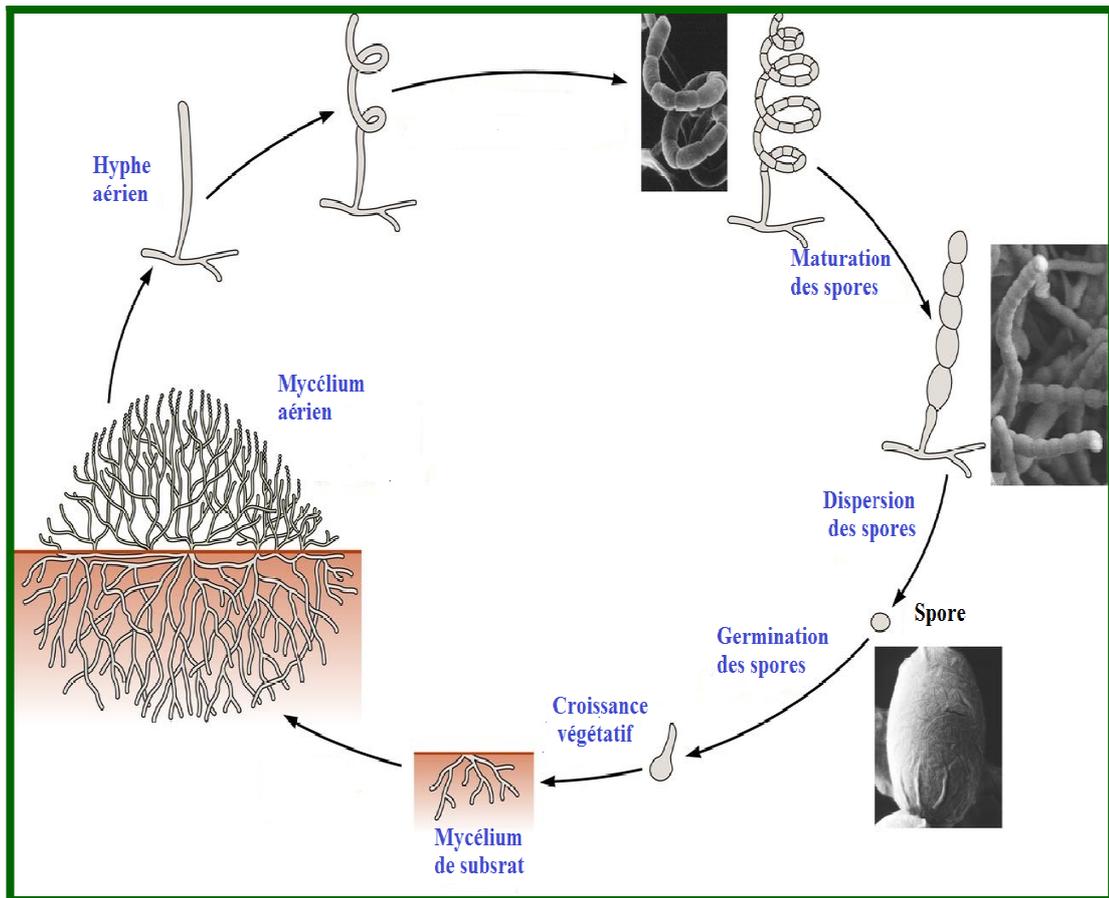
En 1986 Henis a montré que le nombre d'actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de matière organique et que de large population d'actinomycètes coïncidaient avec des taux relativement élevés de matière organique, quelque soit le taux de la salinité du sol (**lee et Hwang, 2002**).

### 1.7. Cycle de vie

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe (**Danilenko et al., 2005**).

Sur milieu solide (sol naturel ou gélose en laboratoire), le genre *Streptomyces* (le genre le plus commun des actinomycètes) se distingue par un cycle de vie qualifié de complexe. Ce dernier commence par une spore (**figure 01**) qui, dans des conditions favorables, va germer et croître en un mycélium végétatif qui va s'étendre et épuiser dans son environnement des substances nutritives. Quand les conditions deviennent limitantes en substrat, un second type (de 46 mycéliums différents) se développe sur le premier. Celui-ci est dit aérien et se sert des réserves du mycélium basal pour se développer. Les extrémités de ce mycélium vont ensuite se différencier, elles aussi, en chaînes de préspores puis en spores uniques qui seront disséminées et pourront recommencer un nouveau cycle (**Drago, 2015**).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certaines souches peuvent sporuler dans cet environnement (**Madigan et Martinko, 2007**).



**Figure 01** : cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

## 1.8. Métabolisme des actinomycètes

Au cours de leur croissance les actinomycètes peuvent passer d'un métabolisme dit primaire (trophophase) à un métabolisme dit secondaire (idiophase).

### 1.8.1. Métabolite primaire

Les métabolites primaires sont des substances produites par des microorganismes en période de croissance active. Lorsque ces derniers sont mis en culture, ils entrent rapidement en phase de croissance. Pendant cette dernière, **des substances nécessaires à leur développement** sont produites par des réactions enzymatiques. Ils sont appelés métabolites primaires ou généraux tel que : les alcools, les enzymes (comme les hydrolases et les protéases) et les acides organiques etc (Bill, 2007).

### **1.8.2. Métabolite secondaire**

Ce sont des substances généralement synthétisées plus tardivement dans le cycle de vie, alors que les micro-organismes vieillissent. Ils sont, en général, produits au cours de la phase stationnaire (**Horinouchi, 2002 ; Ginolhac, 2006**).

### **1.9. Importance des actinomycètes**

Les actinomycètes ont une importance considérable en tant que producteurs d'antibiotiques (**Berdy, 2005**). En plus de ces derniers, ils sont la source de métabolites à différentes activités biologiques comme les enzymes, les antitumorales, les insecticides, les pesticides, les herbicides et les immunomodulateurs (**voir tableau 03**) (**Dietera et al., 2003**).

**Tableau 03** : quelques exemples de molécules bioactives produites par les actinomycètes.

| <b>Molécules bioactives</b>   | <b>actinomycètes producteurs</b>   | <b>Références</b>   |
|---|--|---|
| <p><b>Les antibiotiques :</b></p> <p>Clostomycine</p> <p>Candicidine</p> <p>Streptolydigne</p> <p>Rétamycine</p> <p>Marinomycine</p> <p>Abyssomycine</p>    | <p><i>Micromonospora</i> sp.</p> <p><i>Streptomyces griseus</i></p> <p><i>Streptomyces lydicus</i></p> <p><i>Streptomyce lindensis</i></p> <p><i>Marinispora</i> sp</p> <p><i>Verrucosispora</i> sp.</p> | <p><b>Takahashi et al., 2003</b></p> <p><b>Jinenez et al., 2009</b></p> <p><b>Liu et al., 2007</b></p> <p><b>Inoue et al., 2007</b></p> <p><b>Sturdiková et Sturdik, 2009</b></p> <p><b>Sturdiková et Sturdik, 2009</b></p> |
| <p><b>Les antifongiques</b></p> <p>Blasticidine</p> <p>Phenylacétate</p> <p>Transvalencine</p> <p>Amphotéricine B</p>                                       | <p><i>Streptomyces griseochromogenes</i></p> <p><i>Streptomyces humidus</i></p> <p><i>Nocardia transvalensis</i></p> <p><i>Streptomyces nodosus</i></p>  | <p><b>Fukunaga et al., 2008</b></p> <p><b>Hwang et al., 2001</b></p> <p><b>Mukai et al., 2006</b></p> <p><b>Carle et al., 2003</b></p>  |
| <p><b>Les antitumorale</b></p> <p>Asterobactine</p> <p>Salinosporamide A</p> <p>Mechercharmycine</p> <p>Marinomycine</p> <p>Borrelidine</p> <p>IB-00208</p> | <p><i>Nocardia asteroides</i></p> <p><i>Salinispora tropica</i></p> <p><i>Thermoactinomyces</i> sp</p> <p><i>Marinospora</i> sp</p> <p><i>Streptomyces</i> sp</p> <p><i>Actinomadura</i> sp</p>          | <p><b>Nemoto et al., 2002</b></p> <p><b>Fenical et al., 2006</b></p> <p><b>Kanoh et al., 2005</b></p> <p><b>Kwon et al., 2006</b></p> <p><b>Vino et Lokesh, 2008</b></p> <p><b>Malet-Cascon et al., 2009</b></p>            |
| <p><b>Les immunostimulateurs</b></p> <p>Rubratin</p> <p>Bestatine</p> <p>FR-900494</p>  | <p><i>Nocardia rubra</i></p> <p><i>Streptomyces olivoreticuli</i></p> <p><i>Kitasatosporia kifunense</i></p>   | <p><b>De boer et al., 2000</b></p> <p><b>Ichinose et al., 2003</b></p> <p><b>Iwami et al., 2006</b></p>   |
| <p><b>Les immunosuppresseurs</b></p> <p>Pentalenolactone</p> <p>Brasilicardine A.</p>   | <p><i>Streptomyces filipinensis</i></p> <p><i>Nocardia brasiliensis</i></p>  | <p><b>Uyeda et al., 2001</b></p> <p><b>Komatsu et al., 2005</b></p>   |

## 2. Les enzymes

### 2.1. Définition

Les enzymes, catalyseurs biologiques spécifiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées (entre 10 à 1000 kDa). Elles montrent une instabilité importante, leur dénaturation peut s'effectuer par chauffage à hautes températures, hydrolyse en présence d'acides, bases ou protéases,... (Jarrar, 2011).

### 2.2. Classification

C'est en fonction de leur activité catalytique que les enzymes sont classées. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et divise les enzymes en six grandes classes (voir tableau 04) (Jarrar, 2011).

