

République Algérienne Démocratique et Populaire



*Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique*



Université Abbes Laghrou-Khanchela

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE

*Présenté Pour l'obtention du Diplôme de
MASTER académique*

FILIERE : science biologique
OPTION : Microbiologie appliquée

THEME

Dénombrement des actinomycètes
dans certains sols désertiques sous différents
végétaux

Présenté Par

OUANNES SONIA

SAHRAOUI SOUMIA

PRESIDENT : MR LARBAA RABAH

MCB UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA

EXAMINATEUR : MME ARAB YASMINE

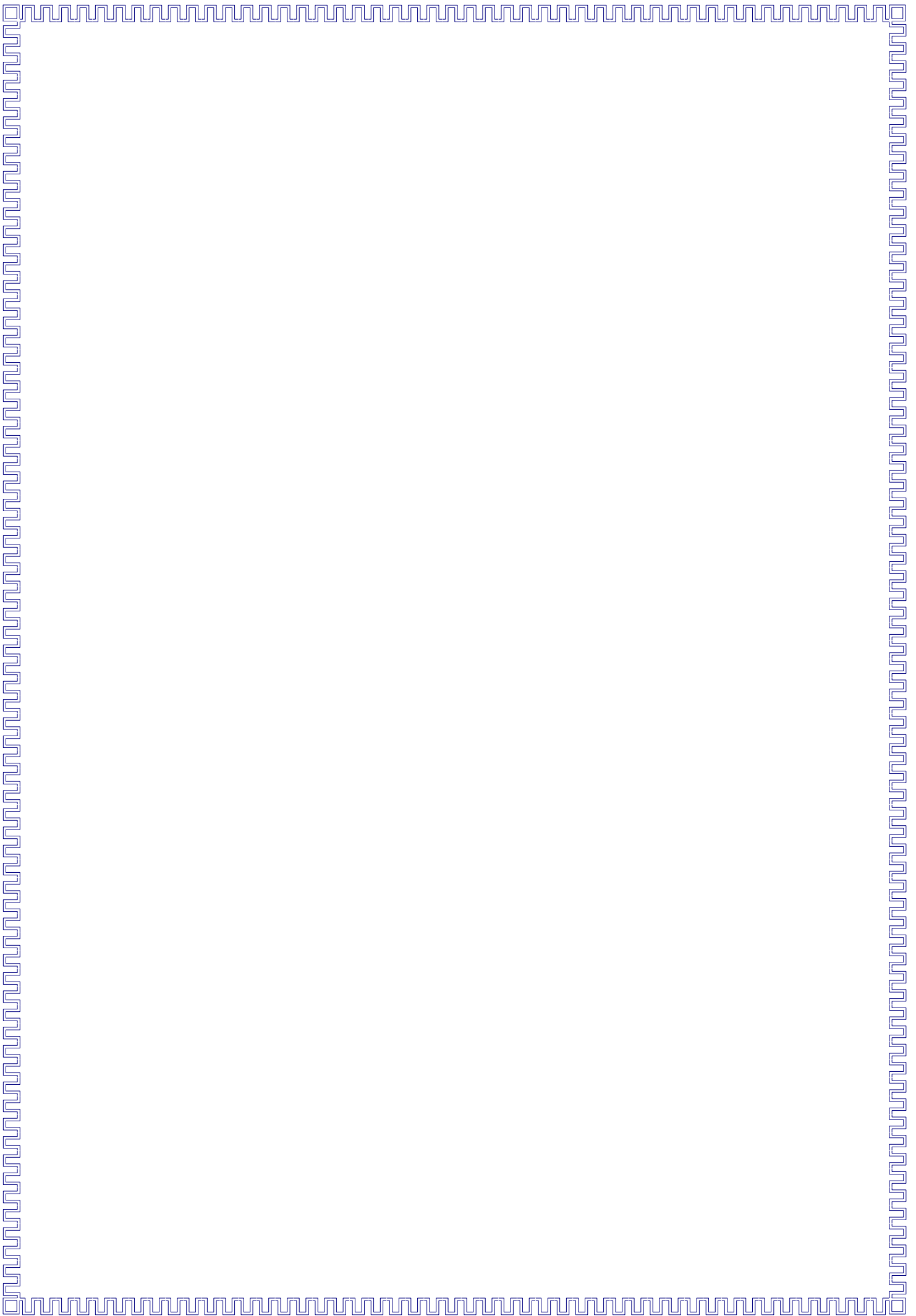
MAA UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA

ENCADREUR: MME BENSOUICI KARIMA

MAA UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Promotion 2017/2018

Laboratoire de Biologie de l'Université Abbés Laghrou- KHENCHELA



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, on tient à remercier notre bon Dieu qui nous a donné le pouvoir pour terminer ce travail.

Nous tiens à exprimer toute notre reconnaissance à notre promotrice de mémoire Madame Bensouici Karima. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Nous remercions également Monsieur Larbaa rabah pour nous faire l'honneur de présider le jury de soutenance. Ainsi que Mme arab Yasmine accepté d'examiner notre mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignements du département de la Biologie,

Tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à notre rencontrer et répondre à nos questions durant nos recherches et particulièrement monsieur Monsaf Ben ghanem et Docteur Sid.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous ses sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Mon père, qui peut être fier, qu'il trouve ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Merci pour l'affection et l'amour qui m'ont donné la force et le courage dans les moments les plus difficiles.

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

Ma collègue dans ce travail

Toutes mes chères amies

*Tous les enseignements du département de La
Biologie*

Toute la promotion microbiologie 2017.

Sonia

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail.

A mon très cher père qui m'a toujours soutenu, et a été toujours présent pour moi.

A la plus chère au mondes, ma mère qui m'a toujours encouragé et me reconforter durant mes études.

A mes sœurs : Bochra, Halima, Samra , Rima .

A mes frères: Nasser , A.elhalim, farouk, Housseem, wael.

Ma collègue de ce travail : Sonia

A mes chères amies : Samira, Alima, Bilel, Loubna, wael, Hakima, Remaïssa...

A toutes Tous mes camarades de promotion

A Toutes mes amies.

SOUMLA

Table des matières

Résumés.....	I
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Introduction	1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I: Les actinomycètes

1. Historique.....	3
2. Définition et propriétés générales des actinomycètes.....	3
3. Caractères morphologiques.....	5
4. Cycle de développement (exemple type: <i>Streptomyces pp</i>).....	6
5. Classification et taxonomie.....	7
6. Caractères culturels	9
7. Physiologie et métabolisme.....	10
7.1. Physiologie.....	10
. Le pH.....	10
. La température.....	10
. Matière organique dans le sol.....	10
7.2. Métabolisme.....	10
8. Génétique et structure de l'ADN.....	11
9. Ecologie.....	12
.Dans le sol.....	12
.Dans l'eau.....	14
.Dans la rhizosphère.....	14
.Dans l'air.....	14
.Dans les Composts.....	14
10. L'importance des actinomycètes.....	15
.La production d'antibiotiques.....	15
.La production des enzymes.....	17

Chapitre II : Les interactions microorganismes –plantes

1. Introduction.....	18
2. L'effet rhizosphérique.....	18
3. Relations symbiotiques.....	19
3.1. Symbiose (rhizobium).....	19
3.2. Symbiose actinorhizienne.....	19
3.2.1. <i>Frankia</i>	21
3.2.2. Intérêt du genre <i>Frankia</i>	22
3.3. Mycorhizes.....	22

Partie 2 : Etude expérimentale

1. Prélèvement des échantillons de sol.....	23
2. Analyse de la matière organique.....	25
3. Préparation du milieu de culture.....	25
4. Préparation de l'eau physiologique.....	25
5. Préparation des dilutions.....	25
6. Ensemencement et incubation.....	25
7. Dénombrement.....	26
8. Purification et conservation.....	26

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Analyse de la matière organique.....	27
2. Isolement des actinomycètes.....	27
3. Dénombrement des actinobactéries.....	28
4. Conclusion.....	31
5. Références bibliographiques.....	32
6. Annexe	VII

Résumés

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries très recherchées pour leurs importances dans plusieurs domaines. Ce sont des microorganismes ubiquitaires qui se rencontre dans presque tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile. Les écosystèmes Sahariens sont connus par leur climat rude et inhabitable dans son apparence. Ces localités s'avèrent une source très appréciable d'actinobactéries. Afin de connaître la variation du nombre et la distribution des actinomycètes dans les différentes couches du sol aride sous couvert végétal, nous avons testé deux niches écologiques situées dans la région de Biskra. Les premiers échantillons proviennent d'un sol sous palmier les seconds ont été prélevés à partir d'un sol sous culture d'olivier. Les analyses de ces deux sols ont permis de les classer comme étant des sols très pauvres en matière organique. La concentration de cette matière tend à diminuer quand la profondeur augmente et ce pour les deux types de sol. Nous avons obtenu 45 colonies d'actinomycètes à partir des différentes couches du sol sous palmier. La plus grande quantité de ces bactéries a été trouvée dans la surface avec un pourcentage de 46 %. Pour le sol sous olivier, 13 actinomycètes ont été récoltés, avec également un pourcentage de 46 % provenant uniquement de la surface. Les couches profondes de ces sols offrent également une quantité d'actinobactéries non négligeable. Cette distribution bactérienne suit positivement le taux de la matière organique présente dans les couches du sol.

Mots clés : Actinomycètes, dénombrement, sol palmier, sol olivier.

Abstract

Actinomycetes are highly sought bacteria for their importance in several fields. They are ubiquitous microorganisms that are found in almost all environments even where life is extremely hostile. Saharan ecosystems are known for their harsh and uninhabitable climate. These localities are a very valuable source of actinobacteria. In order to know the variation in the number and distribution of actinomycetes in the various layers of the arid soil under vegetation cover, we tested two ecological niches located in the Biskra region. The first samples come from a soil under palm tree and the second samples were taken from a soil under olive cultivation. The analyzes of these two soils have classified them as very poor soils in organic material. The concentration of this material tends to decrease as the depth increases for both soil types. We obtained 45 colonies of actinomycetes from the different layers of the soil under palm. The largest amount of these bacteria was found in the surface with a percentage of 46%. For the soil under olive tree, 13 actinomycetes were harvested, with also a percentage of 46% coming only from the surface. The deep layers of these soils also offer a not inconsiderable amount of actinobacteria. This bacterial distribution positively follows the rate of the organic material present in the layers of the soil.

Keywords :Actinomycetes, enumeration, palm tree, olive tree

الملخص

تعتبر الاكتينومييسات بكتيريا مطلوبة بكثرة نظرا لاهميتها البالغة في مجالات عديدة. وهي كائنات حية دقيقة تنمو في كل مكان و في كل الأوساط تقريبا حتى في الأوساط التي تكون فيها الحياة عدائية للغاية. تعرف النظم الإيكولوجية الصحراوية بمناخها القاسي والغير صالح للتكاثر في ظاهرها. هذه المناطق تمثل مصدرا قيما للأكتينومييسات. لمعرفة التغير في عدد وتوزيع هذه البكتيريا في الطبقات المختلفة من التربة الصحراوية تحت غطاء نباتي قمنا باختبار عينتين مأخوذتين من موضعين إيكولوجيين مختلفين من منطقة بسكرة. العينات الأولى اخذت من تربة تحت شجرة النخيل والثانية من تربة تحت شجرة الزيتون. التحاليل التي أجريت لهذا العينة من التربة سمحت بتصنيفها كترية فقيرة جدا من المواد العضوية, بحيث تركيز هذه المواد ينقص مع زيادة في العمق لكل من النوعين للتربة المدروسة.

تم عزل 45 مستعمرة للأكتينومييسات من طبقات التربة المأخوذة من تحت شجرة النخيل, و كانت الكمية الأكبر المتحصل عليها على مستوى السطح و المقدرة بنسبة 46 % , اما بالنسبة للعينة المأخوذة من تحت شجرة الزيتون فتم عزل 13 مستعمرة للأكتينومييسات بنسبة تقدر ب 46 % و المتحصل عليها فقط من السطح. الطبقات العميقة لهذه العينات من التربة منحت كمية من بيكتيريا الأكتينومييسات لا يستهان بها. هذا التوزيع البكتيري يتناسب إيجابيا مع معدل المواد العضوية الموجودة في طبقات التربة.

الكلمات المفتاحية: الاكتينومييسات. احصاء, تربة نخيل, تربة زيتون .

