



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

**قسم :** الميكروبيولوجيا

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

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

---

## **Production de l'acide indole acétique par *Streptomyces laquirus***

---

**Préparé par :** HIRECHE Imene

**Le :** 19/09/2021

**DAHOUAS Khadija**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** BOUDEMAGH A. (Prof. UFM Constantine).

**Rapporteur :** KITOUNI M. (Prof. UFM Constantine).

**Examineurs :** OULMI L. (MCB UFM Constantine).

*Année universitaire  
2020- 2021*

## **Remerciement**

Nous remercions notre promoteur le Professeur Kitouni M. qui nous a accompagné le long de ce travail avec une grande patience et beaucoup d'enthousiasme et qui nous a aidé et encouragé à terminer ce travail de recherche. Nous tenons à remercier les membres du jury pour leur présence, pour leur lecture attentive de notre mémoire.

Nous remercions profondément Mme Oulmi pour sa précieuse aide, ces conseils et le temps qu'elle nous a accordé.

Nous tenons à témoigner notre profonde gratitude envers tous les enseignants qui ont contribué, durant ces cinq dernières années, à notre formation et à tous ceux qui nous ont aidés.

## **Dédicaces**

Je dédie mon modeste travail à mes parents pour leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études.

A ma grand-mère maternelle que j'estime beaucoup

A mes frères, ma sœur, mes tantes

Qui m'ont aidés et soutenues dans mes études et m'encouragent à travailler d'avantage.

**Imene**

## **Dédicaces**

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien  
et leurs prières tout au long de mes études,

**Khadija**

## ملخص

حمض الإندول الخلي هو هرمون نباتي يعمل على تحفيز النمو عند النباتات موجود عند العديد من الأنواع البكتيرية. تعتبر الأكتينومييسيتات من بين الكائنات الحية الدقيقة في التربة التي تنتج هذا الهرمون. لأجل إيجاد أفضل الظروف الملائمة لإنتاج ال AIA تمت الزراعة في أوساط مختلفة من حيث قيم pH (7,5 و 9) و تراكيز NaCl (5% و 10%) كما تم تلقيحها بنسبتين مختلفتين من التراكيز الخلوية (1% و 2%) و كذا احتضانها في درجتين مختلفتين (30°C و 40°C). تم إجراء اختبار إنتاج AIA بعد 4 و 8 أيام من الحضانه عن طريق تطبيق طريقة القياس اللوني التي وصفها Brick et al., 1991، والتي تستخدم كاشف Salkowski. وجدنا أن السلالة قادرة على إنتاج حامض الإندول الخلي، وأن الكمية المنتجة تصل إلى الحد الأقصى (31.12 ميكروغرام / مل) بعد 8 أيام من الحضانه عند 30 درجة مئوية ، عند درجة الحموضة 7 ، والتركيز 5% من NaCl ، و استعمال لقاح ميكروبي 2%.

الكلمات المفتاحية: حمض الإندول الخلي، الأكتينومييسيتات ، الهرمونات النباتية ، *Streptomyces laquirus*.

## Résumé

L'acide indole acétique est une phytohormone qui stimulent la croissance des plantes et que plusieurs espèces bactériennes possèdent la capacité de produire. Les actinomycètes sont parmi les microorganismes du sol producteur de cette hormone. L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité de *Streptomyces laquirus* à produire l'AIA. La souche est cultivée dans des milieux à différentes valeurs de pH (7,5 et 9), et de concentration en NaCl (5% et 10%), les milieux sont inoculés à 1% et 2%, et incubés à 30 °C et 40 °C afin de trouver les conditions les plus favorables pour la production. Le dosage de l'AIA est réalisée après 4 et 8 jours d'incubation en appliquant la méthode colorimétrique décrite par Brick *et al.*, (1991) qui utilise le réactif de Salkowski. Nous avons trouvé que la souche est capable de produire l'acide indole acétique, et que la quantité produite atteint le maximum (31,12 µg/ml) après 8 jours d'incubation à 30 °C, à pH 7, concentration 5% de NaCl, et en inoculant le milieu à 2%.

**Mots clés :** Acide indole acétique, Actinomycètes, phytohormones, *Streptomyces laquirus*.

## **Abstract**

Indole acetic acid is a plant growth stimulating phytohormone that several bacterial species have the ability to produce. Actinomycetes are among the soil microorganisms that produce this hormone. The objective of our work is to study the ability of *Streptomyces laquirus* to produce IAA. The strain is cultivated in media with different pH values (7.5 and 9), and NaCl concentration (5% and 10%), the media are inoculated at 1% and 2%, and incubated at 30 °C and 40 °C in order to find the most favorable conditions for production. The IAA assay is performed after 4 and 8 days of incubation by applying the colorimetric method described by Brick *et al.*, (1991) which uses the Salkowski reagent. We found that the strain is able to produce indole acetic acid, and that the amount produced reaches the maximum (31.12 µg / ml) after 8 days of incubation at 30 ° C, at pH 7, concentration 5% of NaCl, and inoculating the medium at 2%.

**Key words:** Indole acetic acid, Actinomycetes, phytohormones, *Streptomyces laquirus*.

## **Liste des abréviations**

**AIA** : Acide indole-3-acétique

**PGPR** : Plant Growth Promoters Rhizobacteria

**IPA** : Indole-3-acide-pyruvique

**IAM** : Indole-3-acétamide

**IAN** : Indole-3-acetonitrile

**IAAld** : Indole-3-acétaldehyde

**ISP** : International Streptomyces Project

**DO** : Densité optique



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> La composition des différents milieux de culture pour les fermentations... 14	
<b>Tableau 2.</b> Caractères culturaux de la souche <i>Streptomyces laquirus</i> sur les différents milieux de culture ..... 16	
<b>Tableau 3.</b> Caractères microscopiques de <i>Streptomyces laquirus</i> après 7, 14, et 21 jours d'incubation ..... 18	
<b>Tableau 4.</b> Caractères culturaux sur bouillon tryptophane après 8 jours d'incubation. 22	

## Liste des figures

- Figure 1.** Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaires et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$  (Belyagoubi, 2014). ..... 3
- Figure 2.** Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000). ..... 4
- Figure 3.** Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulants (Barka *et al.*, 2016). ..... 7
- Figure 4.** Structure chimique de l'acide indole 3-acétique (AIA) (Paque, 2013). ..... 10
- Figure 5. Différentes voies de biosynthèse de l'AIA à partir de son précurseur (Giroux, 2015). ..... 11
- Figure 6.** Courbe étalon de l'AIA (Monita *et al.*, 2014) ..... 15
- Figure 7.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu DSMZ 65 A. après 7 jours B. après 14 jours C. après 21 jours ..... 17
- Figure 8.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu glucose-asparagine A. après 7 jours B. après 14 jours C. après 21 jours ..... 17
- Figure 9.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu ISP5 A. après 7 jours B. après 21 jours ..... 17
- Figure 10.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu ISP7 après 21 jours . 18
- Figure 11.** Observation sous microscope optique G $\times$ 100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 7 jours d'incubation. A. Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 19
- Figure 12.** Observation sous microscope optique G $\times$ 100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 14 jours d'incubation. A. Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 20
- Figure 13.** Observation sous microscope optique G $\times$ 100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 21 jours d'incubation. A. Mycélium du substrat B. Spores 20
- Figure 14.** Observation sous microscope optique G $\times$ 100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu glucose-asparagine) après 7 jours d'incubation. A. Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 20
- Figure 15.** Observation sous microscope optique G $\times$ 100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles

sur milieu glucose-asparagine) après 14 jours d'incubation. A.Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores..... 20

**Figure 16.** Observation sous microscope optique G×100 de mycélium du substrat de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu glucose-asparagine) après 21 jours d'incubation. ... 21

**Figure 17.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP5) après 7 jours d'incubation. A.Mycélium du substrat B. Mycélium aérien ..... 21

**Figure 18.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP5) après 14 jours d'incubation. A.Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 21

**Figure 19.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP7) après 7 jours d'incubation. A.Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 22

**Figure 20.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au de bleu méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP7) après 21 jours d'incubation. A.Mycélium du substrat B. Mycélium aérien C. Spores ..... 22

**Figure 21.** Cultures sur bouillon tryptophane après 8 jours d'incubation ..... 23

**Figure 22.** Effet du pH sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. A. Concentration d'AIA produite après 4 jours. B. Concentration d'AIA produite après 8 jours ..... 24

**Figure 23.** Effet de la concentration en NaCl sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. A. Concentration d'AIA produite après 4 jours. B. Concentration d'AIA produite après 8 jours ..... 24

**Figure 24.** Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. A. Concentration d'AIA produite après 4 jours. B. Concentration d'AIA produite après 8 jours... 25

**Figure 25.** Effet de la température sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. A. Concentration d'AIA produite après 4 jours. B. Concentration d'AIA produite après 8 jours... 26

**Figure 26.** Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. A. Concentration d'AIA produite après 4 jours. B. Concentration d'AIA produite après 8 jours... 27

## Table des matières

Remerciement	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Table des matières	
Introduction.....	1

### Revue bibliographique Chapitre 1 : Les Actinomycètes

1. Historique .....	2
2. Généralités.....	2
3. Morphologie .....	3
4. Physiologie .....	4
5. Ecologie et distribution dans la nature .....	5
5.1. Le sol.....	5
5.2. Les eaux marines.....	6
5.3. Les eaux douces .....	6
5.4. L'air.....	6
5.5. Les composts.....	6
6. Cycle biologique des actinomycètes .....	7
6.1. La germination des spores.....	7
6.2. La formation du mycélium primaire .....	7
6.3. La formation du mycélium secondaire.....	7
6.4. La formation des spores .....	8
7. Le genre <i>Streptomyces</i> .....	8
8. Les intérêt des actinomycètes .....	9
8.1. La production d'antibiotiques .....	9
8.2. La production d'enzymes .....	9
8.3. D'autres produits.....	9

### Chapitre 2 : L'acide indole acétique

1. L'acide indole acétique.....	10
1.1. Le rôle de l'acide indole acétique .....	10
1.2. La biosynthèse de l'acide indole acétique.....	11

1. Le matériel biologique .....	13
2. Etude morphologique.....	13
2.1. Etude macroscopique .....	13
2.2. Etude microscopique.....	13
3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA).....	13
3.1. Préparation de réactif du Salkowski.....	14
3.2. Dosage de l'AIA .....	14
1. Etude morphologique.....	16
1.2. Etude macroscopique .....	16
1.3. Etude microscopique.....	18
2. Production de l'acide indole acétique .....	22
2.1. Effet du pH sur la production d'AIA .....	23
2.2. Effet du pourcentage en NaCl sur la production d'AIA .....	24
2.3. Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA .....	25
2.4. Effet de la température sur la production d'AIA .....	25
Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	31
Annexes	

Les actinomycètes sont un groupe de bactéries filamenteuses ubiquitaires, mais sont plus abondants dans le sol que dans les autres écosystèmes. Ils sont une grande source de substances d'intérêt biotechnologique, car ils ont la capacité de produire des molécules à activités biologiques variées, comme des agents anti tumoraux, des antiviraux, des inhibiteurs d'enzymes, des insecticides, ou des antibiotiques.