**Tableau 04** : classification des enzymes.

| <b>Classe (E.C.)</b> | <b>Classification</b>  | <b>Type de réaction catalysée</b>                          |
|----------------------|--|--|
| <b>E.C.1</b>         | Oxydoréductases  | Oxydo-réduction  |
| <b>E.C.2</b>         | Transférases   | Transfert de groupements fonctionnels                      |
| <b>E.C.3</b>         | Hydrolases<br>Exp : amylase<br>tyrosinase<br>caséinase<br>gélatinase | Hydrolyse  |
| <b>E.C.4</b>         | Lyases   | Elimination de groupement et formation de doubles liaisons |
| <b>E.C.5</b>         | Isomérases   | Isomérisation  |
| <b>E.C.6</b>         | Ligases  | Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP      |

**EC : commission des enzymes**

### 2.3. Enzymes produits par les actinomycètes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**Tanaka et Omura, 1990 ; Theilleux, 1993 ; Park *et al.*, 2002 ; Vonothini et *al.*, 2008** ).

En industrie, les enzymes sont privilégiées car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts et efficacité des procédés. Un grand nombre d'enzymes spécifiques joue un rôle important dans les processus industriels à savoir l'industrie agroalimentaire (fabrication du jus, lait, paille, plats cuisinés,...), l'industrie pharmaceutique et les industries de nettoyage (traitement des eaux, détergents, lessives) (**Gassara, 2012**).

La classe d'enzymes la plus importante est la celle des hydrolases ou enzymes hydrolytiques dont 75% sont destinées à l'exploitation industrielle. Parmi eux, la tyrosinase, a été découverte initialement dans les champignons, elle est largement distribuée dans la nature et joue un rôle important dans la qualité des produits alimentaires. En deuxième lieu on trouve les protéases qui peuvent être d'origine végétal, animal et microbienne. Ils présentent la plus grande part du marché des enzymes, principalement grâce à leurs utilisations dans la fabrication des détergents. Enfin les amylase qui sont parmi les enzymes les plus utilisés dans plusieurs industries autres qu'alimentaires tel que les industries pharmaceutique (traitement du diabète et de l'obésité), des textiles, de papeteries et celle des détergents (**Mayer et Harel, 1991 ; Godfrey et West, 1996 ; Rao *et al.*, 1998 ; Sandhya et *al.*, 2005 ; Claus et Decker, 2006** ).

Les principaux enzymes produits par les actinomycètes sont consignés dans le **tableau 5** qui figure ci-dessous

**Tableau 5** : les principaux enzymes produites par les actinomycètes

| <b>Enzymes</b>     | <b>Espèces</b>   | <b>Références</b>  |
|--------------------|--|--|
| <b>Amylases</b>    | <i>Streptomyces griseus</i><br><i>Nocardioopsis</i> sp.<br><i>Streptosporangium</i> sp.  | (Vigal, et al, 1991 ;stamford et al, 2001 ;Stamford, et al., 2002 ;Poornima et al., 2008 ;Chakraborty et al., 2009)  |
| <b>Cellulases</b>  | <i>Thermomonospora fusca.</i><br><i>C.bioazotea.</i><br><i>C.uda.</i><br><i>Streptomyces drozdowiczii.</i><br><i>S.lividans.</i>   | (Béguin et Aubert, 1992).  |
| <b>Chitinases</b>  | <i>Streptomyces lividans</i><br><i>Streptomyces viridificans</i><br><i>Streptomyces aureofaciens</i><br><i>Streptomyces venezuelae</i><br><i>Streptomyces coelicolo</i><br><i>Streptomyces griseus</i> | (Miyashita et al., 1991 ;Gupta et al ., 1995 ;Taechowisan et al., 2003 ;Mukherjee et sen, 2006 ;Heggset et al., 2009 ;Avramenko et Galynkin, 2010 ;Thiagarajan et al .,2011) |
| <b>Tyrosinases</b> | <i>Streptomyces glaucescens</i><br><i>Streptomyces antibioticus</i><br><i>Streptomyces lavendulae</i>  | (Katz et al., 1983 ;Bernan et al., 1985 ;Solomon et al., 1996).  |
| <b>Pectinases</b>  | <i>Streptomyces</i> sp.<br><i>Streptomycesviridochromogenes</i><br><i>Streptomyces nitrosporeus</i>  | Agate et al., 1962 ;Sato et kaji, 1980 ;Spooner et Hammerschmidt, 1989)  |

# Matériel et méthodes

## 1. Prélèvement des échantillons

Des échantillons ont été prélevés selon une technique voisine de celle décrite par **Pochon et Tardieux (1962)** à partir d'un sol forestier situé dans la région de Chaab El Rsas de Constantine et d'un sol semi-aride environnant les sources thermales de Teleghma (Mila).

Les prélèvements sont réalisés aseptiquement. Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de terre, environ 30g de terre sont déposés à l'aide d'une spatule stérile dans un flacon préalablement stérilisé. L'analyse des échantillons est effectuée le jour même. Elle commence par un premier tri réalisé par l'utilisation d'un tamis permettant d'écarter les petites pierres et les racines afin d'obtenir un prélèvement homogène (**figure 02**).



**Figure 02** : lieu de prélèvement du premier échantillon (région Chaab El Rsas de Constantine).

## 2. Isolement des actinomycètes

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement des actinomycètes. Elles reposent essentiellement sur les prétraitements des échantillons, l'utilisation de milieux de culture sélectifs et l'addition de substances antimicrobiennes permettant de limiter la croissance des genres envahisseurs (**Dalaney et al., 1955 ; Williams, 1965 ; Boudmogh, 2007**).

## 2.1. Prétraitement des échantillons

Chaque échantillon (parmi les deux) est partagé en trois lots. Le premier est laissé sans aucun traitement. Pour le deuxième lot, 1g de sol est incubé à 30°C pendant 7 jours après avoir ajouté 0,1g de CaCO<sub>3</sub> (Kämpfer, 2006 ; Oskay, 2009). Le troisième lot subit un chauffage à 100°C pendant une heure (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963).

## 2.2. Dilutions et ensemencement

Cent microlitres des dilutions 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup> en eau physiologique (NaCl à 9g/l) des échantillons sont étalés à la surface de quatre milieux de culture : le milieu Olson modifié, le milieu Czapek, le milieu Gausse et le milieu amidon- caséine (Annexe 01). Ces milieux de cultures ont été préparés au laboratoire et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes puis additionnés d'un antifongique (Fluconazol à 50µg /ml/l) et d'un antibiotique anti Gram positif (Lexinal à 1µg/ml) (Williams, 1965).

Toutes les boîtes sont observées après une, deux, trois et quatre semaines d'incubation à 30°C. Les colonies sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique et par l'examen microscopique (observation au grossissement x10) (Williams *et al.*, 1971). Un numéro de code attribué à chaque colonie d'actinomycète observée permet de désigner chaque souche.

## 3. Purification des souches

Les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leurs aspects macroscopiques et microscopiques caractéristiques. Elles sont alors repiquées et ensemencées par la méthode des stries sur des boîtes de pétri contenant le milieu amidon-caséine exempt d'antibiotiques, puis incubées à 30°C. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention de cultures pures. La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs après chaque repiquage (Boussaber *et al.*, 2012).

## 4. Conservation des souches

Pour les conserver, les souches des actinomycètes purifiées sont cultivées sur milieu Gausse (milieu permettant une bonne croissance pour la majorité d'actinomycètes) pendant 14 jours à 30°C. Les spores sont ensuite raclées, déposées dans une solution de glycérol 40% et conservées à -20°C (Kitouni, 2007).

## 5. Caractères culturels (la macromorphologie)

Des observations macroscopiques sont effectuées après deux semaines d'incubation des boîtes contenant le milieu amidon-caséine. Les actinomycètes sont reconnus d'après leur aspect caractéristique.

## 6. Caractères morphologiques : technique des lamelles (Oskay, 2009).

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans le milieu amidon-caséine de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec la surface de celui-ci. Un fragment de la colonie est ensemencé contre la lamelle en contact du milieu à l'aide d'une anse de platine. La boîte est ensuite incubée à 30°C. Après 14 jours d'incubation, la lamelle est retirée avec précaution, déposée sur une lame contenant une goutte d'eau distillée stérile puis examinée directement au microscope optique (G×40, G×100).

## 7. Recherche de quelques activités enzymatiques

Cette étape de travail consiste à réaliser quelques tests permettant la mise en évidence de quelques activités enzymatiques.

### 7.1. Recherche de l'amylase

Dans ce test, les souches d'actinomycètes isolées sont ont été ensemencées sur la gélose de Gausse (**Annexe 02**). Après 14 jours d'incubation à 28°C, la boîte contenant le milieu gélosé est recouverte d'une solution de lugol (**Annexe 03**). L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies à l'inverse des zones contenant de l'amidon qui se colorent en brun (**Geraldine et al., 1981**).

### 7.2. Recherche de la caséinase

Les différentes souches sont cultivées sur un milieu gélosé contenant 5 % de lait écrémé (**Annexe 02**). L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 28° C témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**Stanek et Roberts, 1974**).

### 7.3. Recherche de la gélatinase

Les souches sont cultivées sur le milieu gélose nutritive contenant 0.4% de gélatine (**Annexe 02**) pendant 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique (**Annexe 03**) est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (**Geraldine et al., 1981**).

### 7.4. Recherche de la tyrosinase

Ce test a été réalisé sur une gélose à la tyrosine (**Annexe 02**). Les boîtes sont incubées à 30°C. La lecture des résultats s'est faite après 02 jours et s'est poursuivie jusqu'aux 21 jours d'incubation. La dégradation de la tyrosine se manifeste par une auréole de coloration marron autour des colonies qui peut se transformer graduellement en noir (**Roy et al., 2014**).