Liste des figures

Figure 1: Différents sporanges d'actinomycètes	04
Figure 2 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide.....	05
Figure3: Observation par microscopie électronique à balayage des types fragmentaires et permanents du mycélium des actinomycètes. (B) Bactéries du genre <i>Nocardia</i> qui se fragmentent. A) Bactéries du genre <i>Streptomyces</i> en sporulation	5
Figure 4 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs).....	06
Figure 5 : Cycle de développement des actinomycètes (<i>Streptomyces spp.</i>).....	07
Figure 6 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S.....	09
Figure 7 : Répartition de la production d'antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses.....	15
Figure 8 : Carte géographique de site de prélèvement des échantillons (Biskra).....	23
Figure 9: Site de prélèvement du sol sous palmier.....	23
Figure 10 : Site de prélèvement du sol sous olivier	23
Figure 11 : (A) Couche 1 du sol sous palmier.(B) Couche 2 du sol sous palmier (-20 cm). (C) Couche 3 du sol sous palmier(-40cm).....	24
Figure 12 : (A) Couche 1 du sol sous olivier. (B) Couche 2 du sol sous olivier (-20 cm).(C) Couche 3 du sol sous olivier (-40 cm).....	24
Figure 13: Aspect macroscopique des isolats d'actinomycètes à partir de deux échantillons : (a) Sous palmier, (b) Sous olivier sur ISP2.....	28
Figure 14: Distribution quantitative des actinomycètes dans les sols sous palmier et sous olivier.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Exemples de quelques taxons d'actinobactéries.....	08
Tableau 2 :	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes.....	11
Tableau 3 :	Répartition des actinomycètes dans la nature.....	12
Tableau 4 :	Principales caractéristiques des genres d'actinomycètes fréquents dans les sols.....	13
Tableau 5 :	Exemples d'antibiotiques produits par des actinomycètes.....	16
Tableau 6 :	Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes.....	20
Tableau 7 :	Taux de matière organique dans les deux échantillons de sol sous palmier et sous olivier.....	27
Tableau 8 :	Nombre de colonies d'actinomycètes isolées à partir des deux échantillons de sol	29

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : acide ribonucléique

E. coli : *Escherichia coli*

g : gramme

G+C : guanine + cytosine.

ISP2 : International *streptomyces* project

MIB : 2-méthyl isobornéol

min : minute

Na Cl : chlorure de sodium

pH : potentiel hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Introduction

Les actinomycètes représentent une source très importante des biomolécules et des antimicrobiens les plus utiles en médecine, en agriculture, en biotechnologie et dans bien d'autres domaines. Mais ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques. Environ 70% de ces substances sont produites par les actinobactéries (**Okami et Hotta, 1988**). Ces bactéries se représentent généralement sous l'aspect filamenteux, septées ou non, très ramifiées et ressemblent aux champignons auxquels elles étaient autrefois assimilées. Ces bactéries à coloration de Gram positif possèdent un pourcentage de guanine-cytosine supérieur à 55%. Dans le sol, les actinobactéries sont distribués d'une manière différente dans les couches terrestres où ils jouent un rôle prépondérant dans les cycles géochimiques de la matière vivante. Ces microorganismes contribuent pleinement dans l'influence des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les végétaux.

Ces interactions positives entre les plantes et les microorganismes de la rhizosphère peuvent améliorer la croissance et la résistance des plantes, de manières différentes. Les plantes associées symbiotiquement aux actinomycètes désignées sous le terme général de plantes actinorhiziennes, sont multiples. L'exemple le plus connu est sûrement l'association du genre *Frankia-Aulne* responsable de la fixation d'azote atmosphérique. La tolérance des plantes aux stress environnemental et aux pathogènes telluriques réduisent les besoins d'application des engrais et des pesticides très toxiques (**Dari, 2012**).

Les sols des zones arides et semi-arides étaient supposés pendant longtemps, comme milieux stériles. Mais les travaux d'exploration ont montré qu'il existe des espèces microbiennes, qui s'adaptent aux conditions climatiques extrêmes (**Sasson, 1967**). Les travaux qui s'intéressent à la biodiversité des actinomycètes dans les sols arides sont présents, mais restent insuffisants et incomplets (**Boudemagh, 2007, Boudemagh et Bensouici, 2014**). Les travaux qui s'intéressent à la répartition des actinobactéries sous couvert végétal dans les sols arides et semi arides sont très rares. Le Sahara Algérien est connu par ses palmiers dattiers très anciennement implantés. Ces dernières années, d'autres arbres fruitiers comme les oliviers ont été implantées. Un bilan sur la distribution quantitative des actinomycètes rhizosphériques dans ces zones, est d'une importance certaine. Ils apportent des éléments de réponse sur le rôle de ces bactéries dans les différentes associations avec ces arbres.

Dans cette étude, Nous nous sommes assigné de réaliser une étude comparative sur les actinomycètes qui colonisent les sols sous les palmiers dattiers et sous les oliviers. Cette étude

quantitative permet de délimiter la distribution des actinobactéries selon les différentes couches devant ces plantations. La région de Biskra a été choisie comme zone d'étude car elle est une ressource non négligeable de palmier dattier et de nouveaux arbres comme les oliviers.

Les objectifs principaux de notre recherche sont donc :

- Mesure la matière organique des différentes couches de sols,
- Recherche des actinomycètes à partir de différentes couches de ces deux types de sol,
- Dénombrement et comparaison quantitative des actinomycètes isolés.

Notre mémoire comporte deux parties:

La première est une recherche bibliographique qui représente une généralité sur les actinomycètes et un chapitre consacré aux interactions entre les plantes et les actinomycètes. La seconde concerne le volet expérimental pour l'isolement et le dénombrement des actinomycètes.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I :

Les actinomycètes:

1. Historique

L'histoire des Actinomycètes est divisée en quatre grandes catégories. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et qui 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, avec les travaux de **Krinsky (1914)**, **Cohn, Curtis et Orla Yensen (1909)**, qui créa la famille des *Actinomycetaceae* qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite **Buchanan (1917)** créa l'ordre des *Actinomycetales*. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de **Waksman**, de **Lieske**, de **Krassilnikov** entre autre. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de **Selman Waksman** lui est indissolublement lié (**Le Minor et Veron, 1989**). En **1958 Pridham**, proposa un système de classification des *Streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien, **Ettling et al., (1958)** introduit un critère important dans la différenciation des espèces, c'est la production des pigments mélanoides (**Messoudi, 2003**).

2. Définition et propriétés générales

Le mot «Actinomycètes» est dérivé du Grec «*Aktino, mycetes*» ou «champignons à rayons» ou encore «champignons rayonnants» (**Gottlieb, 1973**). Ils se caractérisent par la formation d'hyphes filamenteux et qui produisent des spores asexuées. Par leur morphologie générale, ils ressemblent fortement aux mycètes. Cette ressemblance résulte en partie d'une adaptation aux mêmes habitats (**Zouaghi, 2007**). Ils constituent une proportion importante de la microflore tellurique (10^4 - 10^6 UFC/ml) (**Shrivastava et al., 2008**). Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (**Le Minor et Veron 1989**). Lorsqu'il croît sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former le mycélium végétatif. Des septums divisent habituellement les hyphes en longues cellules (>20µm) contenant plusieurs nucléoides. Parfois, il se forme une masse qui ressemble à un tissu qui porte le nom de thalle. De nombreux actinomycètes ont également un mycélium aérien qui se dresse au dessus du substrat et qui forme des conidies (**Basilio, 2003**). Des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores sont présentes à

l'extrémité des filaments ; si les spores sont localisées dans un sporange, on les appelle des sporangiospores. Les spores peuvent avoir des formes variables (**Zouaghi, 2007**). Leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines (**Boudemagh, 2007**). Selon les genres, Les spores peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), en longues chaînettes formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne (*Streptomyces*) ou conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (**Belyagoubi, 2014**) (**Photo.1**).

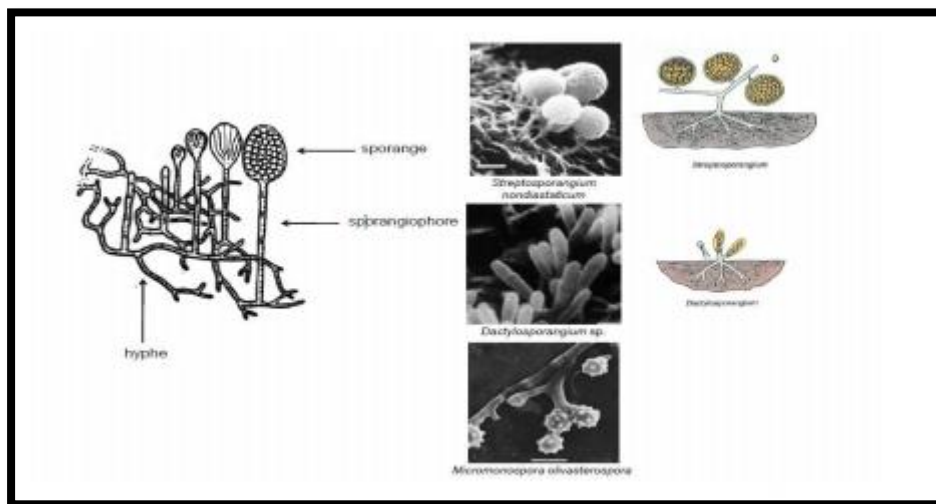


Figure1: Différents sporanges d'actinomycètes (**Belyagoubi, 2014**).

3. Caractères morphologiques

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes. Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 μm , est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 μm) (**Belyagoubi, 2014**). Le diamètre des colonies est de 1 à 4 millimètres. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. (**Boudemagh, 2007**). Les membres des *Actinobacteria* sont deux types : unicellulaires tels que les genres *Micrococcus* (coques) et *Arthrobacter* (bâtonnets irréguliers) et d'autres genres qui produisent des filaments multicellulaires qui se développent sur et dans le milieu (mycélium végétatif) ou à la surface, au dessus du substrat (mycélium aérien) tels que le genre *Streptomyces* (**Aouar, 2012**) (**Fig.1**) (**Photo. 2**)

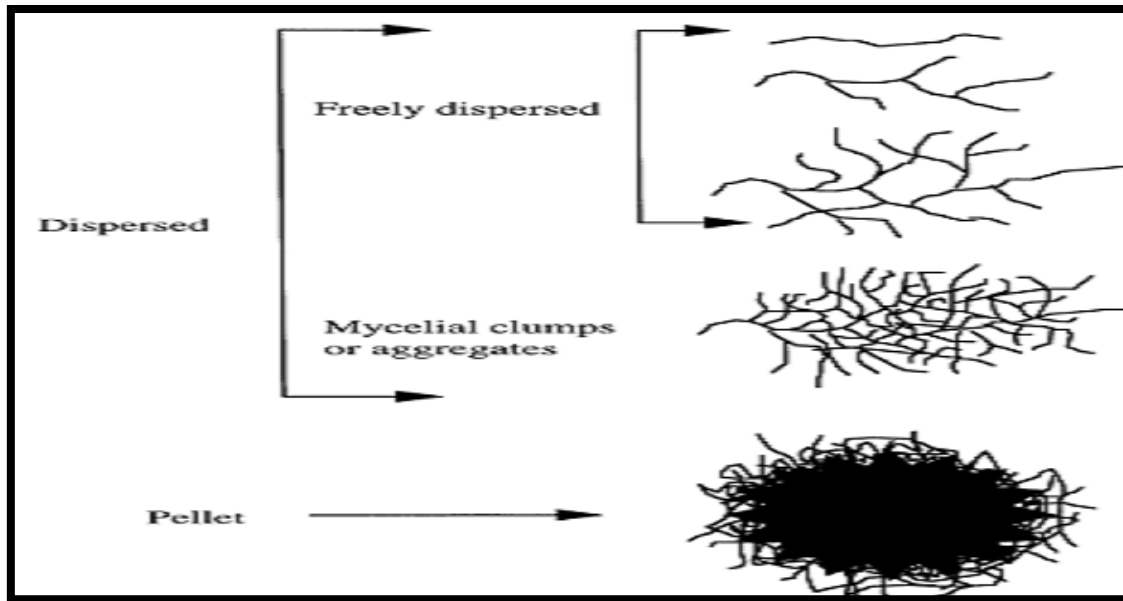


Figure 2 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

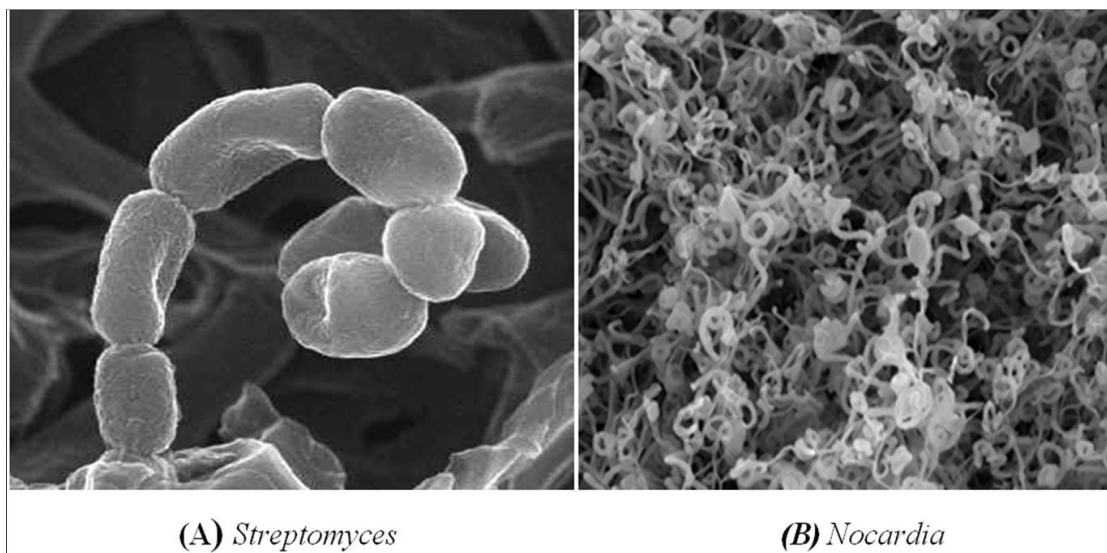


Figure 3: Observation par microscopie électronique à balayage des types fragmentaires et permanents du mycélium des actinomycètes. (B) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent. (A) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 μm . (Belyagoubi, 2014).

