



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa -

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : des Sciences de la Nature et de la Vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Science Biologie

Option: Microbiologie Appliquée à la Sante et l'Environnement

Thème:

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ MÉTABOLIQUE DE DIFFÉRENTS ISOLATS D'ACTINOMYCÈTES

Présenté Par:

Melle

MELLE

Guebla khaoula

AhmAne zinA

Devant le jury

Mr Machai A.

MAA Université de Tébessa

Président

Mm Benhadj M.

MAA Université de Tébessa

Promotrice

Mr Menasria T.

MAA Université de Tébessa

Examineur

Date de soutenance: 30mai 2016

## ملخص

في إطار انجاز هذا العمل, تم اختيار ثلاثة عشرة عزلات من سلالة الاكتينومييسات و التي تم انتقاؤها من مختبر برج باجي مختار في عنابه, وذلك من اجل اختبار تنوعها المورفولوجي و الفزيولوجي و الايضي.

اجل هذا الغرض, تم إخضاع هذه العزلات إلي مجموعة من الاختبارات و التي حققت أن هذه البكتيريا ذات تنوع كبير في المظهر الزراعي بالإضافة إلي قدرتها علي إنتاج أنواع مختلفة من الاصبغة, بالإضافة إلي الدراسة الفزيولوجية و التي أثبتت أن العزلات معتدلة الحرارة, مقاومة للملوحة, أما بالنسبة لدراسة الخصائص الايضية قد بينت أن أغلبية العزلات تتميز بنشاط إنزيمي هام وذلك خصوصا ب: انزيم تحليل النشاء, تحليل الجيلاتين, تحليل الكازيين, و أيضا تحليل السليلوز. أما بالنسبة لاختبار النشاط المضاد للبكتيريا المنجزة بطريقة قوالب الاجار, قد اثبت أن معظم العزلات منتجة للجزيئات النشطة بيولوجيا, , وأيضاً ثلاثة وعشرون بالمائة هي *Staphylococcus Sp* هذه الدراسة بينت كما يلي: ثمانية وثلاثون بالمائة نشطة في *E.coli ATCC25422* ضد *Staphylococcus aureus* نشطة, أيضا ثلاثون بالمائة هي فعالة ضد *Micrococcus luteus* حين أن سبعة بالمائة فعالة ضد

من خلال هذا العمل استطعنا التوصل أن عزلات الاكتينومييسات ذات تنوع ايضي واسع بالإضافة إلي قدرتها علي إنتاج جزيئات نشطة بيولوجيا و فعالة ضد انواع مختلفة من البكتيريا الممرضة

الكلمات المفتاحية: الاكتينومييسات, التنوع الايضي, الجزيئات النشطة.

# ABSTRACT

In this study, thirteen actinomycetes isolates had been chosen among the collection's laboratory of Annaba University. The aim is to study the physiological, morphological characteristics and especially to study the metabolic diversity of these strains. In fact these isolates had submitted many tests in order to determine their different metabolic characteristics.

According to the results, we can observe that the majority of the isolates have a wide cultural variety on the range of ISP medium (International Streptomyces Project) and seen the physiological study, we estimate that the majority of them are mesophilic, salt tolerant and neutrophilic bacteria.

The metabolic characterizations show that this actinomycetes isolates presented an important rate of the enzyme activities concerning the amyolytic, gelatinolytic, caseinolytic and cellulolytic term.

The study of the antibacterial activities by the agar cylinder method proved that the most of the isolates of actinomycetes are producers of bioactive molecules. We can observed that 38 % of this isolates show inhibitory activity towards of *Staphylococcus sp*, 23,07% are active against the *Micrococcus luteus*, 30% of the isolates are active towards *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 and 07 % of them are active against *E.coli* ATCC25422.

At the end of this work, it was possible to highlight the large metabolic diversity of the actinomycetes isolates.

**Key words:** Actinomycetes, metabolic diversity, bioactive molecules.

# Résumé

Dans le cadre de ce travail, treize isolats d'Actinomycètes ont été choisis parmi une collection de laboratoire de Annaba pour l'étude de leur caractéristiques morphologique, physiologique et essentiellement l'étude de leurs diversité métabolique. Ces isolats ont été soumis un ensemble de tests, pour déterminé les déférent caractères métabolique.