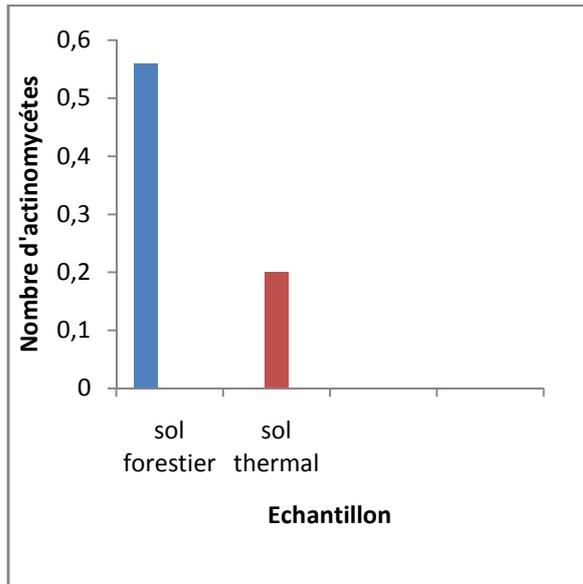
# Résultats et discussions

## 1. Dénombrement des souches d'actinomycètes isolées

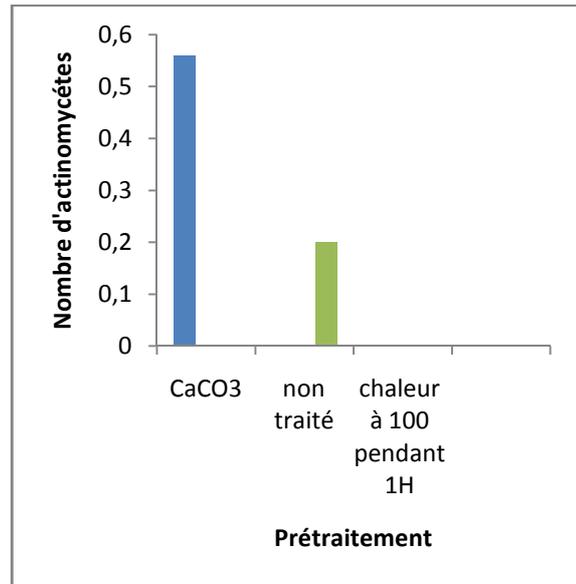
Au bout de 3-4 jours, les colonies d'actinomycètes apparaissent. Elles sont incrustées dans la gélose et se développent lentement sur les quatre milieux de culture utilisés. Les résultats obtenus lors de l'isolement sont rassemblés dans le **tableau 06**. Au total 75 colonies d'actinomycètes ont été isolées.

**Tableau 06** : nombres des souches d'actinomycètes isolé.

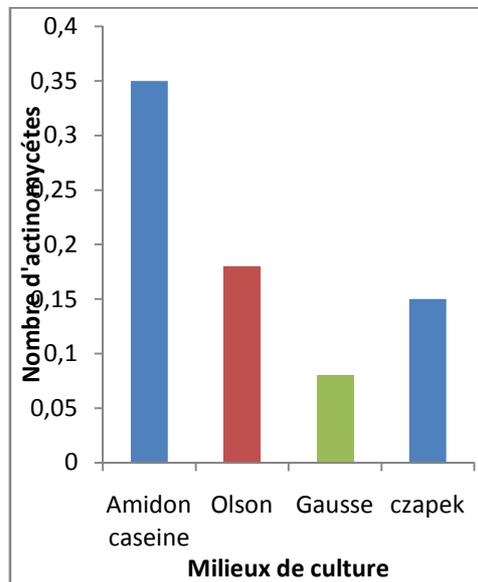
| Nombre d'UFC/g<br>$\times 10^3$<br>Echantillons<br>et prétraitements |                       | Sur<br>milieu<br>amidon-<br>caseine | Sur<br>milieu<br>olson | Sur<br>milieu<br>czapek | Sur<br>milieu<br>gausse | Total<br>et pourcentage |
|--|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Sol<br/>thermal</b>   | - traitement          | 0,03                                | 0,01                   | 0                       | 0                       | 0,04 (5%)               |
|  | +CaCO <sub>3</sub>    | 0,07                                | 0,04                   | 0,01                    | 0,05                    | 0,17 (22%)              |
|  | +Chauffage à<br>100°C | 0                                   | 0                      | 0                       | 0                       | 0                       |
| <b>Sol<br/>Forestier</b>   | -traitement           | 0,05                                | 0,05                   | 0,01                    | 0,04                    | 0,15 (20%)              |
|  | +CaCO <sub>3</sub>    | 0,2                                 | 0,08                   | 0,06                    | 0,06                    | 0,4 (53%)               |
|  | +Chauffage à<br>100°C | 0                                   | 0                      | 0                       | 0                       | 0                       |
| Total et pourcentage%  |                       | 0,35<br>(46%)                       | 0,18<br>(24%)          | 0,08<br>(10%)           | 0,15<br>(20%)           |                         |



**Figure 03 :** Nombre d'actinomycètes isolé à partir de chaque échantillon.



**Figure 04:** Effet du prétraitement sur l'isolement. d'actinomycètes



**Figure 05 :** Nombre d'actinomycètes isolé sur milieux de

D'après les résultats observés (**tableau 06 et figure 03**), il apparaît clairement qu'un nombre plus élevé d'actinomycètes est obtenu à partir de l'échantillon de sol forestier. Ceci peut s'expliquer par le fait que, d'une part l'échantillon de sol est relativement plus riche en matière organique que celui du sol thermal ce qui corrobore avec les travaux de **Djaballah, (2010) et Belyagoubi (2014)** qui affirment que le nombre de ces derniers est corrélé positivement avec le pourcentage de la matière organique et d'autre part cela est due à la différence dans les facteurs physico-chimiques, qui influent considérablement sur le nombre ainsi que le type d'actinomycètes habitant le sol (**Hop et al, 2012 ; Adegbeye et al, 2012**).

Le chauffage à 100°C pendant 1h et le traitement par le CaCO<sub>3</sub> comptent parmi les prétraitements qui sont souvent utilisés dans le but de réduire le nombre des contaminants. D'après les résultats observés dans le **tableau 06 et la figure 04**, le nombre d'actinomycètes isolés à partir des échantillons traités par le CaCO<sub>3</sub> est plus élevé que celui observé à partir des échantillons non traités (**voir tableau 06**). En revanche, le chauffage à 100°C s'est montré négatif comme prétraitement vu qu'il n'a pas favorisé la croissance des actinomycètes dans le cas. Le traitement au CaCO<sub>3</sub> est de ce fait plus efficace pour l'isolement des actinomycètes ce qui est en corrélation avec les travaux de **Boudmeh, (2007) et Kitouni, (2007)** qui ont rapporté que le plus grand nombre d'actinomycètes a été isolé à partir des échantillons traités par le CaCO<sub>3</sub>. D'après **Gurung et al, (2009)** cette technique permet non seulement une augmentation du nombre des colonies d'actinomycètes par un facteur de 100 ou plus en comparaison avec les échantillons non traités par le bicarbonate de calcium, mais aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération court et qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinomycètes. Par ailleurs, le traitement par chauffage à 100°C pendant 1 heure n'a permis d'isoler aucune souche actinomycétale, ceci peut être expliqué par le fait que les souches qui existent dans les échantillons n'ont pas résisté à cette chaleur. Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux obtenus par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)** où le traitement à 100°C pendant 1 heure réduit considérablement le nombre des bactéries sans affecter celui des actinomycètes.

Les milieux à base d'amidon et de caséine comme les milieux amidon-caséine, Olson et Gause se sont révélés être les plus favorables à l'isolement des actinobactéries par rapport au Czapek (**voir Tableau 06 et figure 05**). Cela est confirmé par les résultats obtenus par **Benouagueni (2015)**. Plusieurs chercheurs ont utilisé le milieu amidon-caséine pour un isolement sélectif des actinomycètes du sol. Comme **Hagedorn (1976)** qui a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir des sols arides. D'après **Belyagoubi (2014)** le milieu sélectif

utilisé pour l'isolement des actinomycètes est le milieu Olson, celui-ci est plus spécifique pour isoler les actinomycètes vu qu'il contient le sodium caséinate et l'asparagine favorisant la croissance de ces microorganismes. **Hilali et al., (2002)** ont trouvé les mêmes observations lors d'isolement d'actinomycètes sur le même milieu

## **2. Description des isolats**

### **2.1. Caractères cultureux**

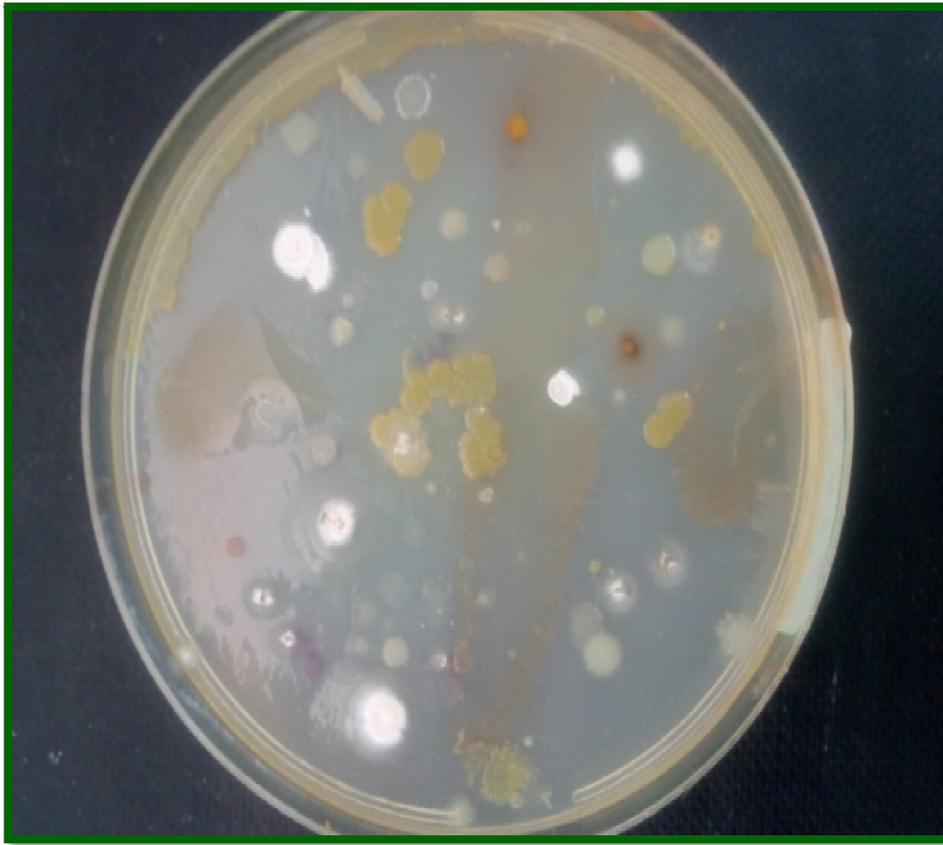
Après 14 jours d'incubation, les colonies qui apparaissent sont repiquées sur le milieu amidon-caséine. Elles sont incrustées dans la gélose et possèdent pour les plupart un mycélium de substrat surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (parfois le mycélium aérien est absent.).