les similarités morphologiques des actinomycètes et des champignons apparaissent plutôt liées au fait que ces microorganismes colonisent des écosystèmes voisins (en particulier le sol), et ont donc développé au cours de l'évolution des modes de reproduction, de dissémination et de croissance voisins (Belyagoubi 2014). Les actinomycètes forment des filaments minces et ramifiés qui, lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme la gélose,

ils se développent à la fois sur la surface et à l'intérieur de celui-ci (**fig.2**) (**Prescott et al., 2010**).

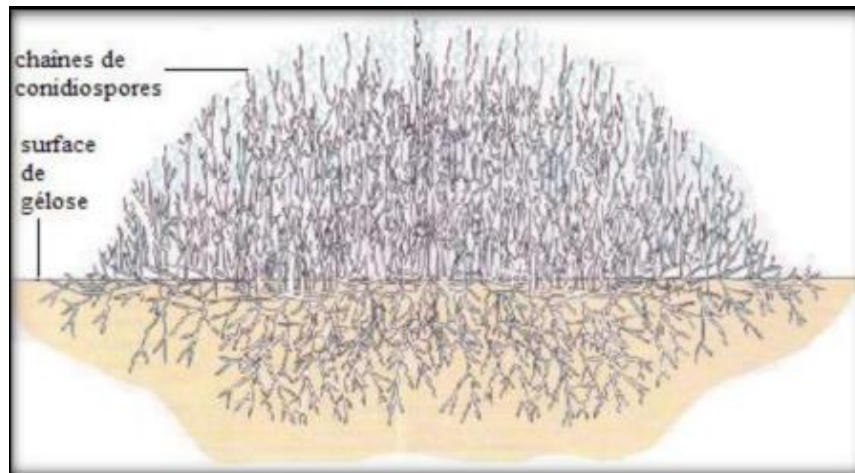


Figure 4: Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs) (**Prescott et al., 2003**).

4. Cycle de développement

La cellule bactérienne initiale, appelée erronément « spore libre » croît à la surface du milieu de support non seulement en s'allongeant, comme toute bactérie, mais aussi en se ramifiant et, même, en pénétrant en profondeur dans le milieu, sans se diviser, sans qu'aucune septation n'apparaisse (= mycélium). Après quelques jours, le mycélium produit des structures aériennes qui s'étendent en hauteur (= hyphes aériens). Ces structures vont développer des torsades, tel un tire-bouchon. Leur partie terminale, après une série de réplifications et de migrations du chromosome bactérien, montre l'apparition d'un nombre important d'événements de septation, qui sont à la base de la formation d'autant de jeunes cellules bactériennes qui vont, après maturation et libération, donner naissance à de nouvelles formes libres, pour que le cycle vital recommence (**fig.3**) (**Zouaghi, 2007**). En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique. (**Smaoui, 2010**).

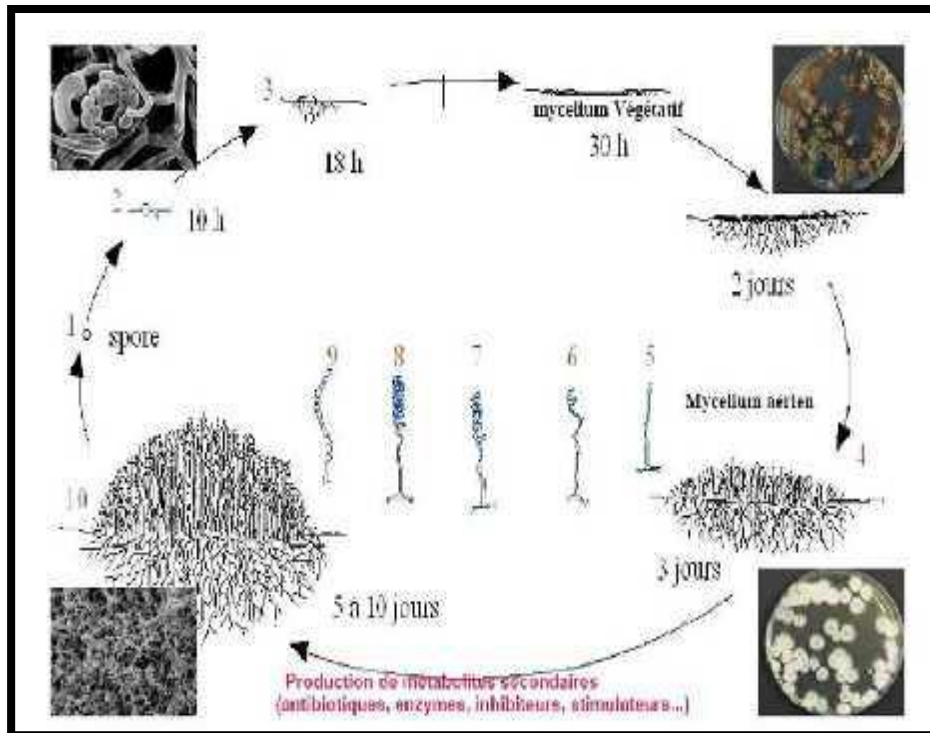


Figure 5 : Cycle de développement des actinomycètes
(*Streptomyces spp.*) (Zouaghi, 2007).

5. Classification et taxonomie

Une grande difficulté de la classification des actinomycètes existe (Ameur Hanan, 2014). Les actinomycètes appartiennent au règne des procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycétales (Ouhdouch, 2003). La classification a établi des groupes taxonomiques (taxon) (tab.1). Ceux-ci sont établis selon des critères phénotypiques et moléculaires à défaut de bases phylogéniques (Kitouni, 2007). L'identification des genres est facilitée par des études :

- Morphologiques : mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production des spores,.... etc.
- Chimio -taxonomiques : la composition cellulaire en acides aminées, en sucres et en lipides, ...etc.

Alors que celle des espèces est basée sur des critères :

- Physiologiques : tolérance au chlorure de sodium, croissance en différentes valeurs de température et de pH, recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et terminaux.

- Moléculaires : détermination du (G+C)%, séquençage des gènes de l'ARNr 16S, hybridation ADN-ADN (Smaoui, 2010).

Tableau 1 : Exemples de quelques taxons d'actinobactéries (Larpent, 2000).

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

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes (Zermane, 2007). Le groupe des actinomycètes comprend actuellement plus de 40 genres et quelques centaines d'espèces (fig.3) (Williams *et al.*, 1983)

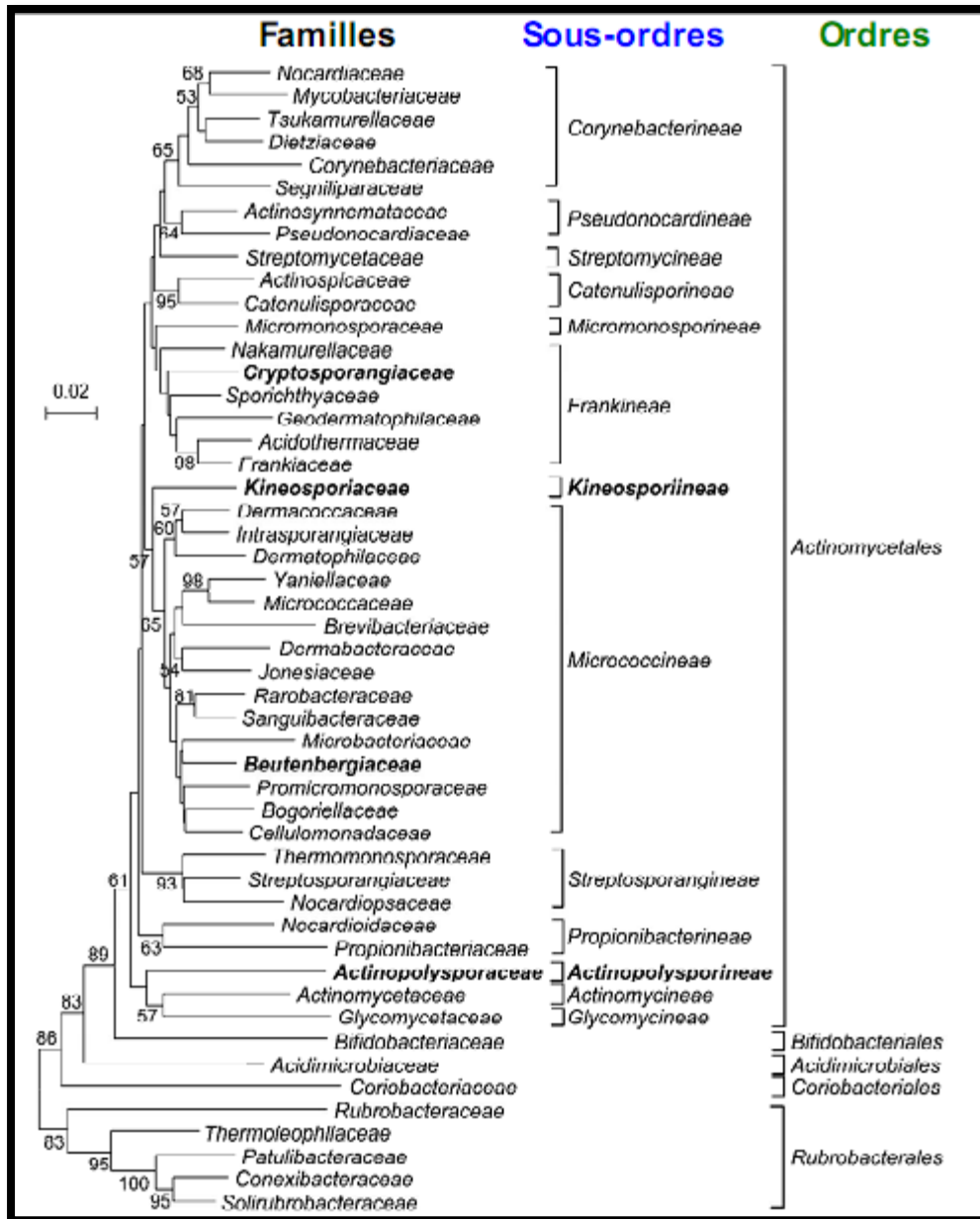


Figure 6 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).

6. Caractères cultureux

Selon **Noureddine** (2006) et **Boudjella et al.** (2007), les caractères cultureux aident pour la différenciation des genres d'actinomycètes. Il y a plusieurs caractères cultureux mais les plus importants sont :

- La production d'un mycélium aérien ou non (par exemple chez les genres : *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Actinoplanes* ;
- La présence ou l'absence d'un mycélium du substrat ;

- La couleur du mycélium aérien et du mycélium du substrat qui peut être définie à l'aide d'une charte de couleur ;
- La production et la couleur des pigments dans un milieu de culture ;

7. Physiologie et métabolisme

7.1. Physiologie

Le sol est un écosystème favorable pour le développement des actinomycètes. Leur présence dans le sol est significative selon les conditions de l'environnement par exemple : pH, température, l'humidité, la salinité (**Sykes et Skinner , 1973**) et (**Basillio et al., 2003**).