D'âpre les résultats obtenu on a pu constater que la majorité des nos isolats ont une large variété culturale sur la gamme des milieux ISP (*International Streptomyces Project*), aussi a partir de l'étude physiologique on estime que la majorité sont des mésophiles, halotolérants et neutrophiles.

La caractérisation métaboliques a présenté une fréquence importante d'activités enzymatiques en terme amylolytiques , gélatinolytiques , caseinolytique et cellulolytique.

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar a montre que la plupart des isolats d'Actinomycètes sont des producteurs de molécules bioactives, on peut noter que 38% des nos isolats montrent une activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus sp*, 23,07% sont actives contre le *Micrococcus luteus*, 30% des isolat sont active vis-à-vis *Staphylococcus aureus ATCC 25293* et 7% sont active contre le *E.coli ATCC25422*.

A l'issu de ce travail on a pu mettre en évidences une large biodiversité métaboliques des Isolats d'actinomycètes.

**Mots clé :** Actinomycètes, diversités métaboliques, molécules bioactive.



# **Remerciement**

*Avant tout nous remercions "Allah" le tout puissant, le Miséricordieux, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la persistance pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus vifs remerciements à Mme **BENHAJ Mabrouka** , maître assistant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Tebessa , pour nous avoir proposé ce sujet, pour son encadrement, ses encouragements, ses orientations, pour ses aides, sa patience, ses conseils scientifiques judicieux , sa compétence et sa gentillesse qui m'ont permis de bien mener ce modeste travail.*

*A Mr. **Machai .A**, nous adressons nos remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury.*

*A Mr. **Menasria .T** pour avoir bien voulu siéger dans ce jury afin d'examiner ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils*

*A Melle. **Linda** la technicienne responsable de laboratoire de microbiologie qu'elle reçoit nos vifs remerciements.*

*Nos remerciements aussi vont à tous les enseignants et 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.*

*Nous associons nos remerciements à toutes nos amies pour leur solidarité, leur aide, et leur disponibilité.*



# TABLE DE MATIERE

المخلص

**Abstract**

**Résumé**

**Dédicace**

**Remerciement**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des planches**

**Liste des symboles**

**Introduction**

## Partie bibliographique

### Chapitre I: généralité sur les Actinomycètes

|  |    |
|--|----|
| I. Généralité sur les Actinomycètes                        | 1  |
| I.1. Similitude entre les Actinomycètes et les champignons | 1  |
| I.2. Similitude entre Actinomycètes et bactéries           | 1  |
| I.2. Définition  | 1  |
| I.3. Taxonomie et critères de classification               | 2  |
| I.3.1. Position taxonomique                                | 2  |
| I.3.2. Evolution des critères d'identification             | 5  |
| I.4. Distribution des Actinomycètes                        | 5  |
| I.4.1. Les sols  | 6  |
| I.4.2. Le milieu marin                                     | 7  |
| I.4.3. Eaux douces   | 8  |
| I.4.4. L' Air  | 8  |
| I.5. Propriétés générales des actinomycètes                | 8  |
| I.5.1. Morphologie des Actinomycètes                       | 8  |
| I.5.1.1. Mycélium de substrat et mycélium aérien           | 10 |
| I.5.1.2. Structure particulière                            | 10 |
| I.5.1.3. Formation des spores                              | 11 |
| I.5.1.3.1. Les exospores                                   | 11 |
| I.5.1.3.2. Les endospores                                  | 11 |
| I.5.1.3.3. Les critères des spores                         | 12 |
| I.5.2. Caractères biochimiques des actinomycètes           | 13 |
| I.5.2.1. Les amino acides                                  | 13 |
| I.5.2. 2. Les Glucides                                     | 13 |
| I.5.2.3. Les lipides                                       | 14 |

|   |    |
|---|----|
| I.5.2.4.Acides nucléiques                       | 15 |
| I.5.3. Physiologie de développement             | 15 |
| I.5.3.1. L'oxygène                              | 16 |
| I.5.3.2. Le pH                                  | 16 |
| I.5.3.3.La température                          | 16 |
| I.5.3.4. L'activité de l'eau ( $A_w$ )          | 16 |
| I.5.3.5. Tolérance en NaCl                      | 16 |
| I.5.4. Cycle du développement des actinomycètes | 16 |