A partir des 75 souches d'actinomycètes isolées et purifiées, nous avons sélectionné 21 souches représentatives sur la base de leurs caractères macroscopiques (formes et textures des colonies, couleurs des mycéliums de substrat et aérien) (**voir Tableaux 7, figure 06**).

**Tableau 07** : caractères cultureux de quelques colonies isolées à partir des deux échantillons de sol.

| Code de la souche et milieu d'isolement | Pigmentation    |                      |                    |
|---|-----------------|----------------------|--------------------|
|   | Mycélium aérien | Mycélium de substrat | Pigment diffusible |
| CF1 (amidon-caséine)                    | Blanc           | Marron foncé         | Marron foncé       |
| CT2 (Olson)                             | Gris            | Jaune                | (-)                |
| CF3 (Gausse)                            | Rose            | Rose                 | Rose               |
| CF4 (Gauss)                             | Orange          | Orange               | (-)                |
| CF5 (Olson)                             | Marron          | Marron               | Marron             |
| CT6 (amidon-caséine)                    | Beige           | Beige                | (-)                |
| CT7 Olson                               | Blanc           | Jaune                | Jaune              |
| CF8 Czapek                              | Gris            | Orange               | Orange             |
| CT9 Czapek                              | Verte           | Rose                 | Rose               |
| CF10 (amidon-caséine)                   | Beige           | Marron               | (-)                |
| CT11 (Olson)                            | Gris            | Gris                 | (-)                |
| CT12( amidon-caséine)                   | Gris            | Beige                | Beige              |
| CT13 (amidon-caséine)                   | Beige           | Marron               | Marron             |
| CT14 (Czapek)                           | Gris            | Marron               | (-)                |
| CT15 (Gausse)                           | Vert claire     | Marron               | (-)                |
| CF16 (Czapek)                           | Gris claire     | Gris claire          | (-)                |
| CF17 (Czapek)                           | Gris            | Jaune                | Jaune              |
| CT18 (Olson)                            | Verte           | Verte                | (-)                |
| CF19(Olson)                             | Beige           | Blanc                | (-)                |
| CT20(Olson)                             | Jaune           | Jaune                | (-)                |
| CF21 (Czapek)                           | Blanc           | Beige                | (-)                |

CT : colonie isolée à partir d'un sol thermal ; CF : colonie isolée à partir d'un sol forestier ; (-) absence des pigments diffusible.