- **pH**

Les actinomycètes du sol généralement sont des neutrophiles. Ils ont la capacité de se développer dans un intervalle de pH entre 5 et 9, mais pour leur croissance optimale le pH doit être neutre ou alcalin (**Lee et Hwang , 2002**) . Il existe des souches acidophiles dont l'intervalle de pH est compris entre (3.5 et 6.5) avec un pH optimale entre (4.5 et 5.5), comme *Streptacidiphilus jiangxiensis* (**Huang et al ., 2004**).

- **Température**

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. La plupart des spores d'actinomycètes sont incapables de résister à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en chaleur sèche, c'est le cas des : *Streptomyces* (**Larpen et Sanglier, 1989**). Il existe également d'autres espèces capables de résister à des températures très élevées. Le traitement à 120°C inhibe juste leur germination, par contre la destruction totale des spores se réalise à 130°C (**El-Nakeeb et Lechevalier , 1963**).

- **Matière organique dans le sol**

Selon les recherches de **Henis** en 1986, le nombre des actinobactéries est corrélé avec le taux de matière organique présentée dans le sol ; c'est-à-dire lorsque le taux de matière organique est élevé, cela conduit à la hausse du nombre des populations d'actinomycètes, quelque soit le taux de la salinité du sol (**Lee et Hwang , 2002**).

7.2. Métabolisme

Les Actinomycètes se séparent en deux groupes. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (**Le Minor et Veron 1989**).

8. Génétique et structure de l'ADN

L'ADN des actinomycètes est de taille de 3.7 Méga Daltons presque deux fois celui d'E.coli, avec une durée de réplication de 50 à 65 minutes. A cause de plusieurs types de mutations les actinomycètes possèdent un grand degré de variabilité génétique (**Larpent et Sanglier, 1989**). Les méthodes classiques d'identification bactérienne sont basées sur la détermination des caractères physiologiques, métaboliques et culturels mais ces méthodes sont incapables de détecter les micro-organismes non cultivables (**Douga et al., 2005**). La taxonomie moléculaire a été mise en place à partir des années 80 et consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment la détermination du pourcentage en GC (**Tab.2**) (**Chargaff et Vischer, 1994**) l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S (**Labeda , 1992**). Ces techniques ont permis de tracer toute la phylogénie des bactéries notamment, celle des actinomycètes.

Tableau 2: Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (**Williams et al., 1989**).

Genre	G + C % (Moles)
<i>Actinomadura</i>	64 à 69
<i>Nocardia</i>	64 à 72
<i>Streptomyces</i>	69 à 78
<i>Micromonospora</i>	71 à 73
<i>Actinoplanes</i>	72 à 73
<i>Actinopolyspora</i>	64
<i>Agromyces</i>	71 à 77
<i>Frankia</i>	66 à 71
<i>Glycomyces</i>	71 à 73
<i>Nocardiopsis</i>	64 à 69
<i>Rodococcus</i>	63 à 72
<i>Streptosporangium</i>	69 à 71
<i>Streptoverticillium</i>	69 à 73
<i>Thermoactinomyces</i>	53 à 55

9. Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires comme le montre le **tableau 3**.

Tableau 3 : Répartition des actinomycètes dans la nature (**Goodflow et Williams, 1983**).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Sacchromonospora</i>	Matière en décomposition

- **Dans le sol**

Les actinomycètes sont des microorganismes très importants à cause de leur production de géosmine et de MIB (2-méthyl isobornéol), elle contribue significativement à l'odeur caractéristique du sol (**Zaitlin et al ., 2006**) . Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**).

Les principales caractéristiques des genres d'actinobactéries du sol sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des genres d'actinomycètes fréquents dans les sols (Stanier, 1966).

Genres	Caractéristiques
<i>Nocardia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Filaments qui se fragmentent rapidement en unités bactériennes. - Les filaments se développent rarement au-dessus de milieu. - Les spores sont rarement produites.
<i>Thermoactinomyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Spore uniques formées sur des filaments dans et au dessus du milieu. - Spore thermorésistantes. - Espèces thermophiles.
<i>Streptomyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Longues chaines de spores formées sur des filaments qui se développent au-dessus du milieu de culture. De nombreuses espèces produisent des antibiotiques
<i>Streptosporangium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Spores formées dans des sporanges ou en chaines sur les filaments au dessus du milieu. - Colonies morphologiquement semblables aux <i>Streptomyces</i>
<i>Micromonospora</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Les filaments ne se développent pas au dessus du milieu. - Spores uniques et produites dans ou à la surface du milieu. - Croissance lente.

- **Dans l'eau**

Les actinomycètes ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques : eau de mer et de sédiments marins (**Jensen et al., 1991**), eau douce (**Kitouni et al., 2005**) et eau issue de marécages salés (**Al-Zarban et al., 2002**).

- **Dans la rhizosphère**

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans la protection des racines des plantes par leur sécrétion d'antifongiques qui provoque l'inhibition du développement des champignons pathogènes, ce qui est prouvé in vitro (**Watson et Williams, 1974**). Plusieurs genres d'actinomycètes sont responsables d'actinomycoses. Le genre *Nocardia* comprend aussi, plusieurs espèces responsables de pathologies chez les animaux et chez l'Homme à l'exemple de *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine (**Zhang et al., 2003**).

- **Dans l'air**

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinomycètes sont des contaminants importants de notre environnement. Les spores de certains actinomycètes se développent dans des matériaux détériorés provoquant, lorsqu'elles sont inhalées, des maladies respiratoires. Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air (**Mazodier, 1974**).

- **Dans les Composts**

Des actinomycètes sont isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tel que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* (**Song et al., 2001**). Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (**Zermane, 2007**). Les actinobactéries se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on retrouve au bord des rivières, des lacs et les champs de riz et les cavernes naturelles. Beaucoup sont capables de sporuler ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (**Djaballah, 2010**).

10. L'importance des actinomycètes

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines: dans le domaine industriel, dans le domaine médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro alimentaire, etc. (George *et al.*, 2012). Ils peuvent également dégrader un nombre et une variété énorme de composés organiques et ils sont extrêmement efficaces pour la minéralisation de la matière organique qui se trouve dans le sol.

- **La production des antibiotiques**

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques (Fig.4) (Berdy, 2005).

Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, produisent la plupart des antibiotiques naturels utilisés en médecine (Birch, 1990), en particuliers le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012). Les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques et peuvent produire un grand nombre d'antibiotiques (environ 80% de la production totale d'antibiotiques) et des métabolites secondaires actifs (tab.5). De nombreux antibiotiques ont été isolés dans une variété de microorganismes et ont été employés dans beaucoup de domaines : l'industrie, l'agriculture, science vétérinaire et pharmaceutique (Oskay *et al.*, 2004). Cependant, des études sont en cours pour identifier de nouveaux antibiotiques efficaces contre les mycètes et les bactéries pathogènes (Belyagoubi 2014).

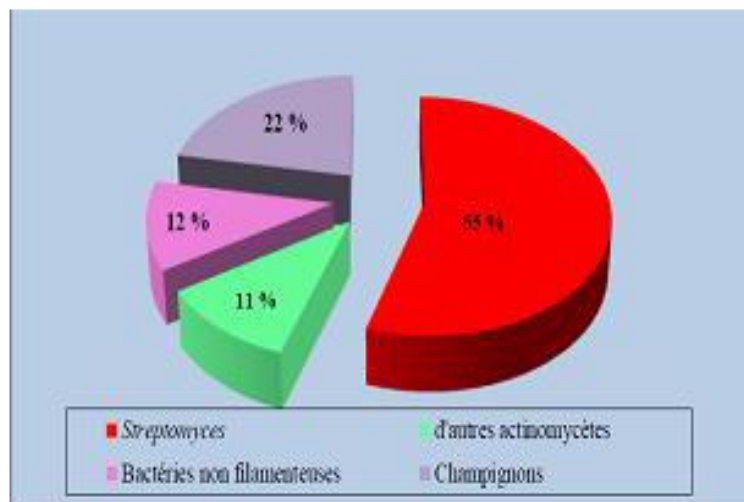


Figure 7 : Répartition de la production d'antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005).

Tableau 5: Exemples d'antibiotiques produits par des actinomycètes (**Zouaghi., 2007**).

Principales classes structurales d'antibiotiques	Exemples d'antibiotiques
Macrolides	Spiramycine Tylosine
Peptides	Actinomycine Pristinamycine
Tétracyclines	Chlorotétracycline Oxytétracycline
Divers	Chloramphénicol

La néomycine et la streptomycine sont également des antibiotiques synthétisés à partir des actinomycètes. Elles sont respectivement produites par *S.griseus* et *S. fradiae* (**Szeszak et Szabo , 1967**). Les espèces *S. viridochromogenes* et *S.hygroscopus* synthétisent le tri-peptide phosphinothricine qui possède des propriétés bactéricides, fongicides et herbicides (**Schwartz et al., 2004**). La staurosporine (*Streptomyces* sp. TP-A0274 et *Lechevalieria staurosporeus*) et la rébéccamycine (*L. aerocolonigenes* ATCC 39243) sont des antibiotiques anti-tumoraux (**Onaka, 2006**). *S. fungicidicus* produit l'enduracidine ayant une activité bactéricide considérable contre les streptocoques multi-résistants et les bactéries à Gram positif. D'un autre côté, *S. rochei* sbsp. *volubilis*, T-2636 accumule la sédécamycine qui inhibe fortement la croissance de *Staphylococcus aureus* (**Higashide, 1995**).

- **La production des enzymes**

La fonction écologique principale des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (**Prescott et al., 2010**), grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases (**Prakash et al., 2012**). Les actinomycètes aussi synthétisent des chitinases, des glucanases, des peroxydases (**Tokala et al., 2002**) et des glutaminases (**Divya Teja et al., 2014**). Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, des cellulases et des hémicellulases. D'autres sont capables de dégrader la lignine. *Streptosporangium sp.* isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (**Hasegawa et al., 2006**). Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**Theilleux, 1993**). Les enzymes peuvent avoir des applications médicales, en Biologie moléculaire, en industrie alimentaire ou celle des détergents, ...etc. Les enzymes isolées à partir des actinomycètes des environnements extrêmes, dites actinomycètes extrémophiles, sont commercialement très importantes (**Loucif, 2010**).

Chapitre II:

*Les interactions
microorganismes -
plantes*

1. Introduction

Les interactions entre les plantes et les microbes font partie intégrante de notre écosystème terrestre. Il existe plusieurs types d'interactions plantes-microbes. Les plus courantes sont le commensalisme et le mutualisme où les deux bénéficient de leur relation (**Campbell, 1995**). Les avantages de la connaissance de ces interactions pour les applications biotechnologiques sont nombreux:

* Dans la lutte biologique et les traitements pesticides menant à bon rapport coût /efficacité et moins d'impact sur la flore environnante (**Boddey et al., 2003**).

* La production de composés d'intérêt pharmaceutique et industriel avec moins d'énergie (**Wu et al., 2006; Del Giudice et al., 2008**).

* La diminution de la nécessité d'ajouter les précurseurs et les catalyseurs coûteux (**Anderson et al., 1993**).

* La séquestration du carbone par des processus de plantes rhizosphère est une méthode potentiellement durable à la réduction du carbone atmosphérique (**Kumar et al., 2006**).

1. L'effet rhizosphérique

La rhizosphère exerce une influence le plus souvent favorable sur la croissance et le développement de la microflore tellurique : c'est ce qu'on nomme « effet rhizosphérique ». Les bactéries sont les plus stimulées par cet effet (*Pseudomonas, Arthrobacter ...*) contrairement aux champignons où il est moins spectaculaire (*fusarium* et *cylindrocarpon*). Les actinomycètes quant à eux sont en nombre important à la surface des racines. Chaque plante induit un effet rhizosphérique qui est caractéristique de son espèce ou de sa variété. Aussi, la densité et la composition des micropopulations varient en fonction du stade de développement de la plante. En effet, la plante commence à exercer une influence sur la microflore dès la phase de germination. Après, les microorganismes du sol croissent et atteignent leur densité maximale à la floraison. Enfin, quand les racines vieillissent, l'effet rhizosphérique s'estompe et est progressivement masquée par la prolifération des microorganismes décomposeurs des tissus végétaux morts.

La plante exerce sur la microflore rhizosphérique une action directe (modification de l'environnement dans le sol tel que la structure et le régime hydrique) et une action indirecte se traduisant par des exsudations racinaires qui selon le cas, peuvent avoir des effets soit inhibiteur soit stimulant sur la microflore et des exfoliations des tissus racinaires favorisant le développement de la microflore des racines en décomposition (cellulolytiques, pectinolytiques , amylolytique, protéolytiques) (**Soltner, 1992**).

