

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

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

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité/Option:** Santé, eau et environnement (microbiologie de l'environnement)

**Département:** Ecologie et de génie de l'environnement

---

**Thème : Evaluation et taxonomie numérique de quelques souches  
d'actinomycètes filamenteux isolées d'un sol agricole de la région  
de Guelma**

---

**Présenté par : Merabti Mounya**

**Merabti Nawal**

**Nouari Radia**

**Devant le jury composé de :**

**Présidente : Mme. Benhalima Lamia M.A.A Université de Guelma**

**Examineur : Melle. Boussadia Meriem Imen M.A.A Université de Guelma**

**Encadreur : Melle. Khenaka Karima M.A.A Université de Guelma**

**Juin 2016**

# **Remerciement**

*Nous tenons à remercier vivement et Profondément:*

*Notre encadreur **Mlle Khenaka Karima**, pour nous avoir proposé ce sujet, pour ses encouragements, ses orientations, sa patience, et pour ses conseils scientifiques judicieux,*

*A Mme **Benhalima Lamia** nous adressons nos remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'il nos fait en acceptant de présider ce jury.*

*Nous remercions également **Mme Boussadia Meriem Imenqui** nous avons fait l'honneur de bien vouloir d'être membres de ce jury.*

*Nos remerciements aussi vont à tous les enseignants et les enseignantes qui nous ont fait former durant ces 5 années, en nous préparant pour cette dernière année de master. Merci pour vos encouragements et votre gentillesse.*

*J'associe à mes remerciements toute l'équipe du laboratoire de microbiologie pour leur gentillesse, leur aide, et leur disponibilité ainsi que toutes nos amies pour leur solidarité.*

*Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*

*A vous tous, un grand Merci.*

## Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

### Revue bibliographique

Introduction ----- 1

#### Chapitre 1 : La rhizosphère

1. Définition de la rhizosphère ----- 3

2. Rôle de la rhizosphère ----- 3

3. La flore de la rhizosphère ----- 4

4. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP/PGPR) ----- 4

#### Chapitre 2 : Généralités sur les actinomycètes

1. Historique ----- 5

2. Définition des Actinomycètes ----- 5

3. Classification des actinomycètes ----- 6

4. Ecologie des actinomycètes ----- 6

4.1. Sols ----- 6

4.2. Eaux douces et marines ----- 7

4.3. L'Air ----- 7

4.4. Composts ----- 8

4.5. Végétaux, animaux et l'homme ----- 8

5. Caractères morphologiques ----- 8

6. Caractères structurales ----- 12

6.1. Acides aminés ----- 12

6.2. Sucres ----- 13

6.3. Acides gras ----- 13

6.4. Acides nucléiques ----- 14

7. Physiologie de développement ----- 14

7.1. Rapports avec l'Oxygène ----- 14

7.2. Le pH ----- 14

7.3. La Température -----	15
7.4. Activité de l'eau (Aw) -----	15
7.5. Matière organique -----	15
7.6. Tolérance en NaCl-----	15
8. Cycle de vie et de développement des actinomycètes -----	16
8.1. La germination des spores-----	16
8.2. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien-----	16
8.3. La formation des spores -----	17
8.3.1. Les exospores -----	17
8.3.2. Les endospores-----	17
9. Diversité métabolique -----	18
9.1. Métabolite primaire -----	19
9.2. Métabolite secondaire-----	19
10. Rôles des actinomycètes -----	19
10.1. Rôles des actinomycètes dans le Sol -----	19
10.2. Rôles des actinomycètes dans l'industrie-----	20

### Chapitre 3 : Taxonomie numérique

1. Définition -----	22
2. La démarche de la taxonomie numérique-----	23
3. Les méthodes de construction des arbres -----	23
3.1. La méthode UPGMA -----	24
3.2. La méthode NJ -----	24

### Matériel et méthodes

1. Les Souches étudiées -----	25
2. Les Milieux de culture -----	25
3. Étude morphologique-----	25
4. Étude physiologique et biochimique -----	25
4.1. Utilisation de sources de carbone -----	25
4.2. Utilisation de sources azotée-----	26

4.3. Les activités de dégradation-----	26
4.4. Production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S)-----	27
4.5. Réduction des nitrates-----	27
4.6. La sensibilité aux divers agents physiques et chimiques -----	27
4.6.1. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques-----	27
4.6.2. Tests de sensibilité à divers agents physiques -----	28
4.6.2.1. Croissance microbienne à différentes concentration en NaCl -----	28
4.6.2.2. Croissance microbienne à différents valeurs de pH-----	28
4.7. La résistance aux antibiotiques -----	28
5. Taxonomie numérique -----	28

### **Résultats et discussions**

1. Étude morphologique-----	29
1.1. Aspect microscopique -----	29
2. Étude physiologique et biochimique -----	31
2.1. Utilisation des sources de carbone -----	31
2.2. Utilisation de sources azotée-----	33
2.3. Les activités de dégradation-----	35
2.4. Production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S)-----	36
2.5. La réduction des nitrates-----	37
2.6. La sensibilité à divers agents physiques et chimiques -----	38
2.6.1. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques -----	38
2.6.2. La sensibilité à divers agents physiques -----	40
2.6.2.1. La Croissance microbienne à différentes concentration en NaCl-----	40
2.6.2.2. La Croissance microbienne à différents valeurs de pH-----	41
2.7. La résistance aux antibiotiques -----	43
2.8. Production des sidérophores, des auxines et solubilisation de phosphate-----	44
3. Taxonomie numérique -----	45
3.1. Calcul de la matrice de distance-----	48

3.2. Reconstruction des arbres phénotypiques -----	48
Conclusion et perspectives -----	52
Références bibliographique	
Annexes	
Résumés	

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°1:</b> Quelques ordres d'actinomycète-----	6
<b>Tableau n°2:</b> Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol -----	7
<b>Tableau n°3:</b> Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois des actinomycètes -----	13
<b>Tableau n°4:</b> Sucres cellulaires totaux des actinomycètes -----	13
<b>Tableau n°5:</b> Calcul du Coefficient de Jaccard entre deux souches A et B -----	23
<b>Tableau n°6:</b> Aspect microscopique des souches actinomycétales -----	29
<b>Tableau n°7:</b> utilisation des sources de carbone-----	32
<b>Tableau n°8:</b> utilisation des sources d'azote-----	34
<b>Tableau n°9:</b> résultats de différentes activités de dégradation-----	36
<b>Tableau n°10:</b> résultats de la production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S)-----	37
<b>Tableau n°11:</b> la réduction de nitrate-----	38
<b>Tableau n°12:</b> Croissance en présence d'inhibiteurs-----	39
<b>Tableau n°13:</b> Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu YMEA et à différentes concentrations de NaCl-----	41
<b>Tableau n°14:</b> Test de croissance des souches d'actinomycètes a différent valeur de PH ----	42
<b>Tableau n°15:</b> résistance aux antibiotiques-----	44
<b>Tableau n°16:</b> Matrice binaires des caractères étudiés-----	46
<b>Tableau n°17:</b> Matrice de distance des souches étudiées-----	48
<b>Tableau n°18:</b> La production des sidérophores, des auxines et solubilisation de phosphate (annexe 2)	



## Liste des figures

<b>Figure n°1:</b> La zone rhizosphérique-----	3
<b>Figure n°2:</b> Les caractéristiques morphologiques des spores -----	9
<b>Figure n°3:</b> différents types de la production de spores dans les sporanges chez les actinomycètes (spores endogènes) -----	10
<b>Figure n°4:</b> La production de seule spore et les spores dans les courtes chaînes (spores exogènes) -----	10
<b>Figure n°5:</b> la production de spores dans la longue chaîne -----	11
<b>Figure n°6:</b> les classes morphologiques de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivé en milieu liquide -----	12
<b>Figure n°7:</b> Étapes de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes (genre <i>Streptomyces</i> ) sur milieu solide -----	18
<b>Figure n°8:</b> Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes -----	21
<b>Figure n°9:</b> photographies de la morphologie microscopique des souches d'actinomycète --	30
<b>Figure n°10:</b> photographies de l'utilisation des sucres comme source de carbone par les souches FRO15, KRO7, KRO3, KRO9, FRO9 -----	32
<b>Figure n°11:</b> photographies de l'utilisation des acides aminés comme source d'azote par les souches KRO8, KRO14, KRO11, KRO3, FRO15 et C15 -----	34
<b>Figure n°12:</b> photographies des activités de dégradation -----	35
<b>Figure n°13:</b> photographies de l'absence de production d'H <sub>2</sub> S par les souches étudiées-----	37
<b>Figure n°14:</b> photographies de la production de nitrate réductase après 14 jours par les souches BES3, FRO18, FRO19 et KRO11 -----	37
<b>Figure n°15:</b> photographie de la croissance des souches en présence d'inhibiteur -----	39
<b>Figure n°16:</b> photographie de la croissance des souches KRO7, FRO15, C15 et FRO9 à 4% en NaCl et à 7% pour les souches KRO7, FRO9 et BES3 -----	40
<b>Figure n°17:</b> photographie de la croissance des souches KRO11, KRO8, KRO13, FRO19, C15 et BES3 à différent valeur de PH -----	42
<b>Figure n°18:</b> photographies de la sensibilité et de la résistance des souches KRO14, FRO9, FRO18, KRO8, aux antibiotiques -----	43

**Figure n°19:** Dendrogramme de la taxonomie numérique construit selon la méthode UPGMA

-----49

**Figure n°20:** Dendrogramme de la taxonomie numérique construit selon la méthode NJ ----50

## Liste des abréviations

AIA : acide indole -3-acétique.

Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> : phosphate tricalcique.

CAS : chrome azurol s.

CMC : carboxy méthyl cellulose.

DAB : Acide 2.4-diaminobutirique

DAP : Acide 2.6-diaminopimélique

H<sub>2</sub>S : sulfate d'hydrogène.

HDTMA : hexadécyltriméthyl ammonium.

HgCl : chlorure de mercure.

ISP : international streptomyces project.

ISP : l'International Streptomyces Project

NJ: Neighbor-Joining

OUT: Operational Taxonomic Unite

PVK : pikovskaia.

RA: retinaculum apertum .

RF : rectiflexible.

S : spirale

TSI : triple sugar iron.

UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean

YMEA : yeast malt extract agar.

# **Introduction**

Les actinomycètes ont longtemps été considérées comme des champignons primitifs du fait de leur type de croissance mycélien (les cellules produisent des filaments et des ramifications), et de fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent. Aujourd'hui ils sont considérés comme des procaryotes à Gram positif, avec un coefficient de chargaff (GC) supérieur à 50%, leur paroi ne renferme ni chitine ni cellulose se trouve respectivement chez les plantes et les champignons, et ce sont pour la plupart des hétérotrophes, mais quelques espèces sont chimio-autotrophes. Généralement, les actinobactéries habitent le sol et ce sont connus par leur activité de décomposition de la matière organique, ce qui rend le sol fertile et par conséquent l'amélioration des récoltes. En plus du sol, ils ont été isolés dans de nombreux environnements aquatiques, à savoir les écosystèmes marins, les eaux douces et les marécages salés (Al-Zarban et al 2002, Boughachiche et al 2005, Kitouni et al 2005).

La rhizosphère représente l'un des habitats les plus particuliers des actinomycètes, cette région représente le lieu des interactions entre le sol et les racines de plantes. Malgré la lenteur de leur croissance et leur faible pouvoir compétitif, Les actinobactéries ont une aptitude formidable à produire de nombreuses substances pro-biotiques et antibiotiques leur confèrent un rôle essentiel dans les interrelations entre les microorganismes en intervenant sur la distribution de certains groupes, ainsi que dans les interactions plantes-sols. Leurs rôles résident principalement dans la production des antibiotiques et des sidérophores ce qui protège les plantes contre les différents agents phytopathogènes, et aussi dans la production des différentes phytohormones bénéfiques pour la croissance des plantes (Goodfellow et Williams 1983).

Ces microorganismes possèdent des caractéristiques métaboliques très diversifiées d'une espèce à l'autre et aussi entre les membres de la même espèce, et du fait et en mesure de leurs applications, leurs aptitudes métaboliques doivent être définies avec rigueur et c'est la raison pour laquelle nous sommes fixés ce travail. Les souches d'actinomycètes utilisées dans cette étude sont connues par leurs capacités promotrices de la croissance de plantes à travers la production des auxines, des sidérophores et la solubilisation de phosphate inorganique.

Le présent travail est réalisé selon les étapes suivantes :

- Une étude morphologique qui vise à déterminer les caractéristiques de croissance des souches telles que la forme et la présence ou l'absence de la sporulation.

- Etude des conditions physiologiques et biochimiques pour la croissance des bactéries, tels que la croissance à différents pH, la tolérance de la salinité et les pesticides et l'utilisation des différentes sources de carbone et d'azote.
- A la fin, les résultats obtenus sont utilisés pour étudier la ressemblance entre les souches du point de vue phénotypique à travers l'élaboration d'une matrice binaire et un arbre en utilisant deux algorithmes UPGMA et NJ.

# **CHAPITRE I**

# **LA RHIZOSPHERE**

## 1. Définition de la rhizosphère

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (Figure n°1) (Campbell et Greaves 1990, Westover et al 1997). Elle se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines, et elle est généralement divisée en deux parties:

- La rhizosphère au sens strict correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.
- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines (Soufiane 1998).



Figure n°1 : La zone rhizosphérique (Bazot S 2005).

## 2. Rôle de la rhizosphère

La rhizosphère joue un rôle actif dans la régulation des interactions entre plantes et microorganismes (Hirsch A.M et al 2003). De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques (Lynch J.M 1990, Cook R.J et al 1995) C'est une zone de vie, où les exsudats racinaires, d'une part, permettent le développement d'une faune et d'une flore spécifiques et d'autre part, permettent le développement d'une flore symbiotique qui assure une bonne croissance aux plantes, en produisant de substances bénéfiques à la croissance comme les phytohormones et les antibiotiques assurant la protection contre des phytopathogènes.

C'est une niche écologique qui éveille et stimule diverses activités microbiennes, en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, le phosphore, le fer, etc. (De Carne C.Ch 2010).

### 3. La flore de la rhizosphère

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Cardon Z et D.J Gage 2006). Certains sont sans effets sur le développement des végétaux, d'autres encore sont favorables alors que d'autres ont des effets délétères (Wipps J.M 2001).

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (Van Loon L.C 2007). Ces modifications quantitatives de la microflore ou « effet rhizosphère », s'accompagnent également de modifications qualitatives.

Les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux de la rhizosphère, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  UFC par gramme de sol (Davet P. 1996). Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^3$  UFC par gramme de sol (Dommeregues Y. et Mangenot F. 1970). La densité des champignons est estimée à  $10^6$  UFC par gramme de sol et les bactéries filamenteuses ou actinomycètes peuvent atteindre  $10^7$  unités par gramme de sol (Morel R. 1996).

### 4. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (RPCP/PGPR)

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Ces bactéries sont alors reprises sous le terme RPCP/PGPR.

Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries, elles comprennent de nombreuses espèces bactériennes (Wipps J.M 2001, Ahmed O.H et all 2008).

Les PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via divers mécanismes. Cet effet bénéfique peut être directe, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante-hôte) ou indirecte, lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (antagonisme) (Dobbelaere S.J et all 2003).

**CHAPITRE II**  
**GENERALITES SUR LES**  
**ACTINOMYCETES**

## 1. Historique

D'après Waksman (1961), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875 et en 1878, Harz, nomma *Actinomyces bovis*, un organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les actinomycètes ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux, de presque tous les habitats où la vie est possible (Theilleux 1993 et bergey's manual, 2007 cité par Djinni, 2009).

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en quatre catégories. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise. La dernière époque historique est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940.

## 2. Définition des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des Bactéries à Gram-positif, filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Rastogi et Kishore 1997). Cela explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ».

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote) (Otto 1998), du fait de leur morphologie. Actuellement ils sont classés définitivement parmi les bactéries (procaryote), du fait que leur matériel génétique est dépourvu de noyau, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Les principales différences entre les champignons et les actinomycètes peuvent être résumées dans les points suivants:

- Leurs parois ne renferment ni cellulose ni chitine, dont ces polymères se retrouvent respectivement chez les plantes et les champignons (Shukla 2010).
- Le diamètre de leur mycélium est approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8  $\mu\text{m}$ ),
- Les actinomycètes sont sensibles aux attaques des bactériophages et du lysozyme (Hawker et Linton 1971).

- Les actinomycètes sont sensibles aux antibiotiques antibactériens (Rangaswami et al 2004, Winn et Koneman 2006).

### 3. Classification des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent au règne des *Procaryotes*, à la division des *Firmicutes* et à la classe des *Thalobacteria*, contenant l'ordre des *Actinomycetales* (Larrent2000). La classe des *Actinobacteria* peut être représentée selon le tableau suivant :

**Tableau n°1** : Quelques ordres d'actinomycète (Larrent 2000).

Sous-classe	Ordre	Famille
<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Acidimicrobiaceae</i>
<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Rubrobactérales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobactérales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>
<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Sphaerobactérales</i>	<i>Sphaerobacteraceae</i>
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinobacteriale</i>	

### 4. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larrent et Sanglier 1989). La grande majorité est d'origine tellurique (Dommergues et Mangenot 1970, Ishizawa et Araragi 1976). Et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes et dans des zones géographiques variées (Lacey 1997).

#### 4.1. Sols

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. La fréquence des divers genres d'actinomycètes les communs dans le sol sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2m de profondeur c'est-à-dire dans la rhizosphère. La couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total de microorganismes (Waksman 1963), la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40 % cela est confirmée par Iwai et Takashi 1992. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl

isobornéol qui sont responsable de l'odeur d'humus caractéristique des sols (Omura 1992, Zaitlin et al 2003).