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* produisent 70 à 80% des substances bioactives naturelles utilisées dans le domaine pharmaceutique ou agrochimique, mais les antibiotiques restent le produit le plus important synthétisé par ce genre. Il existe plus de 60 molécules à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* utilisées dans le monde de l'agriculture, de l'industrie, et dans la médecine vétérinaire et humaine.

L'acide indole acétique (AIA) est un autre produit très intéressant que plusieurs espèces actinomycétales possèdent la capacité de produire. Le principal rôle de cette phytohormone dans la rhizosphère lorsqu'elle est sécrétée par des actinomycètes appartenant au groupe des PGPR (ou Plant Growth Promoters Rhizobacteria) est la stimulation de la croissance des plantes en favorisant par exemple l'élongation et la division cellulaire, l'initiation des racines, la production d'éthylène, le développement des fruits...etc.

Il est aussi rapporté que l'acide indole acétique est une molécule de signalisation car il affecte l'expression des gènes dans divers microorganismes. Plusieurs études ont montré aussi que l'AIA favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. L'acide indole acétique est produit sous forme de métabolite secondaire à partir du tryptophane le principal précurseur, mais il existe aussi des voies indépendantes du tryptophane pour le synthétiser.

Au cours de ce présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche de la production et le dosage de l'acide indole acétique chez l'espèce *Streptomyces laquirus*, et l'influence du pH, de la concentration en NaCl, de la taille de l'inoculum, de la température et la durée d'incubation sur cette production.

# **Revue bibliographique**

## Chapitre 1 : Les Actinomycètes

### 1. Historique

Le premier actinomycète a été décrit par Ferdinand Cohn en 1875. L'histoire des actinomycètes a été divisée par Waksman en quatre périodes, la première allant de 1874 à 1890, se rapporte à la découverte de leur rôle dans la pathologie. La seconde va de 1900 aux années 1919, s'attache à l'isolement et l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman, et de Curtis. Puis suit la période de l'étude des caractères bactériologiques de ces microorganismes entre les années 1919 et 1940. La dernière, allant de 1940 jusqu'à nos jours, se rapporte à l'étude de la capacité de ces bactéries à produire des antibiotiques (Harir, 2018).

### 2. Généralités

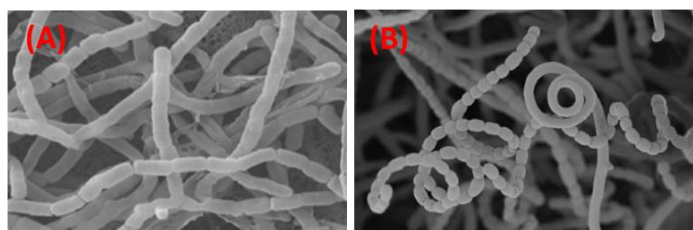
Le terme actinomycète dérive des mots grecs (aktis ou aktin) qui veut dire «rayon» et (mukes) qui veut dire «champignons». Auparavant, les actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre les champignons et les bactéries (Barka *et al.*, 2016), car beaucoup d'entre eux forment des filaments comme les mycètes filamenteux tels que les genres *Frankia*, *Actinomyces*, et *Strptomyces*, certains se reproduisent par des spores asexuées externes comme les moisissures (Tortora *et al.*, 2012). Actuellement ils sont reconnus comme des organismes procaryotes et classés parmi les bactéries, car leur cellules ne possèdent pas de noyau distinct, leur paroi est constituée de peptidoglycane, en plus de leur sensibilité aux agents antibactériens (Barka *et al.*, 2016).

Les actinomycètes sont un groupe de bactéries formant des filaments minces ramifiés, septés, bacilles à coloration de Gram positive, saprophytes, possédant un taux élevé en guanine-cytosine (GC) compris entre 60-70%. Leur croissance donne naissance à des colonies constituées d'hyphes (Harir, 2018). Ils sont impliqués dans la décomposition de la matière organique, produisent des substances biologiquement actives comme les antibiotiques, les enzymes et les vitamines. Certaines espèces sont capables de produire des substances antifongiques et donc jouent un rôle dans le contrôle phytopathologique (Ameur, 2014).



### 3. Morphologie

Morphologiquement, les actinomycètes ressemblent beaucoup aux champignons. Cependant, le diamètre des hyphes, généralement de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$ , est deux à dix fois plus petit que celui des mycètes. Le mycélium peut être rudimentaire au point d'être inexistant (*Mycobacterium*), fugace qui se fragmente comme chez quelques espèces du genre *Nocardia*, ou un mycélium développé et persistant comme chez les espèces du genre (*Streptomyces*) (Belyagoubi, 2014).



**Figure 1.** Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaires et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$  (Belyagoubi, 2014).

Le mycélium permanent des actinomycètes peut être organisé en mycélium du substrat et/ou mycélium aérien. Le mycélium du substrat est constitué d'un ensemble d'hyphes résultant de la germination des spores, il se développe sur la surface et à l'intérieur du milieu solide. Alors que le mycélium aérien se forme après, à partir des hyphes primaires qui donnent des branches spécialisées se développant loin des colonies et formant dans l'air un mycélium dans lequel se trouve les spores (Zerizer, 2014).

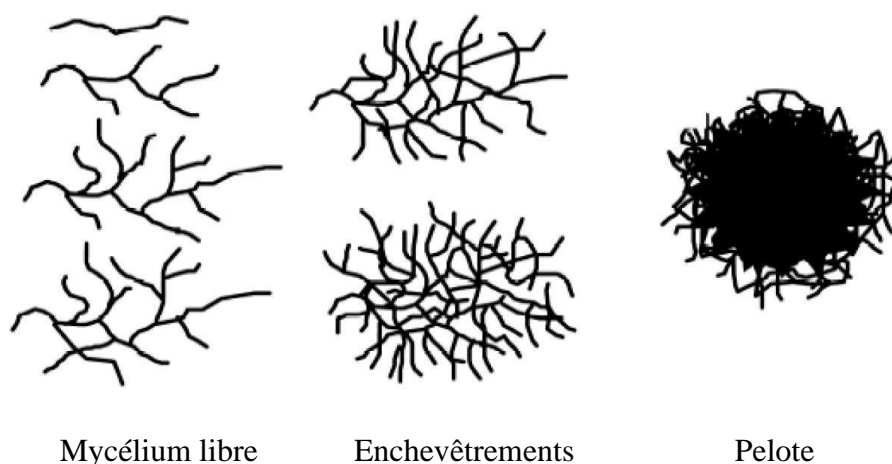
Certains actinomycètes présentent seulement le mycélium du substrat comme le genre *Frankia*, d'autres forment le mycélium du substrat puis le mycélium aérien mûri en conidies comme les *Streptomyces*. Le genre *Sporichthya* est le seul parmi les actinomycètes qui ne possède que le mycélium aérien, et s'attache aux milieux en utilisant des crampons (Belyagoubi, 2014).

La majorité des actinomycètes sont immobiles. Toutefois, certains possèdent des spores flagellées (appelées zoospores), qui leur permettent de se disperser dans les milieux aquatiques. Les spores produites par les actinomycètes peuvent être isolées (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en longues chaînettes (*Streptomyces*), ou en courtes chaînettes (*Actinomadura*). La surface des spores

est aussi diverse, elle peut être lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu. Certaines espèces d'actinomycètes possèdent un sporange où les spores sont contenues, il se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (Belyagoubi, 2014).

Les colonies d'actinomycètes filamenteux qui se forment sur milieu solide sont constituées d'hyphes ramifiés. Le diamètre de ces colonies est de 1 à 10 mm. Elles peuvent être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisse ou échancrés. Généralement, les colonies possèdent une pigmentation, la couleur de pigment varie selon les espèces (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc...) (Belyagoubi, 2014).

En milieu liquide sans agitation, les hyphes qui se forment après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air. Alors que, en milieu liquide avec agitation les spores et le mycélium aérien ne se forment pas. Les *Streptomyces* par exemple, forment des agrégats constitués de filaments libres qui se ramifient et s'entremêlent (figure 2.) (Belyagoubi, 2014).



**Figure 2.** Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

Les spores asexuées, appelées conidies, peuvent être organisées sous forme de courtes chaînes contenant 20 spores ou moins par chaîne, de longues chaînes contenant plus que 20 spores, ou bien rassemblées en synnemata. Il existe aussi certaines espèces possédant une paire de conidies tel le genre *Microbispora*, et d'autres avec seulement une conidie comme chez le genre *Micromonospora* (Belyagoubi, 2014).

#### 4. Physiologie

Physiologiquement, les actinomycètes sont divisés en deux groupes. Le premier comprend des organismes fermentatifs, anaérobies strictes ou facultatifs, représenté par

le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes des cavités naturelles de l'homme et des animaux. Le deuxième groupe comprend des organismes oxydatifs, aérobies (*Streptomyces* par exemple) colonisant principalement le sol et à partir duquel ils sont dispersés, en particulier dans l'air.

Généralement les actinomycètes sont des chimioorganotrophes tirant l'énergie de diverses sources y compris les polymères complexes. Mais il existe plusieurs espèces chimioautotrophes qui utilisent l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Aouar, 2012).

Beaucoup d'actinomycètes ont une activité antimicrobienne, ils sont souvent bactériolytiques et producteurs d'un grand nombre d'antibiotiques au cours de leurs croissance (Boudemagh, 2007). Ils interviennent également dans la décomposition de la cellulose et de la lignine (Aouar, 2012).

Les *Streptomyces* par exemple, sont connus pour leur production d'antibiotiques tels que les tétracyclines, le chloramphénicol, la streptomycine et l'érythromycine. Ils sont responsables aussi de l'odeur caractéristique du sol humide, due à la production de gésomines (Perry *et al.*, 2004).