2. Relations symbiotiques

Les symbioses sont des associations à bénéfice réciproque entre une plante et un microorganisme. Certaines symbioses se manifestent par la formation d'organes spécialisés comme les nodules et les mycorhizes. Les nodules varient par leur taille (de quelques millimètres à plusieurs centimètres), leur forme, leur implantation, et le type de microorganisme responsable. Ils sont induits par deux types de microorganismes: les *Rhizobium* qui produisent la formation de nodules sur les racines des légumineuses et les *Frankia*, qui produisent la formation de nodules sur les racines de certains arbres qualifiés d'actinorhiziens (**Roger et Garcia, 1993**).

2.1. Symbiose (rhizobium)

La plupart des espèces de légumineuses possèdent sur leurs racines, des nodules contenant des bactéries fixatrices d'azote (**Roger et Garcia, 1993**). L'un des principaux groupes, et le plus anciennement connu est celui des *Rhizobium* (à croissance rapide) et des *Bradyrhizobium* (à croissance lente). Les *Rhizobium* sont des bactéries souvent abondantes au voisinage des racines des plantes, particulièrement dans les sols dont le pH est voisin de 7. Le processus de l'association symbiotique commence par un échange de signaux entre la plante-hôte et la bactérie (**Davet, 1997**). La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs nécessaires à la bactérie qui en retour fixe l'azote qu'intégreront les protéines végétales (**Tortora et al, 2003**).

2.2. Symbiose actinorhizienne

Le nom de plantes « actinorhiziennes » a été introduit en 1978, lors d'un symposium à l'Université de Harvard dans le Massachusetts. Il a été attribué à toutes les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des actinomycètes du genre *Frankia* (**Benson et Silvester, 1993 ; Wheeler et al., 2008 ; Chaia et al., 2010**). L'association symbiotique avec *Frankia* aboutit le plus souvent à l'apparition de nodules racinaires. Dans des conditions climatiques particulières caractérisées par une forte humidité, des nodules caulinaires peuvent être observés à 130-150 cm au dessus du sol chez *Casuarina cunninghamiana* (**Prin et al., 1991**). À l'exception du genre *Datisca* qui est une herbacée, les plantes actinorhiziennes sont des arbres et des arbustes appartenant au clade des Angiospermes. On distingue environ 260 espèces de plantes actinorhiziennes réparties en 8 familles et comprenant 24 genres (**Tableau 6**), parmi lesquelles on trouve le Filao (*Casuarina equisetifolia*), l'olivier de Bohême (*Elaeagnus angustifolia*), le myrte des marais (*Myrica gale*) et l'aulne (*Alnus* sp.) (**Benson et al., 1993**).

Tableau 6 : Taxonomie, et répartition géographique des plantes actinorhiziennes (Dawson, 2008).

Famille	Genre	Nombre total d'espèces	Nombre d'espèces nodulantes
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	47	47
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	59	54
	<i>Casuarina</i>	18	18
	<i>Ceuthostoma</i>	2	2
	<i>Gymnostoma</i>	18	18
<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	16	16
<i>Datisceae</i>	<i>Datisca</i>	2	2
<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	45	35
	<i>Hyppophae</i>	3	2
	<i>Shepherdia</i>	3	2
<i>Myricaceae</i>	<i>Comptonia</i>	1	1
	<i>Myrica</i>	60	28
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Adolphia</i>	1	1
	<i>Ceanothus</i>	55	31
	<i>Colletia</i>	17	4
	<i>Discaria</i>	10	5
	<i>Kentrothammus</i>	2	2
	<i>Talguenea</i>	1	1
	<i>Trevoa</i>	6	2
<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus</i>	20	4
	<i>Chamaebatia</i>	2	1
	<i>Cowania</i>	25	1
	<i>Dryas</i>	3	1
	<i>Purshia</i>	4	2

2.2.1. *Frankia*

Le microorganisme *Frankia* est initialement décrit dans les nodules racinaires de l'aulne par Frank, au cours de la deuxième moitié du XIX^e siècle. En raison de sa nature

filamenteuse, *Frankia* a été longtemps assimilé à un champignon et dénommé *Schinzia alni* (**Woronin, 1866**). En 1886, Brunchorst proposait le nom *Frankia subtilis* en hommage à son mentor Frank (1839-1900). Les observations des nodules d'*Elaeagnus* et de *Myrica* ont permis de mettre en évidence la différence entre les hyphes et les «bacteroides-likes» (actuellement dénommés diazovésicules et sporanges) de l'endosymbiote d'une part et les structures des champignons d'autre part. En 1902, Shibata rapprochait les structures de l'endosymbiote de celles des actinomycètes et assignait *Frankia* au groupe des mycobactéries.

Les expériences d'incultures croisées avec des broyats nodulaires et les études morphologiques (**Becking, 1970**) ont abouti à la définition de 10 espèces au sein du genre : *Frankia. alni*, *F. elaeagni*, *F.brunchorstii*, *F. discariae*, *F. casuarinae*, *F. coriariae*, *F.dryadis*, *F. purshiae*, *F. ceanothi* et *F. cercocarpi* respectivement associées à *Alnus*, *Elaeagnus*, *Myrica*, *Discaria*, *Casuarina*, *Coriaria*, *Dryas*, *Purshia*, *Ceanothus* et à *Cercocarpus*. Cependant en l'absence d'isolats valides selon les postulats préconisés par Koch et de la possibilité d'avoir plusieurs souches de *Frankia* dans un nodule, cette classification a été largement critiquée.

Pendant plus qu'un siècle (1866 à 1978) *Frankia* a été considéré comme un assemblage de « symbiotes obligatoires » présentant un statut taxonomique incertain. Ce n'est qu'en 1978 que (**Callaham et al., 1978**) obtiennent le premier isolat de *Frankia* en culture pure . A partir des années 80, l'accroissement des études sur ce genre d'actinobactéries, du à la disponibilité d'autres isolats de *Frankia* de 17 genres de plantes hôtes, a justifié la redéfinition du taxon. Cependant le taux de croissance très lent (temps de génération de 1 à 7 jours (**Benson et al., 1993**) et la quasi-impossibilité d'isoler la souche à partir de certaines plantes actinorhiziennes, notamment les *Rosaceae* , *Datisceae*, *Coriariaceae*, *Ceanothus* et certaines *Casuarinaceae*, ont amplement limité la progression des études sur ce genre. Ainsi, les souches de *Frankia* qui ne croissent qu'en symbiose, sont qualifiées de symbiotes obligatoires. C'est le cas des souches associées aux *Rosaceae*, *Datisceae*, *Coriariaceae*, *Ceanothus* mais également de certaines *Frankia* qui sporulent abondamment dans le tissu végétale (**Vandijk, 1979; Torrey, 1987; Schwintzer, 1990**) et qualifiées de souche à spore positive.

2.2.2. Intérêt du genre *Frankia*

C'est grâce à la fixation biologique de l'azote atmosphérique établie par l'actinobactérie *Frankia* que les plantes actinorhiziennes ont un avantage sélectif substantiel manifesté par leur aptitude à se développer sur des sols pauvres en azote et dégradés à l'extrême (**Burleigh et Dawson, 1991**). Les plantes actinorhiziennes sont des espèces pionnières par excellence qui aménagent la succession d'autres communautés végétales et participent à la réhabilitation et la régénération des sols marginaux. Selon les données paléontologiques, ces plantes des colonisateurs primaires communs aux sites endommagés par les catastrophes naturelles. Telles que les glissements des terrains, éruptions volcaniques, les brulis et l'érosion (**Burleigh et Dawson, 1991**). La présence de pollen dans les sédiments marins a attiré Heusser et Shackleton (1979), qui ont montré que ces plantes ont été les premières à coloniser les terrains délaissés par les glaciers et les océans lors des changements climatiques majeurs. Sur le plan biotechnologique l'extension de la capacité à établir des symbioses fixatrices d'azote en dehors des partenaires classiques par l'obtention de symbioses artificielles serait une perspective relativement fondée dans le cas de *Frankia*. En effet cette dernière dispose en effet de mécanismes intrinsèques de protection de la nitrogénase grâce à la localisation de l'enzyme dans les diazovésicules (**Harris et Silvester, 1992**).

2.3. Mycorhizes

Le mycorhize correspond à l'association de la racine et d'un champignon mycorrhizogène. Il existe deux types majeurs d'associations mycorhiziennes ; l'ectomycorhize et l'endomycorhize. Contrairement aux champignons ectomycorhizogènes dont le développement demeure intercellulaire, celui des endomycorhizogènes est à la fois inter et intracellulaire (**Stengel et Gelin, 1998**).



ETUDE
EXPERIMENTALE

1. Prélèvement des échantillons de sol

Tous les échantillons testés dans cette étude ont été prélevés à partir d'une zone de la wilaya de Biskra. Trois échantillons de sol proviennent de la zone rhizosphérique d'un sol aride sous palmier (**photo. 3**). Trois autres échantillons sont prélevés à partir d'un sol aride sous olivier (**photo. 4**).

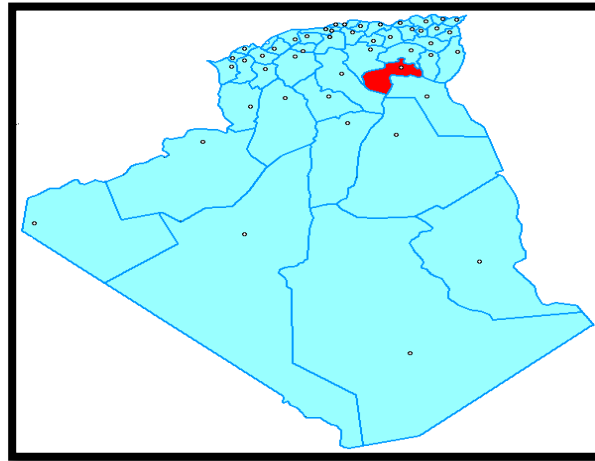


Figure 8 : carte géographique de site de prélèvement (biskra)



Figure 9 : Site de prélèvement de sol sous palmier.



Figure 10 : Site de prélèvement de sol sous olivier.

Les trois prélèvements qui proviennent du sol sous palmier, sont effectués à partir de la surface du sol, puis à une profondeur de 20 centimètres en dessous la surface du sol, ensuite à une profondeur de 40 centimètres (**photo. 5**). Pour la couche superficielle, 100 grammes de terre sont prélevés à l'aide d'une spatule stérile puis déposés dans un flacon stérile. Les pierres, les racines et autres débris sont éliminés de l'échantillon. Les prélèvements sont immédiatement transportés au laboratoire d'analyse. Les mêmes opérations sont effectuées pour les trois échantillons qui proviennent du sol sous olivier (**photo. 6**).

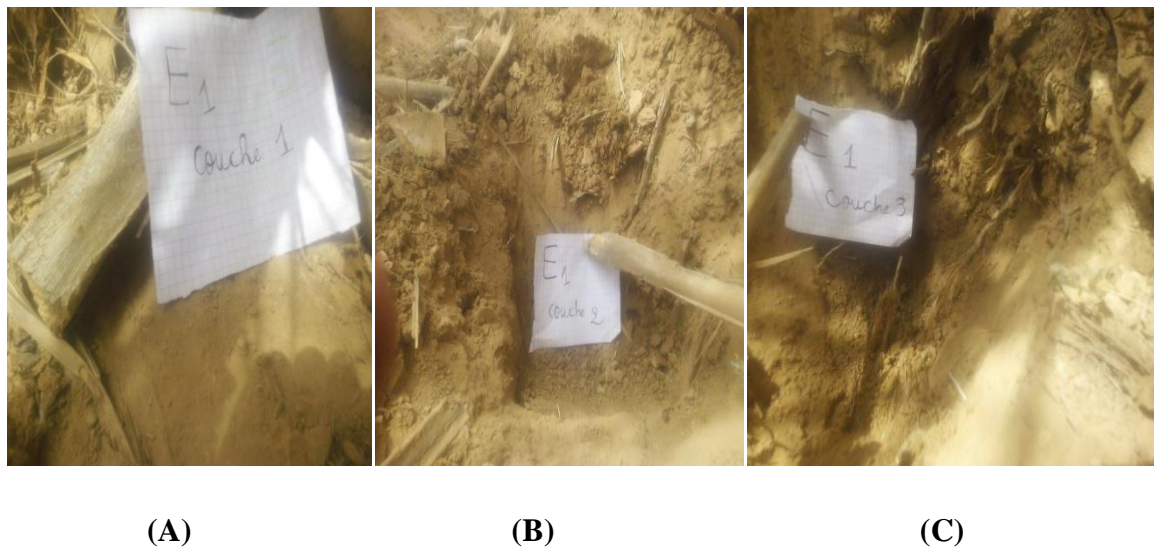


Figure 11 : (A) Couche 1 du sol sous palmier. (B) Couche 2 du sol sous palmier (-20 cm). (C) Couche 3 du sol sous palmier (-40 cm).