**Tableau n°2 :** Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol (Andriam bololona 2010)

Genres	Pourcentage (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Microspolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

#### 4.2. Eaux douces et marines

Les Actinomycètes sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Microspora sp.*, d'*Actinoplanes sp.* et de *Streptosporangium sp.* C'est essentiellement dans les sédiments. Ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Xu et al 1996, Hwang et al 2001).

#### 4.3. L'Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (Ouhdouch 1989). La dissémination des actinomycètes dans l'air est principalement liée à la quantité de poussière dans laquelle les spores et les fragments du mycélium s'accrochent (Arvind et al 2003).

#### 4.4. Composts

Le compost, produit final du compostage est composé pour l'essentiel de la matière organique de type humique stable et de composés minéraux (Mustin1987).

Des actinomycètes sont isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autre thermotolérants tel que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* (Ensign et all 1993, Lacey 1997, Song et all 2001). Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du compostage (Zermane 2007).

#### 4.5. Végétaux, animaux et l'homme

Les actinomycètes sont qualitativement et quantitativement importants dans la rhizosphère, ils ont une influence bénéfique sur la croissance et le développement des plante (Petrolini et all 1991, Crawford et all 1993), Les genres, y compris : *Streptomyces* (15%), *Corynebacterium* (50-83%), *Mycobacterium* et *Nocardia* sont les plus abondants dans la rhizosphère des plantes.

Les actinomycètes sont responsables d'un certain nombre de maladies de l'homme et de l'animal (Pirouz et all 1999), à titre d'exemple des espèces de *Nocardia* peuvent causer une variété d'infection chez l'homme, qui est cliniquement classées en nocardiosis cutanée et nocardiosis pulmonaire (Kano et all 2002).

### 5. Caractères morphologiques

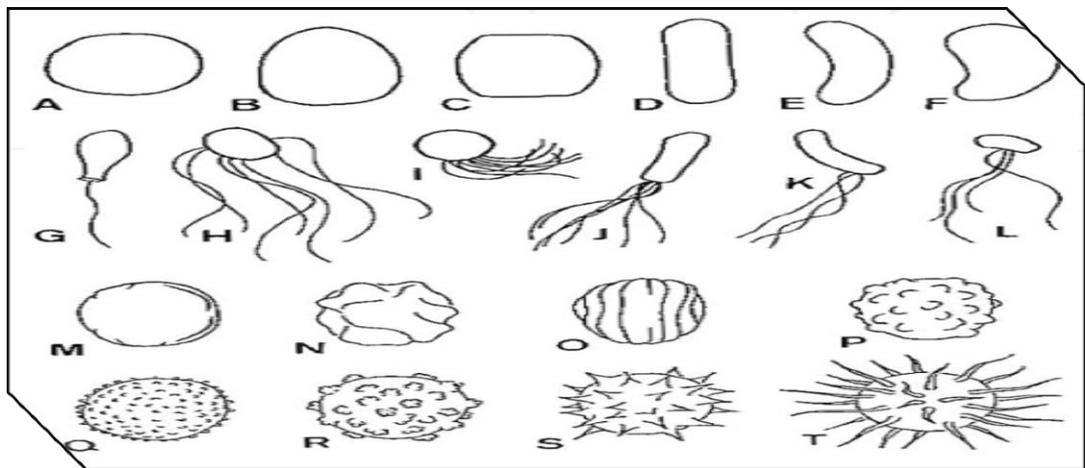
Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifié. Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier et lechevalier 1985).

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un hyphe aérien (Silvey et Roach 1975). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons.

Une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surface en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu etc... (Pine 1970). Le mycélium de substrat peut produire un

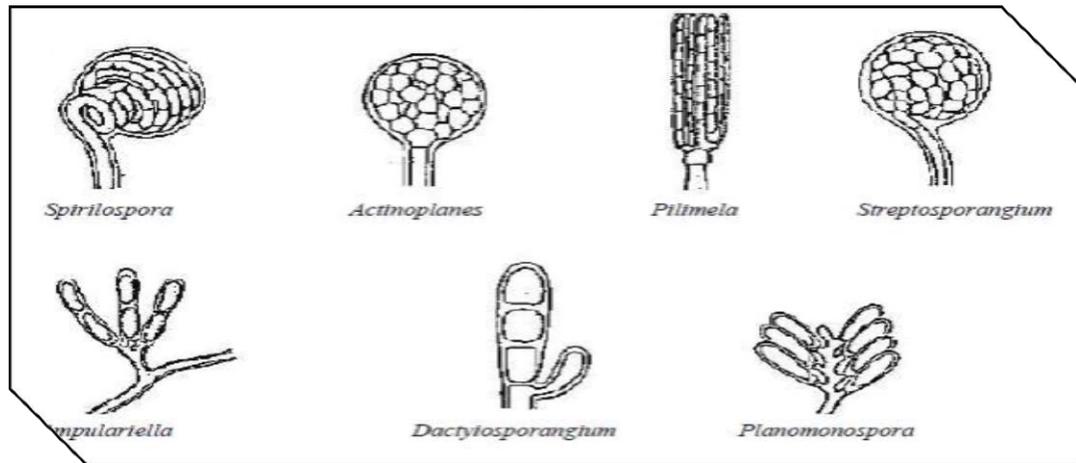
pigment soluble dans l'eau qui peut infiltrer dans le milieu de culture, ou non soluble (liposoluble) ce qui colore seulement la colonie.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies qui libèrent des spores de formes variées, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges qui peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles (*Streptosporangium*) (kalakoutsii et Agre 1976) (Figure n°2 et 3).



**Figure n°2** : Les caractéristiques morphologiques des spores (Miyadoh et all 1997).

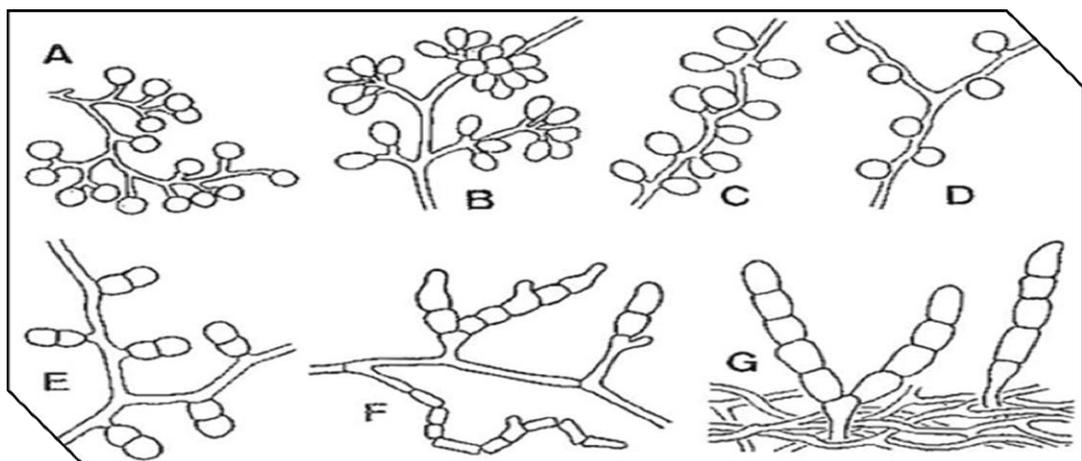
Forme générale des spores: (A) globuleux, (B) ovoïde, (C) doliform, (D) en forme de bâtonnet, (E) allantoïde, (F) réniforme. Type d'autoflagellation: (G) monotrichous monopolaire, (H) péritriches, (I) polytrichous, (J) monoploarpolytrichous (= lophotrichous), (K) polytrichous subpolaire, (L) polytrichous latérale. ornémentation de surface: (M) lisse, (N) rugose irrégulière, (O) rugose parallèle (P) warty, (Q) verruqueuse, (S) aiguillat, (T), poilue.



**Figure n°3:** différents types de la production de spores dans les sporanges chez les actinomycètes (spores endogènes) (Errakhi 2008).

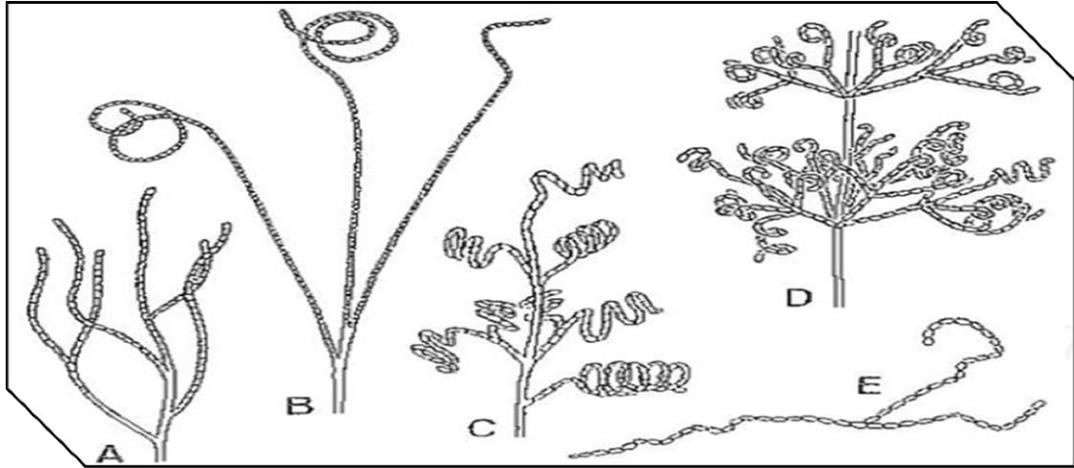
Chez les actinomycètes nocardioformes, le mycélium de substrat se fragmente en éléments dont chacun devient un centre de croissance. On retrouve cette fragmentation des hyphes pour des genres ne produisant que peu ou pas de spores.

Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les spores sont disposées directement sur les hyphes aériennes ou sur de très courtes branches latérales. Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales (Figure n°4 et 5) (Lechevalier et al 1998).



**Figure n°4 :** La production de seule spore et les spores dans les courtes chaînes (spores exogènes)(Miyadoh et al 1997) : Monospore : (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*,

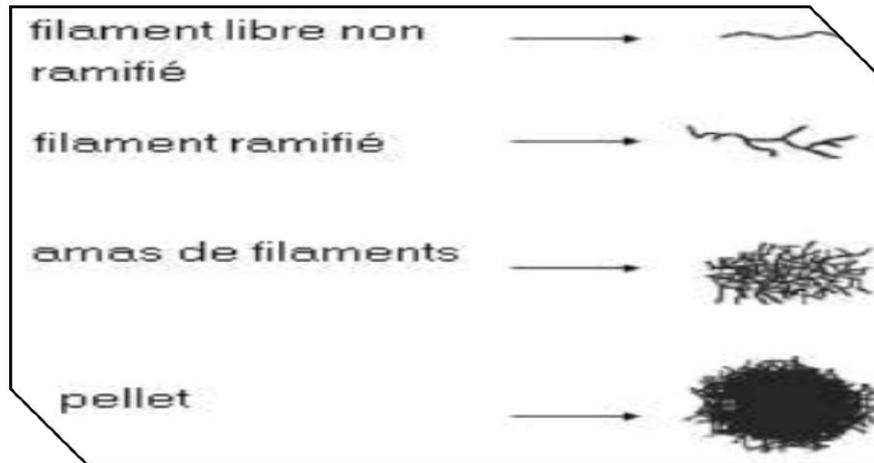
(C) *Saccharomonospora*, (D) *Thermoactinomyces*. Disporous: (E) *Microbispora*.  
Oligosporous: (F) *brevicatena* *Nocardia*, (G) *Catellatospora*.



**Figure n°5 :** la production de spores dans la longue chaîne (Miyadoh et all 1997).

(A) *Rectusflexibilis* : chaînes de spores droites à flexueuse. (B) *Retinaculum Apertum* : chaînes de pores avec des crochets, des boucles ouvertes ou courtes. (C) *Spira* : chaînes de spores en spirales montrant deux sous-types différents: (a), spirale compacte fermée et (b) des spirales ouvertes, libres et tendus. (D) *Verticillata* : chaînes de spores formées en verticilles et les branches en ombelles. (E) Fragmentation d'hyphes aériens ramifié (*Nocardiosis*) : qui peut être droite-flexueux ou en zigzag en forme, fragmenter complètement dans les spores de différentes longueurs

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Keulen et all 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former des pellets (Figure n°6).



**Figure n°6** : les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian et all 2002).

## 6. Caractères structurales

Les actinomycètes ont une structure cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif, et également cette composition structurale pourrait fournir des informations utiles afin de différencier les genres d'actinomycètes.

### 6.1. Acides aminés

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une (Tableau n°3):

- glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes Fermentatives
- glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP), ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives.

Si le DAP est présent, les bactéries contiennent généralement l'un des isomères : la forme LL ou la forme meso (DL) et cela suivant les genres.

Chez quelques actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diamino butyrique (Becker et all 1965).

**Tableau n°3:** Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois des actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier 1970).

Types de paroi	Constituants majeurs	Exemple de genres
I	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP Glycine, xylose, Arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP : Acide 2.6-diaminopimélique ; DAB : Acide 2.4-diaminobutyrique.

### 6.2. Sucres

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP. Sur cette même base, il est aussi possible de répartir en deux sous-groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de Madurose (Tableau n°4).

**Tableau n°4 :** Sucres cellulaires totaux des actinomycètes (Prescott et all 2003).

Profil de sucres	Sucres caractéristiques	Genres représentatives
A	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia, Rhodococcus, Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura, Streptosporangium, Dermatophilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora, Actinosynnema, Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, Xylose	<i>Micromonospora, Actinoplanes</i>

**N.B :** Le madurose est le 3-O-méthyl-D-galactose.

### 6.3. Acides gras

Ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre. Les acides gras rencontrés chez les

actinomycètes sont, soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbones, soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus* (Collin et al 1977 cité par Kitouni 2007).

#### 6.4. Acides nucléiques

Le matériel génétique des actinomycètes est constitué d'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par l'ADN plasmique. Un caractère majeur est la proportion élevée environ 70% de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes (Theilleux 1993).

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3,7 méga daltons, et la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes (Iarpent et al 1989).

### 7. Physiologie de développement

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes. La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier: l'oxygène, le pH, la température...etc. (Sykes et Skinner 1973, Basilio 2003).

#### 7.1. Rapports avec 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*, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs (Le Minor 1989). Ils font partie de la flore de veillons (Avril et al 1992).
- Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier dans le sol (Avril et al 1992).

#### 7.2. Le pH

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8 (Lee et Hwang 2002).

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces neutrophiles (Basilio 2003). Les souches acidophiles croissent à des valeurs de pH optimal de croissance compris entre 4.5 et 5.5 tel que : *Streptacidiphilus jiangxiensis* (Huang et al 2004) et *Streptacidiphilus oryzae* (Wang et al 2006).

### 7.3. La Température

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. La température optimale de croissance est entre 25 à 30 C°. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50 et 60°C. (Rangaswami et all 2004). Le genre *Streptomyces* comporte aussi des espèces psychrophiles (Holt et all 1994) et même thermophiles comme *Streptomyces thermocoprophilus* (Kim et all 2000).

### 7.4. Activité de l'eau (Aw)

La germination des spores de la pluparts des actinomycètes, peut-être observée à des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0,67, l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égal à 0,98 (Zvyagintsev et all2005). En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faible jusqu'à modérés d'humidité (Oskay et all 2004, Prescott et all 2007).

### 7.5. Matière organique

En général les actinomycètes sont des Chimio-organotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi d'être chimio-autotrophes, utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald1990). Afin d'obtenir une croissance abondante, des matières suffisamment énergétiques doivent être fournis et des sources appropriées d'azote, soit organique ou inorganique et certains minéraux sont également nécessaires (Srinivasan et all1991). Certains ont des exigences nutritionnelles en facteurs de croissance telles que les vitamines et certains acides aminés. (Srinivasan et all1991).

### 7.6. Tolérance en NaCl

Selon leurs exigences en NaCl, ces microorganismes sont divisés en deux groupes :

- **Les halophiles** : Ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (Poids/Volume) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.
- **Les halotolérants** : Acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V) ;

et les extrêmement tolérants (se développe de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (Messaoudi 2012).

## **8. Cycle de vie et de développement des actinomycètes**

Les actinomycètes possèdent une structure des procaryotes, mais un cycle biologique qui ressemble à celui de certains champignons (Larpent et Sanglier 1989).

### **8.1. La germination des spores**

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Trois événements distincts sont décrits :

- L'activation: qui débute par un apport de certains cations divalents. C'est un processus nécessitant de l'énergie. Cette étape est accompagnée par des changements de la réfractibilité des spores, d'une diminution de l'absorbance et de la thermorésistance et d'une augmentation remarquable de l'activité respiratoire.
- L'initiation: qui dépend de la présence d'une source de carbone exogène, et elle est marquée par une augmentation de l'activité métabolique et biosynthétique.
- L'émergence du tube germinal: qui nécessite une source de carbone et d'azote (Sharpley et Schaal 1981, Salas et Hardison 1981, Salas et al 1983).

### **8.2. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien**

Le mycélium de substrat également dénommé mycélium végétatif ou primaire, est un ensemble de filaments multi nucléaires, se développe à partir du tube de germination issu de la spore (Theilleux 1993). La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. La largeur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2  $\mu\text{m}$ .

Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette habitude de formation de mycélium de substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaire (Locci 1976).

Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (Smaoui 2010). Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup

moins ramifiés que les hyphes du substrat. Elles sont en général pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe.

Le mycélium du substrat est aérobic facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobic strict (Silvey et Roach 1975).

### **8.3. La formation des spores**

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation: exospores et endospores (Theilleux 1993), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Saffroy 2006).

#### **8.3.1. Les exospores**

Les exospores peuvent être formés sur le mycélium de substrat et/ou le mycélium aérien. Elles sont biologiquement peu actives mais ne se sont pas en dormance. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (Prescott et al 2007).