## 5. Ecologie et distribution dans la nature

### 5.1. Le sol

Le sol constitue l'habitat le plus important des actinomycètes. En réalité, ils représentent 80% des microorganismes présents dans la couche superficielle du sol. Leur densité est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^9$  UFC/g du sol, où le genre *Streptomyces* est le plus abondant représentant 95% des actinomycètes présents dans cet écosystème. Toutefois, ces valeurs sont influencées par divers facteurs comme la nature du sol, la température, le taux de la matière organique, et le pH. La plupart sont mésophiles, avec croissance optimale entre 25°C et 30°C (Kitouni, 2007). Cependant, il existe des espèces thermophiles capables de croître à des températures situées entre 50°C et 60°C (Barka *et al.*, 2016). En générale, les actinomycètes sont des bactéries neutrophiles, leur croissance est meilleur à pH compris entre 6 et 9, avec un maximum autour de la neutralité. Toutefois, certaines espèces appartenant au genre *Streptomyces* ont été isolées à partir de sol acide, capables de croître à des pH compris entre 3,5 et 6,5 (Kitouni, 2007).

Les actinomycètes colonisent aussi la rhizosphère, la partie du sol entourant les racines. Dans cette rhizosphère, plusieurs actinomycètes font partie de groupe de microorganismes appelé PGPR (ou Plant Growth Promoters Rhizobacteria), c'est un groupe important de communauté bactérienne qui stimule la croissance des plantes. Divers actinomycètes peuvent agir contre les microorganismes pathogènes grâce à leurs caractères compétitifs, beaucoup d'entre eux produisent des antibiotiques inhibant les phytopathogènes. Certains vivent en symbiose avec les plantes supérieures, formant des associations appelées actinorhizes au niveau des racines, ce sont des nodules fixatrices d'azote (transformation de l'azote atmosphérique en une forme assimilable par les plantes comme chez le genre *Frankia*) (Loqman, 2009).

### **5.2. Les eaux marines**

Des espèces d'actinomycètes ont été isolées des milieux marins, mais leur origine n'est toujours pas claire. Certains actinomycètes tolèrent la pression, la salinité, et capable de croître à des températures faibles colonisant ainsi les sédiments marins. Des *Nocardioformes* ont été isolés à plus de 2000 m de profondeur, où la pression atteint 500 bars et à 18°C (Saci, 2011).

### **5.3. Les eaux douces**

Les actinomycètes ont été également trouvés dans les eaux douces dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres, principalement les souches de *Microbispora*, d'*Actinoplane*, et de *Streptosporangium* où ils sont impliqués dans la décomposition des débris végétaux (Saci, 2011).

### **5.4. L'air**

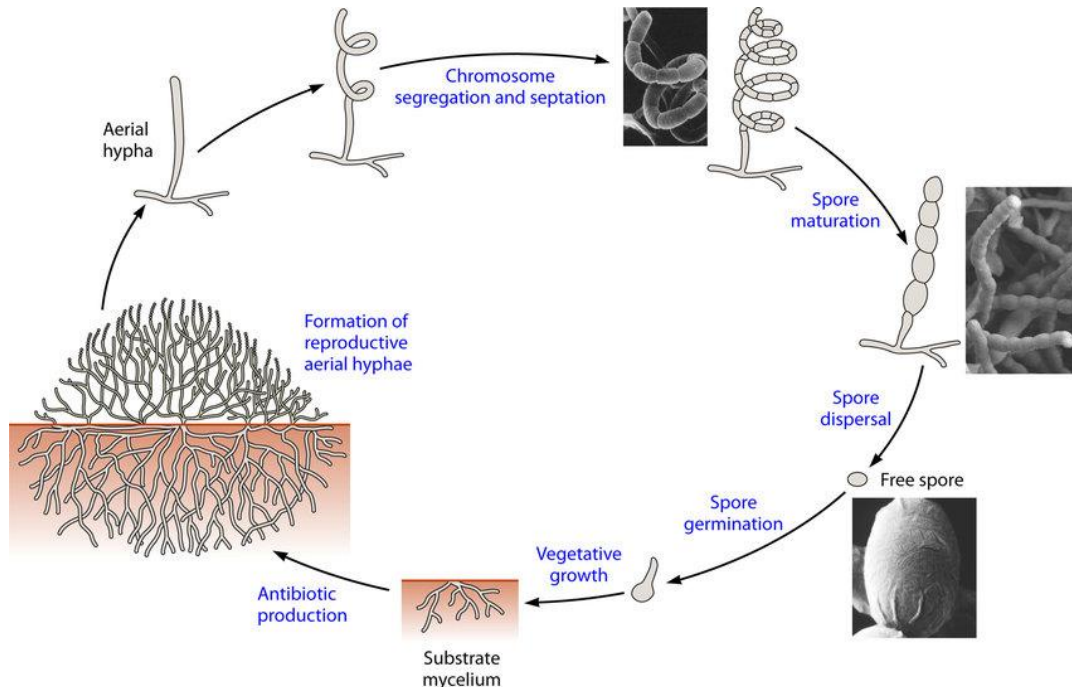
L'air ne constitue pas un habitat pour les actinomycètes, mais un moyen de transport des spores. Ces spores sont des contaminants importants de notre environnement, elles peuvent provoquer des maladies respiratoires si elles sont inhalées (Saci, 2011).

### **5.5. Les composts**

Les actinomycètes sont présents en grand nombre dans le compost, principalement les espèces thermophiles tels que les *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* (Chavan *et al.*, 2013).

## 6. Cycle biologique des actinomycètes

Les actinomycètes sont des organismes avec une structure procaryotique. Cependant, leur cycle biologique est similaire à celui de certains champignons (figure 3).



**Figure 3.** Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulants (Barka *et al.*, 2016).

### 6.1. La germination des spores

Le cycle de développement commence par la germination des spores, elle s'effectue en quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence puis la croissance du tube germinatif. Chez certaines espèces, l'activation peut être entraînée par un choc thermique (Boudemagh, 2007).

### 6.2. La formation du mycélium primaire

Il se développe sur et dans le support solide à partir du tube germinatif qui va croître et donner des hyphes qui se ramifient intensément. Ce mycélium est fragmenté chez les *Nocardioformes* en éléments dont chacun devient un centre de croissance (Kitouni, 2007).

### 6.3. La formation du mycélium secondaire

Le mycélium secondaire, appelé aussi aérien, se développe sur le mycélium primaire. Les hyphes constituant ce mycélium, sont généralement pigmentés et pourvus d'une enveloppe hydrophobe (Kitouni, 2007).

### 6.4. La formation des spores

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores qui se forment par septation des hyphes, comme chez les *Streptomyces*, ou bien des endospores produites par formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe après réorganisation du cytoplasme (Kitouni, 2007).

## 7. Le genre *Streptomyces*

*Streptomyces* est le genre type de la famille de *Streptomycetaceae*, il contient 1890 espèces et 114 sous espèces. Ils colonisent tous les écosystèmes, mais sont plus abondants dans le sol (Zerizer, 2014). La plupart des espèces appartenant à ce genre sont mésophiles (température optimale de croissance située entre 25 °C et 35 °C), mais il existe aussi quelques espèces psychrophiles et thermophiles. Leur pH optimal est situé entre 6 et 8. Ils sont capables d'utiliser un grand nombre de substances organiques comme sources de carbone et d'énergie (Harir, 2018).

Les colonies du genre *Streptomyces* ont une forme lichenoïde. Elles possèdent une surface lisse au début de leur croissance, mais le mycélium aérien qui se forme tout au long de leur développement leur donne un aspect floconneux, granuleux, poudreux ou velouté. La couleur du mycélium aérien permet la classification des *Streptomyces* sp. en sept séries : rouge (bronze, rose et rose pâle), jaune (jaunâtre à jaune-verdâtre), vert (verdâtre à gris-verdâtre pâle), bleu (bleuâtre à bleu-grisâtre pâle), violet, gris (de gris à brun) ou blanc. La couleur du mycélium du substrat est aussi utilisé pour différencier les colonies, elle peut être : jaune brunâtre, jaune brunâtre et rouge (orange), jaune brunâtre et bleu ou violet, jaune brunâtre et vert (Zerizer, 2014).

Le mycélium primaire des *Streptomyces* est formé de filaments de 0,5 à 2,0 µm de diamètre, il est très ramifié, et généralement non cloisonné. Les spores sont immobiles et leur forme diffère selon les espèces (rondes, ovales ou cylindriques). Les chaînes de spores qui se forment peuvent être de forme droites, flexibles, rectiflexibles ou spirales, monoverticillées ou biverticillées, droites ou en spires (Zerizer, 2014).

Beaucoup de *Streptomyces* ont la capacité à coloniser les racines des plantes hôtes et sont antagonistes des champignons telluriques, ce qui favorise leur utilisation en agriculture. En effet, 60% des composés antimicrobiens utilisés dans le domaine de l'agriculture sont produits par le genre *Streptomyces* (Harir, 2018). Ils sont producteurs d'un grand nombre d'enzymes d'intérêt biotechnologique (comme par exemple la xylose

isomérase issue d'un Streptomycète thermophile) et d'antibiotiques (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), et sont impliqués dans la dégradation de polymères et de polluants organiques (Belyagoubi, 2014).

## **8. Les intérêt des actinomycètes**

### **8.1. La production d'antibiotiques**

Les actinomycètes sont connues d'être la plus importante source d'antibiotiques, ils sont responsables des deux tiers d'antibiotiques isolés jusqu'ici (par exemple anthracyclines, aminoglycosides, bêta-lactamines, chloramphenicol, macrolides, tetracyclines). Parmi les antibiotiques synthétisés par les actinomycètes, 80% sont produits par le genre *Streptomyces*.

Ils sont aussi une source de substances antitumorales : actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine (Barka *et al.*, 2016).

### **8.2. La production d'enzymes**

Les actinomycètes produisent un grand nombre d'enzymes pouvant avoir des applications dans le domaine industriel. Par exemple les cellulases synthétisées chez les *Streptomyces*, les ligninases produites par beaucoup d'espèces telles que *Streptomyces thermoviolaceus*, les pectinases (*Actinoplanes*), les chitinases (*Microbispora*), et les protéases (*Micropolyspora*) etc. (Barka *et al.*, 2016).