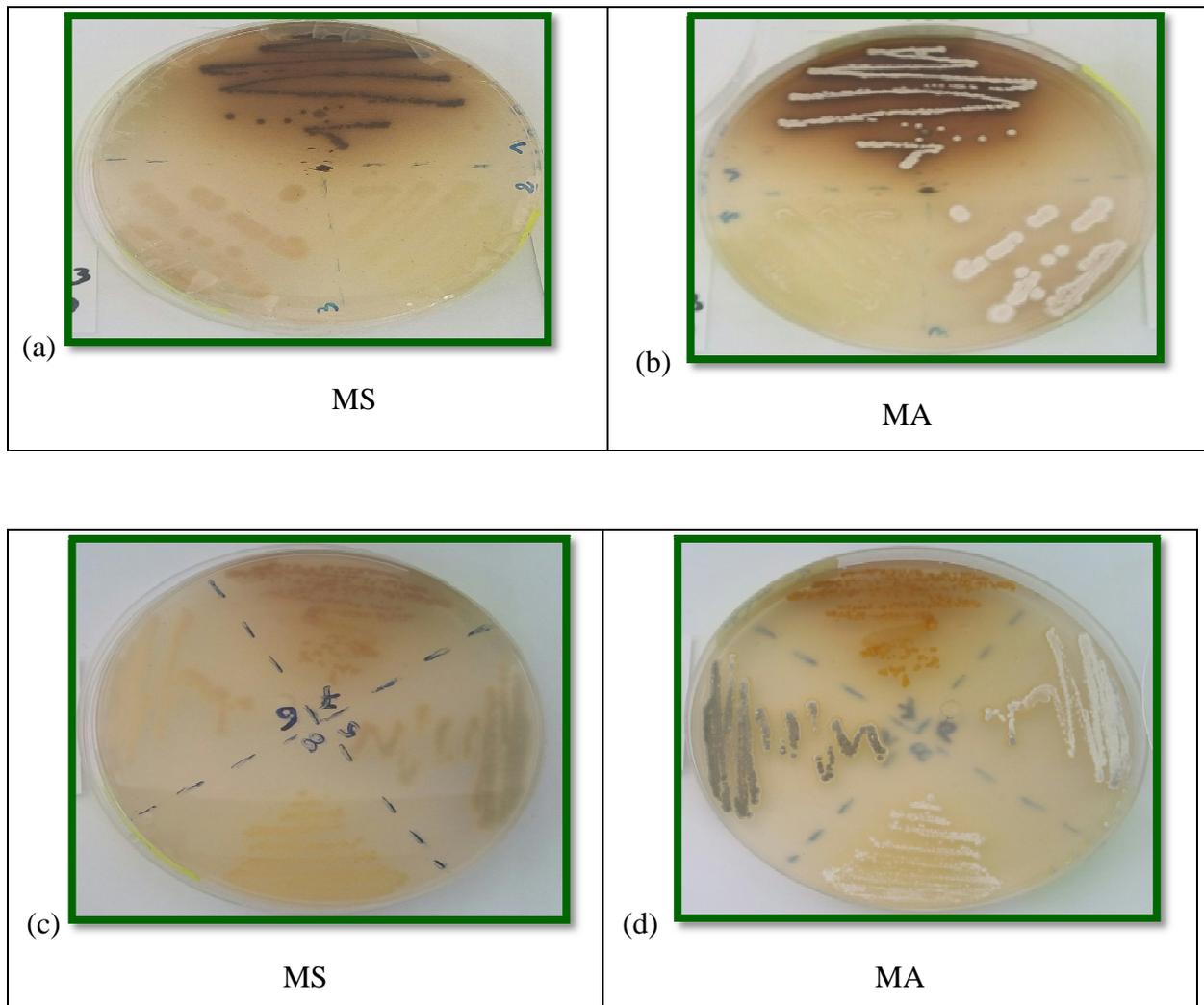


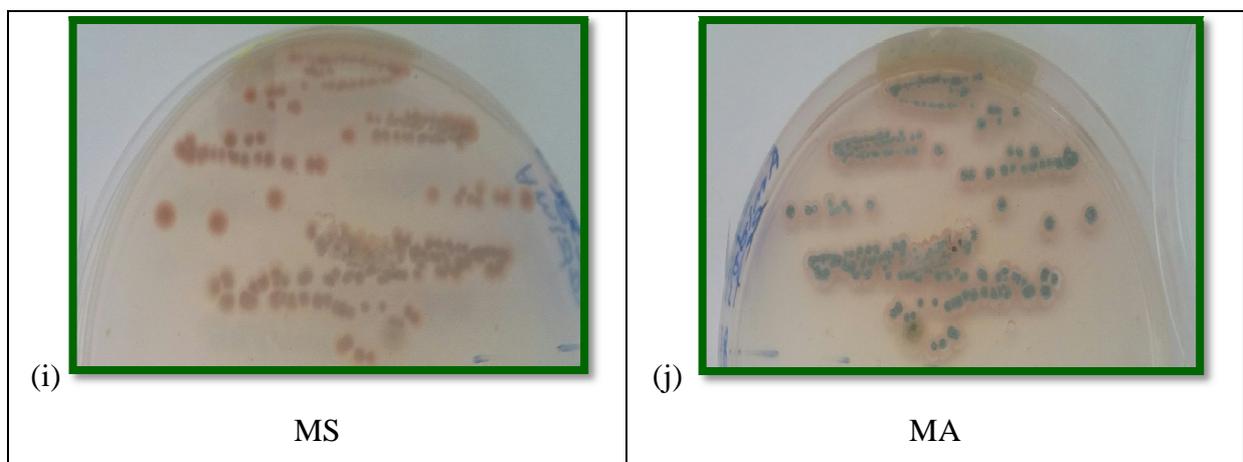
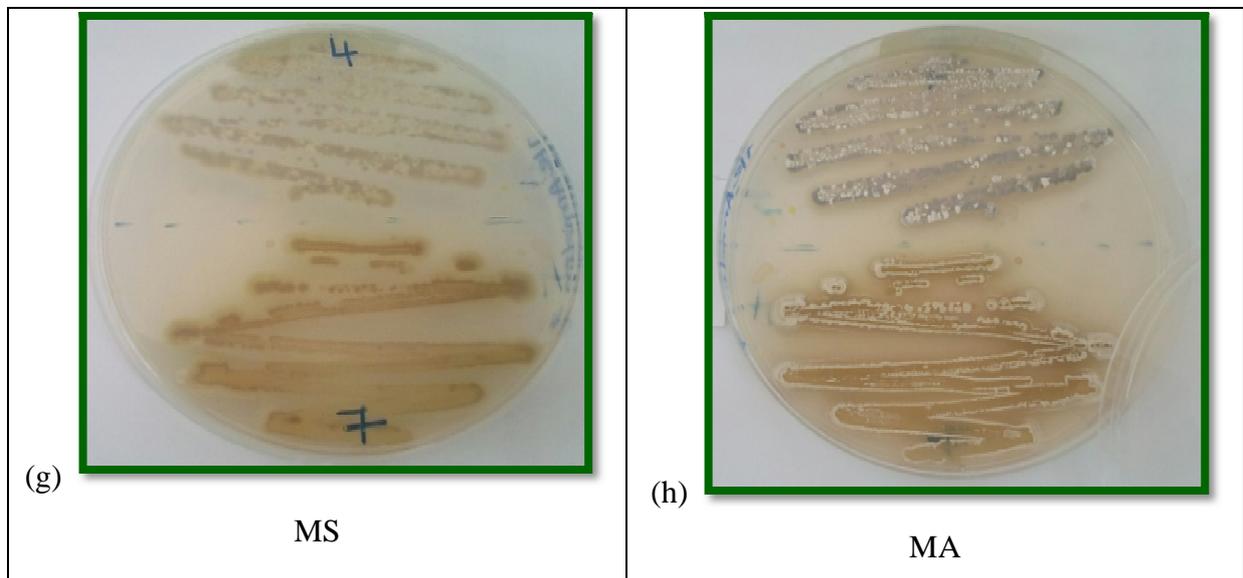
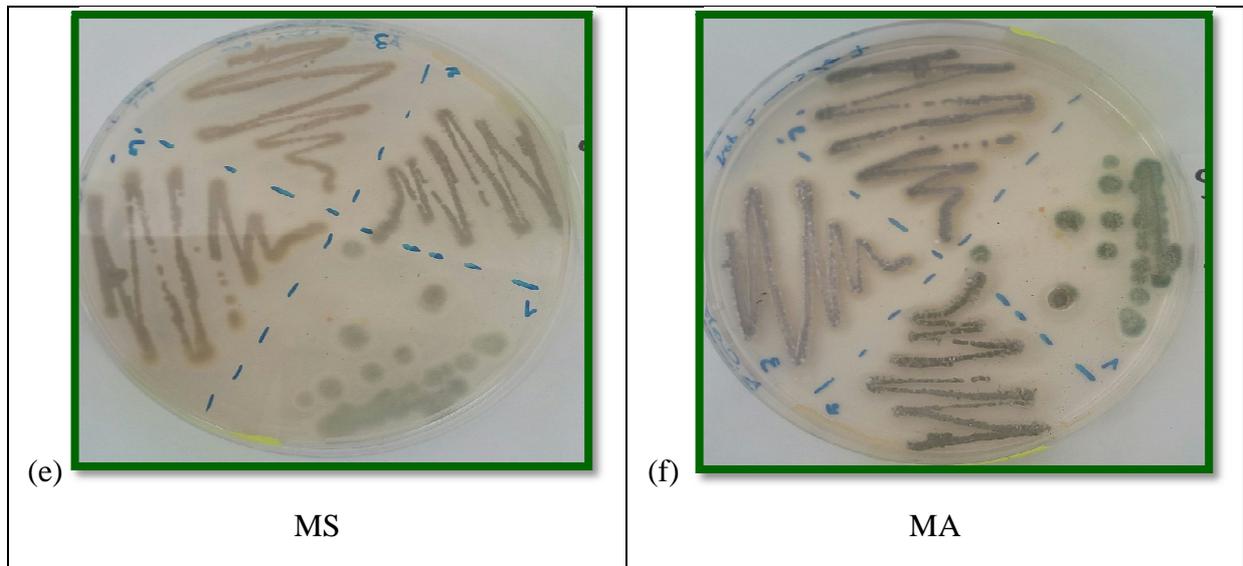
**Figure 06** : photographie présentant quelques colonies d'actinomycètes cultivées sur le milieu amidon caséine.

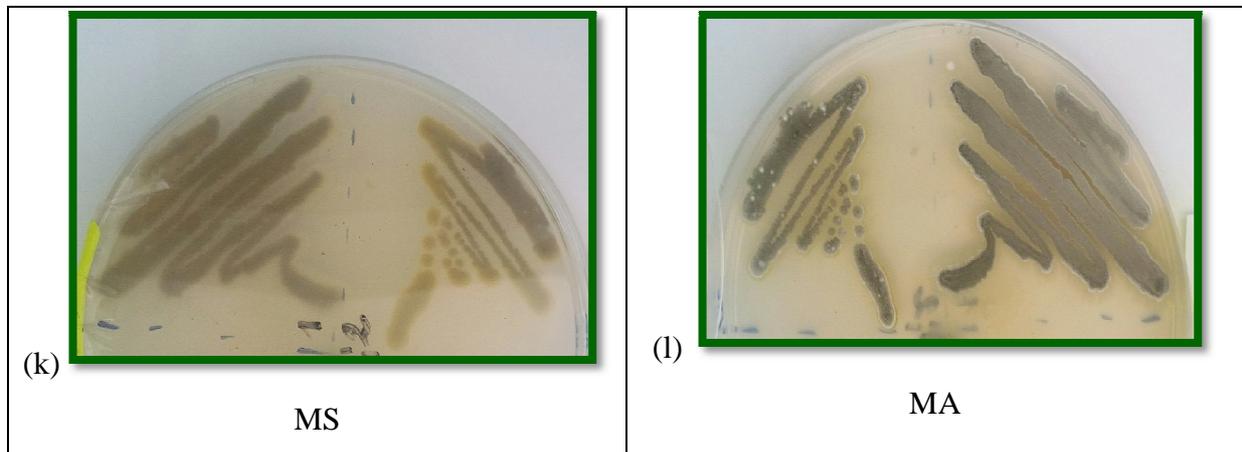
Les colonies sont généralement rondes, opaques et présentent un contour irréguliers. Elles adhèrent à la surface de la gélose et présentent un aspect poudreux (CF1, CT2, CT7...), granuleux (tel que CF4, CF5...) ou lisse (CF3, CT6...).

Le mycélium aérien présente des différentes couleurs : marron (CF5), beige (CT6, CF10, CT13, CF19), verte (CT9, CT15, CT18), rose (CF3), orange (CF4), blanche (CF1, CT7, CF21), grise (CT2, CF8, CT11, CT12, CT14, CF16, CF17) et jaune (CT20). Ceci a été constaté par d'autres chercheurs dans plusieurs travaux comme **Arasu *et al.*, (2009)** ; **Belyagoubi, (2014)** et **Belabed, (2014)**.

L'observation du revers de la colonie (dos de la boîte de Pétri) permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat qui est : beige (CT6, CT12 , CF21), marron-foncé (CF5, CF10, CT13, CT14, CT15), jaune (CT2, CT7, CF17, CT20), rose (CF3, CT9), orange (CF4, CF8), (CT6,CT12), gris (CT11, CF16) , vert ( CT 18). Les mêmes observations ont été constaté par plusieurs auteurs comme **Balasubramaniam *et al.*, (2011)** et **Belabed, (2014)**. (Voir figure 07).





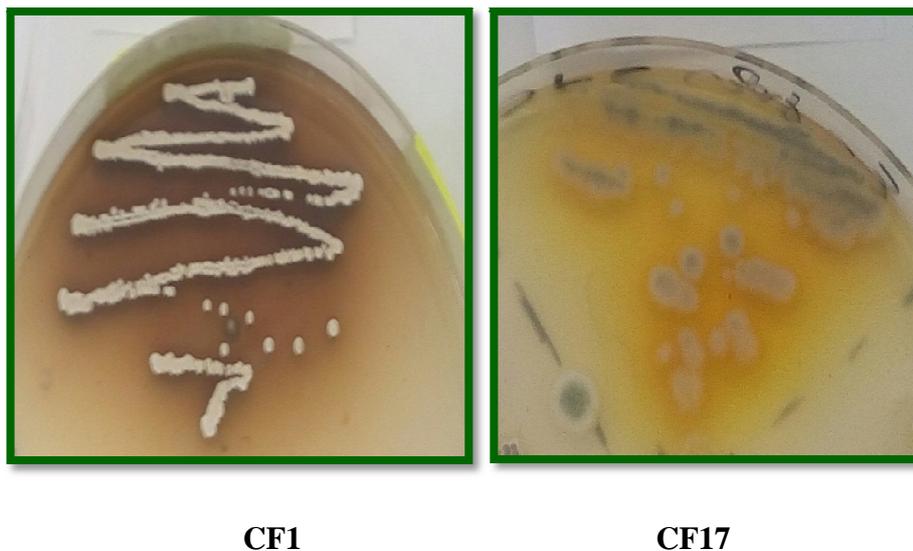


MS : mycélium de substrat ; MA : mycélium aérien

**Figure 07** : photographie présentant des couleurs du mycéliums du substrat et aérien des isolats.

Les pigments mélanoides sont des produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine responsable de la couleur brune-noire. Ils possèdent des propriétés radioprotectrices et antioxydantes et peuvent éventuellement protéger le microorganisme vivant des ultraviolets. (**Boucheffa, 2011**).