Les conidies sont formées par septation des extrémités des filaments. Dans ce cas, des parois transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée et des ornements externes peuvent se former (Wildermuth et Hopwood 1970, Williams et al 1972, Miguelez et al 2000).

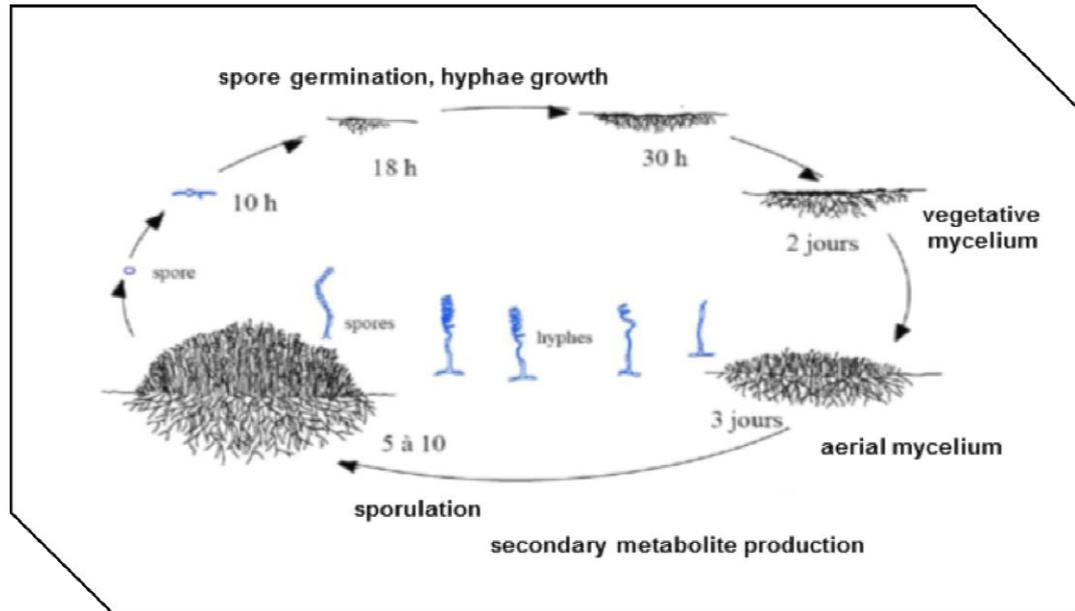
#### **8.3.2. Les endospores**

Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Ces endospores sont semblables à celles des bacillus et clostridium.

Dans ce groupe, une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (Locciet Sharples 1984). On parle ainsi de «sporulation entérothallique», lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale.

On parle de «sporulation holothallique», lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe.

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. C'est un processus hautement régulé (McCormick et Flardh 2012). Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.



**Figure n°7:** Étapes de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes (genre *Streptomyces*) sur milieu solide (Hopwood et all 1985).

## 9. Diversité métabolique

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (Theilleux 1993, Zhang et Zeng 2007). La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (Singh et all 2006).

Le métabolisme des Actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (Strub 2008).

### **9.1. Métabolite primaire**

Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex : acides aminés) en macromolécules (ex : protéine). (Hodgson 2000).

### **9.2. Métabolite secondaire**

De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas de fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié 2005). Le métabolisme secondaire intègre la production des antibiotiques et des molécules permettant un meilleur accès aux nutriments (Wang et al 1999, Hopwood et Challis 2003). Grâce à leur diversité métabolique, c'est à dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents (De Boer et al 1998).

## **10. Rôles des actinomycètes**

### **10.1. Rôles des actinomycètes dans le Sol**

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Ils contribuent à la fertilisation des sols (Goodfellow et al 1984) et jouent un rôle essentiel dans la formation de l'humus en participant activement à la décomposition de la matière organique (Hirsch et Christensen 1983). Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc..(Lechevalier 1981, Goodfellow et Williams 1983).

Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (Goodfellow et Williams, 1983).

Sous des conditions limitantes en fer, certains genres d'actinomycètes produisent des composés de faible poids moléculaire de (400-1000 kDa) appelés sidérophores (Briat, J.F. 1992). Ces derniers dont le rôle est d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques, de le solubiliser et de le chélater le rendant, ainsi, accessible aux micro-organismes (Neilands, J.B. 1995). Cette forte compétition pour le fer provoque une réduction de la croissance saprophyte de l'agent pathogène, et donc de la fréquence des

infections racinaires, ce qui s'accompagne d'une amélioration de la santé de la plante-hôte (Aarab et al 2009).

Des Actinomycètes du genre *Frankia* sont des symbiotes de plantes (Larpen et Larpen-Gourgaud 1985) forment des nodules (nodules actinorhiziens) au niveau des racines de certains arbres et arbustes et participent activement à la fixation de l'azote atmosphérique au même titre que les *Rhizobium* sur les racines des légumineuses en particulier pour le reboisement de sols peu fertiles (*Casuarinacées*) (Sardi et al 1992, Thirupl et al 2001 Pawlowski et Sirrenberg 2003).

Certains genres d'actinomycètes tel que *Thrichoderma sp*, *Micrococcus sp* et *Actinomyces sp* sont capables de solubiliser le phosphate et le mettre assimilable par les plantes par la production des acides organiques et une grande variété des enzymes phosphatases (Mba 1997, Rudresh et al 2005).

### **10.2. Rôles des actinomycètes dans l'industrie**

L'hétérogénéité biochimique des actinomycètes, leur diversité écologique et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire (Abbas 2006).

Les actinomycètes notamment le genre *Streptomyces sp* produisent un grand nombre de métabolites secondaires (figure n°8) tels que : l'acide indolacétique (Khamna et al 2010), les toxines, les pigments (Bastide et al 1986, Keiser et al 2000), et les antibiotiques de structures chimiques très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, macrolides, etc....) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (Okami et Hotta 1988).

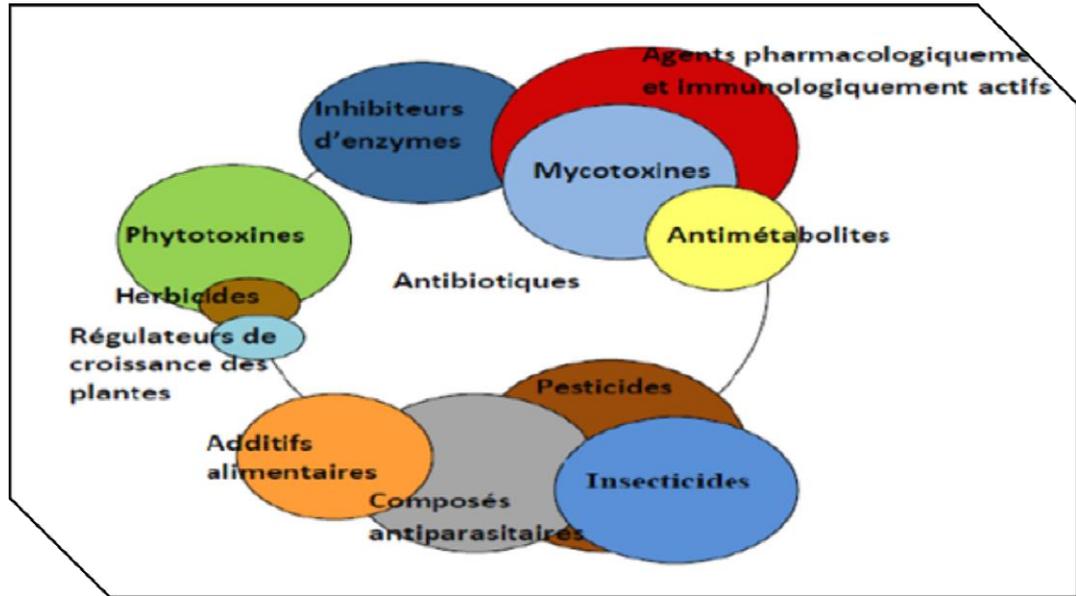


Figure n°8 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn 2005)

# **CHAPITRE III**

# **TAXONOMIE NUMERIQUE**

## 1. Définition

La taxonomie ou taxinomie est l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle consiste à former des groupes d'individus qui se ressemblent selon des critères prédéfinis et à éliminer ceux qui s'en distinguent qui pourront former un autre groupe avec leurs semblables. Ces groupes sont appelés taxons. Deux ou plusieurs taxons peuvent être à leur tour groupés en un nouveau taxon d'un niveau hiérarchique supérieur qui comprendra un plus grand nombre d'individus. De regroupements en regroupements, on arrivera à faire rentrer tous les individus dans un même ensemble (le dendrogramme).

La taxonomie recouvre trois domaines différents: la classification, la nomenclature, et l'identification (Rene-Chaume 1975,Wayen et all 1987, Euzeby2000, Larpent 2000, Stackbrandt et all 2002) :

- La classification établit des taxons selon des critères phénotypiques et moléculaires.
- La nomenclature affecte un nom à ces taxons selon un système binomial procédant des lois de Linné dans lequel un nom latin de genre précède le nom d'espèce.
- L'identification assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits.

Les différentes approches taxonomiques sont :

Taxonomie phénotypique,

Taxonomie numérique,

Chimio-taxonomie,

Taxonomie moléculaire.

### ➤ Taxonomie numérique

La taxonomie numérique a connu un essor remarquable depuis les travaux de Sokal et Sneath (1963) qui ont publié leur travail fondamental "*Principles of Numerical Taxonomy*", qui ouvre une ère nouvelle dans le domaine des classifications (Poncet 1973). De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plusieurs caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et à attribuer pour chaque caractère un code numérique binaire (1 : pour la présence du caractère ou 0 : pour l'absence de ce caractère) (Prescott 2003).

La taxinomie numérique est fondée sur la mathématisation des données observées par un calcul du coefficient de similitude. Le plus utilisé en microbiologie étant celui de Jaccard (tableau 5).

**Tableau n°5:** Calcul du Coefficient de Jaccard entre deux souches A et B.

$S(i, j) = \frac{a}{a + b + c}$	a : caractères présents chez les deux souches (1,1)
	b: caractères propres à la souche A (1, 0)
	c: caractères propre à la souche B (0, 1)

Une matrice résumant les valeurs de ces coefficients inter-individus est établie. Les distances taxonomiques entre tous les individus, pris deux à deux, sont alors déduites de la matrice des similitudes selon l'équation : Distance= 1- Similitude.

### 2. La démarche de la taxonomie numérique

Selon Anderegg (1973), les étapes pour une taxonomie numérique sont les suivantes :

- 1- Choix des objets d'étude: ce sont les taxons à analyser
- 2- Choix des caractères et leurs états qui servent à la description des individus : ils doivent présenter deux états pour chaque caractère (par exemple présence ou absence).
- 3- Codage des états des caractères: L'intérêt portera sur une matrice de caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques codée de façon binaire (1 et 0 ou + et -)
- 4- Choix des algorithmes de construction: choisir un algorithme pour garantir un résultat optimal, c'est à dire obtenir l'arbre le plus adéquat en un temps de calcul raisonnable. Plusieurs programmes sont actuellement proposés à travers l'Internet et en libres droits.
- 5- Calcul du graphe arborescent (la phénogramme): La méthode consiste à regrouper les individus deux à deux et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il ne reste plus que deux groupes (Réne-Chaume 1975, Lecointre 2001).
- 6- Interpréter les résultats: l'interprétation de l'arbre est basée sur la topologie obtenue.

### 3. Les méthodes de construction des arbres

Les différentes méthodes phénétiques peuvent être regroupées en plusieurs catégories: Les méthodes de distance, les méthodes de parcimonie et les méthodes de vraisemblance. Chacune d'elles diffère à la fois par les hypothèses évolutives qu'elles impliquent et par les algorithmes qu'elles utilisent (Edwards et Cavalli- Sforz 1964, Felsenste 1973, Darlu et Tassy 2004).

Les méthodes les plus utilisées sont les méthodes de distance Pour les méthodes de distance, il s'agit tout d'abord de choisir le critère de distance entre les futures feuilles de l'arbre

(individus). Par exemple, si ces individus sont des séquences d'ADN, on peut choisir comme distance entre deux d'entre elles le nombre de nucléotides qui diffèrent. Pour déterminer cette valeur, on est amené à en effectuer un alignement. Puis on peut utiliser la méthode UPGMA ou celle de NJ pour en déduire l'arbre. Par contre, si ces individus ont été étudiés sur les plans morpho-physico-biochimiques, alors les distances découleront des coefficients de similarité.

### **3.1. La méthode UPGMA**

UPGMA utilise un algorithme de clustérisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre se fait pas à pas grâce à cet ordre. Il y a d'abord identification des deux individus (OTU) les plus proches et ce groupe est ensuite traité comme un tout, puis on recherche l'individu le plus proche et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes.

Cet algorithme permet de calculer un arbre ultra métrique (Luchetta et al 2005).

### **3.2. La méthode NJ**

Cette méthode développée par Saitou et Nei (1987) tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches (arbre non ultra métrique). La matrice de distances permet de prendre en compte la divergence moyenne de chacune des individus avec les autres.

L'arbre est alors construit en reliant les individus les plus proches dans cette nouvelle matrice (Luchetta et al 2005).

# **Matériel et méthodes**

## 1. Les Souches étudiées

Notre étude a porté sur des souches fournies par le laboratoire de génie microbiologique et applications université Mentouri constantine par Mlle Khenaka Karima.

Nous avons étudiés treize souches d'actinomycètes notées: FRO9, FRO15, FRO18, FRO19, KRO3, KRO7, KRO8, KRO9 ,KRO11, KRO13 ,KRO14 , BES3 et C15 connu par leur capacité à produire des sidérophores, des auxines et à solubiliser le phosphore inorganique (Annexe 2).

## 2. Les Milieux de culture

- Les milieux d'isolement et de conservation des actinomycètes: Yeast Malt Extract Agar (YMEA).
- Les milieux pour l'étude des caractères microscopiques des actinomycètes: milieux International Streptomyces Project (ISP2).
- Le Milieu Sierra: pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80%.
- CarboxyMéthyl Cellulose-agar (CMC): pour la mise en évidence de la dégradation de cellulose.
- Le milieu TSI: pour la mise en évidence de la production d'H<sub>2</sub>S.
- Bouillon nutritif à 0,1 % de KNO<sub>3</sub>: milieu pour la mise en évidence de la production de nitrate réductase.

## 3. Étude morphologique

La technique de culture sur lame est appliquée pour définir la morphologie des souches bactériennes. Les souches sont ensemencées sur milieu solide ISP2+glucose (Annexe 1). Ensuite, une portion rectangulaire d'Agar de 1cm x 1cm x 2 mm est découpé puis déposé sur une lame et recouvert avec une lamelle. Les cultures sous forme de sandwich sont incubées à 28°C pendant 14 jours. L'observation se fait sous microscope optique à grossissements (X 100) (Zaitlin B et all 2003).

## 4. Étude physiologique et biochimique

### 4.1. Utilisation de sources de carbone

L'utilisation des différents substrats comme sources de carbone a été étudiée selon les méthodes de Shirling et Gottlieb (1966), Goodfellow (1971) et Williams et all (1983b). Le

milieu ISP9 est utilisé comme milieu de base. Les sucres sont incorporés à une concentration finale de 1%, tandis que les sucres alcool et les acides organiques à 0,1% (P/V), les sources utilisées sont :

- **Sucre:** glucose, saccharose, arabinose, xylose, lactose, fructose, maltose, galactose, rhamnose, inositol, xylitol, surbose, mannose, glucose,
- **SucresAlcool :** Mannitol, sorbitol;
- **Acides organiques :** propionate de sodium et succinate de sodium.

L'utilisation des différents substrats est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur les milieux servant de contrôle positif (milieu ISP9 contenant 1% de glucose) et de contrôle négatif (milieu ISP9 sans la source de carbone).

### 4.2. Utilisation de sources azotée

La mise en évidence de la capacité des souches à utiliser de différentes sources d'azote a été déterminée selon la méthode décrite par Williams et all (1983b). Le milieu ISP9 est additionné par des substrats azotés à une concentration de 0,1% (P/V). Les différentes substances utilisées sont : la méthionine, la thiamine, l'alanine, valine, la leucine, la trypsine, l'asparagine, l'histidine, la tyrosine, l'arginine, la proline, la glycine, le tryptophane. Les résultats d'assimilation sont notés après 14 jours par comparaison avec le témoin positif (asparagine) et négatif (sans source d'azote ajoutée).

### 4.3. Les activités de dégradation

La dégradation de la gélatine (0,4%), la caséine (1%), l'amidon (1%), la ninhydrine (0,1%) et l'adénine (0,1%) a été déterminée sur le milieu de base de l'ISP9. L'hydrolyse du tween 80 à 1 % a été testée sur milieu de Sierra (Annexe 1). Les souches sontensemencées sur le milieu et les activités de dégradation sont notées après 14 jours d'incubation.

Pour les composés insolubles, les activités ont été détectées par l'apparition, autour des colonies, de zones claires. Cependant, le résultat pour la gélatine et l'amidon est notée après inondation des cultures respectivement avec la solution de chlorure de mercure (Hg Cl ) et de lugol et laisser à température ambiante pendant quelques minutes (Williams et all 1983a, Hankin et all 1971, Nicemol Jacob et all 2006).

La dégradation de cellulose été déterminée selon la méthode décrite par (Maki et all 2011) à partir d'une culture pure (inoculas) des isolats, une colonie est prélevée, ensuite déposée sur boîte contenant du CMC (Carboxyméthyl cellulose) gélosé (Annexe 1). La production de

cellulase est mise en évidence par la coloration à la solution Iodine (Gram) (Annexe 1). Pour ce faire, un volume de 10 ml est coulé dans la boîte. Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulase.