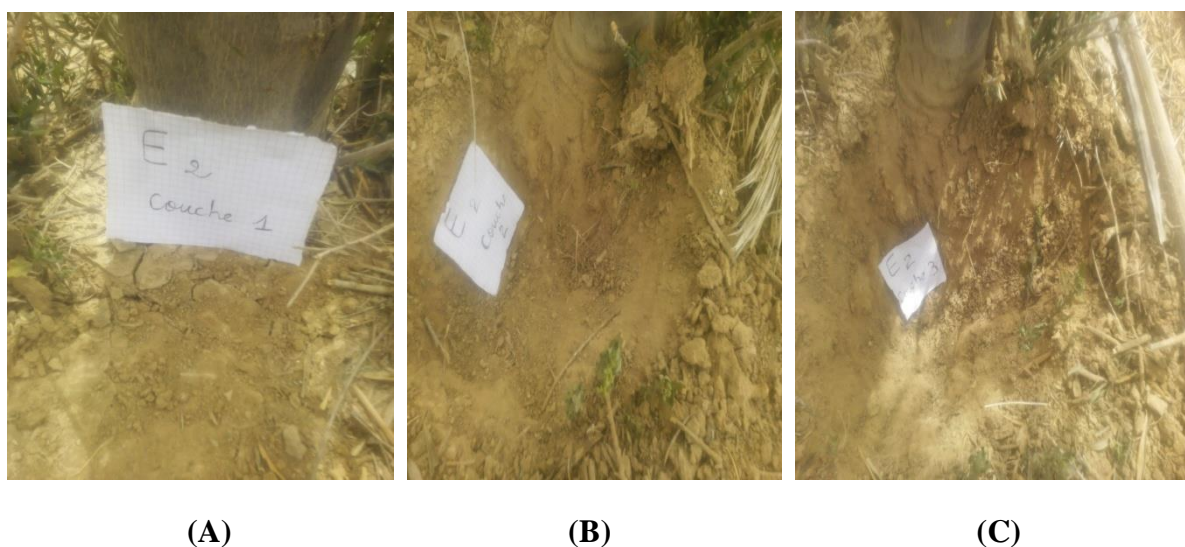


Figure 12 : (A) Couche 1 du sol sous olivier. (B) Couche 2 du sol sous olivier (-20 cm). (C) Couche 3 du sol sous olivier (-40 cm).

2. Analyse de la matière organique

L'analyse de la matière organique est réalisée dans un laboratoire d'analyses microbiologiques dans la ville de Khenchela. Il s'agit du laboratoire des travaux privés de Docteur Sid (EURL SID LABORATOIRE).

3. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture **ISP2** préconisé par Shirling et Gottlieb (1966) est un milieu sélectif de la croissance et l'isolement des actinomycètes. Ces composants sont donnés dans l'**annexe 2**. L'amphotéricine B est un antifongique additionné aseptiquement au milieu de culture à une concentration de 100 µ/ml de milieu de culture (**Boudemagh et Bensouici 2014**) à l'aide d'un filtre de 0.2 µm de diamètre de porosité. L'amphotéricine B est utilisée comme agent antifongique afin d'éliminer la flore fongique envahissante qui perturbe et empêche les actinomycètes de se développer.

4. Préparation de l'eau physiologique

9 grammes d'NaCl sont pesés et mises dans un bécher gradué contenant 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est déposé sur une plaque avec un agitateur par barreau magnétique afin d'assurer l'homogénéisation de la solution. 9 ml de la solution sont mises dans des tubes à essai à vis à l'aide d'une pipette graduée. Les tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

5. Préparation des dilutions

La dilution permet la diminution de la charge microbienne de l'échantillon à analyser ainsi qu'une lecture plus aisée des colonies obtenues (**Guiraud, 1998**). 1 gramme de chaque échantillon des deux sols est dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile. La suspension subit une agitation par un vortex pour l'homogénéisation. Cela constitue la solution mère. 1ml de la solution mère est prélevé puis transféré dans 9 ml d'eau physiologique stérile, ceci représente la dilution 10^{-1} . 1ml de la dilution 10^{-1} est prélevé puis transféré dans 9 ml d'eau physiologique stérile cela constitue la dilution 10^{-2} . De la même manière, des dilutions décimales sont préparées jusqu'à la dilution 10^{-4} pour les deux types de sol.

6. Ensemencement et incubation

0.1ml de chaque dilution sont ensemencés en surface à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sous forme de râteau sur le milieu d'isolement **ISP2**. Les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve réglée à 30° C pendant 21 jours. Les observations sont effectuées après 7 jours, 15 jours, et 21 jours.

7. Dénombrement

Les colonies d'actinobactéries sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique grossissement $\times 10$. Les boîtes présentant des colonies dénombrables et bien distinctes, sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

8. Purification et conservation

Les colonies des actinomycètes sont prélevées soigneusement puis purifiées par repiquage successif sur milieu **ISP2** par la méthode des stries (**Annexe 5**). Cette opération est répétée jusqu'à obtention de souches pures. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 7 jours, puis conservés à 4°C dans un réfrigérateur.

Résultats

et

Discussion

1. Analyse de la matière organique

Les résultats d'analyse de la matière organique dans les deux échantillons : sol sous palmier et sol sous olivier sont résumés dans le tableau 7 selon les normes NF 44-041 NF ISO 10694.

Tableau 7 : Taux de matière organique dans les deux échantillons de sol sous palmier et sous olivier

Echantillons	Taux de la matière organique	
	Echantillon sous palmier	Echantillon sous olivier
Sol de surface	0,45 %	0,40 %
Sol (- 20 cm)	0,40%	0,40 %
Sol (- 40 cm)	0,25 %	0,35 %

Les résultats d'analyses nous ont permis de constater que les deux sols étudiés présentent un faible taux de matière organique. En (2002), **Lee et Hwang**, ont montré que le taux de matière organique en pourcentage dans un sol est considéré comme : faible dans l'intervalle (4.0-7.0) ; modéré entre 7.1 et 9.0 et élevé entre 9.1 et 11.0. Dans les trois couches du sol sous palmier, on remarque que la quantité de la matière organique décroît avec la profondeur avec les pourcentages respectifs de 0,45, 0.40 et 0.25. Ce résultat montre que la quantité de matière organique est plus importante en surface qu'en profondeur. Elle chute de presque 50% à (-40 cm) comparativement à la surface. La distribution des actinobactéries sera fonction de cette disparité de MO dans ces couches. Pour le sol sous olivier, le pourcentage de la matière organique est identique pour la couche de surface et celle de (-20 cm) avec 0.40% pour les deux, contre 0.35 pour la couche (-40 cm). Ces sols selon la classification de Lee et Hwang, sont considérés comme des sols très pauvres en matière organique.

2. Isolement des actinomycètes

Après 21 jours d'incubation à 30°C sur le milieu ISP2, les actinobactéries isolés à partir des deux écosystèmes sont reconnus par leur aspect morphologique caractéristique. D'après **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande

partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Les colonies apparaissent sèches, rigoureuses, colorés ou non, qui adhèrent à la gélose et certaines présentent un mycélium végétatif et aérien, avec des tailles différentes (petite, moyenne, grande) et de forme variable (lisse, bombé, aplatie....etc.) (**photo.7**). Certains actinomycètes montrent seulement un mycélium du substrat (**Boudemagh, 2007**).

Il est à signaler par ailleurs, que certains problèmes de contamination ont été rencontrés dans les isollements et même les repiquages des colonies. Il s'agit d'une sorte de plage bactérienne qui gêne la croissance des actinomycètes par l'envahissement de la gélose. Cet organisme a été assigné à une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. Ce type de contamination a été longtemps remarqué dans beaucoup de travaux de ce genre (**Boudemagh, 2007 ; Kitouni, 2007 ; Chelli, 2010**).



(a)



(b)

Figure 13: Aspect macroscopique des isolats d'actinomycètes à partir de deux échantillons : (a) Sous palmier, (b) Sous olivier sur ISP2

3. Dénombrement des actinobactéries

Les résultats du dénombrement des actinomycètes dans les trois couches des deux échantillons sont représentés dans **le tableau 8**.

Tableau 8: Nombre de colonies d'actinomycètes isolées à partir des deux échantillons de sol

Echantillons	Nombre de colonies (10^{-4})	
	Sol sous palmier	Sol sous olivier
Echantillon de surface	21	6
Echantillon (-20 cm)	9	4
Echantillon (-40 cm)	15	3
Total	45	13

D'après les résultats illustrés dans le **tableau 8**, une différence dans le nombre d'actinomycètes isolés et purifiés à partir des deux échantillons est observée. Le sol sous palmier marque le plus grand nombre d'isolat, avec 45 actinobactéries contre 13 pour le sol sous olivier. Le plus grand nombre d'actinomycète a été isolé, à partir du sol sous palmier en surface où la matière organique est égale à 0.45%. La distribution des actinomycètes sous dans le sol sous palmier, est corrélé positivement avec la quantité de MO. Elle suit également le même tableau pour le sol sous olivier concernant la MO. Ces résultats montrent que les actinomycètes sont distribués dans la rhizosphère selon le type de végétaux et les interactions entre les racines du palmier. Des résultats similaires ont été rapportés par **Miller et al (1989)** et **Crawford et al (1993)**, ils ont montré que les actinomycètes sont plus abondants dans les sols rhizosphériques. Cependant, nos résultats concernant le palmier ou l'olivier, montrent que le nombre est plus important en surface qu'en profondeur comme l'illustre l'**histogramme** ci-dessous. Cette situation peut être expliquée par la présence de résidus de récolte. En effet, ces résidus de récolte à proximité du palmier dattier ou l'olivier, après le retournement du sol, représentent un apport nutritif essentiel pour les microorganismes. D'après **Chaussod et al., (1992)**, la localisation des résidus de récolte influencent directement la localisation des activités microbiennes.

La différence existe également dans le nombre des actinomycètes dans les différentes couches du même sol. Pour le sol sous palmier, c'est l'échantillon de surface qui marque le plus grand nombre avec 21 actinomycètes. Ce nombre diminue dans la couche (- 20 cm) avec 9 actinobactéries, puis augmente dans la couche (- 40 cm) avec 15 isolats. Cette différence dépend peut être du taux de matière organique qui change d'une couche à la l'autre et qui stimule la prolifération de la microflore actinomycétale. Il existe surement d'autres

paramètres qui influencent cette distribution. Nous pouvons citer l'humidité, le pH, la salinité ...etc. Ces paramètres n'ont pas pu être suivis à cause du manque des moyens.

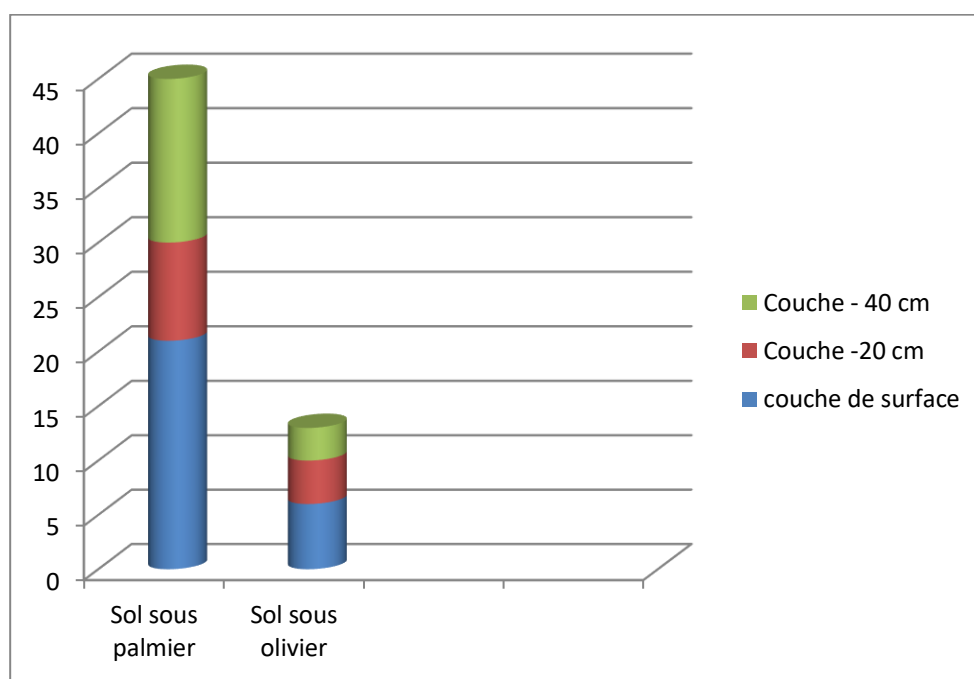


Figure 14: Distribution quantitative des actinomycètes dans les sols sous palmier et sous olivier.