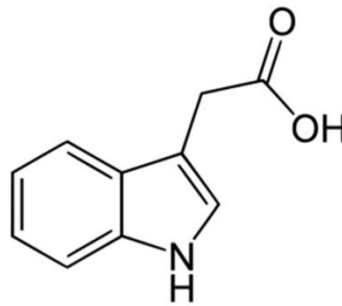
### **8.3. D'autres produits**

Les actinomycètes produisent divers autres produits permettant leur utilisation comme des insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine) et des substances à activité immunosuppressives et immunostimulantes comme la rapamycine et le FK 500 (Saci, 2011).

## Chapitre 2 : L'acide indole acétique

### 1. L'acide indole acétique

L'acide indole acétique (AIA) est l'hormone végétale la plus abondante dans la nature de la classe d'auxine. Cette phytohormone est naturellement synthétisée par les plantes, mais il est rapporté qu'environ 80% de microorganismes provenant de rhizosphère (bactéries, mycètes) sont capables de produire l'AIA sous forme de métabolite secondaire à partir du tryptophane comme principal précurseur. Cependant, la documentation de la production d'IAA par les bactéries Gram positive est rare. Parmi les genres bactériens producteurs de l'acide indole acétique on retrouve : *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium* et *Bacillus*. Il est formé d'un noyau indole et une courte chaîne latérale portant le groupement carboxyle (figure 4) (Paque, 2013 ; Giroux 2015).



**Figure 4.** Structure chimique de l'acide indole 3-acétique (AIA) (Paque, 2013).

#### 1.1. Le rôle de l'acide indole acétique

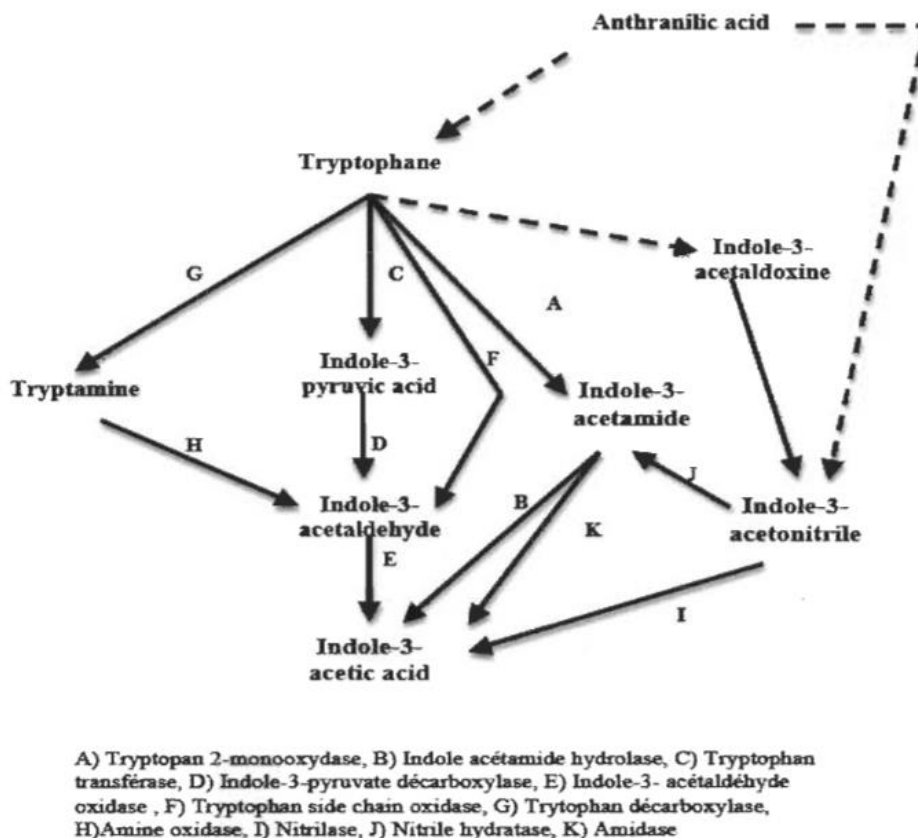
L'AIA influence principalement le développement des plantes, il est impliqué dans plusieurs aspects de leur croissance, en stimulant par exemple l'élongation et la division cellulaire, l'initiation des racines, la production d'éthylène, le développement des fruits, et aide aussi à la production de racines plus longues avec une augmentation du nombre des poils racinaires conduisant à une meilleure disponibilité en eau et en nutriments. Plusieurs études ont montré que l'AIA est une molécule de signalisation parce qu'il affecte l'expression des gènes dans divers microorganismes. Il est aussi rapporté que l'acide indole acétique favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère (Narula *et al.*, 2006 ; Mohite, 2013 ; Giroux, 2015).



## 1.2. La biosynthèse de l'acide indole acétique

Les plantes synthétisent l'AIA selon diverses voies, dépendantes du tryptophane, ou indépendantes du tryptophane en utilisant généralement l'indole et l'indole-3-glycérol phosphate comme précurseurs dans ce cas pour la biosynthèse. Plusieurs sous voies sont connues à côté de la voie tryptophane-dépendante comme la voie de l'indole-3-acétamide, de l'indole-3-pyruvic acide, de la tryptamine et de l'indole-3-acétaldoxine.

Chez les microorganismes, plusieurs voies de biosynthèse de l'AIA existent, dont le tryptophane constitue le précurseur principale. Un microorganisme peut avoir plus qu'une voie de biosynthèse. IPA (l'indole-3-acide-pyruvique), IAM (l'indole-3-acétamide), et IAN (indole-3-acetonitrile) sont considérées comme les majeures voies de synthèse de l'acide indole acétique chez les bactéries (figure 5).



**Figure 5.** Différentes voies de biosynthèse de l'AIA à partir de son précurseur (Giroux, 2015).

La voie de l'IAM est la mieux caractérisée, où le tryptophane est en premier lieu converti par tryptophan-2-monooxygénase en IAM, ensuite cet IAM est transformé en AIA par l'activité de IAM hydrolase. Cette voie est utilisée généralement par les bactéries pathogènes, elle est retrouvée chez les phytopathogènes provoquant des tumeurs chez la

plant hôte comme *P. syringae* spp. *savastoni*, *P. agglomerans* spp. *gypsophilliae* et *Agrobacterium tumefaciens*. Les PGPR utilisent principalement la voie de l'IPA, dans laquelle le tryptophane est premièrement convertit en IPA par l'activité d'aminotransférase, ensuite cet IPA sera carboxylé, et transformé en indole-3-acétaldéhyde (IAAld) par l'indole-3-pyruvate décarboxylase, et enfin la dernière étape est l'oxydation de IAAld pour arriver à l'AIA. Plusieurs facteurs environnementaux influencent la biosynthèse de l'acide indole acétique par les bactéries rhizosphériques, tels que le pH acide, le stress osmotique, ou la limitation du carbone. Des conditions de pH élevé et de grande quantité de tryptophane augmentent la production de l'AIA (Mohite, 2013 ; Giroux, 2015 ; Shih-Feng *et al.*, 2015 ; Bunsangiam *et al.*, 2019).

# **Matériels et méthodes**

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et applications au biopôle Chaab Erssas Université Frères Mentouri Constantine 1 sous la directive du Pr. M. Kitouni.

### 1. Le matériel biologique

Dans notre étude, nous avons utilisé la souche actinomycétale, *Streptomyces laquirus* de la collection du laboratoire conservée à -18 °C. La mise en culture de la souche est effectuée sur milieu ISP5 à partir de tube de conservation.

### 2. Etude morphologique

#### 2.1. Etude macroscopique

La détermination des caractères culturels est effectuée sur les milieux : ISP 5, ISP 7, DSMZ 65, et glucose-asparagine que nous avons préparé (annexe) et stérilisé à 121 °C pendant 20 min. Les milieux sont ensemencés par stries en surface ensuite incubés à 30 °C et observés après 7, 14, et 21 jours. Le milieu ISP 7 est utilisé pour mettre en évidence la production de pigments mélanoides.

#### 2.2. Etude microscopique

L'observation microscopique des mycéliums du substrat, aérien, et des spores est réalisée selon la technique des lamelles décrite par Williams et Cross (1971). Elle consiste en l'insertion délicatement d'une lamelle stérile dans les milieux gélosés de telle façon qu'elle forme un angle de 45 degrés. Le milieu est ensemencé à l'intersection lamelle-gélose. Après incubation à 30 °C, une lamelle est retirée après 7, 14, et 21 jours de chaque milieu et est déposée soigneusement sur une lame. Après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol on observe au microscope optique G×100 à immersion.

### 3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

La capacité de la souche à produire l'acide indole acétique est testé en bouillon tryptophane (annexe). Nous avons préparé 50 ml de milieu de culture dans 8 flacons à différentes valeurs de pH (7,5 et 9) et concentration en NaCl (10% et 5%). L'inoculum est préparé dans un erlenmeyer contenant l'eau physiologique stérile à partir de spores raclées des cultures sur milieu ISP5. À l'aide de spectrophotomètre nous avons mesuré la DO à 660 nm. Les milieux sont inoculés à 1% et 2% ensuite incubés à 30 °C et 40 °C (tableau 2).

**Tableau 1.** La composition des différents milieux de culture pour les fermentations.

Milieu	NaCl (%)	pH	Inoculation (%)	Température d'incubation (°C)
M <sub>1</sub>	10%	7,5	2%	30 °C
M <sub>2</sub>	10%	9	1%	30 °C
M <sub>3</sub>	5%	7,5	2%	30 °C
M <sub>4</sub>	5%	9	1%	30 °C
M <sub>5</sub>	5%	7,5	1%	40 °C
M <sub>6</sub>	5%	9	2%	40 °C
M <sub>7</sub>	10%	7,5	1%	40 °C
M <sub>8</sub>	10%	9	2%	40 °C

### 3.1. Préparation du réactif de Salkowski

La mise en évidence de la production de l'AIA est effectuée selon la méthode colorimétrique décrite par Brick *et al.*, 1991 en utilisant le réactif de Salkowski, nous avons préparé le réactif à 0,5 M de FeCl<sub>3</sub> et 35% de l'acide perchlorique.

### 3.2. Dosage de l'AIA

Dans 8 tubes, nous avons filtré 5 ml de chaque culture à travers le papier filtre. 2 ml des filtrats récupérés sont ajoutés à 4 ml de réactif de Salkowski, ensuite les tubes sont mis à l'obscurité pendant 20 min. La coloration rose rouge indique la présence de l'AIA. La densité optique des 8 tubes est mesurée au spectrophotomètre à  $\lambda=530$  nm. Les quantités d'AIA produites sont calculées à l'aide de la droite de régression de la courbe étalon d'AIA de Monita *et al.*, (2014) (figure 6).