#### **4.4. Production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S)**

Des tubes contenant du milieu TSI (Annexe 1) sont ensemencés puis incubés pendant 14 jours à 28°C. La production de l'H<sub>2</sub>S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu (Guiraud 1998).

#### **4.5. Réduction des nitrates**

Le nitrate Réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrates NO<sup>-3</sup> en NO<sup>-2</sup> (nitrite) ou en azote. Elle est mise en évidence selon le protocole de (Singleton 1999). 10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium (Annexe 1) sont ensemencés et incubés à 28°C. Au 5eme, 10eme et 14eme jour d'incubation, trois gouttes des réactifs de Griess I et II sont ajoutées à 1ml de culture. La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés. L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche). En absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites).

#### **4.6. La sensibilité aux divers agents physiques et chimiques**

Pour évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis de certains composés, à des concentrations définies, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinomycètes sont choisis à savoir :

##### **4.6.1. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques**

Pour l'étude de l'effet d'inhibiteurs chimiques sur la croissance bactérienne, les souches d'actinomycètes sont ensemencées sur milieu ISP9 + glucose (Annexe 1) additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes : phénol (0,1 P/V), Crystal violet (0,0001 P/V). Sur le même milieu, l'effet des pesticides sur la croissance des actinomycètes est étudiées aussi, les pesticides testés sont : Tilt (propiconazol [(Dichloro 2,4phényl)-2propyl-4dioxolanne-1,3yl-2]-méthyl]-1lh-triazole-1,2,4(2RS,4RS)(2RS,4SR)), Topik (clodinafop-propargyl[2-propylnyl-(R)-2-[4-(5-chloro-3-fluro-2-pyridinyloxy)-phenoxy]]propionate)], Trypsine, Sulfo. Tous les pesticides sont testés à deux concentrations, 10 et 50 µg/ml.

La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée après 7 et 14 jours d'incubation par comparaison avec le témoin (Williams et al 1983, Gordon et al 1977).

#### **4.6.2. Tests de sensibilité à divers agents physiques**

##### **4.6.2.1. Croissance microbienne à différentes concentration en NaCl**

Une colonie d'actinomycète estensemencée sur le milieu ISP9 + glucose ou YMEA à différentes concentrations en NaCl. Les concentrations étudiées sont : 2%, 4%, 6%, 7%, 8%, 10% et 13%. Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance des souches est estimée visuellement après 14 jours d'incubation (Crawford et al 1993).

##### **4.6.2.2. Croissance microbienne à différents valeurs de pH**

Les souches d'actinomycètes sontensemencées sur le milieu YMEA ou ISP9 + glucose (Annexe1) tamponné à différents pH (4,5, 6,7, 7.5, 8, 9). La croissance des souches est estimée visuellement après 14 jours d'incubation à 30°C (Crawford et al 1993).

#### **4.7. La résistance aux antibiotiques**

La mise en évidence de la sensibilité des souches d'actinomycètes aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (YMEA) (Annexe1), recommandée par Williams et al (1983). Les différents antibiotiques utilisés sont , des beta lactamines : l'imipenème (IPM), peneceline (P),l'amoxicilline (AMC30),cefotaxime (CTX), des glycopeptides : vancomycine (Va), des macrolides : l'Erythromycine (E), des aminoside : la gentamicine (CN), phénicolés : chloromphenecol (C) et les diaminopyrimidines : trimethoprim (SXT), et À partir des cultures pures des souches d'actinomycète, une colonie estensemencée par stries sur la surface de la gélose puis les disques d'antibiotiques y sont déposés. Après une pré-diffusion de 30 minutes, les boites sont incubées à 30°C pendant 3 à 5 jours, ensuite les diamètres d'inhibition sont mesurés.

#### **5. Taxonomie numérique**

Afin d'étudier la ressemblance entre les souches étudiées. Une matrice binaire est établie en regroupant tous les caractères étudiés. La matrice binaire est créée par Excel dont le « 1 » représente la présence de caractère alors que le « 0 » représente son absence.

Les matrices de distance et les arbres établis sont réalisés par le logiciel Past 3.

# **Résultats et discussion**

## 1. Étude morphologique

### 1.1. Aspect microscopique

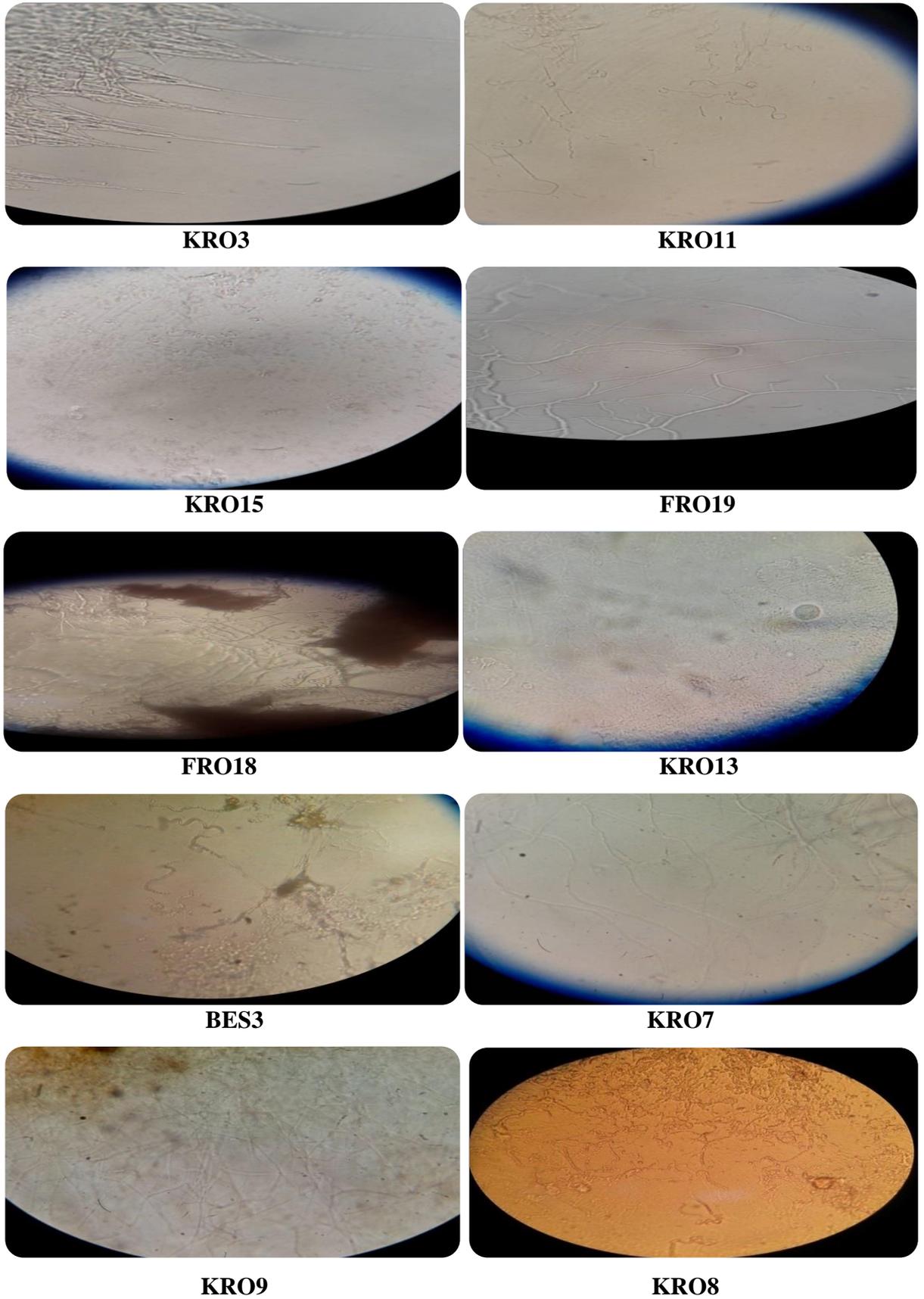
L'étude microscopique des 13 souches par la technique des lames a donné les résultats rassemblés dans le tableau n°6. Il apparaît que toutes les souches développent un mycélium de substrat à l'exception de la souche BES3. D'autres parts, on constate que à l'exception des souches KRO14, C15 et FRO9 toutes les souches développent un mycélium aérien longue, fine et ramifiée, peu épais pour la souche FRO19, ces hyphes aériens portent des chaînes de spores qui sont de forme rectiflexible pour les souches FRO18, BES3, KRO3, KRO7 et KRO13, Retinaculum Apertum pour les souches KRO11 et KRO8, et spirale pour la souche FRO15 de 4 à 5 spire (Figure n°9).

La longueur des chaînes de spores est variable, elle est supérieure à 20 spores par chaîne pour les souches BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 et KRO13 et inférieure à 20 spores par chaîne pour les souches FRO15 et FRO18. La forme de spores est arrondie pour les souches FRO15, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 et KRO13, tandis que pour les autres souches FRO18 et FRO19 les spores sont de forme cylindrique. Les souches KRO9 et FRO19 ne forment pas des spores. Il est noté aussi qu'aucune autre structure n'est observée comme les sporanges.

**Tableau n°6:** Aspect microscopique des souches actinomycétales

Souches	Mycélium de substrat	Mycélium aérien						
		La forme des chaînes de spores			La longueur des chaînes de spores		La forme de spore	
		RF	S	RA	<20	>20	Cylindrique	Arrondie
FRO9	+	-	-	-	-	-	-	-
FRO15	+	-	+	-	+	-	-	+
FRO18	+	+	-	-	+	-	+	-
FRO19	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	+	-	-	-	-	-	-	-
BES3	-	+	-	-	-	+	+	-
KRO3	+	+	-	-	-	+	-	+
KRO7	+	+	-	-	-	+	-	+
KRO8	+	-	-	+	-	+	-	+
KRO9	+	-	-	-	-	-	-	-
KRO11	+	-	-	+	-	+	-	+
KRO13	+	+	-	-	-	+	-	+
KRO14	+	-	-	-	-	-	-	-

(+): présence, (-): absence.



**Figure n°9:** La morphologie microscopique des souches d'actinomycètes (x100).

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 sp*, *Streptoverticillium sp*, *micromonospora sp*, *microbispora sp...*) peuvent être identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia sp*, *Actinomadura sp...*) par simple observation microscopique (Williams et all 1993).

Sur la base des observations microscopiques, les souches FRO15, FRO18, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 et KRO13 montrent les traits typiques liés aux Streptomycètes, ce qui laisse supposer leur appartenance à ce genre *Streptomyces sp*. Cette classification est confirmée par la forme des chaînes de spores qui sont de forme spirale, droit ou rectiflexible, selon Myadoh et all (2002) ces formes sont typique des *Streptomyces sp*, à cela s'ajoute la forme arrondie à cylindrique et la surface lisse des spores qui selon Ezra et all 2004 caractérise le genre *Streptomyces sp*.

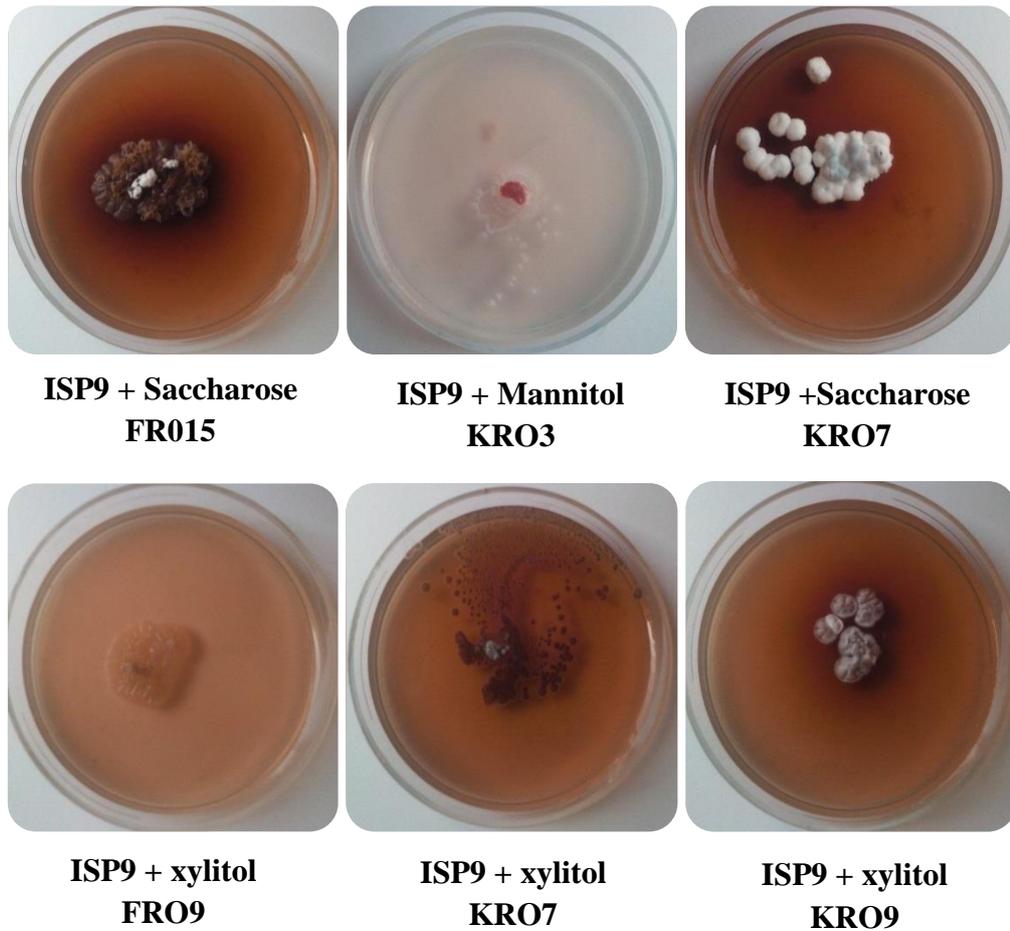
Par contre les autres souches on n'a pas pu les déterminer leur genre parce que on a fait une étude morphologique limitée.

## **2. Étude physiologique et biochimique**

### **2.1. Utilisation des sources de carbone**

Les 13 souches diffèrent par leurs capacités à utiliser les différentes sources de carbone. Toutes les souches sont capables d'utiliser le fructose, l'inositol, le maltose, le mannose et le saccharose comme seule source de carbone.

Pour l'ensemble de 17 sources de carbone. FRO18 et KRO11 utilisent les 17 sources comme elles donnent une croissance très abondante avec le xylitol et glucose. Les souches FRO19, BES3 et KRO8 assimilent 15 sources et elles sont toutes incapables d'utiliser le surbose et le xylose. Les souches KRO3 et KRO13 assimilent 14 sources de carbone avec une croissance faible pour l'arabinose, le mannitol et le propionate de sodium, comme elles sont incapables d'assimiler le surbose et le xylose. Les souches FRO9 et KRO9 assimilent 13 sources de carbone, KRO7 et FRO15 utilisent 12 sources, et KRO14 et C15 utilisent respectivement 10 et 6 sources de carbone (Tableau n°7, Figure n°10).



**Figure n°10:** photographies de l'utilisation des sucres comme source de carbone par les souches FRO15, KRO3, KRO7, KRO3, KRO9, FRO9.

**Tableau n°7 :** utilisation des sources de carbone.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KR O3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
Arabinose	+	+	±	+	-	+	±	-	+	-	±	±	-
Fructose	+	+	+	++	±	+	±	+	±	±	±	+	±
Galactose	±	-	+	±	-	±	++	±	++	±	+	±	-
Glucose	++	±	++	++	-	±	+	±	++	+	++	-	±
Inositol	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+
Lactose	+	-	+	+	-	±	++	-	+	±	++	±	±

Tableau n°7 (suite) : utilisation des sources de carbone.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KR O3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
<b>Maltose</b>	+	+	+	+	±	±	±	+	±	+	+	+	±
<b>Mannitol</b>	-	-	±	±	-	±	±	±	++	-	++	±	-
<b>Mannose</b>	+	±	+	±	±	+	+	+	++	±	+	+	±
<b>Rhamnose</b>	+	±	+	±	-	±	-	-	±	±	±	±	-
<b>Saccharose</b>	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	±	++
<b>Sorbitol</b>	+	±	++	+	-	+	±	+	+	+	+	+	±
<b>Surbose</b>	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
<b>Xylose</b>	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
<b>Xylitol</b>	±	±	++	++	-	+	+	++	+	±	++	+	±
<b>P.de sodium</b>	-	±	++	+	±	±	±	±	±	+	±	±	-
<b>Su.de sodium</b>	-	±	+	+	-	++	±	+	+	+	±	+	±

(-): pas de croissance, (±): croissance faible, (+): croissance modérée, (++) : Croissance abondante.

## 2.2. Utilisation de sources azotée

Toutes les souches sont capables d'assimiler le proline, l'alanine, l'histidine, glycine, valine, leucine, trypsine et l'asparagine. De même, toutes les souches sont capables d'utiliser la méthionine et tyrosine à l'exception de la souche C15. Seulement les souches FRO19 et C15 sont incapables d'utiliser la thiamine. Pour l'arginine seul les deux souches BES3 et C15 qui sont incapable de le utiliser. Seules les souches FRO15, C15 et KRO8 sont incapable d'utiliser le tryptophane (Tableau n°8). Quelques photographies montrent l'utilisation de source d'azote par quelques souches sont représentée dans la figure n°11.