La production des pigments mélanoides a été observé chez quelques souches isolées (comme CF1) et il y'avait d'autre souches qui diffusaient des pigments de couleurs différentes : beige , jaune, verte,...comme les souches (CF3 , CF5, CT7 , CF8, CT9, CT12, CT13, CF17 ), d'autres ne diffusent aucun pigment (CT2, CF4, CT6, CF10, CT11, CT14, CT15, CF1,6 CT18, CF19, CT20).(figure 08)



**Figure 08** : photographie présentant les pigments diffusibles produits par les souches d'actinomycètes.

## 2.2. Caractères morphologiques

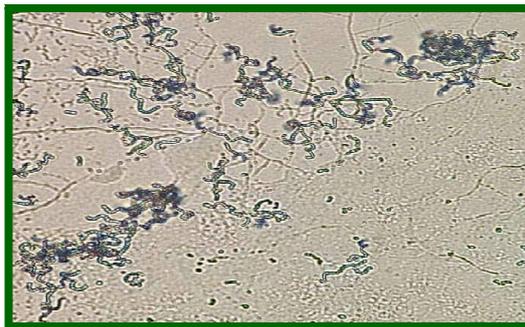
L'étude de la morphologie des mycelia de substrat et aérien est menée par la technique des lamelles qui permet la distinction entre les différentes formes susceptibles d'être trouvées. Cette technique nous a permis d'étudier la morphologie des souches isolées aux grossissements  $\times 40$  et  $\times 100$ . Les résultats obtenus sont regroupés dans la **figure 09** qui montre le mycélium aérien des différentes souches étudiées.



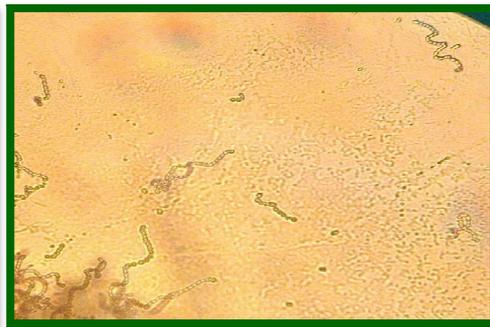
(A) MA.X40



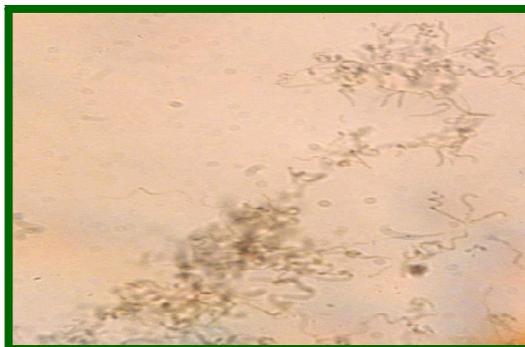
(A) MA. X100



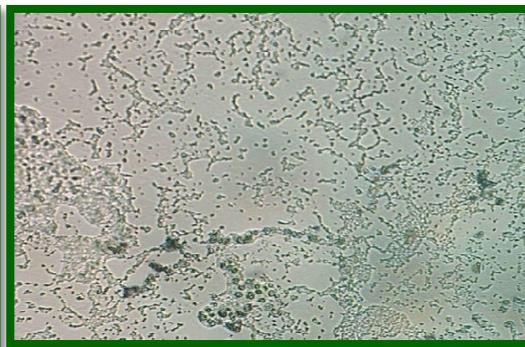
(B) MA. X40



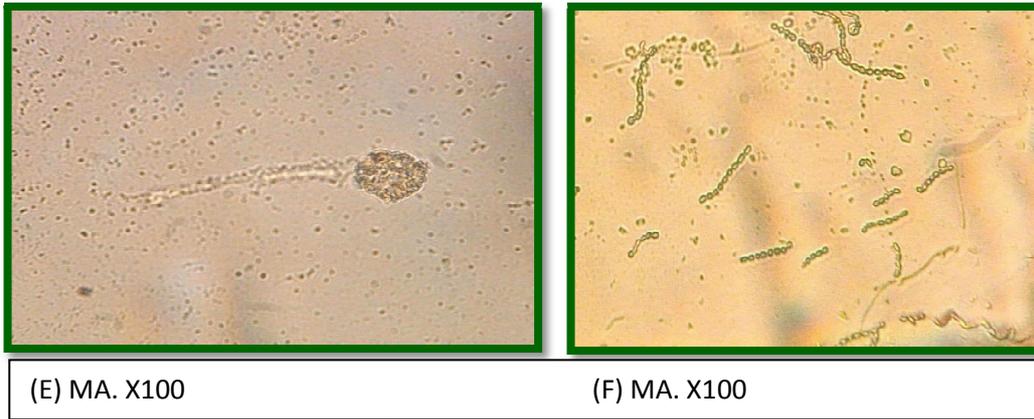
(B) MA. X100



(C) MA. X100



(D) MA. X40



**Figure 9:** photographies des différents aspects microscopiques de quelques souches actinomycètes.

Les structures observées seront ensuite comparées avec les diagrammes schématiques du mycélium aérien des différents genres d'actinomycètes. (**Annexe 04 et tableau 08**).

**Tableau 08** : aspect morphologique des souches d'actinomycètes

| Photographie numéro : | Morphologie du mycélium aérien   | Le genre soupçonné       |
|-----------------------|--|--------------------------|
| (A)                   | Mycélium arborescent, présentant des sporophores qui contiennent une seule spore à leurs extrémités. | <i>Planomonospora</i>    |
| (B)                   | Filaments fragmenter non cloisonnés portant des chaînes de spores spiralées                          | <i>Streptomyces</i>      |
| (C)                   | Filaments fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores) avec une forme spiralée.         | <i>Streptomyces</i>      |
| (D)                   | Mycélium très fin, fragmenté en élément. Leurs spores sont immobiles.                                | <i>Nocardia</i>          |
| (E)                   | Mycélium abondants différenciées en sporanges sphériques   | <i>Streptosporangium</i> |
| (H)                   | Mycélium sporulé, non fragmenté et des chaînes de spores droites                                     | <i>Streptomysces</i>     |

L'étude des caractéristiques morphologiques, des souches d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. Selon **Shirling et Gottlieb (1976)** l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *micromonospora*, *microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

Les observations microscopiques, montrent de façon certaine que les isolats obtenus appartient aux différents genres d'actinomycètes.

### 3. Mise en évidence de l'activité enzymatique

#### 3.1 . Test d'amylase

L'activité amylolytique se traduit par l'absence de coloration autour des colonies à l'inverse les zones contenant de l'amidon qui se colorent en brun après ajout de lugol (**figure 10**), et ça a été constaté par **Geraldine et al., (1981)**.



Test négatif

**Figure 10** : photographie présentant l'activité amylolytique de quelques souches d'actinomycètes.

### 3.2. Test de la caséinase

Le test caséinase a été positif pour une seule souche d'actinobactérie parmi 21 souches isolées. Cette activité se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (**figure 11**). Ceci est similaire aux travaux de **Stanek et Roberts, (1974)**.

**Test positif**



**Test négatif**

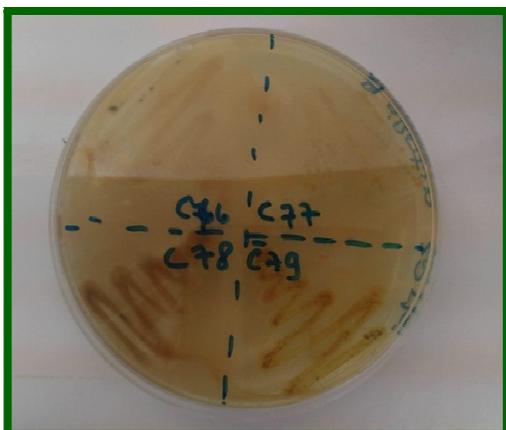


**Figure 11** : Photographie présentant l'activité caséinolytique.

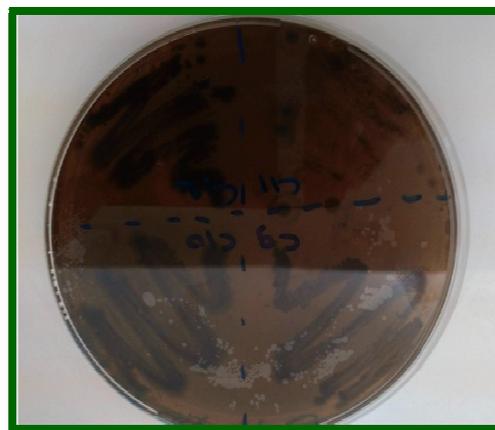
### 3.3. Test de la gélatinase

L'hydrolyse de la gélatine est mise en évidence par l'apparition des zones claires alors que où la gélatine n'est pas dégradée ces dernières s'opacifient lorsque le chlorure de mercure est ajouté, dans notre expérience nous avons la plus part des souches sont incapable de produire la gélatinase (**figure 12**). Cette résultat s'accorde avec celle de **Geraldine et al., (1981)**.

**Test positif**



**Test négatif**



**Figure 12**: Photographie présentant l'activité gélatinolytique.

### 3.4. Test de la tyrosinase

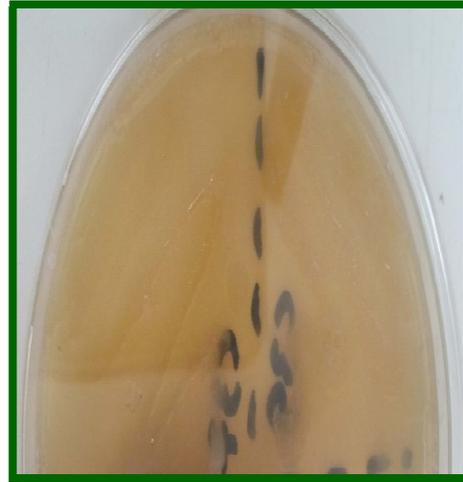
Les résultats de la dégradation de la tyrosine, indiquent que la majorité de nos souches sont positifs.

L'activité positive se traduit par l'apparition d'une auréole marron autour des colonies (figure 13). Ceci est similaire aux travaux de Roy *et al.*, (2014).

**Test positif**



**Test négatif**



**Figure 13 :** Photographie présentant l'activité tyrosinolytique.

# Conclusion et perspectives

Notre travail est basé sur deux objectifs : le premier consiste à l'isolement des actinomycètes à partir de deux sols, l'un forestier et un autre voisin d'une source thermale, La deuxième concerne la mise en évidence de quelques activités enzymatiques.