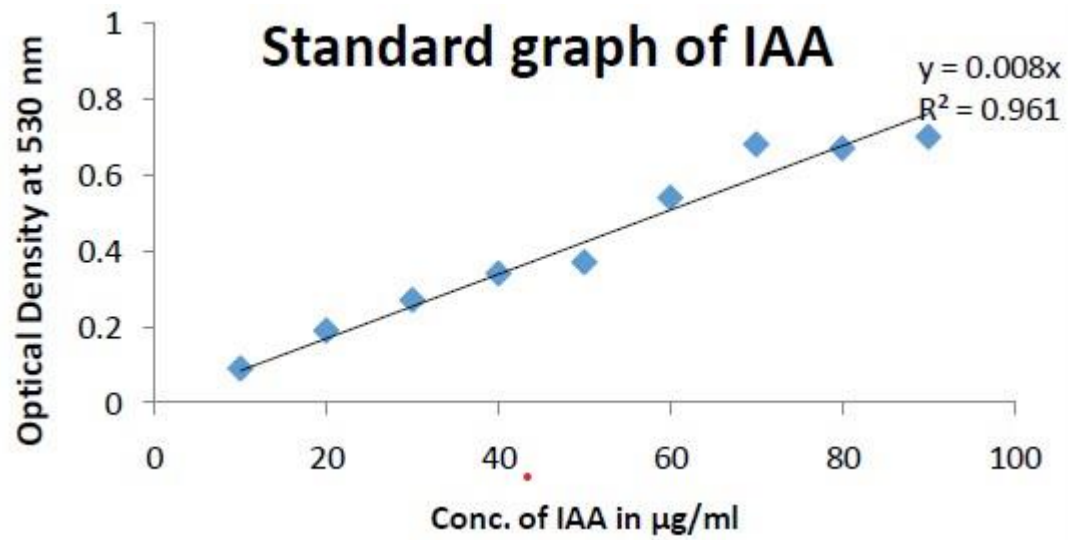


Figure 6. Courbe étalon de l'AIA (Monita *et al.*, 2014)

## **Résultats et discussion**

## 1. Etude morphologique

### 1.2. Etude macroscopique

L'espèce *Streptomyces laquirus* croît sur tous les milieux de culture utilisés à des degrés de croissance différents. La croissance est rapide sur les milieux DSMZ 65 et ISP5, lente et faible sur le milieu glucose-asparagine. Sur tous les milieux, elle développe des colonies sèches, rugueuses, opaques, bombées, et avec des bords irréguliers. Sur le milieu ISP5 après 7 jours d'incubation, nous avons observé la présence de colonies de forme ronde et de taille moyenne.

**Tableau 2.** Caractères cultureux de la souche *Streptomyces laquirus* sur les différents milieux de culture

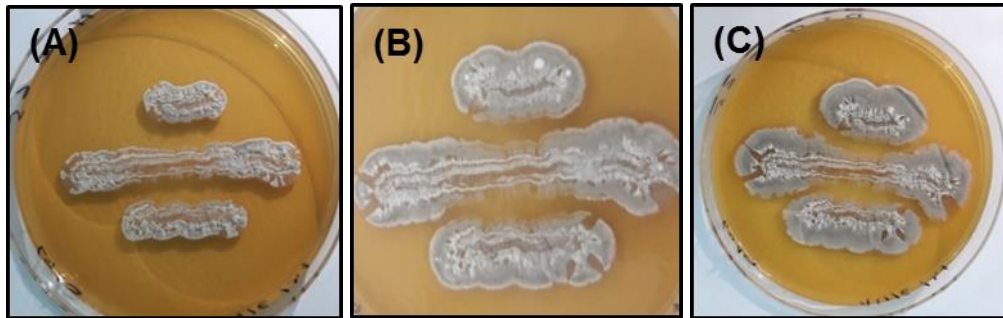
Durée d'incubation	Milieu de culture	Caractéristiques			
		Croissance	Mycélium du substrat	Mycélium aérien	Masse sporale
7 jours	ISP5	+	+ blanc	+ blanc	+ grise
	DSMZ 65	+	+ blanc	+ blanc	+ grise
	Glu-asp	+/-	+/- blanc	+/- blanc	+/- grise
14 jours	ISP5	+	+ blanc	+ blanc	+ grise
	DSMZ 65	++	++ blanc	+ blanc	++ grise
	Glu-asp	+/-	+/- blanc	+/- blanc	+/- grise
21 jours	ISP5	++	+ blanc	++ blanc	+ grise
	DSMZ 65	++	++ blanc	+ blanc	++ grise
	Glu-asp	+/-	+/- blanc	+/- blanc	+/- grise

+/- faible croissance; + croissance moyenne; + bonne croissance; ++ très bonne croissance.

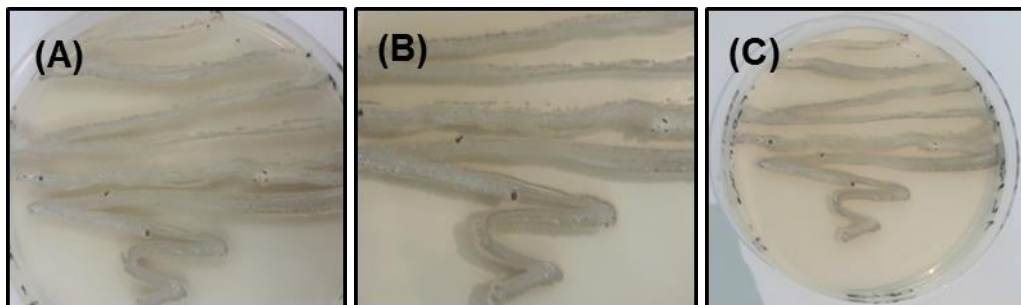
Sur les différents milieux de culture utilisés se forme un mycélium du substrat et un mycélium aérien de couleur blanche, une masse sporale de couleur grise, avec absence totale de production de pigments diffusibles. La masse sporale est très abondante sur



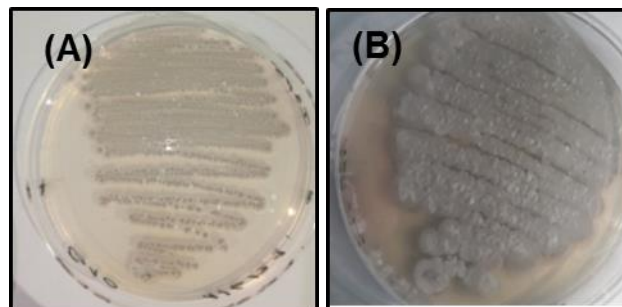
DSMZ65, bonne sur ISP5, et très faible sur le milieu glucose-asparagine. Le meilleur développement de mycélium du substrat est observé sur le milieu DSMZ65. Après 21 jours d'incubation, nous avons observé l'absence de production de pigments mélanoïdes par l'espèce *Streptomyces laquirus* sur le milieu ISP7 (tableau 3).



**Figure 7.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu DSMZ 65 **A.** après 7 jours **B.** après 14 jours **C.** après 21 jours



**Figure 8.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu glucose-asparagine **A.** après 7 jours **B.** après 14 jours **C.** après 21 jours



**Figure 9.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu ISP5 **A.** après 7 jours **B.** après 21 jours



**Figure 10.** Culture de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur milieu ISP7 après 21 jours

### 1.3. Etude microscopique

L'observation au microscope optique est réalisée à grossissement à immersion entre lame et lamelles après coloration au bleu de méthylène et lactophénol.

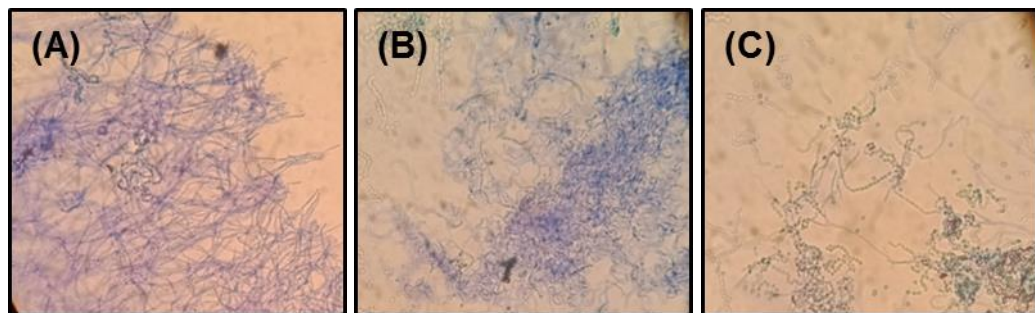
L'examen microscopique de l'espèce *Streptomyces laquirus* sur tous les milieux et pendant 21 jours montre la présence d'un mycélium du substrat formé de filaments ramifiés et enchevêtrés, et un mycélium aérien peu ramifié et fin. Les spores ont une forme ovale ou ronde, elles peuvent être isolées ou organisées en longues chaînes. Une chaîne peut porter plus que 20 spores. La fragmentation du mycélium du substrat est observée après 21 jours sur les milieux DSMZ65 et glucose-asparagine (tableau 4).