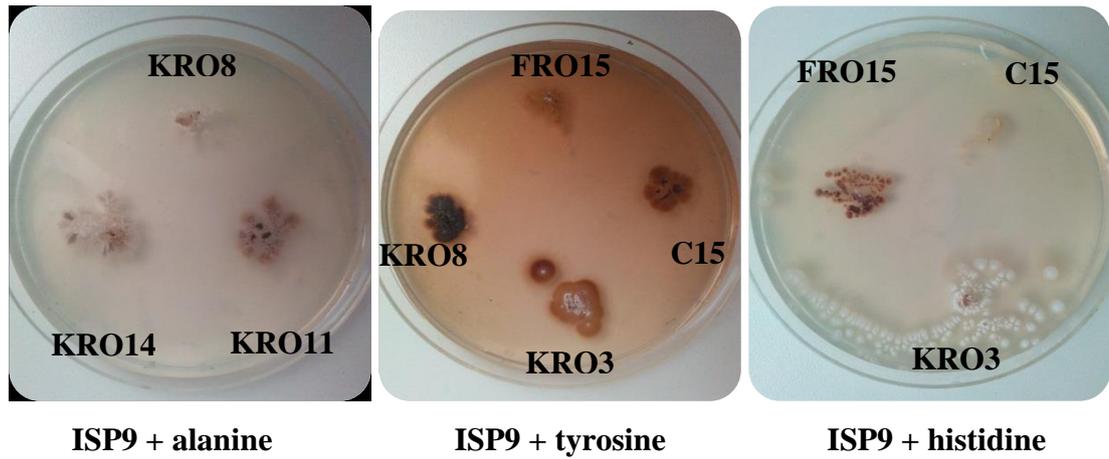


Figure n°11: photographies de l'utilisation des acides aminés comme source d'azote par les souches KRO8, KRO14, KRO11, KRO3, FRO15 et C15.

Tableau n°8 : Utilisation des sources d'azote.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
Arginine	+	+	+	±	-	-	+	+	±	±	+	+	±
Proline	+	±	+	±	±	+	±	±	±	+	+	+	+
Thiamine	+	±	±	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±
Tyrosine	±	±	+	±	-	±	±	±	+	±	+	±	±
Alanine	+	±	+	+	++	+	+	±	+	+	+	±	+
Histidine	+	+	++	+	±	++	++	+	+	±	++	±	±
Glycine	±	±	++	+	±	+	+	±	±	+	±	±	±
Méthionine	±	±	±	±	-	±	+	±	±	±	±	±	±
Valine	++	±	++	±	++	++	+	+	±	+	+	±	±
Leucine	+	±	+	±	±	±	+	±	±	±	+	±	±
Tryptophane	+	-	+	+	-	+	±	+	-	+	+	±	±
Trypsine	±	±	+	±	±	±	+	±	±	±	+	+	±
Asparagine	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	±	±	+

(-) : pas de croissance, (±): croissance faible, (+) : croissance modérée, (++) : croissance abondante.

Grace à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'azote, les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. Ces tests n'indiquent pas l'appartenance ou non des souches étudiées aux Streptomycètes, mais ils nous renseignent sur les habitudes et les caractères des souches selon Shirling et Gottlieb (1966). La plupart des études taxonomiques des actinomycètes, qui concernent l'assimilation des sources de carbone et d'azote, utilisent ces tests pour juste connaître le métabolisme et bien caractériser les souches pour des études ultérieures (Bouras et al 2013, Suneetha et al 2011, Nonoh et al 2010, Dehnad et al 2010).

### 2.3. Les activités de dégradation

Toutes les souches hydrolysent la Gélatine. Tandis que toutes les souches sont incapables de dégrader l'adénine et la Cellulose à l'exception de la souche KRO8.

La Caséine a été dégradée seulement par les quatre souches FRO15, KRO3, KRO7 et KRO9. Uniquement les deux souches KRO3 et KRO9 ne dégradent pas l'amidon et seules les deux souches KRO11 et KRO14 ne dégradent pas le tween 80 (Tableau n°9). De plus, toutes les souches sont incapables de dégrader la Ninhydrine à l'exception de trois souches KRO3, KRO7 et KRO11.

Quelques photographies montrent l'activité de dégradation exercée par quelques souches et sont représentées dans la figure n°12.

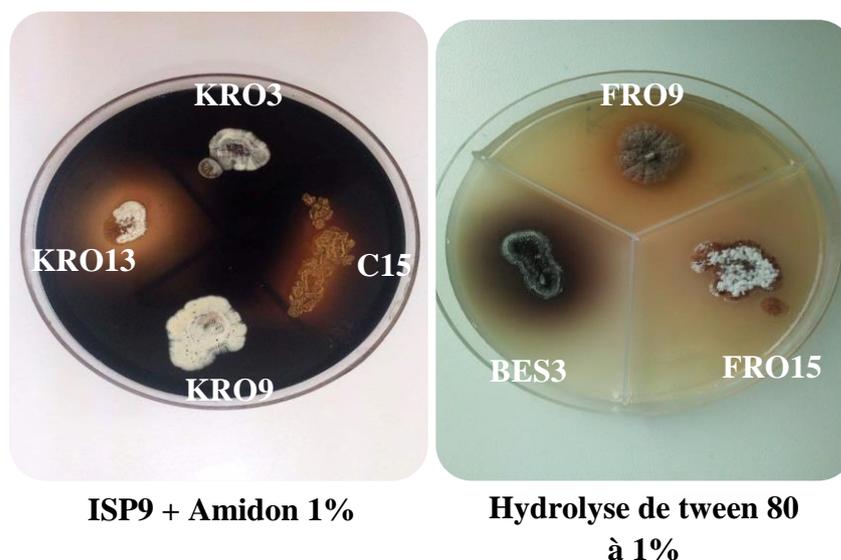


Figure n°12: photographies des activités de dégradation.

Tableau n°9 : Les différentes activités de dégradation.

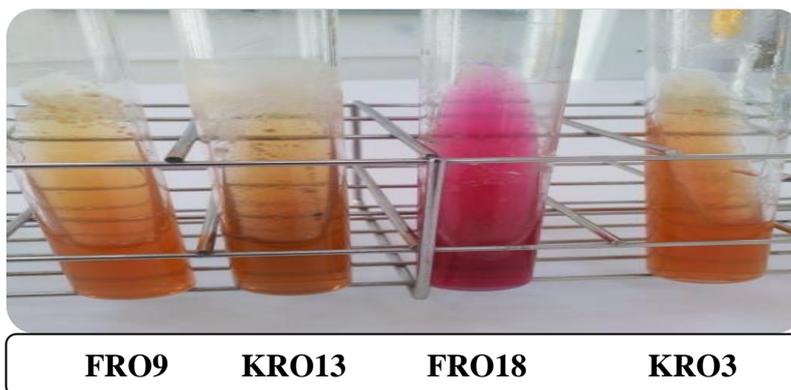
	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
<b>Gélatine</b>	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+
<b>Caséine</b>	-	++	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<b>Amidon</b>	+	++	+	+	++	++	-	+	+	-	±	++	++
<b>Adénine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cellulose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
<b>Tween80</b>	++	++	±	++	±	++	++	+	++	±	-	+	-
<b>Ninhydrine</b>	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±	-	-

(-): pas de dégradation, (±): dégradation faible, (+): dégradation modérée, (++) : dégradation forte.

D'après les résultats du tableau 9 la plupart des souches étudiées sont des microorganismes saprophytes, qui ont la capacité d'hydrolyser des polymères. C'est grâce à leur diversité métabolique, c'est à dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, que les actinomycètes jouent un rôle extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par la fertilisation du sol (Hirsch et Christensen, 1983).

#### 2.4. Production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S)

Toutes les souches ne présentent aucune production d'H<sub>2</sub>S dans le milieu TSI (Absence taches noire dans le milieu) (figure 13). Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau n°10.



**Figure n°13:** photographies de l’absence de production d’H<sub>2</sub>S par les souches étudiées.

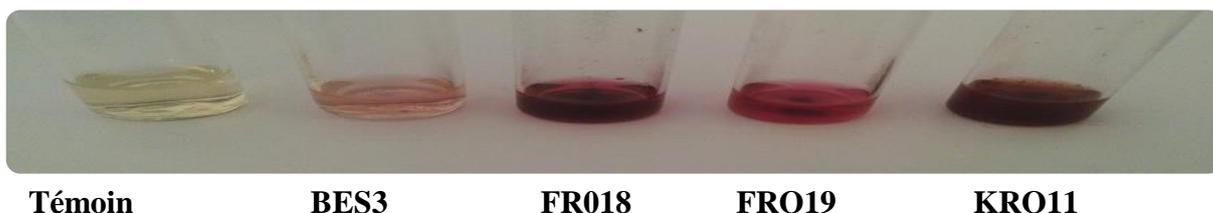
**Tableau n°10 :** résultats de la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D’après ces résultats les souches étudiées ne sont des bactéries sulfato-réductrices C’est-à-dire elles sont incapables de produire l’hydrogène sulfuré par fermentation anaérobie de la matière organique, ce dernier joue un rôle essentiel dans le cycle biologique du soufre.

### 2.5. La réduction des nitrates

Les souches FRO15, FRO19, BES3, KRO11, KRO14 a montré des réactions négatives pour leur activité nitrate réductase après 5, 10 et 14 jours d’incubation par contre les souches FRO9, FRO18, C15, KRO3, KRO7, KRO8, KRO9, KRO13 indique la production de cette enzyme (Tableau n°11) (Figure n°14).



**Témoin                      BES3                      FRO18                      FRO19                      KRO11**

**Figure n°14:** photographies de la production de nitrate réductase après 14 jours par les souches BES3, FRO18, FRO19 et KRO11.

**Tableau n°11** : la réduction de nitrate.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
<b>Nitrate réductase</b>	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-

(-) : absence, (+) : présence.

60% de nos isolats ont réduit le nitrate en nitrite par l'utilisation des nitrates réductases. La présence de nitrate dans le sol est issue principalement de l'agriculture suite à l'épandage des doses massives d'engrais azotés. Les bactéries participent ainsi dans la réduction des nitrates en nitrites et par la suite en ammoniac qui va être assimilé par les plantes. Cependant, les nitrates constituent aujourd'hui la cause majeure de pollution du sol dans le globe. Grace à cette capacité de dégradation les actinomycètes jouent un rôle important dans la dépollution.

## 2.6. La sensibilité à divers agents physiques et chimiques

### 2.6.1. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques

Dans le Tableau n°12 sont portés les résultats de la croissance des souches en présence de différents inhibiteurs. Seules les souches FRO15, C15, BES3, KRO9, KRO14 leur croissance a été inhibée en présence de phénol, Cependant, la croissance des toutes les souches n'a pas été affectée en présence de Crystal violet.

La croissance de toutes les souches a été inhibée en présence des deux pesticides (Tilt et Topik) pour les deux concentrations (1et 5 %), par contre la croissance des toutes les souches n'a pas été affectée par les deux autres pesticides (Trypsine et sulfo).

Quelques photographies montrent la croissance et l'inhibition de quelques souches sont représentée dans la figure n°15.

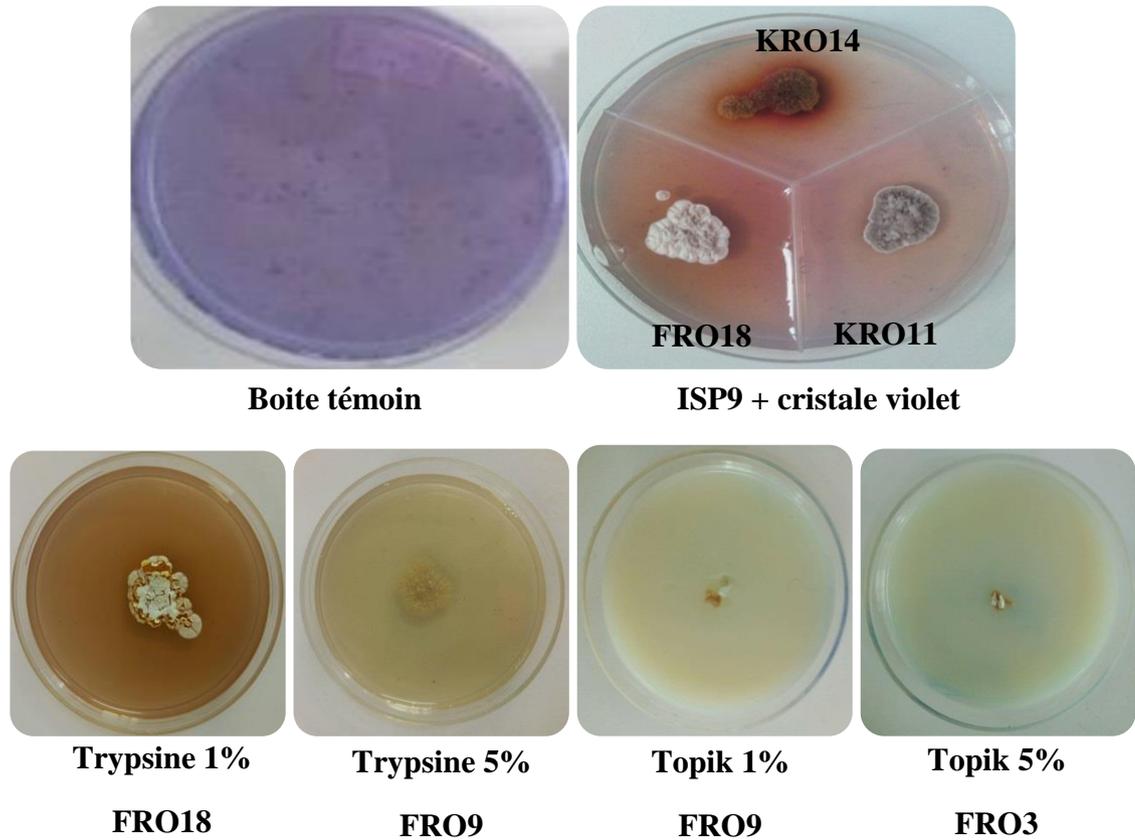


Figure n°15 : photographie de la croissance des souches en présence d'inhibiteur.

Tableau n°12 : Croissance en présence d'inhibiteurs.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
Phénol	±	-	±	±	-	-	+	±	±	-	+	+	-
Crystal violet	+	+	+	++	±	±	++	+	±	±	+	+	+
Tilt 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilt 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Topik 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Topik 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin 1%	±	±	+	±	+	+	±	+	+	±	+	+	±
Trypsin 5%	±	±	+	±	±	±	±	+	±	±	+	+	±
Sulfo 1%	±	+	+	±	+	±	±	+	±	±	±	+	+
Sulfo 5%	±	±	+	±	+	+	±	+	+	±	+	+	+

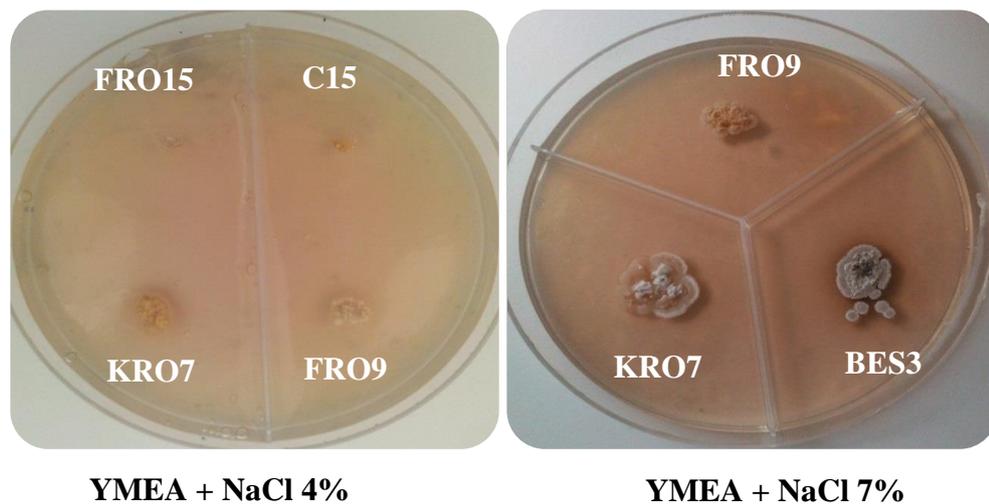
(-): pas de croissance, (±) : croissance faible, (+) : croissance modérée.

Malgré les conditions défavorables pour la croissance des isolats. Il y a quelques souches qui sont restées vivantes en présence de phénol, de Crystal violet et certains types de pesticides, cela permettrait de mieux exploiter la capacité de la biodégradation et de la biotransformation des actinomycètes pour des applications telle que la bioremédiation.

## 2.6.2. La sensibilité à divers agents physiques

### 2.6.2.1. La Croissance microbienne à différentes concentration en NaCl

Les résultats indiquent que la croissance des 13 souches étudiées est variable d'une concentration à une autre avec une croissance optimum entre 2% et 6% en NaCl par contre on observe une absence totale de développement à 13% en NaCl pour toutes les souches étudiées (Tableau n°13). Quelques photographies montrent la croissance microbienne de quelques souches sont représentée dans la Figure n°16.



**Figure n°16 :** photographie de la croissance des souches KRO7, FRO15, C15 et FRO9 à 4% en NaCl et à 7% pour les souches KRO7, FRO9 et BES3.

**Tableau n°13** : La croissance des souches actinomycètes sur le milieu YMEA à différentes concentrations de NaCl.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
NaCl 2 %	+	+	++	+	++	-	++	++	++	+	++	+	++
NaCl 4 %	++	±	+	+	-	+	+	±	±	±	+	+	++
NaCl 6 %	±	-	±	+	++	-	++	++	++	+	++	+	+
NaCl 7 %	-	-	-	±	-	+	±	+	-	-	±	±	-
NaCl 8 %	±	±	±	±	-	+	+	±	+	±	+	±	±
NaCl 10 %	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
NaCl 13 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): pas de croissance, (±): croissance faible, (+): croissance modérée, (++) : Croissance abondante.

Ce tableau montre que la majorité de ces souches sont des halotolérants qui sont capables de croître dans une gamme de salinité de 2-10% de NaCl (Kuznetsov et al, 1992). Ces données nous donnent donc un aperçu sur la diversité des milieux colonisés par les actinomycètes ainsi, que leur adaptation et leur résistance à certaines conditions hostiles.