## Chapitre II : Description du quelque genre des *Actinomycète*

|  |    |
|--|----|
| II.1. Description du genre <i>Streptomyces</i>   | 19 |
| II.2. Description du genre <i>Micromonospora</i> | 20 |
| II.3. Description du genre <i>Actinomadura</i>   | 21 |
| II.4. Description du genre <i>Nonomuraea</i>     | 23 |
| II.5. Description du genre <i>Nocardia</i>       | 24 |

## Chapitre III : Propriétés métaboliques des Actinomycètes

|  |    |
|--|----|
| III.1.Importance des actinomycètes   | 26 |
| III.1.1. Importance en agronomie   | 26 |
| III.1.2. Importance en biotechnologie  | 26 |
| III.1.2.1. Production des Antibiotiques  | 26 |
| III.1.2.1.1. La production des Antibiotiques par le genre <i>Streptomyces</i>          | 27 |
| III.1.2.1.2.Production des antibiotiques par le genre <i>Micromonospora</i>            | 28 |
| III.1.2.1.3.Production des antibiotiques par le genre <i>Nocardia</i>                  | 29 |
| III.1.2.2. Production d'Enzymes  | 29 |
| III.1.2.2.1. Production des enzymes par le genre <i>Streptomyces</i>                   | 29 |
| III.1.2.2.2.Production des enzymes par le genre <i>Micromonospora</i>                  | 30 |
| III.1.2.3. Production de Sidérophores  | 30 |
| III.1.2.4. production des vitamines  | 31 |
| III.1.2.5. Production des métabolites secondaire par différent genre des actinomycètes | 31 |

## Partie expérimentale

|   |    |
|---|----|
| I. Matériel utilises                    | 34 |
| I.1.Grands matériels                    | 35 |
| I.2.Petits matériels                    | 35 |
| I.3.Matériels biologiques               | 35 |
| I.4.Les milieu de cultures              | 35 |
| I.5.Les solutions et colorants utilises | 35 |
| I.6.Réactifs et autre produits          | 35 |
| II. Méthodes                            | 36 |
| II.1.Origine des souches                | 36 |

|   |    |
|---|----|
| II.2.Repiquage et vérification de la pureté des isolats                   | 36 |
| II.3.Etude de la caractérisation morphologique                            | 37 |
| II.3.1.Etude de la caractérisation micro morphologique                    | 37 |
| II.3.2.Etude de la biodiversité macromorphologique                        | 37 |
| II.4.Etude de la biodiversité physiologique                               | 38 |
| II.4.1.Croissance a différentes température                               | 38 |
| II.4.2.Tolérance a différents degrés du PH                                | 38 |
| II.4.3.Resistance a différentes concentrations de l'Na Cl                 | 38 |
| II.5.Etude de la biodiversité métabolique                                 | 39 |
| II.5.1.Hydrolyse de l'amidon: recherche d'amylase                         | 39 |
| II.5.2.Hydrolyse de la caséine: recherche de caenase                      | 39 |
| II.5.3.Hydrolyse de la gélatine: recherche de gélatinas                   | 39 |
| II.5.4.Action sur le lait écrème  | 39 |
| II.5.5.Test de dégradations des acides gras: recherche d'estérase         | 40 |
| II.5.6.Dégradation des sels de sodium                                     | 40 |
| II.5.7. La recherche de Nitrate réductase                                 | 40 |
| II.5.8.Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone | 40 |
| II.5.9.Dégradation de Cellulose: recherche de cellulase                   | 41 |
| II.5.10.La recherche de l'activité hémolytique                            | 41 |
| II.6.Utilisation de L'Api20E  | 41 |
| II.6.1. Principe  | 41 |
| II.6.2.Mode opératoire galerie Api 20 <sup>E</sup>                        | 42 |
| II.6.3. Interprétation  | 42 |
| II.7.Identification numériques  | 43 |
| II.8.La recherche de l'activité antibactérienne des Actinomycètes         | 43 |
| II.8.1.Culture des Bactéries-tests en milieu solide                       | 43 |
| II.8.2. Préparation de l'inoculum (des bactéries-tests)                   | 43 |
| II.8.3.Application des cylindres d'Agar                                   | 43 |
| II.9. Identification des Bactéries-tests d'origine clinique               | 44 |
| III. Résultats et discussion  | 45 |