**Tableau 3.** Caractères microscopiques de *Streptomyces laquirus* après 7, 14, et 21 jours d'incubation

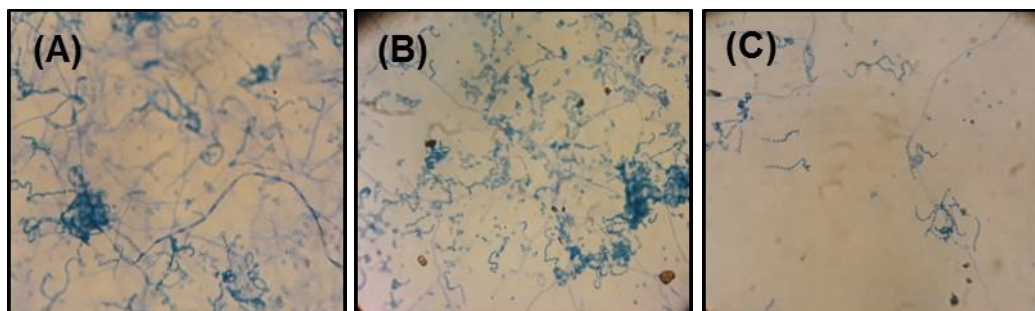
Durée d'incubation	Milieu de culture	Caractéristiques		
		Mycélium du substrat	Mycélium aérien	Spores
7 jours	ISP5	Enchevêtré, ramifié	Peu ramifié	Chaînes de spores
	DSMZ 65	Enchevêtré, très ramifié	Peu ramifié	Chaînes de spores, spores isolées de forme ovale
	Glu-asp	Enchevêtré, ramifié	Peu ramifié	Longues chaînes de spores, spores isolées, forme ovale
	ISP7	Enchevêtré, ramifié	Peu ramifié	Longues chaînes de spores, spores isolées de forme ovale et ronde

## Résultats et discussion

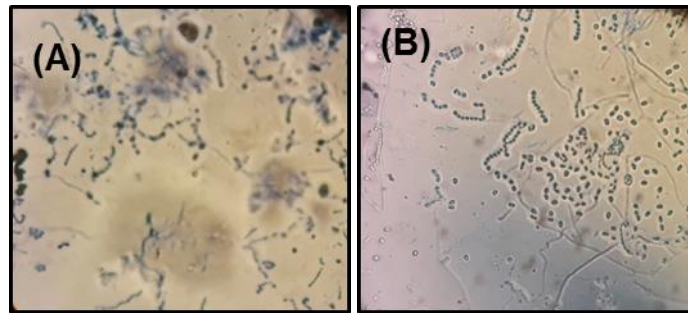
Durée d'incubation	Milieu de culture	Caractéristiques		
		Mycélium du substrat	Mycélium aérien	Spores
14 jours	ISP5	Enchevêtré, ramifié	Peu ramifié	Longues chaînes de spores
	DSMZ 65	Enchevêtré, très ramifié	Peu ramifié	Spores isolées de forme ovale, chaînes de spores
	Glu-asp	Enchevêtrés et ramifiés	Peu ramifié	En longues chaînes et isolées, forme ovale
21 jours	DSMZ 65	Fragmenté	Peu ramifié	En chaînes et isolées, forme ovale
	Glu-asp	Fragmenté	Fragmenté	Isolées de forme ronde
	ISP7	Enchevêtré, ramifié	Fragmenté	Longues chaînes de spores, spores isolées de forme ovale et ronde



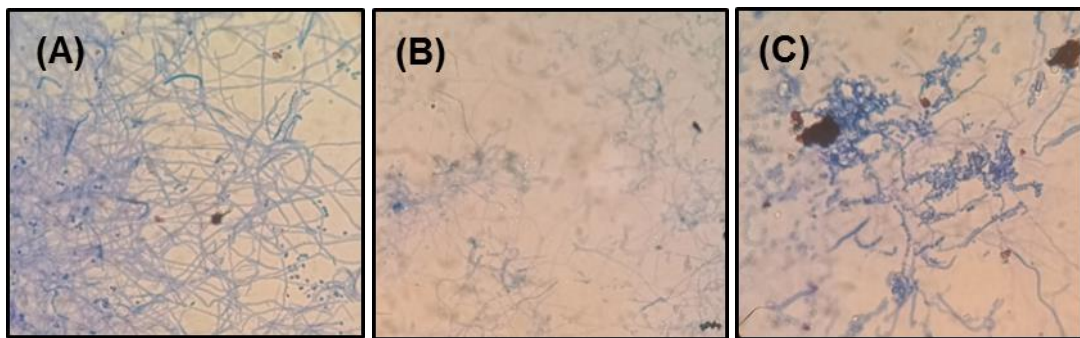
**Figure 11.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 7 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



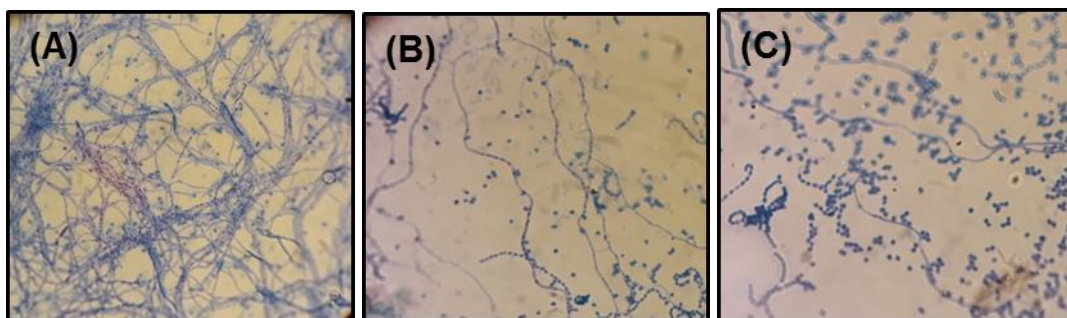
**Figure 12.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 14 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



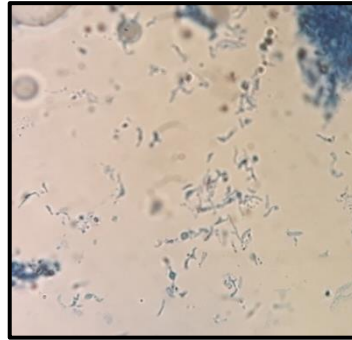
**Figure 13.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu DSMZ 65) après 21 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Spores



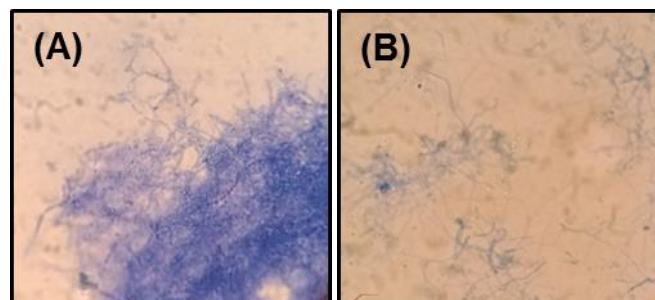
**Figure 14.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu glucose-asparagine) après 7 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



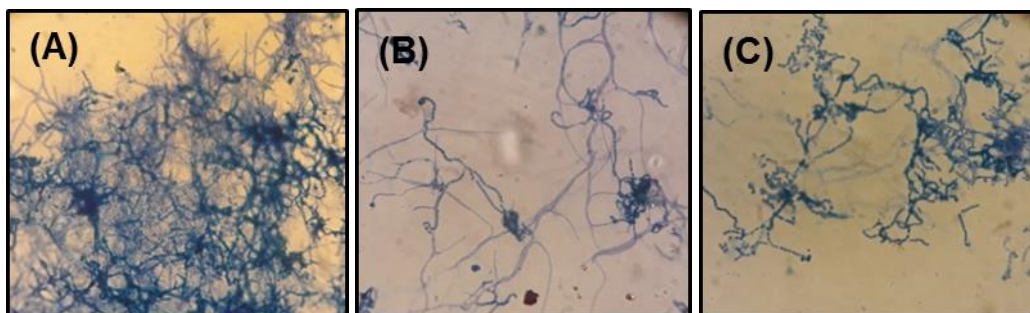
**Figure 15.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu glucose-asparagine) après 14 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



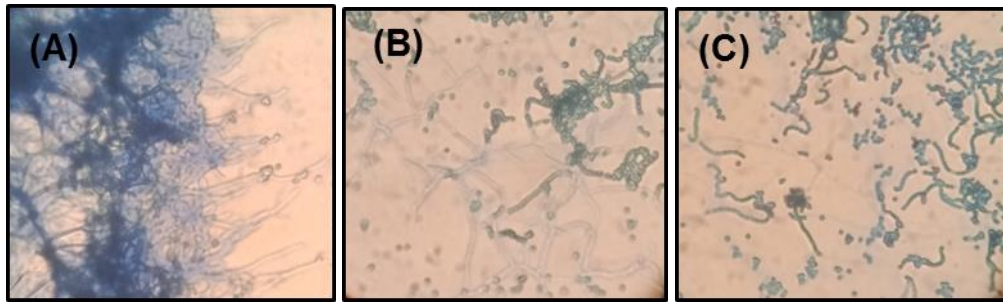
**Figure 16.** Observation sous microscope optique G×100 de mycélium du substrat de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu glucose-asparagine) après 21 jours d'incubation.



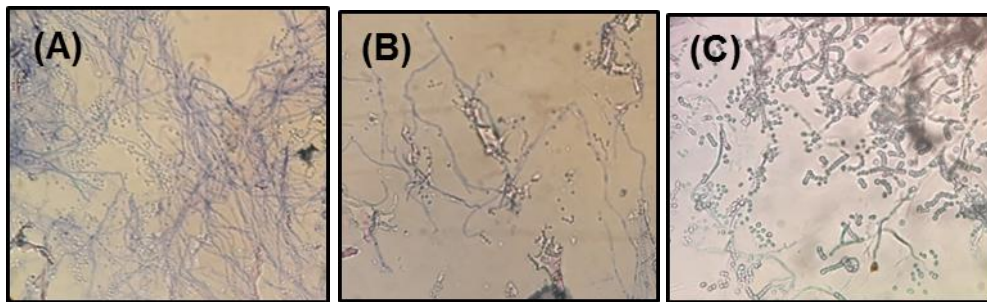
**Figure 17.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP5) après 7 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien



**Figure 18.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP5) après 14 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



**Figure 19.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au bleu de méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP7) après 7 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores



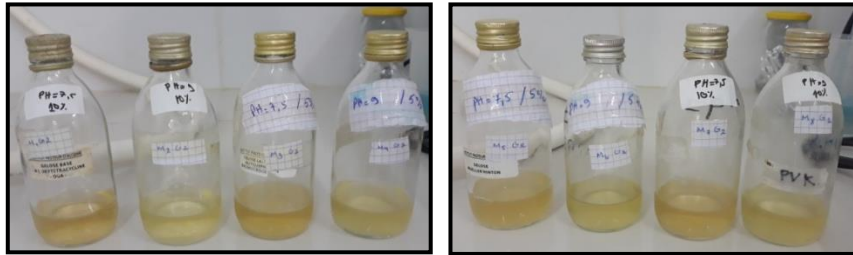
**Figure 20.** Observation sous microscope optique G×100 de l'espèce *Streptomyces laquirus* après coloration au de bleu méthylène ou lactophénol (technique des lamelles sur milieu ISP7) après 21 jours d'incubation. **A.** Mycélium du substrat **B.** Mycélium aérien **C.** Spores

## 2. Production de l'acide indole acétique

Les caractères des cultures sur bouillon tryptophane sont rapportés dans le tableau 5.