#### 2.6.2.2. La Croissance microbienne à différents valeurs de pH

Selon les résultats de la croissance des 13 souches étudiées à différentes valeurs de pH, Nous avons constaté que toutes les souches sont capables de se développer à différentes valeurs de pH (5, 6, 7, 7.5, 8 et 9) avec un optimum de croissance à pH= 9 (pH alcalin).

Le pH = 4 semble influencer négativement la croissance de tous les souches étudiés (Tableau n°14, Figure n°17)

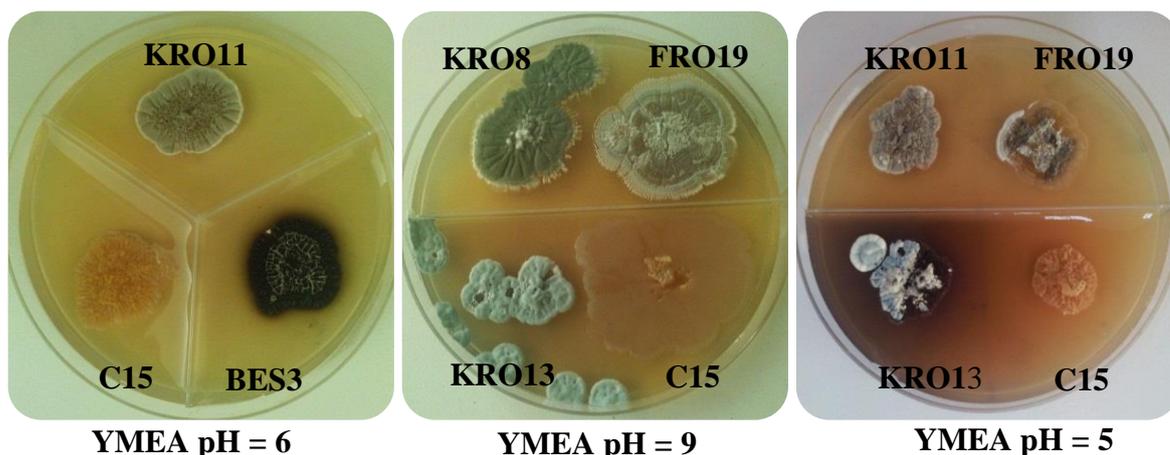


Figure n°17 : photographie de la croissance des souches KRO11, KRO8, KRO13, FRO19, C15 et BES3 à différent valeur de pH.

Tableau n°14 : Test de croissance des souches d’actinomycètes a différent valeur de pH.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 5	+	+	+	+	±	+	++	++	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	++	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+
pH 7	++	+	+	+	+	+	++	++	+	++	+	++	+
pH 7,5	+	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+
pH 8	+	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+
pH 9	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

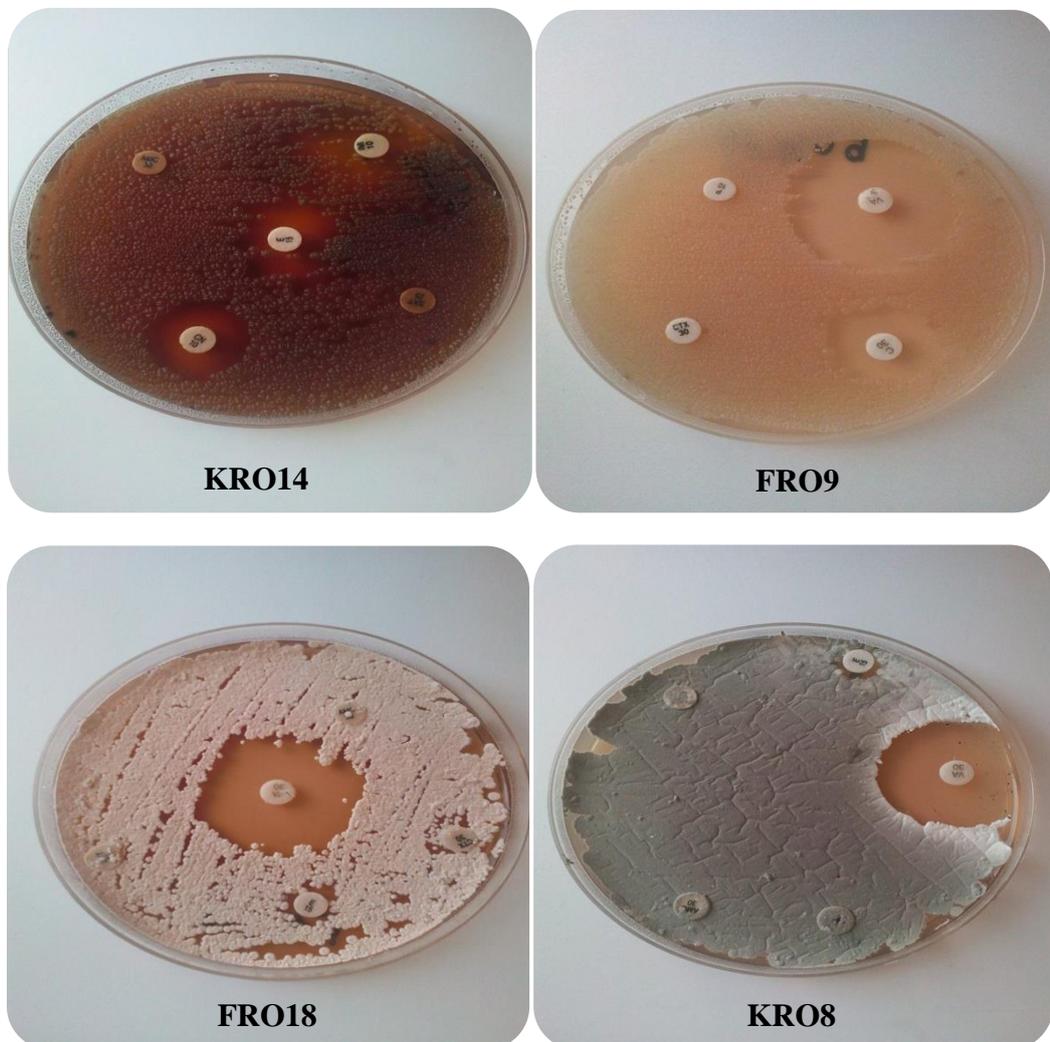
(-): pas de croissance, (±): croissance faible, (+): croissance modérée, (++) : Croissance abondante.

La plupart des souches de *Streptomyces* se comportent comme des neutrophiles dans la nature, avec une croissance entre un pH 5 et 9, et avec un optimal près de la neutralité (williams et al 1983a), cette capacité de vivre avec une croissance abondante à différente valeur de pH est lié ainsi par la production abondante des molécules actives, ce qui en parfaite concordance avec l’activité métabolique des actinomycètes. Dans notre cas, et selon les résultats obtenus, toutes les souches ont une croissance très abondante en pH alcalin, ce qui laisse penser que ces souches peuvent être appliquées dans des sols alcalins.

### 2.7. La résistance aux antibiotiques

Toutes les souches sont sensibles à la gentamicine à l'exception de deux souches KRO13 et FRO18, et à la vancomycine à l'exception de la souche C15 et à la chloromphynocol à l'exception de deux souches : BES3 et KRO3. Cependant elles sont toutes résistantes à la triméthoprim, à l'rythromycine sauf les souches FRO18, FRO19 et KRO14 et elles sont toutes résistantes à imipénème, amoxicilline et pénicilline à l'exception de la souche KRO9 et à la cefotaxime sauf la souche C15 (Tableau n°15).

La plus grande zone d'inhibition a été enregistrée avec vancomycine pour la souche BES3 (53 mm). Quelques photographies montrent la sensibilité et la résistance de quelques souches sont représentées dans la figure n°18.



**Figure n°18** : photographies de la sensibilité et de la résistance des souches KRO14, FRO9, FRO18, KRO8, aux antibiotiques.

Tableau n°15 : La résistance aux antibiotiques.

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
érythromycine	0	0	9	14	0	0	0	0	0	0	0	0	16
gentamicine	18	20	0	19	13	20	10	16	20	20	10	0	18
imipenème	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
amoxicilline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Pénicilline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Chloromphynecol	20	20	14	21	19	0	0	50	15	20	15	21	48
Trimethroprim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefotaxime	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Vancomycine	34	35	33	37	0	53	14	28	26	35	10	24	42

Les souches étudiées soumises à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques. Williams (1967) a rapporté que les souches appartenant à la même espèce présentent généralement le même profil de sensibilité, la différence est généralement notée par rapport à un ou deux antibiotiques.

Les Streptomyces sont des germes multi-résistants aux antibiotiques (Rigali S et all 2008), la majorité des  $\beta$ -lactamines, des céphalosporines, et des macrolides sont inefficaces contre eux (Veyssier P 1979). La raison, à cette multi-résistance, est que la plupart des classes de ces antibiotiques cités sont produits par le genre *Streptomyces sp.* D'après notre étude la majorité des souches d'actinomycètes ont montrés une résistance vis-à-vis des bêta-lactamines, des macrolides.

## 2.8. Production des sidérophores, des auxines et solubilisation de phosphate

D'après les résultats fournis par le laboratoire de génie microbiologie et application (Annexe 2), la capacité à solubiliser le phosphate inorganique varie d'une souche à l'autre, sur les 13 isolats analysés, seulement les deux souches KRO3 et KRO7 sont capables de solubiliser le phosphate inorganique. Ainsi, dans cette étude, 15,4 % des souches d'actinomycètes sont capables de solubiliser le phosphate inorganique. Ces résultats sont proches de ceux obtenus

par d'autres auteurs. Hamdali et all (2008) ont montré que parmi 300 actinomycètes étudiés, seulement 55 souches solubilisent le phosphate. La capacité de la solubilisation du phosphate par les bactéries promotrices de croissance comme les actinomycètes est un caractère très important pour la fertilisation des sols et pour rendre le phosphate plus disponible et assimilable par les plantes.

Les treize souches ont la capacité à produire des sidérophores, ces chélateurs de fer améliorent l'assimilation du fer par la plante, en fait, le fer est un élément essentiel pour la santé et la croissance des plantes, car il est indispensable à formation de la chlorophylle, à la respiration de la plante, à la fixation de l'azote et à la synthèse de certaines protéines.

Les souches FRO19, C15, BES3 et KRO7 sont productrices des auxines. Ces phytohormones est améliorent ainsi la croissance végétale, en augmentant le taux de germination, l'élongation racinaire et le poids sec des racines (Tokala et all 2002). Selon Matsukawa et all (2007), chez de nombreuses espèces de *Streptomyces sp*, l'indole 3-acétique acide (AIA) stimule la formation du mycélium et améliore également la production des antibiotiques.

### **3. Taxonomie numérique**

Tous les résultats obtenus sont représentés dans une matrice binaire (Tableau 16).

Tableau n°16 : Matrice binaires des caractères étudiés.

Souches	Caractères morphologique										Source de carbone										Source d'azote																						
	phosphate	Sidérophores	Auxines	MS	MA	Sporulation de MA	Chaîne de S <20	Chaîne de S >20	spore cylend	spore arrondi	Arabinose	fructose	galactose	Glucose	inositol	Lactose	maltose	mannitol	mannose	rhamnose	Saccharose	Sorbitol	Surbose	Xylose	xylitol	P de sodium	Su de sodium	Arginine	proline	thiamine	Tyrosine	alanine	nynhydrine	Histidine	glycine	méthionine	valine	leucine	tryptophane	trypsine	asparagine		
<b>FRO9</b>	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0		
<b>FRO15</b>	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<b>FR018</b>	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	
<b>FR019</b>	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
<b>C15</b>	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
<b>BES3</b>	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
<b>KRO3</b>	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
<b>KRO7</b>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	
<b>KRO8</b>	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>KRO9</b>	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	
<b>KRO11</b>	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	
<b>KRO13</b>	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>KRO14</b>	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

MS : mycélium de substrat, MA mycélium aérien.

Tableau n°16 (suite) : Matrice binaires des caractères étudiés.

Souches	Activité de dégradation								Effet d'inhibiteur chimique								Effet d'inhibiteur physique								Résistance aux antibiotiques																			
	H2S	Nitrate réductase	caséine 1%	tween 80%	Cellulose	Adénine 0,1%	Amidon	Gélatine 0,4%	Phénol	Crystal violet	Tilt 1%	Tilt 5%	Topik 1%	Topik 5%	Trypsine 1%	Trypsine 5%	Sulfo 1%	Sulfo 5%	Nacl 2%	Nacl 4%	Nacl 6%	Nacl 7%	Nacl8%	Nacl 10%	Nacl 13%	Ph 4	Ph 5	Ph 6	Ph 7	PH 7,5	Ph 8	Ph 9	érythromycine	gentamicine	Imipenème	Amoxiciline	Pénicilline	Chloromphyne	Trimethoprim	Cefotaxime	Vancomycine	Vancomycine		
FRO9	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
FRO15	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
FR018	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
FR019	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
C15	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	
BES3	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
KRO3	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
KRO7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
KRO8	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
KRO9	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
KRO11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
KRO13	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
KRO14	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	

### 3.1. Calcul de la matrice de distance

Le calcul du coefficient de Jaccard pour chaque souche bactérienne nous a permis de calculer la matrice de similarité. Une fois calculée, cette matrice servira pour le calcul de la matrice des distances selon l'équation : Distance = 1 - Similitude.

La matrice de distance obtenue est présentée dans le tableau 17.

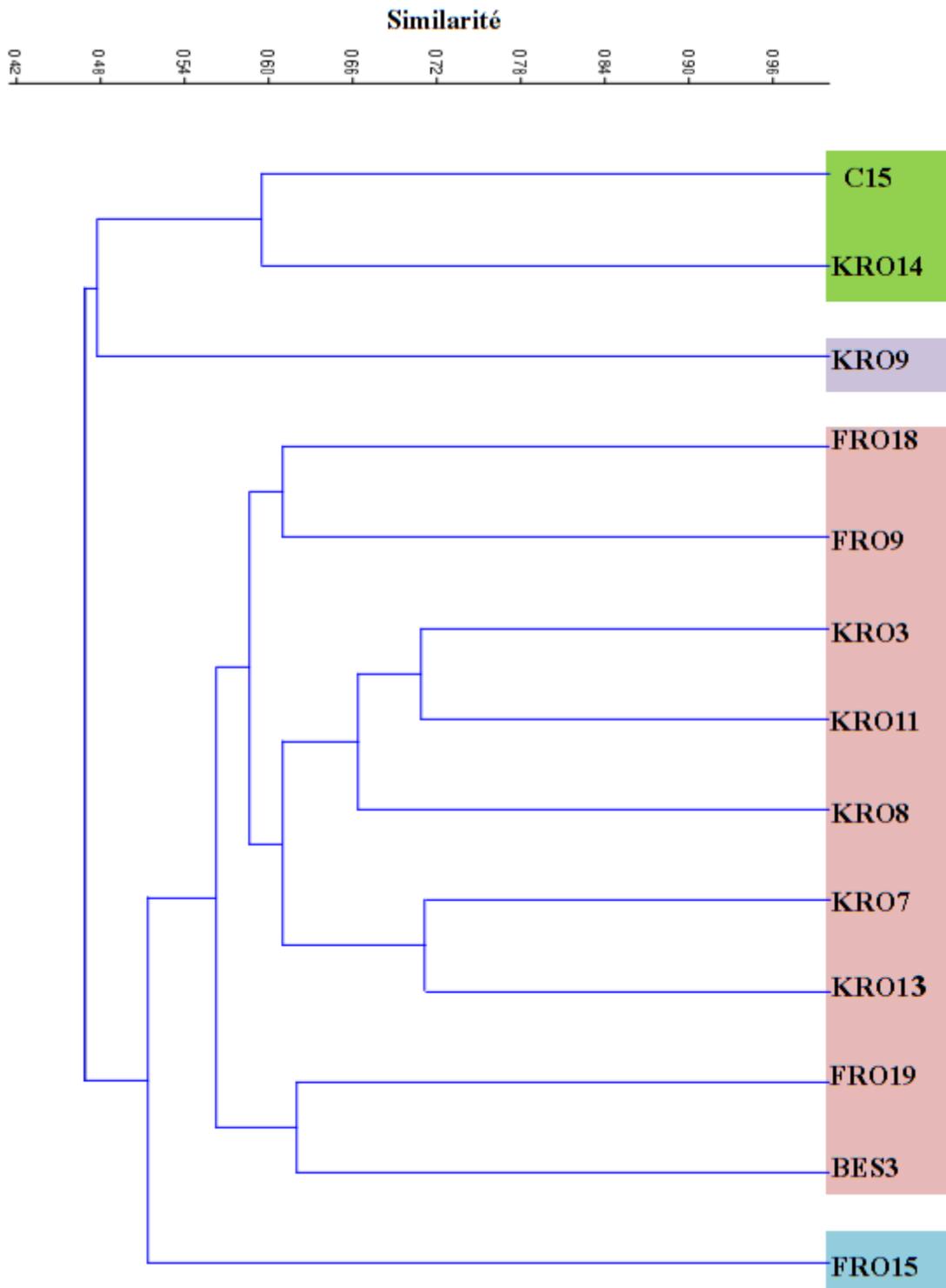
**Tableau n°17:** Matrice de distance des souches étudiées