75 souches ont été isolées après l'utilisation d'un protocole bien précis où deux types de prétraitements et quatre milieux d'isolement additionnés d'antimicrobiens ont été utilisés. Les résultats montrent que 73% d'actinomycètes ont été isolées à partir des échantillons traités par CaCO<sub>3</sub> alors que le reste soit 26% isolé à partir des échantillons non traités. Dans nos résultats apparaît également que les milieux amidon-caseine, Olson et Gausse sont les plus favorables à l'isolement de ces derniers par rapport au milieu czapek

Parmi les 75 colonies observées, nous avons sélectionné 21 pour la poursuite de notre travail. Après l'étude de leurs caractères culturels et morphologiques nous avons pu les rapprocher de quelques genres d'actinomycètes. La mise en évidence de quelques activités enzymatiques a montré que nos souches sont capables de produire essentiellement la tyrosinase en premier lieu, l'amylase, la caséinase et la gélatinase en comptant sur un protocole spécifique pour chaque enzyme.

Enfin, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi car plusieurs perspectives peuvent être envisagées comme:

- ❖ l'étude des caractères biologiques ; physiologiques et moléculaires des souches isolées
- ❖ l'étude de l'aptitude à produire d'autres enzymes et pourquoi pas d'autres substances d'intérêt industriel.
- ❖ l'optimisation des conditions de culture pour une bonne production enzymatique.
- ❖ l'extraction et la purification des enzymes produits.

# Références bibliographique

## A

**Adegboye, M., F et Babalola, O ( 2012).** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. African Journal of Agricultural Research. Vol 7. N° 15: 2255-2261.

**Agate, A., Bhat, J (1963).** A method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. Antonie Van Leeuwenhoek. 29: 297-304.

**Agate, A., Bilimoria, M., Bhat, J (1962).** Pectin transeliminase activity in *Streptomyces viridochromogenes*. Curr. Sci. 31, 462–463.

**Al-Zarban, S., Al-Musallam, A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kioppenstedt, R (2002).** *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated.

**Avramenko, S et Galynkin, V (2010).** Features of Biosynthesis of Chitinolytic Enzymes by *Streptomyces griseus* Var. *Streptomycini*. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 46, No. 4: 405–408.

**Avril, J et al (1992).** Bactériologie clinique. 2 éd. Paris : ellipses. 511.

## B

**Balasubramaniam, V., Ganesh, S., Karunanithi, V., Perumal, P (2011),** Improved Culturing, Screening and Fermentation of soil Actinomycetes for Actinomicrobial Agents, *Int. J. Pharm and Ind. Res* VI (01) Issue (02): 153-159.

**Barnabé, S (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières, Vecteur environnement 36 (2): 50-62.

**Beckers, h., Van Der Hoeven, J., S (1982)** Growth Rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* During Early Colonization of Tooth Surfaces in Gnotobiotic Rats. Infection and immunity. Vol. 35. N°. 2: 583-587.

**Belabed, B (2014).** Recherche des activités anti-pathogènes chez les espèces du genre *Streptomyces* isolées de différents biotopes. Mémoire magistère : Biologie moléculaire et génétique des microorganismes. Oran : Université d'Oran, 98.

**Belyagoubi, L (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse. Tlemcen : Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, 170.

**Boucheffa, K (2011).** Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire magistère : Microbiologie appliquée aux substances anti

**Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., et Sabaou, N (2007).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, 161, 288-298. microbiennes. Bejaia : Université Abderrahmane Mira Bejaia, 90.

**Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A (2005).** Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhia de Ain Mlila. *Sciences et Technologie C*, 23 : 5–10.

**Boussaber, E., Kadmiri, I., Hilali, L., Hilali, A (2012).** Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *ScienceLib Editins Mersenne*. Vol 4. N ° 121203: 1-21

## C

**Crawford, D., Lynch, J., Whipps, J., Ousley, M (1993).** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol* 59:3899-905.

**Crook, P., Carpenter, C., Klens, P.** The use of sodium propionate in isolating actinomycetes from soils. *Science*. 1950 Dec 1;112 (2918):656–656.

## D

**Dgigal, D (2003).** Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar, 157.

**Djaballah, C (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolerants isolets de La Sebka de AIN M'LILA. Mémoire Magistère : Ecologie Microbienne. Université Mentouri de Constantine, Algérie, 79.

**Dlaunay, S., Rondags, E., Germain, P (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique. J 6008 : 1-12.

**Drouin, M (2005).** Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître des sciences (M.Sc.). Canada.

## G

**Gazenko, S., Reponen, T., Grinshpan, S., Willeke, I (1998).** Analysis of airborne actinomyete spores with flurogenic substrates. Applied and Environmental Microbiology. 64:4410-4415.

**Gassara, F (2012).** Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications.

**Geraldine, M., Schofield, M., Schaal, K (1981).** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol*, 127(2): 237–259.

**Ghanem, N., Sabry, S., El-Sherif, Z., Abu El-Elal, G (2000).** Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.

**Goodfellow, M., Williams, S (1983).** Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. Vol: 37: 189-216.

**Goodfellow, M (2012)** Actinobacteria phyl. Nov. In: Whitman W.B, Goodfellow .M, Kämpfer. P, Busse H-J, Trujillo M.E, Ludwig. W, Suzuki. K.I, Parte A (eds). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol 5: 2nd edn .The actinobacteria part B. Springer, New York: 33-34.

**Gomez, R., Semedo, L., Soares, R., Alviano. C., Linhares, L., et Coelho., R (2000).** Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 30: 146-150.

## H

**Hayakawa, M (2008).** Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol.* 22: 12- 19.

**Heggset, E., Hoell, I., Kristoffersen, M., Eijsink, V et Varum, K (2009).** Degradation of chitosans with chitinase G from *Streptomyces coelicolor* A3 (2): production of chito-oligosaccharides and insight into subsite specificities. *Biomacromolecules* 10: 892–899.

**Holzappel, W., Brost, I., Faerber, P., Geisen, R., Bresch, H., Jany, K., Mengu, M., Jakobsen, M., Steyn, P., Teniola, D., Addo, P (2002).** Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.* 19.

**Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C., Otaguro, M., Hang, D., Miyadoh, S., Luong, D., et Ando, K (2012).** Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics.* Vol: 64: 599–606.

## J

**Jarrar, H (2011).** Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. These de doctorat en chimie . Ecole nationale superieure de chimie de Montpellier,163p.

**Jensen, P., Dwight, R., Fenical, W (1991).** Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108.

## K

**Kampfer, P (2006).** The family Streptomycetaceae , Part I: Taxonomy, *Prokaryotes* 3: P 538-604.

**Katz, E., Thompson, C., Hopwood, D (1983).** Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.*, 129 :2703–2714.

**Kitouni, M (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 170.

**Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioia, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1): 45–51.

**Kuhad, R., Kapoor, M et Rustagi, R (2004).** Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 257–263.

## L

**Lacey, J (1973).** *Actinomycetes in soils, composts and fodders*. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York: 231–251.

**Lamari, L (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou : 156.

**Larpent, J et Sanglier, J (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson. Paris.

**Lee, J et Hwang, B (2002).** *Diversity of antifungal actinomycètes in various vegetative soils of korea.can.J. Microbiol.* 48. 407-417.

**Lechevalier, H (1981).** *Introduction to the order Actinomycetales*, (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922.\*

**Lechevalier, M (1985).** *Actinomycetes in agriculture and forestry*, p. 327-358. In M. Goodfellow, S. T. Williams, et M. Mordarski (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, Inc., New York.

**Leclerc, EL et Guillaume, J., Watter, P (1977).** microbiologie appliquée. 67-71.

**Lee, Y et Hwang, B (2002).** *Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea*. Can. J. Microbiol. Vol : 48: 407–417.

**Lefebvre, T (2008).** Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leurs microflore actinomycétale: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la vie et de la santé : Paris : 168.

**Le Minor, L et Veron, M (1989).** Bacteriologie médicale. 2ème édition. *Medecine. Sciences Flammarion*.

**Loqman, S (2009).** La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie : 253.

## M

**Madigan, M et Martinko, M (2007).** Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e édition : 331-423, 686-718.

**Mayer, A et Harel, E (1991).** *Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables*. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science: 373-398.

**Messaoudi, O (2012).** Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar).

**McKinney, R (2004).** *Environmental Pollution Control Microbiology*. CRC Press : New York : 448.

## N

**Nomura, H et Ohara, Y (1969).** *The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate-culture isolation method for Microbispora and Streptosporangium strains. Part 1.* J. Ferment. Technol. 47: 463-469.

## O

**Omura, S (1992).** *The search for bioactive compounds from microorganisms.* Springer, Verlag, New York.

**Oskay, M (2009).** *Comparaison of Streptomyces diversity between agricultural and non-cultural soils by using various culture media, Scientifique Research and Essay Vol.4 (10):* 977-1005.

**Otto, H (1998).** *Écologie forestière. Institut pour le développement forestier : Paris:* 397.

## P

**Park, O., El-Tarabily, K., Ghisalberti, E et Sivasithamparam, K (2002).** *Pathogenesis of Streptovorticillium albireticuli on caenorhabditis elegans and its antagonism to soil-borne fungal pathogens.* Letters in Applied Microbiology. 35: 361-365.

**Pelmont, J (2005).** *Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement.* EDP Sciences : Grenoble : 798.

**Perry, J., Staley, J et Lory, S (2004).** *Microbiologie.* Edition Dunod.

**Pochon, J et Tardieux, P (1962).** *Techniques d'analyse en microbiologie du sol.* Éditions : Tourelle: 111.

**Porter, N (1971).** *Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes.* Adv Appl Microbiol, 14: 73–92.

**Prescott, L., Harley, M et Klein, (2010).** *Microbiologie de Boeck : Bruxelles. 2eme édition :* 1088.

**Prescott, L., Harley, J et Klein, D (2007).** Microbiologie de Boek et Larcier, Bruxelles: 805–825.

## K

**Kalaichelvan, T (2011).** *Extracellular chitinase production by Streptomyces sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on Fusarium oxysporum PTK2 cell wall.* Int. J. Curr. Sci.1: 30-44.