**Tableau 4.** Caractères cultureux sur bouillon tryptophane après 8 jours d'incubation.

Milieu de culture	Caractères
M <sub>1</sub>	Trouble, pelètes au fond
M <sub>2</sub>	Limpide, pelètes au fond
M <sub>3</sub>	Trouble, pelètes et voile
M <sub>4</sub>	Limpide, filaments au fond
M <sub>5</sub>	Trouble, pelètes au fond
M <sub>6</sub>	Limpide, pelètes au fond
M <sub>7</sub>	Trouble, pelètes au fond
M <sub>8</sub>	Trouble, pelètes au fond



**Figure 21.** Cultures sur bouillon tryptophane après 8 jours d'incubation

Les concentrations d'AIA produites par la souche sont calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de Monita *et al.*, (2014).

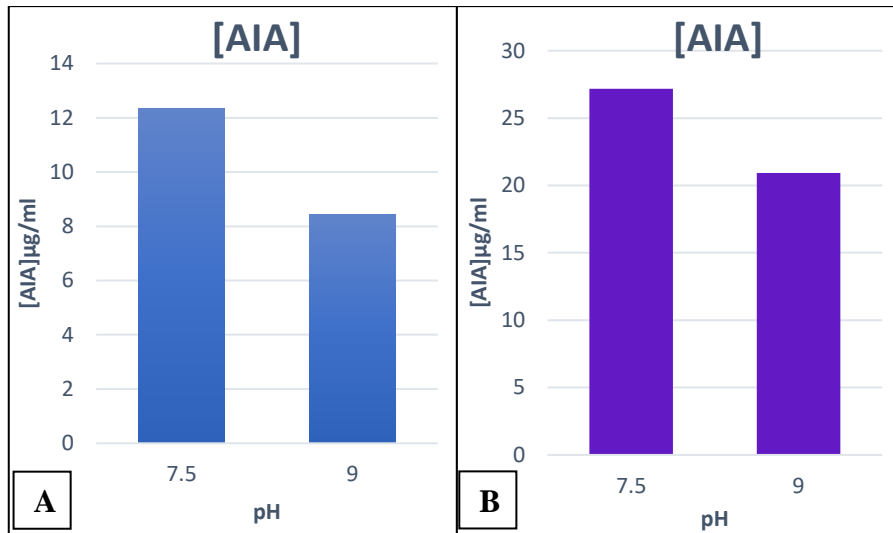
La concentration d'AIA après 4 jours d'incubation produite se situe entre 7,62  $\mu\text{g/ml}$  et 19  $\mu\text{g/ml}$  (tableau 6), et entre 18,75  $\mu\text{g/ml}$  et 31,12  $\mu\text{g/ml}$  après 8 jours d'incubation (tableau 7).

La plus grande quantité d'AIA (31,12  $\mu\text{g/ml}$ ) est observée dans le milieu  $M_3$  après 8 jours (tableau 7). Alors que la plus faible (7,62  $\mu\text{g/ml}$ ) est obtenue dans le milieu  $M_1$  au quatrième jour d'incubation (tableau 6). Nous avons remarqué aussi que les quantités produites après 8 jours sont plus élevées que les quantités obtenues après 4 jours d'incubation.

### 2.1. Effet du pH sur la production d'AIA

L'étude de l'effet du pH sur la production d'AIA est réalisée à pH 7,5 et 9 après 4 et 8 jours d'incubation.

La quantité d'AIA produite par la souche dans les milieux à pH 7,5 incubés pendant 4 et 8 jours est plus importante que la quantité obtenue dans les milieux à pH 9. La valeur la plus favorable est 7,5 car la quantité maximale produite par *Streptomyces laquirus* est obtenue dans le milieu  $M_3$  préparé à pH 7,5 (figure 23). Autre étude sur la production de l'AIA chez différentes espèces de *Streptomyces* par Goudjal *et al.*, (2013) a montré que le pH optimal est 7, cette valeur est très proche de pH que nous avons trouvé le plus favorable.

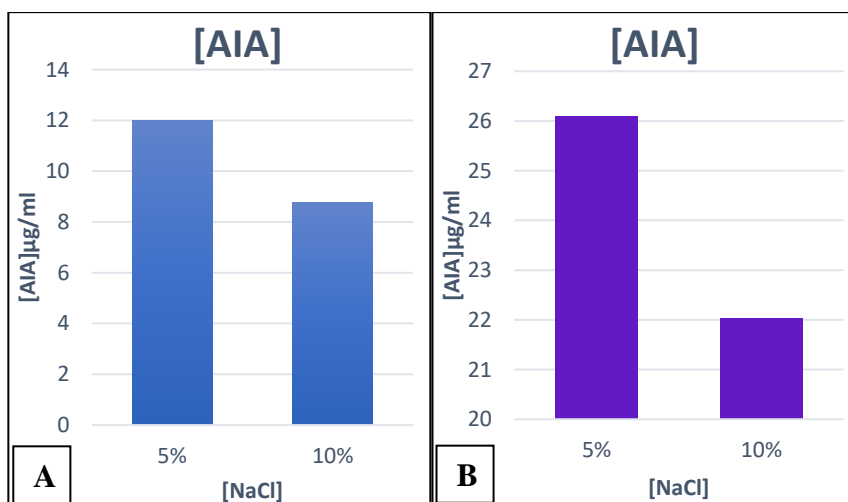


**Figure 22.** Effet du pH sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. **A.** Concentration d'AIA produite après 4 jours. **B.** Concentration d'AIA produite après 8 jours

## 2.2. Effet du pourcentage en NaCl sur la production d'AIA

Pour étudier l'effet de la concentration en NaCl sur la production de l'AIA par la souche *Streptomyces laquirus*, nous avons utilisé une concentration de 5% et 10%.

La quantité d'AIA produite par la souche dans les milieux à concentration 5% de NaCl est plus élevée que la quantité produite dans les milieux à 10% pendant les deux périodes d'incubation. La concentration de NaCl la plus favorable pour la production d'AIA par *Streptomyces laquirus* est 5% car la quantité maximale (31,12 µg/ml) est obtenue dans le milieu M<sub>3</sub> préparé à cette concentration. Alors que la plus faible est obtenue dans le milieu M<sub>1</sub> préparé à 10% de NaCl (figure 24).



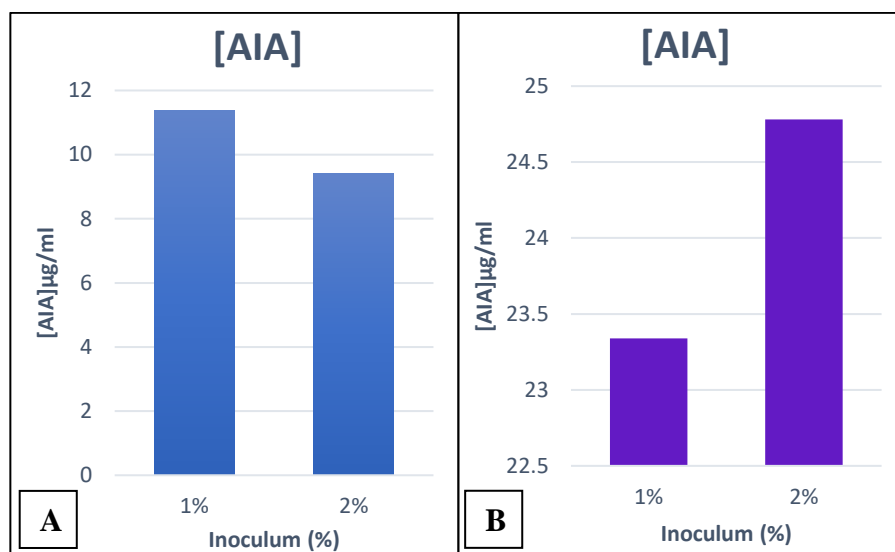
**Figure 23.** Effet de la concentration en NaCl sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. **A.** Concentration d'AIA produite après 4 jours. **B.** Concentration d'AIA produite après 8 jours



### 2.3. Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA

Afin d'étudier l'effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA par la souche, les milieux ont été inoculés à 1% et 2%.

La quantité d'AIA produite par la souche dans les milieux inoculés à 1% est plus élevée que la quantité produite dans les milieux inoculés à 2% pendant 4 jours d'incubation. Après 8 jours, la concentration d'AIA obtenue dans les milieux inoculés à 2% est devenue la plus grande (figure 25).

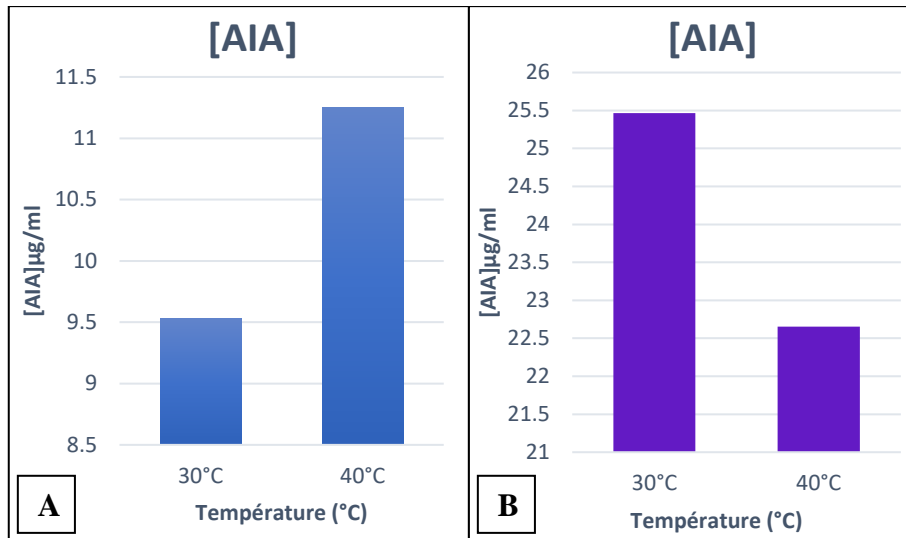


**Figure 24** Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. **A.** Concentration d'AIA produite après 4 jours. **B.** Concentration d'AIA produite après 8 jours.

### 2.4. Effet de la température sur la production d'AIA

L'étude de l'effet de la température sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus* est réalisée en incubant la souche à 30 °C et 40 °C.

La souche a produit plus d'AIA dans les milieux incubés à 30 °C après 8 jours d'incubation. À cette température, nous avons aussi observé la plus grande concentration (31,12 µg/ml) obtenue dans le milieu M<sub>3</sub>. Au quatrième jour, la quantité était plus élevée dans les milieux incubés à 40 °C (figure 26). Dans une étude de la production de l'AIA par *Streptomyces albidoflavus*, Narayana *et al.*, (2009) ont trouvé que la production était maximale à 35 °C. Ils ont montré aussi que la production diminue lorsque la température est inférieure à 25 °C ou supérieure à 40 °C.