En **1992** (**Sabaou et al.**) ont étudié les distributions qualitatives et quantitatives des actinomycètes sur des horizons superficiels et profondes d'une plantation de palmiers en Algérie. Les distributions ont été influencées directement par certains facteurs morphologiques et pédologiques des horizons, parmi lesquels, les plus importants en dehors de la profondeur, étaient la quantité et la qualité de la matière organique, l'abondance d'argile et le contenu calcaire.

En **2009** les études réalisées par (**Sutthinan et al.**) montrent qu'un total de 445 isolats d'actinomycètes a été obtenu à partir de 16 sols de rhizosphère de plantes médicinales. Des études morphologiques et chimiotaxonomiques ont montré que 89% des isolats appartenaient au genre *Streptomyces*, 11% étaient non *Streptomyces*: *Actinomadura sp.*, *Microbispora sp.*, *Micromonospora sp.*, *Nocardia sp.*, *Nonomurea sp.* et trois isolats n'ont pas été classifiés. Le plus grand nombre et la plus grande diversité d'actinomycètes ont été isolés à partir du sol de la rhizosphère de *Curcuma mangga*.

Conclusion

&

Perspective

Les actinomycètes sont des bactéries ubiquistes qui colonisent les écosystèmes les plus diversifiés et les plus extrêmes. Les rhizosphères des sols sous couvert palmier dattier et olivier, étudiés dans ce travail, présentent un nombre d'actinomycètes variable.

Dans cette étude, les résultats montrent que les deux sols sont très pauvres en matière organique. Cette concentration chute quand on descend en profondeur. Le sol sous palmier est de presque trois fois plus riche en actinobactéries que celui cultivé par les oliviers. Le plus grand nombre d'actinomycète a été isolé, à partir de la surface où la matière organique est relativement plus importante. Il apparaît clairement que le nombre des actinobactéries augmente quand la concentration de la matière organique est élevée et ce quelque soit le type de végétation. Cette concentration élevée de matière organique a été mesurée en surface comparativement aux deux autres couches de sols étudiés. Elle est due aux résidus des récoltes qui se déposent sur cette surface et engendrent une activité microbienne intense.

Un nombre presque aussi important d'actinomycètes a été également isolé à partir des zones profondes de ces sols. Ce résultat confirme que ces bactéries sont présentes près des racines d'arbres. Cela suppose que certaines interactions mutuelles existent entre ces bactéries et les exsudats des racines de ces essences.

Il serait judicieux l'ors de l'isolement des actinobactéries à partir de couvert végétal de ce genre de plantation dans ce type de sol aride, de travailler sur plusieurs échantillons qui proviennent de la surface et de l'ensemble de couches terrestres. Cette stratégie permet l'obtention de la plus part d'actinomycètes.

Nous espérons dans l'avenir, compléter nos recherches en poussant encore plus les profondeurs du sol, d'essayer d'isoler sous d'autres couverts végétaux comme les plantes médicinales ou autres cultures maraichères que notre Sahara possède. Il serait aussi intéressant d'analyser d'autres facteurs physico-chimiques comme le pH, l'humidité, la salinité, la concentration en azote et en phosphore et de voir leurs effets sur cette distribution. En fin, les techniques d'identifications moléculaires des actinomycètes sont très souhaitables afin de déterminer leurs distributions qualitatives dans ces zones spéciales.

*Références
bibliographiques*

-A-

Almaris N. et Alonso, 2007. Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytic actinomycetes *Thermobifida fusca*. UMI. Pp: 134.

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.

Ameur Hanane, 2014. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Thèse de du diplôme de doctorat en sciences Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie .145p.

Anderson, T.A., E.A. Guthrie et B.T. Walton, 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630–2636.

Aouar L., 2012. Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des Appl. *Environ. Microbiol.* 67: 1001-1003.

-B-

Basilio, A., 2003. Patterns of antimicrobial from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.*

Basilio.A., Gonza'les I ., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonza'lez A. et Genilloud O., 2003. Patterns of antibiotiques actives from soil actinomycetes isolated under different condition of pH and salinity. *J. Appl microbial.* 95.814.823.

Becking JH., 1970. Frankiaceae fam. Nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886,174. *Int J Syst Bacteriol.* 20 :201-220.

Belyagoubi L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. pp.07-17.

Benson DR., Silvester WB., 1993. Biologie of *Frankia* strains, actinomycete symbiots of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57 : 293-319.

Bérdy, j., 2005. Bioactive microbial metabolites, a personal view. *J. Antibiotic.* 58: 1-26.

Boddey, R.M., S. Urquiaga, B. J. R ., Alves et V. Reis, 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil.* 252: 139–149.

Boudemagh A., Bensouici K., 2014. The effect of thermic pretreatment and antibiotics on the selective isolation of the culturable actinomycetes from Algerian desert soil. *Sciences et technologie C-N°39.* 25-32.

Boudemagh A., 2007. Isolement à partir des sols Sahariens des bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri-Constantine, Algérie. p 23.

Birch A., 1990. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* sp. *J Bacteriol* 27: 4138-4142.

Burleigh SH, O. J. Dawson., 1991. Effects of sodium chloride and melibiose on the in vitro growth and sporulation of *Frankia* strain HFPCc13 isolated from *casuarina cunninghamiana*. *Aus J Ecolo* .16 : 531-535.

-C-

Callaham D, Tredici PD., Torrey JG., 1978. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *comptonia*. *Science*. 199 :899-902.

Campbell, N., 1995. Prokaryotes and the origins of metabolic diversity. In *Biology*, Chapter 27. 5th edn. Brady, E.B. (ed.). Redwood City, CA, USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company. 502–519.

Chaia, E., Dawson, J. et Wall, LG., 2010. Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. *Symbiosis* 51(3): 201-226.

Chargaff E. et Vischer E., 1994. The composition of the desoxyribose nucleic acids of thymus and spleen, *J. Biol. Chem.*, vol. 177, pp. 405–416.

Chelli R., 2010. Etude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes rares. Mémoire de Magister en Microbiologie de l'environnement. 80 p.

-D-

Dari R., 2012. Dénombrement de la biomasse microbienne des sols arides exemple d'un sol salé sous deux types de cultures. Mémoire En Vue De L'obtention Du Diplôme d'ingénieur d'état en sciences Agronomiques. universite kasdi merbah-ouargla faculte des sciencs de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers. 53p

Davet Pierre, 1997. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. France, 384 p.

Dawson, J. O., 2008. Ecology of actinorhizal plants. In: *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses- Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress* (eds. Pawlowski, P. & Newton, W. E.), Springer, New York, pp. 199-234.

Del Giudice, L., D.R. Massardo, P. Pontieri, C.M. Berteà, D. Mombello, E. Carata. 2008. The microbial community of Vetiver root and its involvement into essential oil biogenesis. *Environ. Microbiol.* 10: 2824–2841.

Djaballah CH., 2010. Biodiversité des actinomycètes halotolérants isolés de la SEBKHA d'AIN M' LILA. pp.09-10.

Divya Teja, D., N. Harsha, S. Satya Vishala, P. K., et Santhosha Lakshmi. 2014. Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. Int. J. Adv. Res. 2 (1): 485-491.

Douga Catherine, Joel Dore, Abdelghani Sghir, 2005. La diversité insoupçonnée du monde microbien, MEDECINE/SCIENCES, vol. 21, pp. 290-296.

-F-

El-nakeeb M.A., Lechevalier HA., 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Appl Microbiol. 75-7.

-G-

George M., Anjumol A., George G., Mohamed Hatha A., 2012. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. Afr J Microbiol Res., 6:2265-2271.

Goodflow M., Williams S.T., 1983. Ecology of actinomycetes. Ann.Rev.Microbiol.37,189-216 .

Gottlieb D., 1973. General considerations and implications of the actinomycètes. In: Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Sakes G., Skinner FA. (Eds). Academic Press, New York. pp.1-10.

Guiraud J., 1998. Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques. Ed, Dunod.

-H-

Harris S., Silvester W., 1992. Nitrogenase activity and growth of Frankia in batch and continuous culture. Can J Microbiol. 38 : 296-302.

Hasegawa S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura H. Kunoh, 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. Actinomycetol. 20 (2): 72-81.

Higashide E., 1995. Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. Actinomycetol. 09 (1): 75-82.

Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., Goodfellow M. et Liu Z., 2004 Streptacidiphilus jiangxiensis . sp.nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. Antonie van Leeuwenhoek ,86.159-165.

-J-

Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W., 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore.

-K -

Kitouni M., 2007. Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université de Mantouri Constantine, Algérie (39-54).

Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51. Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70.

kumar, R., S. Pandey et A. Pandey. 2006. Plant roots and carbon sequestration. *Curr Sci*. 91: 885–890.

-L -

Labeda D., 1992. DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*, *Gene Vol.* 115, pp. 249-253,

Larpent J. J., 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, ed : Tec et Doc, pp 280.

Larpent J.P. et Sanglier J.J., 1989. Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481p.

Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. 1967. Biologie of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 21 : 71-100.

Lee J.Y., Hwang B.K. , 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48.407-417.

Le Minor L., veron M., 1989. Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. pp 335-349.

Loucif k., 2010. Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. P 22.

-M -

Mazodier J., 1974. Sociétés industrielles et déchets solides. Sciences et Vie. (106): 109-115.

Messoudi O., 2003. Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar). Thèse de Magistère en Microbiologie Appliquée. Université Abou BakrBelkaid Tlemcen. 78p.

-O -

Okami, Y., Hotta, K., 1988. Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, editors. Actinomycetes in biotechnology. New York: Academic Press, Inc; p.33-67.

Onaka, H., 2006. Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds. Actinomycetol. 20(2): 62-71.

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.

Ouhdouch Y., 2003. Aperçu bibliographique sur la taxonomie des actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC. Pp : 18-70.

-P -

Prakash A.; Satyanarayana T.; Johri B. N., 2012. Microorganisms in Environmental Management. Springer. Pp: 819.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2010. Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 3eme édition Pp : 10.

Prescott L. M.; Harley J. P.; Klein D. A., 2003. Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp: 1164.

Prin, Y., Duhoux, E., Diem, H. G., Roederer, Y. et Dommergu, Y. R. 1991. Aerial Nodules in Casuarina cunninghamiana. Appl Environ Microbiol 57(3): 871-874.

-R -

Roger P., Garcia J.L., 1993. Cours de microbiologie du sol. Orstom. France, 163 p.

-S-

Sabaou N., Hacéne., H, Bennadji A., 1992. Description quantitative et quantitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. Can. J.Microbiol, 38, 1066-1073

- Sasson. A, 1967.** Recherches éco-physiologique sur la flore bactérienne de sol des régions du Maroc. Série botanique et biologie végétale. Travaux de l'institut scientifique chérifien et de faculté des sciences, rabat, N°30:27-55.
- Schwartz, D., S. Berger, E., Heinzemann, K. Mudchko, K., Xelzel, et W., Wohlleben. 2004.** Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12): 7093-7102.
- Schwintzer CR., 1990.** Spore-positive and spore-negative nodules, p. 177-193. In C. R Schwintzer and J. D. Tjepkema(ed), the biology of Frankia and actinorhizal plants. Academic press, Inc., New York
- Shrivastava S., S. F. D'Souza et P. D. Desai, 2008.** Production of indole-3-acetic acid by immobilized sp.) for soil applications. *Current Sci.* 94 (25): 1595-1604.
- Smaoui S., 2010.** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Génie de procédés et environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 207p. vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48:407-414.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. 2012.** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, 7:373–390.
- Soltner D., 1992.** Les bases de la production végétale : Le sol. 19ème Edition SOLTNER D. France. Sciences et techniques agricoles, 464 p.
- Song J.; Weon H. Y.; Yoon S. H.; Parrk D. S.; Go S. G.; Suh J. W., 2001.** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 97-102.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271
- Stengel P. et Gelin S., 1998.** Sol : Interface fragile. Institut nationale de la recherche agronomique. Paris, 222 p.
- Sutthinan Khamna, Akira Yokota, Saisamorn Lumyong, 2009.** Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*
- Sykes G. et Skinner F.A., 1973** Actinomycetales : Characteristics and practical importance. Academic press London. New York
- Szeszak, F. et Szabo, G., 1967.** Antibiotic production of hyphal fractions of *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 15(5): 1010-1013.

-T-

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, pp 425.

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.

Torry JG., 1987. Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plant.70 :279-288.