**Kämpfer, P (2006),** *the family streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy, Prokaryotes 3: P 538-604.

## R

**Rangaswami, G., Bagyaraj, D et Bagyaraj, G (2004).** *Agricultural Microbiology PHI :* New Delhi : 440.

**Rastogi, B et Kishore, B (1997).** *A Complete Course in ISC Biology.* Pitambar Publishing: New Delhi : 592.

**Rao, M., Tanksale, A., Ghatge, M et Deshpande, V (1998).** *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.* *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-625.

**Raval, (2012).** *Biotransformation of a single amino acid L tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA.* Int JSci Res, 2: 2250–3153.

**Roy, S., Das, I., Munjal, M., Karthik, L., Kumar, G., et Kumar, S, et Rao, K (2014).** *Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment.* Front. Biol. 9 (4): 306–316.

## P

**Prinzis, S (1990).** *Isolement et caractérisation de d'actinomycétales. Purification et étude structurale de leurs métabolites antifongiques,* Thèse UCBL LYON I.

## S

**Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G et Pandey, A (2005).** *Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem.*, 40: 2689-2694.

**Sato, M et Kaji, A (1980).** *Another pectate lyase produced by streptomyces nitrosporeus. Agric. Biol. Chem.* 44:1345-1349.

**Shirling, B et Gottlieb, D (1966).** *Methods for characterization of Streptomyces species. Int J Syst Bacteriol*, 16(3): 313–340.

**Shirling, E et Gottlieb, D (1966) .** *Methods for characterization of streptomyces species. Int J syst bacteriol.* 16: 313-340.

**Smaoui, S (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France: 251.

**Song, J., Weon, Y., Yoon., S., Parrk, S et Suh, W (2001).** *Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS Microbiol Lett*, 202(1): 97–102.

**Solomon, E., Sundaram, U et Machonkin, T (1996).** *Multicopper oxidases and oxygenases. Chem Rev.*, 96: 2563-2606.

**Spooner, F et Hammerschmidt, R (1989).** *Characterization of extracellular pectic enzymes produced by Streptomyces sp. Phytopathology*: 79-1190.

**Stackebrandt, E., Rainey, F et Ward-Rainey, N (1997).** *Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int. Journal.Syst. Bacteriol.* Apr; 47(2): 479-491.

**Stamford, L., Stamford, P., Coelho, C et Araujo, M (2002).** *Production and characterization of a thermostable glucoamylase from Streptosporangium endophyte of maize leaves, Bioresour Technol* 83:105–109.

## T

**Staneck, J et Roberts, G (1974).** Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol*, 28(2): 226–231.

**Theilleux, J (1993).** *Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Leveau, J et Mouix, M et Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612 : 425.

**Thiagarajan, V., Revathia, R., Aparanjini, K., Sivamanic, P., Girilala, M., Priyad, C et Kalaichelvan, P (2011).** *Extracellular chitinase production by Streptomyces sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on Fusarium oxysporum PTK2 cell wall.* *Int. J. Curr. Sci.*1: 30-44.

## V

**Vonothini, G., Murigan, M., Sivakumar, K et Sudha, S (2008).** *Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond.* *Afr J Biotechnol.* 7 : 3225-3230.

**Vujaklija, D., Schroder, W et Abramic, M (2002).** *A novel Streptomyces lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the Streptomyces rimosus GDS (L)- lipase gene.* *Arch. Microbiol.* 178(2): 124–30.

## W

**Waksman, S (1959).** *The actinomycetes: nature, occurrence and activities.* *The Williams and Wilkins Company*, Baltimore, 1: 29–46.

**Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., Goodfellow, M et Rodriguez, C (2006).** *Streptacidiphilus pryzae* sp. Nov., an actinomycetes isolated from rice-field soil in Thailand. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 56 :1257-1261.

**Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, L., Moore, W., Murry, R., Stackebrandt, E et Trüper, H (1987).** *Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International Journal Systematic and evolutionary microbiology.* 37: 463-464.

**Willams, S et Davis, F (1965)** *.use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycètes in soil.*J Gen Microbiol. 38 : 251-26.

**Willams, S et Cross T (1971).** *Methods in microbiology. Academic press, London.* 4:295-334.

**Willams, S et Cross, T (1971).** *Methods in microbiology. Academic press, London.* 4: 295-334.

**Williams, S et Wellington, E (1982).** *Principales and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: Search and discovery. Academic Press, London:* 9-26.

**Williams, S., Lanning, S et Wellington, E (1984).** *Ecology of Actinomycetes. In: The Biology of the Actinomycetes. Eds : Goodfellow, M. et Mordarski , M. et Williams, S Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo:* 481–528.

## Z

**Zaitlin, B., Watson, S., Ridal, J., Satchwill, T et Parkinson, D (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can*, 95 (2): 113-118.

**Zaitlin, B., Watson, S.B. (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res*, 40(9): 1741–1753.

**Zaitlin, B. et Watson S.B. (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*,40:1747-1753.

**Zvyagintsev, D., Zenova, G., Sudnizin I et Doroshenko E (2005).** The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.

# Annexes

## Annexe 01- Composition des milieux pour l'isolement des actinomycètes :

### ➤ **Olson modifié :**

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Caseine .....                         | 2g     |
| L.Asparagine .....                    | 0,1g   |
| Sodium propionate .....               | 4g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 0,5g   |
| FeSO <sub>4</sub> .....               | 0,01g  |
| Agar .....                            | 15g    |
| ED.....                               | 1000ml |
| PH .....                              | 7,2    |

### ➤ **Amidon Caseine :**

|  |        |
|--|--------|
| Amidon.....                              | 10g    |
| KNO <sub>3</sub> .....                   | 2g     |
| Nacl.....                                | 2g     |
| Caséine.....                             | 0,3g   |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O..... | 0,05g  |
| CaCO <sub>3</sub> .....                  | 0,02g  |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O..... | 0,01g  |
| ED.....                                  | 1000ml |
| PH .....                                 | 7,2    |
| Agar .....                               | 18g    |

### ➤ **Gausse :**

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| KNO <sub>3</sub> .....                | 1g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 0,5g   |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 0,5g   |
| Nacl.....                             | 0,5g   |
| FeSO <sub>4</sub> .....               | 0,01g  |
| Amidon.....                           | 20g    |
| Agar.....                             | 30g    |
| ED .....                              | 1000ml |
| PH.....                               | 7,4    |

➤ **Czapek :**

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Saccharose .....                      | 30g    |
| Nitrate de sodium.....                | 2g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1g     |
| KCl .....                             | 0,5 g  |
| FeSO <sub>4</sub> .....               | 0,01 g |
| Agar.....                             | 15 g   |
| ED.....                               | 1000ml |
| PH.....                               | 7,3    |

**Annexe 02-** composition des milieux utilisés pour les tests enzymatiques

➤ **Gélose nutritive à la gélatine**

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Peptone.....           | 5 g     |
| Extrait de boeuf ..... | 3 g     |
| Gélatine.....          | 4 g     |
| Agar .....             | 15 g    |
| Eau distillée .....    | 1000 ml |
| PH.....                | 7       |

➤ **La gélosé au lait écrémé**

|  |         |
|--|---------|
| Peptone .....                                  | 10 g    |
| NaCl.....                                      | 5 g     |
| Extrait de levure.....                         | 3g      |
| Agar .....                                     | 20g     |
| Lait écrémé 100 g dans 1000 mL d'eau distillée |         |
| pH .....                                       | 6.5-7.2 |

➤ **la gélose à la tyrosine**

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Peptone .....          | 5g  |
| Extrait de viande..... | 3g  |
| L-tyrosine.....        | 5g  |
| Agar .....             | 20g |

Eau distillée .....1000 ml

PH.....7

### **Annexe 03- réactifs**

#### **La solution de chlorure de mercure**

HgCl<sub>2</sub>.....15g

HCl concentré .....20 ml

Eau distillée .....100 ml

#### **La solution de Lugol :**

Iode.....1g

Iodure de potassium.....2g

Eau distillé.....300ml

Isolement d'actinomycètes à partir de deux échantillons de sol et la mise en évidence de quelques activités enzymatiques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie général et Biologie Moléculaire des Microorganismes

**Résumé :**

Notre travail s'est intéressé en premier lieu, à l'isolement d'actinomycètes à partir de deux sols différents. Les échantillons prélevés ont subi différents traitements avant être ensemencés sur quatre milieux de culture différents supplémentés par deux substances antimicrobiennes. Les résultats montrent que le traitement par le CaCO<sub>3</sub> favorise l'isolement de ces microorganismes beaucoup plus que le chauffage à 100°C. Les milieux amidon-caséine et Olson se sont montrés les plus favorables au développement d'actinomycètes.

La deuxième étape a été consacrée à la mise en évidence de l'aptitude des 21 souches sélectionnées parmi les 75 isolées à produire quatre enzymes qui sont, l'amylase ; la caséinase ; la gélatinase ; la tyrosinase. La plupart des souches a donné des résultats positifs ce qui démontre leur importance. La tyrosinase est l'enzyme la plus produite par nos souches suivie par l'amylase puis la gélatinase et la caséinase.

**Mots clés :** actinomycètes, isolement, activité enzymatique, amylase, caséinase, gélatinase, tyrosinase.

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de microbiologie N°14

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mme Oulmi-L. (Maitre de conférences B - UFM Constantine)

**Rapporteur :** Mme Reghioua . (Maitre- assistants A - UFM Constantine)

**Examineur :** Melle Abdlaziz-W.(Maitre- assistants A - UFM Constantine)

**Date de soutenance :** 01/07/2018