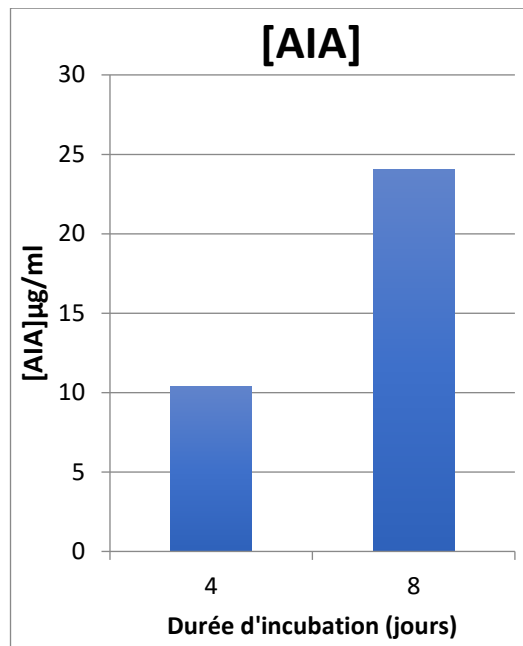


**Figure 25.** Effet de la température sur la production d’AIA par *Streptomyces laquirus*. **A.** Concentration d’AIA produite après 4 jours. **B.** Concentration d’AIA produite après 8 jours

## 2.5. Effet de la durée d’incubation sur la production d’AIA

Le dosage de l’AIA est réalisé après 4 et 8 jours d’incubation afin d’étudier l’effet du temps d’incubation sur la production.

Il est a noté que la quantité d’AIA produite par la souche au huitième jour est clairement plus élevée que la quantité produite en incubant la souche pendant 4 jours (figure 27). Plusieurs études réalisées sur l’effet de la durée d’incubation sur la production d’AIA ont montré différents résultats pour le même genre. Abd-Alla *et al.*, (2013) ont trouvé une production maximale par *Streptomyces atrovirens* après 13 jours, alors que Goudjal *et al.*, (2013) ont trouvé que la production d’AIA par *Streptomyces sp* atteint le maximum après 7 jours et commence a diminué après cette période. Dans le travail réalisé par Narayana *et al.*, (2009), *Streptomyces albidoflavus* a produit la plus grande concentration au quatrième jours d’incubation.



**Figure 26.** Effet de la taille d'inoculum sur la production d'AIA par *Streptomyces laquirus*. **A.** Concentration d'AIA produite après 4 jours. **B.** Concentration d'AIA produite après 8 jours

# **Conclusion**

Ce travail a permis la mise en évidence de la production de l'acide indole acétique par *Streptomyces laquirus* et l'étude de l'effet des différentes valeurs de pH, concentration en NaCl, taille d'inoculum, température et durée d'incubation sur la production dans des milieux préparés à base du tryptophane.

L'étude macroscopique a montré la présence d'un mycélium de substrat et un mycélium aérien de couleur blanche, et une masse sporale de couleur grise sur tous les milieux de culture. Nous avons observé que la croissance est plus abondante sur DSMZ 65 et ISP 5 est très faible sur glucose-asparagine. La souche n'a pas produit de pigments diffusibles sur les différents milieux de culture utilisés ou de pigments mélanoides sur ISP 7. L'observation au microscope optique grossissement à immersion après coloration a montré un mycélium du substrat ramifié et enchevêtré et un mycélium aérien fin et peu ramifié. Les spores produites sont organisées en longues chaînes ou isolées, elles ont une forme ronde ou ovale. La fragmentation du mycélium du substrat est observée après 21 jours d'incubation dans les milieux DSMZ 65 et glucose asparagine.

Nous avons trouvé que la souche est capable de synthétiser l'AIA dans tous les milieux de culture utilisés mais à des concentrations différentes, la quantité produite par la souche à la fin de la période d'incubation se situe entre 18,75 µg/ml et 31,12 µg/ml. Les conditions les plus favorables où la production est maximale sont un pH de 7, une concentration de 5% de NaCl, en inoculant le milieu à 2%, et en incubant la souche à 30 °C pendant 8 jours.

À la suite de ces résultats, il serait intéressant d'approfondir ce travail et d'étudier l'influence de la concentration du tryptophane le principal précurseur sur la production de l'AIA par *Streptomyces laquirus*, et de tester l'effet direct de la souche sur la croissance des plantes.

# **Références bibliographiques**

- **Abd-Alla M., El-Sayed E., Rasmey A.** (2013). Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt. Journal of Biological and earth Sciences. 3. <https://www.researchgate.net/publication/259226300> Indole-3-acetic acid IAA production by Streptomyces atrovirens isolated from rhizospheric soil in Egypt . Consulté le 19/04/2021.
- **Ait Barka, Essaïd & Vatsa, Parul & Sanchez, Lisa & Vaillant-Gaveau, Nathalie & Jacquard, Cédric & Meier-Kolthoff, Jan & Klenk, Hans-Peter & Clément, Christophe & Ouhdouch, Yder & Wezel, Gilles.** (2016). Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 80. iii-iii. 10.1128/MMBR.00044-16.
- **Amanullah A., Jüsten P., Davies A., Paul G.C., Nienow A.W., Thomas C.R.** (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. Biochemical Engineering Journal. 5 : 109-114. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00059-5). Consulté le 25/04/2021.
- **Ameur, H.** (2014). Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **Aouar, L.** (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de Doctorat : Biochimie et Microbiologie Appliquée. Constantine : Université Frères Mentouri.
- **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.
- **Boudemagh, A.** (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat : Microbiologie Appliquée. Constantine : Université Frères Mentouri.
- **Boughachiche, F.** (2012). Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkhah. Thèse de

Doctorat : Biotechnologie Microbienne. Constantine : Université Frères Mentouri.

- **Chavan Dilip V., Mulaje S., Mohalkar R.Y.** (2013). A Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. International Journal of Pharmaceutic Sciences Research. 4(5); 1730-1742.
- **Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni A.** (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. World J Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s11274-013-1344-y. Consulté le 05/07/2021.
- **Harir, M.** (2018). Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'Algéries. Thèse de Doctorat : Intérêt des microorganismes en Agriculture et en Agroalimentaire. Oran : Université d'Oran 1 Ahmed Ben bella.
- **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 : Microbiologie Appliquée. Constantine : Université Frères Mentouri.
- **Loqman, S.** (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat : Biologie et Physiologie Végétale. Reims : Université de Reims Champagne-Ardenne.
- **Monita Patel V., Rajesh Patel K.** (2014). Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, the little run of kutch. CIBTech Journal of Microbiology. 3 : 17-28. DOI: [10.1007/s00284-013-0348-z](https://doi.org/10.1007/s00284-013-0348-z). consulté le 05/07/2021.
- **Narayana K., Prabhakar P., Krishna S., Yenamandra V., Vijayalakshmi M.** (2009). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces albidoflavus*. Journal of Biological Research. 11 : 49-55. [https://www.researchgate.net/publication/236873840\\_Indole-3-acetic\\_acid\\_production\\_by\\_Streptomyces\\_albidoflavus\\_Narayana\\_K\\_J\\_Peddikotla\\_Prabhakar\\_Krishna\\_P\\_S\\_J\\_Yenamandra\\_Venketeswarlu\\_Muvva\\_Vijayala](https://www.researchgate.net/publication/236873840_Indole-3-acetic_acid_production_by_Streptomyces_albidoflavus_Narayana_K_J_Peddikotla_Prabhakar_Krishna_P_S_J_Yenamandra_Venketeswarlu_Muvva_Vijayala)



kshmi JournalJournal of Biological Research 2009 Vol .Consulté le 05/07/2021.

- **Perry Jerome J., James Staley T., Stephen L.** (2004) Microbiologie. Paris: Dunod. 152 p.
- **Saci, A.** (2011). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces sp.* Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Mémoire de Magister : Ecologie. Constantine : Université Frères Mentouri.
- **Zerizer, H.** (2014). Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1.

# **Annexes**

- Milieux de culture

- **Milieu ISP5**

Glycérol	10 g
L-asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solution saline	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 à 7,4	

- **Milieu DSMZ 65**

Glucose	4 g
Extrait de levure	4 g
Extrait de Malt	10 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2	

- **Milieu ISP7**

Glycérol	15 g
L-asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01 g

Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 à 7,4	

- **Milieu Glucose-asparagine**

Glucose	10 g
L-asparagine	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6,2	

- **Solution saline**

FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée	100 ml

- Réactif de Salkowski

FeCl <sub>3</sub>	4,06 g.
Acide perchlorique	75 ml.
Eau distillée	75 ml.

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes**

### Production de l'acide indole acétique par *Streptomyces laquirus*

#### Résumé

L'acide indole acétique est une phytohormone qui stimulent la croissance des plantes et que plusieurs espèces bactériennes possèdent la capacité de produire. Les actinomycètes sont parmi les microorganismes du sol producteur de cette hormone. L'objectif de notre travail est d'étudier la capacité de *Streptomyces laquirus* à produire l'AIA. La souche est cultivée dans des milieux à différentes valeurs de pH (7,5 et 9), et de concentration en NaCl (5% et 10%), les milieux sont inoculés à 1% et 2%, et incubés à 30 °C et 40 °C afin de trouver les conditions les plus favorables pour la production. Le dosage de l'AIA est réalisée après 4 et 8 jours d'incubation en appliquant la méthode colorimétrique décrite par Brick et *al.*, (1991) qui utilise le réactif de Salkowski. Nous avons trouvé que la souche est capable de produire l'acide indole acétique, et que la quantité produite atteint le maximum (31,12 µg/ml) après 8 jours d'incubation à 30 °C, à pH 7, concentration 5% de NaCl, et en inoculant le milieu à 2%.

**Mot clés :** Acide indole acétique, Actinomycètes, phytohormones, *Streptomyces laquirus*.

#### Membre du jury :

**Président du jury :** BOUDEMAGH A. (Prof. UFM Constantine).

**Rapporteur :** KITOUNI M. (Prof. UFM Constantine).

**Examineurs :** OULMI L. (MCB UFM Constantine).

**Présentée par : HIRECHE Imene  
DAHOUAS Khadija**

**Année universitaire : 2020-2021**