Tortora G.J., Funke B .R. et Case C.L., 2003. Introduction à la microbiologie. Renouveau Pédagogique Inc. (Ed). Tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108.

-V-

Van Djik C., 1979. Endophyte distribution in the soil, p. 84-94. In J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. perry(ed.), *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*. Oregon State Univ. Press, Corvallis.

-W-

Watson E.T. et Williams S.T., 1974. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. *Actinomycetes in coastal and belt. Soil Biol. Biochem.*, 6,43-52.

Wheeler, C. T., Akkermans, A. D. L. et Berry, A. M. 2008. Frankia and actinorhizal plants: a historical perspective. In: *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbioses-Nitrogen Fixation Research: Origins and Progress* (eds. Pawlowski, P. & Newton, W. E.), Springer, Dordrecht, pp. 1-24.

Williams S.T, Goodfellow M., Alderson G., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In “*Bergeys manual of systematic bacteriology*, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-2492.

Williams ST. ,Goodfellow Mand. Wellington E.M.H Sneath P.H.A et sackin M.J ,1983. Numerical classification on of streptomyces and related genera .*Journal of eneral microbiology*.Vol 129 :1743-1813) .

Woronin M., 1866. Uber die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewohnhches Garten-Lupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. *Mem. Acad. Imp.Sci. St. Petersburg.*7 : 1-13.

Wu, C. H., T. K. Wood, A. Mulchandani et W. Chen., 2006. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol* 72: 1129–1134.

-Z-

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

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.p33-38.

Zhang J., Liu Z. et Goodfellow M., 2003. *Nocardia caishijiensis* sp. nov. a novel soil Actinomycete. Inter J of Syst and Evol Microbiol. 53 : 999–1004.

Zhi X. Y.; Li W. J.; Stackebrandt E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. Int J Syst Evol Microbiol, 59 (Pt 3): 589–608.

Zouaghi A., 2007. Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Projet de fin d'études Pour l'obtention du Diplôme National de LE MINOR., VERON M., (1989). Bacteriologie médicale. 2 ème édition. pp 335-349.

Annexes

Annexe 1**Milieu ISP2 (International *Streptomyces*-Project)**

Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt	10g
Glucose.....	4g
Eau distillée	1000ml
Agar.....	20g
pH	7,2

Eau physiologique

NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation à l'autoclave 120°/20min

Annexe 2

Préparation de la solution mère

La solution mère a été préparée à partir d'un gramme d'échantillon de sol à étudier. Il est mis dans un tube à essai contenant 9 ml de l'eau physiologique stérilisé. Le tube est ensuite agité à l'aide d'un vortex pour homogénéiser la solution.

Préparation des dilutions

- Etiqueter les tubes de diluant: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} , où la dilution 10^{-1} présente la solution mère.
- A l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 ml munie d'une poire à aspiration, prélever aseptiquement 1 ml de la suspension mère (10^{-1})
- Transférer aseptiquement 1ml prélevé dans le tube 10^{-2} . La pipette ne devant pas pénétrer dans les 9 ml de diluant.
- procéder de même manière pour les derniers tubes (du tube 10^{-2} au tube 10^{-3} et du tube 10^{-3} au tube 10^{-4}) (**fig.6**). En utilisant à chaque prélèvement une nouvelle pipette stérile.
- On agité les dilutions par un vortex pour l'homogénéisation.

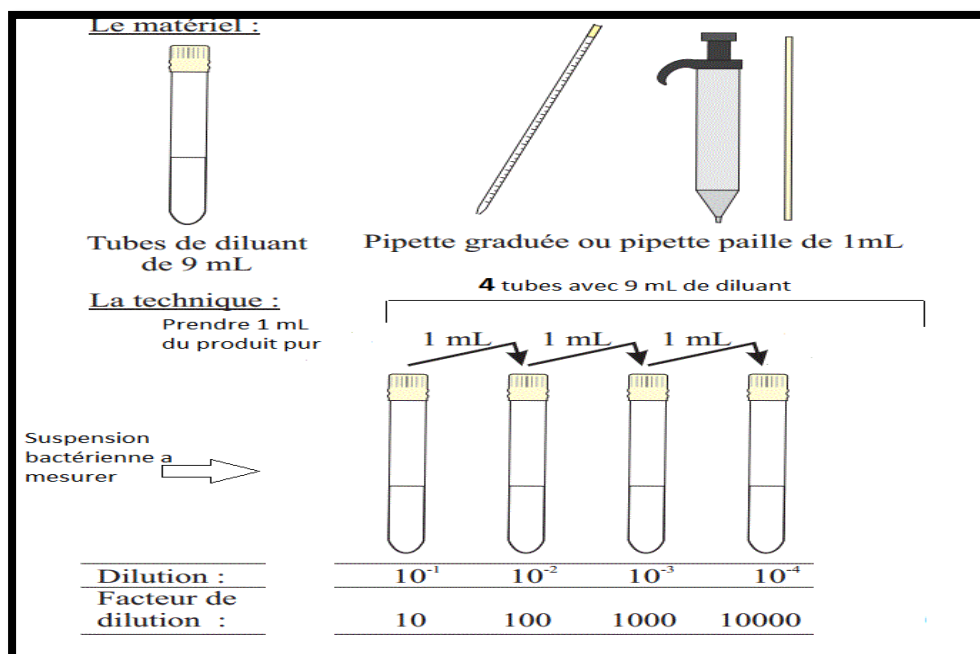


Figure 1: Préparation des dilutions décimales

Annexe 3

Fabrication de râteau d'étalement

La pipette pasteur a été flambée par le bec bunsen jusqu'à ce qu'elle devienne sous forme d'un râteau.

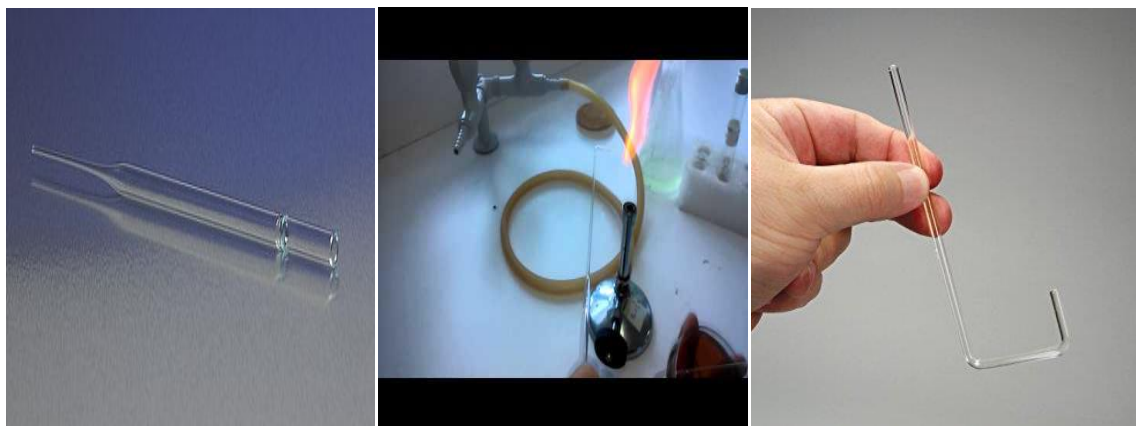


Figure2 : Fabrication d'un râteau par une pipette pasteur.

Annexe 4

Technique d'ensemencement en surface

Tout est effectué dans la zone stérile (20 cm de diamètre autour de bec benson) :

- Etiqueter les boîtes de milieu ISP2 : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .
- A l'aide d'un vortex on agité la solution mère et les dilutions
- On prélevé 0,1 ml de la dilution 10^{-2} homogénéisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la posé à la surface de boîtes de pétrie contenant de le milieu ISP2 séchés.
- On répété la même étape précédente pour les dilutions 10^{-3} puis 10^{-4} .
- Étaler l'inoculum rapidement à la surface du milieu (**photo. 2**) à l'aide d'une pipette pasteur sous forme d'un râteau.
- Laisser sécher à température du laboratoire pendant 15 minutes,
- Incuber les boîtes retournées à l'étuve, à la température convenable 30°C , pendant le temps indiqué 21 jours.



Figure 3 : Technique d'ensemencement en surface.

Annexe 5

Technique de repiquage

C'est une technique qui permet, s'il est bien réalisée, d'obtenir *des colonies isolées*, donc d'obtenir des **cultures pures** d'une espèce bactérienne (des actinomycètes dans notre travail). On utilise la technique d'ensemencement par la méthode des stries pour chaque dilution. Dans la zone stérile :

- On pose un dépôt initial de la solution d'un bord d'une boîte de pétrie contenant le milieu de culture.
- A l'aide d'une anse de platine, on étale ce dépôt en réalisant des stries serrées sur environ 1/3 de la boîte.
- Stérilisation de l'instrument d'étalement.
- Etalement d'une partie des stries précédentes, après avoir fait tourner la boîte d'environ 50 °.
- Répétition des deux étapes précédentes 2 fois.
- Faire un Z final vers le centre de milieu.

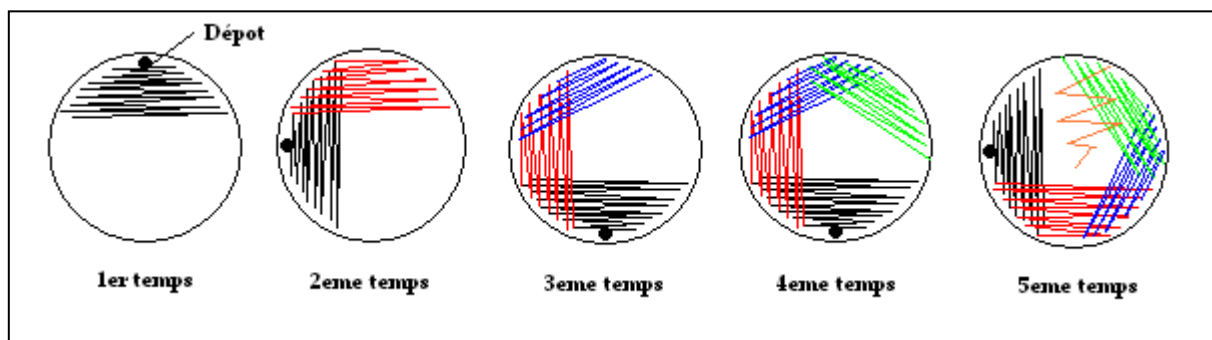


Figure 4 : Technique d'ensemencement par la méthode des stries.

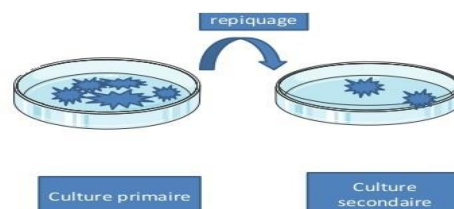


Figure 5 : Principe de repiquage.

Nom : OUANNES

Prénom : SONIA

Nom : SAHROUI

Prénom : SOUMIA

Master Académique en Biologie option :
Microbiologie générale et Biologie moléculaire

Thème : Dénombrement des actinomycètes dans certains sols désertiques sous différents végétaux

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries très recherchées pour leurs importances dans plusieurs domaines. Ce sont des microorganismes ubiquitaires qui se rencontre dans presque tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile. Les écosystèmes Sahariens sont connus par leur climat rude et inhabitable dans son apparence. Ces localités s'avèrent une source très appréciable d'actinobactéries. Afin de connaître la variation du nombre et la distribution des actinomycètes dans les différentes couches du sol aride sous couvert végétal, nous avons testé deux niches écologiques situées dans la région de Biskra. Les premiers échantillons proviennent d'un sol sous palmier les seconds ont été prélevés à partir d'un sol sous culture d'olivier. Les analyses de ces deux sols ont permis de les classer comme étant des sols très pauvres en matière organique. La concentration de cette matière tend à diminuer quand la profondeur augmente et ce pour les deux types de sol. Nous avons obtenu 45 colonies d'actinomycètes à partir des différentes couches du sol sous palmier. La plus grande quantité de ces bactéries a été trouvée dans la surface avec un pourcentage de 46 %. Pour le sol sous olivier, 13 actinomycètes ont été récoltés, avec également un pourcentage de 46 % provenant uniquement de la surface. Les couches profondes de ces sols offrent également une quantité d'actinobactéries non négligeable. Cette distribution bactérienne suit positivement le taux de la matière organique présente dans les couches du sol.

Mots clés: Actinomycètes, dénombrement, sol palmier, sol olivier.

Membres du jury :

President : MR LARBAA RABAH

MCB UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Encadreur : MME ARAB YASMINE

MAA UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Examineur : MME BENSOUICI KARIMA

MAA UNI. ABBES LAGHROUR KHENCHELA