	<b>FRO9</b>	<b>FRO15</b>	<b>FRO18</b>	<b>FRO19</b>	<b>C15</b>	<b>BES3</b>	<b>KRO3</b>	<b>KRO7</b>	<b>KRO8</b>	<b>KRO9</b>	<b>KRO11</b>	<b>KRO13</b>	<b>KRO14</b>
<b>FRO9</b>	0												
<b>FRO15</b>	0,43	0											
<b>FRO18</b>	0,39	0,54	0										
<b>FRO19</b>	0,42	0,49	0,43	0									
<b>C15</b>	0,57	0,57	0,6	0,57	0								
<b>BES3</b>	0,45	0,55	0,43	0,38	0,54	0							
<b>KRO3</b>	0,43	0,5	0,45	0,48	0,57	0,48	0						
<b>KRO7</b>	0,43	0,41	0,43	0,43	0,49	0,37	0,41	0					
<b>KRO8</b>	0,45	0,49	0,43	0,41	0,48	0,38	0,37	0,37	0				
<b>KRO9</b>	0,52	0,6	0,54	0,44	0,56	0,57	0,55	0,52	0,54	0			
<b>KRO11</b>	0,4	0,55	0,32	0,47	0,56	0,45	0,29	0,38	0,3	0,54	0		
<b>KRO13</b>	0,46	0,44	0,36	0,48	0,52	0,45	0,44	0,29	0,4	0,58	0,35	0	
<b>KRO14</b>	0,52	0,47	0,55	0,44	0,41	0,54	0,55	0,55	0,51	0,49	0,51	0,46	0

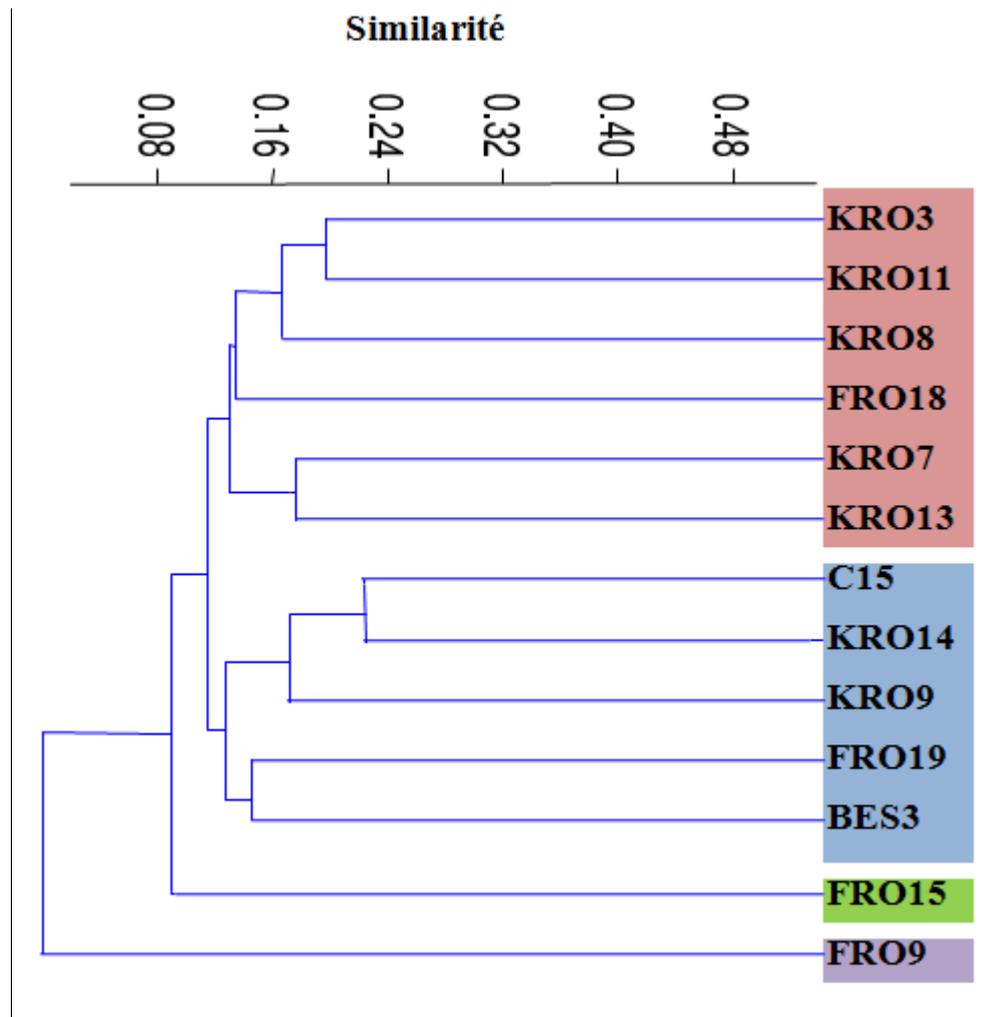
D'après ce tableau, toutes les souches sont phénotypiquement différentes, les distances obtenues varient entre 0,29 et 0,60. La distance la plus petite est enregistrée entre les souches KRO7 et KRO13 ainsi entre les souches KRO3 et KRO11. Alors que la distance la plus grande est observée entre la souche FRO18 et C15 et entre la souche FRO15 et KRO9.

### 3.2. Reconstruction des arbres phénotypiques

Les deux dendrogrammes obtenus en utilisant le coefficient de Jaccard comme index de similarité avec les deux algorithmes UPGMA et NJ sont présentés sur les figures 19 et 20 respectivement.



**Figure n°19:** Dendrogramme de la taxonomie numérique construit selon la méthode UPGMA



**Figure n°20:** Dendrogramme de la taxonomie numérique construit selon la méthode NJ.

Selon les deux dendrogrammes, aucune similarité de 100% n'est observée entre les souches. Les similarités les plus élevées sont observées à 0,72 pour le dendrogramme d'UPGMA et 0,24 sur le dendrogramme de NJ.

En ce fixant le degré de similarité à 0,48 sur le dendrogramme de UPGMA, deux groupes distincts sont observés : un porte les souches C15, KRO14 et KRO9 et l'autre porte le reste des souches. Sur le dendrogramme de NJ et à un degré de similarité de 0,08 seulement la souche FRO9 était séparée du reste.

En se fixant un autre degré de similarité plus grand (0,54), les souches forment quatre groupes distincts comme c'est mentionné sur le dendrogramme :

- (C15, KRO14), (KRO9), (FRO15), (le reste des souches)

Sur le dendrogramme de JN, et à un degré de similarité de (0,075), les souches forment les groupes suivants :

- (FRO9), (FRO15), (C15, KRO14, FRO19, FRO9, BES3), (le reste des souches).

En comparant ces résultats des deux dendrogrammes, il est possible de constater que la souche FRO15 forme un groupe séparé sur les deux dendrogrammes, ce qui signifie que phénotypiquement cette souche est loin des autres. Les souches C15 et KRO14 existe toujours sur le même groupe, de même, les souches KRO3, KRO11, KRO8, FRO18, KRO7et KRO13 existent aussi sur le même groupe avec les deux méthodes.

# **Conclusion et perspectives**

Le présent travail portant sur l'étude de quelques souches d'actinomycètes filamenteux isolées à partir d'échantillons de sol agricole prélevés de la région de Guelma. Ces souches sont connues par leurs capacités promotrices de la croissance de plantes à travers la production des auxines, des sidérophores et la solubilisation de phosphate inorganique. Dont l'objectif de l'étude était l'étude morphologique, et Etude des conditions physiologiques et biochimiques pour la croissance des souches, et à la fin d'établir des matrices et des dendrogramme qui regroupent ces isolats selon leurs similitudes phénotypiques.

Les résultats de l'étude morphologique obtenus laissent supposer que les huit souches codées : FRO15, FRO18, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 et KRO13 parmi les treize souches étudiées sont des actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces sp.*

Les résultats des études physiologiques et biochimiques obtenus sur les treize souches, fournissent des informations sur leurs préférences nutritionnelles, leurs capacités de se développer dans des habitats très différents et des conditions très variées. Ces résultats ont permis de connaître certains caractères de cultures pouvant être utilisés pour la sélection tels que la résistance des souches à la salinité, au pH alcalin et à certains pesticides, ce qui encourage à leur utilisation sur des sols salins, alcalins ou pollués par les pesticides. De même les résultats des tests de dégradation et d'assimilations des différents substrats ainsi que la sensibilité aux antibiotiques peuvent nous orienter dans l'étude de la synergie entre ces souches.

L'établissement d'une taxonomie numérique sur l'ensemble des souches isolées a permis de les classer en quatre groupes phénotypiquement distincts, dont la souche FRO15 forme un groupe séparé sur les deux dendrogrammes, ce qui signifie que phénotypiquement cette souche est loin des autres. Les souches C15 et KRO14 existent toujours dans le même groupe, de même, les souches KRO3, KRO11, KRO8, FRO18, KRO7 et KRO13 sont toujours regroupés dans le même groupe avec les deux méthodes appliquées pour la construction du dendrogramme.

En perspectives pour cette étude, il est recommandé :

- De compléter l'identification des souches jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques chimiotaxonomiques et moléculaires plus approfondies.

- De tester l'aptitude de ces souches à synthétiser des enzymes dégradants la pectine, la lignine, la chitine et les hydrocarbures.
- De tester leur aptitude à améliorer la croissance des plantes sur des sols alcalins et des sols salins.

# **Références bibliographiques**

## **A**

---

**Aarab S., Laglaoui A., Bakkali M., et Arakrak A. (2009).** Selection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique: inoculation des graines triticales (variété montaz) *Covaphos III*. 5 : 147-152.

**Abbas I.H., (2006).** A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res.* 2.10: 809-815.

**Ahmed O.H., Aminuddinet M.H.A., Husni (2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.

**Al-Zarban S.S., Al-Musallam A.A., Abbas I., Stackebrandt E., Kioppenstedt R.M. (2002).** *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Sys Env Microbiol.* 52: 555-558.

**Andriambololona T. (2010).** Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe : 5-10.

**Arvind K., Bohra C. P. and Singh L. K. (2003).** Environment, pollution and management. S.B. Nangia ET A.P.H. Publishing Corporation : 531.

**Attrassi K., Selmaoui K., Ouazzani T.A., Badoc A., Douira A. (2005).** Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. 144 : 47-62.

**Avril J. L. (1992).** Bactériologie clinique. 2 éd. Paris : ellipses : 511.

**Azouaoui-ait K.T., Boucena B., Amgoud M., Rahmania F. (2007).** Essai de lutte in vitro par le glyphosate contre des champignons telluriques phytopathogène : *Fusarium* et *Pythium*. *Sciences et technologie.* 26 : 75-80.

## **B**

---

**Basilio A., González I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O. (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl Microbiol.* 95: 814-823.

**Bastide A., De Méo M., Andriantsao M., Laget M., Duménil G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique. *MIRCEN Journal*. 2: 453-466.

**Bazot S. (2005).** Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne, Unité Mixte de Recherche INRA INPL Agronomie Environnement Nancy Colmar. 176: 25-26

**Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965).** - Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 13 : 236-242.

**Bergey's Manuel. (2007).** Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby J. and Tindall B.J. In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Copyright, Michigan State University Board of Trustees.

**Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi I., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005).** Isolement d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhah de Ain Mlila. *Sciences & Technologie*. N 23: 5-10.

**Briat J.F. (1992).** Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2475-2483.

## C

---

**Campbell R. and Greaves M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. *In: the rhizosphere*. Lynch I. M. (Eds). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology: 11-34.

**Cardon Z., D.J. Gage. (2006).** Resource exchange in the rhizosphere - molecular tools and the microbial perspective. *Ann. Rev. Ecol.*, 37: 459-488.

**Chater K. (1999).** David Hopwood and the emergence of *Streptomyces* genetics. *Int Microbiol.* 2: 61-68.

**Colombié V. (2005).** Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse: 174.

**Conn V. M. (2005).** Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University: 297.

**Cook R.J., Thomashow D.M., Weller D., Fujimoto M., Mazzola G., Bangera, D.S. Kim. (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4197-4201.

**Crawford D.L, Lynch J.M, Whipps J.M, Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterization of Actinomycetes antagonists of a fungal roots pathogen. *Appl. Env. Microbiol.* 59 (11): 3899-3905.

## ***D***

---

**Darlu P., Tassy P., (2004).** La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Masson. Paris. ISBN : 9-241-225.

**De Boer W., Gunnewiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E., Woldendorp Dommergues Y., Mangenot F. (1970).** Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie. France.

**De Carne C.Ch. (2010).** Agriculture biologique, une approche scientifique. Edition: France agricole. Productions végétales et grandes cultures, 434 p. ISBN : 978-2-85557-211-6.

**Djinni I. (2009).** Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Mémoire De Magister en Microbiologie Appliquée, Université A. Mira de Bejaia : 54.

**Dobbelaere S.J., Vanderleyden, Okon Y. (2003).** Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* P 22: 107-149.

## ***E***

---

**Edwards A.W.F. and Cavalli- Sforz L. L. (1964).** Phenetic and Phylogenetic Classification. Chapter Reconstruction of evolutionary trees, *System. Association Publ.* 6: 67-76.

**Ensign J.C., Normand P., Burden J.P., Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycètes genera. *Res.Microbiol.* 144 : 657-660.

**Errakhi R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.

**Eunice J.A., Prosser J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of genetic microbiology* (129): 2029-2036.

**Euzeby J.P. (2000).** Bactériologie Vétérinaire: Les *Listeria*. [En ligne]. Créé le : 25 Juin 2000. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html>. (Consulté le 25 Avril 2010).

**Erz D., Castillo U.F. and Strobel G.A. (2004).** Caronamycins, peptide antibiotics produced by a Verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic *Monstera*. *Microbiol.* 150: 785-793.

## ***F***

---

**Felsenste J. (1973).** Maximum likelihood and minimum- steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* 22: 240–249.

## ***G***

---

**Goodfellow M. (1971).** Numerical Taxonomy of Some Nocardioform Bacteria. *Journal of General Microbiology.* 69: 33 -80.

**Goodfellow M., Williams S.T., (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annuals Review of Microbiology* (37): 189-216.

**Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M. (1984).** Introduction to and importance of the actinomycetes. *In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp: 1-6.*

**Gordon R.E., Barnett D.A. (1977).** Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 176-178.

**Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. *In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.*

**Grigorova R., Norris J. R. (Editors). (1990).** Techniques in microbial ecology. *Methods in Microbiology, Vol.22. Academic Press, London, pp: 627.*

**Guiraud J.P. (1998).** Techniques d'analyse microbiologique, dans: Microbiologie alimentaire. Dunod Paris: 171-334.

## ***H***

---

**Hamdali H., Bouizgarne B., Hafidi M., Lebrihi A., Virolle MJ., Ouhdouch Y. (2008).** Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38: 12-19.

**Hankin L., Zucker M., Sands D.C. (1971).** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22: 205-209.

**Hawker L.E., Linton A.H. (1971).** Mico-organismes: 325-333.

**Hayakawa M., Yoshida Y., Iimura Y. (2004).** Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces Violaceusniger* phenotypic cluster. *J.Appl. Microbiol.* 96: 973-981.

**Hibar K., Mejda D. R, Jabnoun-Khiareddine Hayfa, El Akram Znaidi Ibrahim, EL Mahjoub Mohamed. (2006).** Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici* : 101-108.

**Hirsch A.M., Bauer W.D., Bird D.M., Cullimore J., Tyler B. and Yoder J.I. (2003).** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecol.* 84: 858-868.

**Hirsch C. F., Christensen L. (1983).** Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (4) : 925-929.

**Hodgson D.A. (2000)** Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Phys.*, 42: 47-238.

**Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H.A., Staley J.T., Williams S.T.(1994).** Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Hsu S.C. et Lockwood J.L.(1975).** Powdered chitin agar as a selective medium for a enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.*29: 422-426.

**Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., Goodfellow M., Liu Z. (2004).** *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov, a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, (86): 159-165.

**Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. (2001).** Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. (67): 3739-3745.

## ***I***

---

**Ishizawa S., Araragi M., (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. In: *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo: 97-107.

**Iwai Y., Omura S., (1992).** Cultural conditions for screening of new antibiotics. *Journal of Antibiotics*, (35): 123-141.

## ***J***

---

**J.W. (1998).** Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 30. No. 2: 193-203.

## ***K***

---

**Kalakoutskii L.V. and Agre N.S. (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* 40(2): 469-524.

**Keiser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. (2000).** General introduction to Actinomycete Biology. In: *Practical Streptomyces* the John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England: 1-21.

**Keulen G.V., Jonkers H.M., Closson D., Woston H.A.B. (2003).** Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185(4): 1455-1458.

**Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *EurAsian Journal of BioSciences*. (4): 23-32.

**Kim (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc.*

**Kim B., Al-Tai A. M., Kim S. B., Somasundaram P., Michael Goodfellow M. (2000).** *Streptomyces thermocophilus* sp. nov, a cellulase-free endo-xylanaseproducing streptomycete. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, (50): 505-509.

**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 doc: université Mentouri Constantine.

**Kuznetsov V.D., Zaitseva T.A., Vakulenko L.V. and Filippova S.N. (1992).** *Streptomyces albiacialis* sp. nov. A new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo and halotolerant *Streptomyces*. *Microbiology*. 61 : 62–67.

## L

---

**Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, 4 : 113-121.

**Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

**Larpent J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Technique et documentation. Londres- Paris-New York. Lavoisier. ISBN : 26743060417- 7 : 261.

**Larpent J.P., Sanglier J.J., (1989).** Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris : 481.

**Le Minor L., Véron M. (1990).** Bactériologie médicale. Médecine-Sciences Flammarion. France.

**Lechevalier M.P. (1981).** Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl*, 11: 159-166.

**Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC: 315-360.

**Lechevalier M.P., Lechevalier H.A., Genus *Sporichthya* In., Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. (1989).** (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 4: 2507-8, Williams & Wi-kins, Baltimore.

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

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

**Locci R., Sharples G.P. (1984).** Morphology. In: "The biology of actinomycetes". (Goodfellow M., Modarski M. and Williams S. T., Eds.) . Ac. Press. London: 165-199.

**Loci R. (1997).** Developmental micromorphology of actinomycetes. In: actinomycetes, the boundary microorganisms. Aria T. ED, Tokyo : 170-180.

**Luchetta P., Maurel M.C., Higuët D. et al. (2005).** Evolution moléculaire. Dunod. Paris. ISBN : 2 10 006880 6. 330.

## ***M***

---

**Maki Miranda L., Michael Broere, Kam Tin Leung, WenshenQin.(2011).**Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol*;2(2): 146-154.

**Mariat f., Sebald M. (1990).** Les actinomycètes Dans: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France : 935-949.

**Matsukawa, E., Y. Nakagawa, Y. Limura et M. Hayakawa. 2007.** Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetol.* 21: 32-39.

**Mba C.C. (1997).** Rock phosphate solubilizing *Streptosporangium* isolates from casts of tropical earthworms. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 381-385.

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

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

**Mighelez E.M, Hardisson C. and Mauzanal M.B. (2000).** Streptomyces: a new model to study cell death. In: Identification des actinomycétales isolées des eaux et de sol de Sebgha.

Optimisation des milieux de culture de sporulation et de croissance (Boughachiche Faiza Mémoire de Magister).

**Miyadoh S., Hamada M., Hotta K., Seino A., Vobis G., Yokota A. (1997).** Atlas of Actinomycetes. Japan: Askura Publishing Co. Lid.

**Myadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002).** Digital Atlas of Actinomycetes. ([Http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas](http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas)). The Society of Actinomycetes. Tokyo, Japan.

**Mustin M. (1987).** Le Compost, gestion de la matière organique. Ed: François Dubusc. Paris: 954.

## N

---

**Neilands J.B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem. Agrobacterium*, 270: 26723-26726.

## O

---

**O'DONNELL A.G. (1988).** Recognition of novel actinomycete. In Goodfellow MWilliams S.T. and Mordarski M. (eds), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic.

**Okami Y. et Hotta K. (1988).** Search and discovery of new antibiotics.

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

**Oskay M., Tamer A.U., Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3 (9) : 441-446.

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

**Ouhdouch Y. (1989).** Bactéries actinomycétales rares productrices d'antifongiques. Thèse de Doctorat. Nancy. Press. London.

- Pamboukian C.R.D, Guimarães L.M. and Facciotti M.C.R. (2002).** Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz. J. Microbiol.* 33(1): 17-21.
- Pawlowski K. and Sirrenberg A. (2003).** Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 1165-83.
- Pérez-Miranda S., Cabirol D., George-Téllez R., Zamudio-Rivera L.S. and Fernández F.J.O-CAS. (2007).** A fast and universal method for siderophore detection; *Journal of Microbiological Methods.* 70(1): 127-131.
- Perrig, D., M. L. Boiero, O.A. Masciarelli, C. Penna, O. Ruiz, F.D. Cassan et M.V. Luna. 2007.** Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 75 (5): 1143-1150.
- Perry J. J., Staley J.T., Lory S. (2004).** *Microbiologie.* Dunod, Paris: 497-498.
- Petrolini B., Quaroni S., Saracchi M and Sardi P. (1991).** Studies on the *Streptomyces* population inhabiting plant roots. *Actino.* 2 (1): 56-65.
- Pine L. (1970).** Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int. J. Bacteriol.* 20: 445-474
- Pirouz T., Karbasian M.A and Goodfellow M. (1999).** Isolation of some aerobic Actinomycetes species from the soil of Zahedan country, south-east of Iran. *Plant Pathol.* 119: 243-254.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.(2003).** *Microbiologie.* 2<sup>ème</sup> édition. Boeck Université. ISBN : 968- 2 -8041- 4256- 8.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.(2007).** *Microbiologie.* De Boek & Larcier, Bruxelles: 805-825.
- Prescott L., Harley J.P. and Klein D.A. (1995).** *Microbiologie tomeII.* De Boeck, Bruxelles : 506-517.

**Pridham T.G., Hesseltine C.V., Benedict R.G. (1958).** A guide for the classification of Streptomyces according to selected group's placement of strain in morphological sections. Applied Microbiology. (6): 52-70.

## **R**

---

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

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

**Réne Chaume R. (1975).** Les méthodes de taxonomie numérique, *Boissiera*. 24: 369- 381.

**Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W., Hopwood D.A. et Van Wezel G.P. (2008).** Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces. EMBO Rep. 9(7): 670–675.

**Rudresh D.I., Shanmugam V. et Prasad. (2005).** Tricalcium phosphate solubilising abilities of *Trichoderma* sp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Can. J. Microbiol. 51: 217-222.

## **S**

---

**Saffroy S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez Streptomyces pristinaespiralis. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France: 150.

**Salas J.A. and Hardisson C. (1981).** Sugar uptake during germination of Streptomyces antibioticus spores. J. Gen. Microbiol. 125: 25-31.

**Salas J.A., Guijarro J.A. and Hardisson C. (1983).** High calcium content in Streptomyces spores and its release as an early event during spore germination. J. Bacteriol. 155 (3): 1316-1323.

**Sandhya G., Nanjani & Harsha P., Soni. (2011).** Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. Bioinformatica. Vol:1. N°1: 1-15.

- Sardi P., Saracchi M., Petrolini B., Borgonovi G.E. and Merli S. (1992).** Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Appl. Env. Microbiol.* 58 (8): 2691-2693.
- Schwyn B. and Neilands J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Sharma S., Vijayk and Ram B.T.(2011).** Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Researc* (2): 90-95.
- Sharples G.M. and Schaal K.P. (1981).** A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J. Gen.Microbiol.* 121: 237-259.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 16(3): 313-340.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1976).** Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomy criteria, in: *Actinomycetes the boundary microorganisms*. Ed: Arai T. Tokyo: 9-42.
- Shukla G. Soil Enzymology. 2010.** Springer: Berlin: 384.
- Silvey J.K.G. and roach A.N. (1975).** The taste and odour producing aquatic actinomycetes. *Crit. Rev. Environ. Control.* 5: 233-273
- Singh S.L., Baruah I., Bora T.C. (2006).** Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*, 5 (2): 217-221.
- Singleton P. (1999).** *Bacteria in biology, bacteriology and medicine*. Wiley, Chichester UK: 236.
- Sokal R.R. et Sneath P. H. (1963).** *Principle of numerical taxonomy*. Freeman and company San Francisco – London: 359.
- Song J., Weon H.Y., Yoon S. H., Parrk D. S., Go S.G., Suh J.W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinimycetes isolated from mush room composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202 : 97-102.

**Soufiane B. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, Québec.

**Srinivasan M.C., Laxman R.S. and Deshpande M.V. (1991).** Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 171-184.

**Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P., Kampfer P., Maiden M. (2000).** Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.

**Strub C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. : 174.

**Sykes G and Skinner F.A. (1973).** Actinomycetales: characteristics and practical importance producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine. *J. Biosci.* vol 1. Number 2: 236-239.

## ***T***

---

**Takahashi Y. and Omura S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Appl. Microbiol.* 49: 141-154.

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

**Thirupl L., Johsen K. and Winding A. (2001).** Succession of indigenous *Pseudomonas* spp. And Actinomycetes on Barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (3) : 1147-1153.

**Tokala, R. K., J. I. Strap, C. M. Jung, D. L. Crawford, M. H. S. Love, L. A. Deoblad, J. F. Bailey et M. J. Morra. 2002.** Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2161-2171.

**Tyrabi G. et Estienne G. (1983).** L'avenir des *Streptomyces*. *biofutur* : 33-37.

## V

---

- Van Loon, L.C. (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R.N., Gange A.C. (2009).** Endophylitic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss: Isolation, Diversity, and Anti Microbiol activity. *Microbiol Ecology.*, (57): 749-756.
- Veyssier P. (1979).** Actinomycoses-Nocardioses. In : *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Ed. Elsevier. Paris : 8123.

## W

---

- Waksman S. A. (1963).** Ma vie avec les microbes. Albin. Michel (ed.), 280 p.
- Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M., Rodri guez C. (2006).** *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. *J. Sys. Ev. Microbiol.* Vol 56: 1257-1261.
- Wang Y., Zhang Z.S., Ruan J.S., Wang Y.M., Ali S.M. (1999).** Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 178-187.
- Wayen G., Bernner D.J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic . *Int. J .Syst. Microbiol.* 37: 463- 464.
- Westover K.M., Kennedy A.C. and Kelley S.E. (1997).** Patterns of rhizosphere microbial cornmunity structure associated with Co-occurring plant species. *J. Ecol.* 85: 563-873.
- Williams S.T. (1967).** Sensitivity of Streptomycetes to Antibiotics as a Taxonomi Character. *J. gen. Microbiol.* 46 : 151-160.
- Williams S.T. et Cross T. (1971).** Actinomycetes, dans: *Methods in microbiology*. Academic Press, London: 295-334.
- Williams S.T., Bradshaw R.M., Costerton J. W. and Forge A. (1972).** Fine structure of the spore sheath of some Streptomyces species. *J. Gen. Microbiol.* 72: 249-258.

**Williams S.T., Goodfellow M, Alderson G, Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. et Sackin M.J. (1983a).** Numerical classification of Streptomyces and related genera. *J Gen Microbiol.* 129: 1743-1813.

**Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E. M. H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P. H.A., Sackin M. J. (1983b).** A probability matrix for identification of some Streptomyces's. *J Gen Microbiol.* 129: 1815-1830.

**Winn W.C., Koneman E.W. (2006).** Koneman's color atlas and textbook of diagnostic

**Wipps J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J.*

## X

---

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

## Z

---

**Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T., Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can,* 95 (2): 115-113-118-125.

**Zermane F. (2007).** Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse : 33-38.

**Zhang J.W, Zeng R.Y. (2007).** Purification and characterization of a cold-adapted  $\alpha$ -amylase produced by nocardiosis sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnol,* 10: 75-82.

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

# **Annexes**

## Annexe 1

## Milieux de culture (g/l)

**Isp2**

Extrait de levure .....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Peptone.....	15g
agar .....	20g

pH: 7.3

**Isp9**

(NH) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2.64g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2.38g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	5.65g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1g
Solution saline 2.....	1ml
Agar.....	20g

pH: 6.8-7.0

**YMEA (Yeast Malt Extract Agar)**

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt.....	10g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g

pH: 7.3

**Bouillon nutritif à 0.1% d'KNO<sub>3</sub>**

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
NaCl.....	5g

pH: 7.2

**CMC (CarboxyMéthylCellulose)**

Extrait de levure.....	0.2g
Glycérol.....	2ml
CMC (CarboxyMéthylCellulose).....	10g
Agar.....	20g

(ajouter le CMC progressivement sous l'agitation et à une température d'environ 60°C )

pH:7.3

**Sierra**

Tryptone.....	3g
Extrait de levure.....	5g
Glucose .....	5g
Tween.....	1%
CaCl <sub>2</sub> .....	0.01%
Agar .....	20g

pH : 7

**SCA (Starch Casein Agar)**

Amidon.....	10g
KNO <sub>3</sub> .....	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2g
NaCl.....	2g
Caseine.....	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
Agar .....	20g

pH: 7.2-7.5

**PVK (Pikovskaya)**

Glucose .....	10g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5g
KCL.....	0.2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.1g
Nacl.....	0.2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.02g
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0.002g
Agar.....	20g

pH : 7

**Solutions****Solution saline2**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1.1g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O .....	6.4g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	1.5g/l
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	7.9g/l

**Solution iodine (Gram)**

KI.....	2g
I <sub>2</sub> .....	1g
Eau distillée.....	300ml

## Annexe 2

**Tableau n°18 : La production des sidérophores, des auxines et la solubilisation de phosphate par les souches étudiées (Ces résultats ont été fournis par le laboratoire de génie microbiologique et applications université Mentouri Constantine).**

	Souches												
	FRO9	FRO15	FRO18	FRO19	C15	BES3	KRO3	KRO7	KRO8	KRO9	KRO11	KRO13	KRO14
<b>phosphate</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>Sidérophores</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Auxines</b>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

# Résumés

## Résumé

Le présent travail est une étude phénotypique de quelques souches d'actinomycètes isolées d'un sol agricole de la région de Guelma. Treize souches d'actinomycètes codées FRO9, FRO15, FRO18, FRO19, C15, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO9, KRO11, KRO13 et KRO14, ont fait l'objet d'une étude phénotypique afin de déterminer leurs morphologie et leurs capacité métabolique et aussi d'étudier leurs similitudes par taxonomie numérique.

Tous les tests réalisés sont étudiés sur milieux solides additionné aux substrats d'intérêt. La taxonomie numérique est établie par le logiciel Past 3, dont la matrice de similarité est établie par le coefficient de Jaccard et les dendrogrammes sont obtenus par deux algorithmes

(UPGMA et NJ).

L'étude morphologiques, montrent que les huit isolats FRO15, FRO18, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 et KRO13 présentent les traits typique des Streptomycètes.

L'étude physiologique et biochimique des souches a permis de déterminer certaines caractéristiques physiologiques et biochimique importantes de ces souches, tels que la croissance à différente pH et surtout dans des pH alcalin, et différentes concentrations en NaCl avec une tolérance jusqu'au 10% pour la plupart des souches. De même, ces isolats ont la capacité à assimiler différentes sources de carbone et d'azote et à dégrader plusieurs polymères complexes tels que la caséine, l'amidon et le tween 80.

L'établissement d'une taxonomie numérique sur l'ensemble des souches isolées a permet les classés en quatre groupes phénotypiquement distincts, dont la souche FRO15 forme un groupe séparé sur les deux dendrogrammes, ce qui signifie que phénotypiquement cette souche est loin des autres. Les souches C15 et KRO14 existe toujours dans le même groupe, de même, les souches KRO3, KRO11, KRO8, FRO18, KRO7et KRO13 sont toujours regroupés dans le même groupe avec les deux méthodes appliquées pour la construction du dendrogramme.

**Mots clés :** rhizosphère, Actinomycètes, étude morphologique, Taxonomique numérique, *Streptomyces*.

## ملخص

هذا العمل هو دراسة تصنيفية لبعض سلالات البكتيريا الخيطية معزولة من تربة زراعية في منطقة قالمه. ثلاثة عشر سلالة من البكتيريا الخيطية مشفرة : FRO9, FRO15, FRO18, FRO19, C15 BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO9, KRO11, KRO13 و KRO14 موضوع دراسة مظهرية لتحديد مورفولوجيتها وقدرتها الايضية ، وكذلك لدراسة أوجه التشابه بينها في مجال التصنيف العددي. كل الاختبارات المحققة تم انجازها في وسط صلب مضاف اليه مواد ذو فائدة. التصنيف العددي تم انشائه بواسطة البرنامج باست 3 ، تم تأسيس مصفوفة التشابه بواسطة معامل JACCARD ويتم الحصول على dendrogrammes من قبل اثنين من الخوارزميات (UPGMA, NJ) .

وتظهر الدراسة المورفولوجية أن ثمانية من البكتيريا المعزولة FRO15, FRO18 ، BES3 ، KRO3 ، KRO7 ، KRO8 ، KRO11 KRO13 لها الميزات النموذجية ل *Streptomyces* .

الدراسة الفيزيولوجية والبيوكيميائية للسلالات حددت بعض الخصائص الفيزيولوجية والبيوكيميائية المهمة لهذه السلالات، مثل النمو في درجة حموضة مختلفة، وخصوصا في درجة الحموضة القاعدية، وتركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم مع تحمل يصل إلى 10٪ لمعظم السلالات. وبالمثل هذه العزلات لديها القدرة على استخدام مصادر الكربون والنيتروجين المختلفة وتحليل عدة مركبات أكثر تعقيدا مثل : الكازين، والنشا، وتوين 80.

إنشاء التصنيف العددي لجميع السلالات المعزولة يسمح بتصنيفها ظاهريا إلى أربع مجموعات مميزة، السلالة FRO15 تشكل مجموعة منفصلة عن الكل بالطريقتين dendrogrammes، وهو ما يعني أن هذه السلالة هي ظاهريا بعيدة عن الآخرين. السلالات C15 و KRO14 لا تزال موجودة في نفس المجموعة. وبالمثل، السلالات KRO3 ، KRO11 ، KRO8 ، FRO18 ، KRO7 و KRO13 تم تجميعها دائما في نفس المجموعة بالطريقتين المستخدمتين لبناء dendrogrammes .

الكلمات المفتاحية: الشعاعية ريزوسفير، دراسة مورفولوجية، تصنيف الرقمية، *Streptomyces*.

## Abstract

The present work is a phenotypic study of some isolated strains of actinomycetes of an agricultural soil of the Guelma region. Thirteen strains of actinomycetes coded FRO9, FRO15, FRO18, FRO19, C15, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO9, KRO11, KRO13 and KRO14 have been phenotypic study to determine their morphology and their ability metabolic and also to study their similarities in numerical taxonomy.

All the tests are studied on solid media supplemented with substrates of interest. Numerical taxonomy is established by the Past 3 software, the similarity matrix is established by the Jaccard coefficient and the dendrogram is obtained by two algorithms (UPGMA and NJ).

The morphological study show that eight isolates FRO15, FRO18, BES3, KRO3, KRO7, KRO8, KRO11 and KRO13 present the typical features *Streptomyces*.

The physiological and biochemical study of the strains identified some important physiological and biochemical characteristics of these strains, such as growth at different pH and especially in alkaline pH, and various concentrations of NaCl with a tolerance to 10% most strains. Similarly, these isolates have the ability to assimilate different carbon and nitrogen sources and degrade more complex polymers such as casein, starch, and tween 80.

The establishment of a numerical taxonomy of all isolated strains allows phenotypically classified into four distinct groups, the strain FRO15 form a separate group on both dendrograms, which means that this strain is phenotypically away from others. The C15 strains and KRO14 still exists in the same group, similarly, KRO3 strains KRO11, KRO8, FRO18, KRO7et KRO13 are always grouped in the same group with the two methods used for the construction of the dendrogram.

Keywords: rhizosphere actinomycetes, morphological study, Digital Taxonomy, *Streptomyces*.