## **Conclusion**

## **Référence bibliographique**

## **Glossaire**

## **Annexe**

## LISTE DES TABLEAUX

| N° | Titre de Tableau  | Page |
|----|---|------|
| 1  | répartition des actinomycètes dans la nature  | 06   |
| 2  | Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol   | 07   |
| 3  | tableau déterminé les Caractères biochimiques des actinomycètes   | 14   |
| 4  | Antibiotiques courants synthétisés par les <i>Streptomyces</i>  | 28   |
| 5  | les différents types d'hémolyse   | 41   |
| 6  | Résultats des caractères micromorphologiques des 13 isolats   | 46   |
| 7  | Les caractères morphologiques des 13 isolats sur les différents milieux ISP Après 14 jours d'incubation | 47   |
| 8  | Les résultats de test des croissances des 13 isolats à différentes températures                         | 53   |
| 9  | Résultats de test des croissances des 13 isolats à différentes Concentration de NaCl % aux 14 jours     | 55   |
| 10 | Résultats de test des croissances des 13 isolats à différents pH  | 57   |
| 11 | Résultats de tests de la biodiversité métabolique des 13 isolats  | 63   |
| 12 | Résultat de l'Api 20E pour les enzymes produites par les 13 isolats                                     | 66   |
| 13 | Résultat de l'Api 20E pour les bcterie6-testes  | 66   |
| 14 | Les résultats de test d'activité des 13 isolats d'actinomycètes contre 22 souches                       | 73   |

# LISTE DES FIGURES

| N° | Titre de Figure   | Page |
|----|---|------|
| 1  | Classification du phylum des Actinobacteria des Les relations phylogénétiques entre les ordres, les sous-ordres et les familles sont basées sur les données de l'ARNr 16S | 04   |
| 2  | Une coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants   | 09   |
| 3  | Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage Montrant différents sporanges d'actinomycètes  | 10   |
| 4  | Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes  | 12   |
| 5  | Morphologie des spores des Actinomycètes  | 13   |
| 6  | Cycle Biologique d'un <i>Streptomyète</i>   | 17   |
| 7  | représente les colonies de <i>Streptomyces</i> au stade du mycélium végétatif   | 20   |
| 8  | Les colonies de <i>Micromonospora aurantiaca</i>  | 21   |
| 9  | Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de quelques espèces d' <i>Actinomadura</i>   | 22   |
| 10 | Photographies par microscope électronique des chaînes de spores de quelques espèces de <i>Nonomuraea</i>  | 23   |
| 11 | Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de deux espèces du genre <i>Nocardia</i>   | 24   |
| 12 | Dendrogramme représentatif de similarité des isolats d'Actinomycètes  | 68   |

## LISTE DES pLanchES

| <b>N°</b> | <b>Titre de Planche</b>  | <b>Page</b> |
|-----------|--|-------------|
| 1         | Photos des caractères cultureux des quelques isolats sur les différents milieux ISP2                     | 46          |
| 2         | photos des résultats de l'observation microscopique optique après la coloration de Gram ( $\times 100$ ) | 48          |
| 3         | Photos des caractères cultureux de quelques isolats sur les différents milieux                           | 50          |
| 4         | Photos du test de croissance à différentes température   | 54          |
| 5         | Photos de résultats du test tolérance a différentes concentrations de NaCl pour Quelques isolats         | 56          |
| 6         | Photos des résultats du test de tolérance à différentes pH   | 58          |
| 7         | Photos de résultats de différents tests métaboliques   | 63          |
| 8         | Photo des résultats de système Api 20E des Bactéries-teste.  | 67          |
| 9         | Photos des résultats de système Api 20E des quelques isolats   | 69          |
| 10        | Photos des résultats de test d'activité  | 76          |

# LISTE DES SYMBOLES

**ADH** : arginine dihydrolase.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMY**: amygdaline

**ARA**: arabinose

**ARNr** : Acides Ribonucléiques Ribosomiaux

**ATCC** : American Type Culture Collection

**C** : Cytosine

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

**CIT**: citrate de sodium

**DAP**: L'acide 2,6 diaminopimélique

**FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O** : sulfate de fer sept fois hydraté

**GC**: guanine cytosine.

**GEL**: gélose; gélatinas

**GLU** : glucose

**GYEA gélose yeast extract agar**

**H<sub>2</sub>S**: thiosulfate de sodium; production d'H<sub>2</sub>S

**HCl** : acide chlorhydrique

**IC**: isolat clinique

**IND**: production d'indole.

**INO**: inositol

**ISP** : International Streptomyces Project

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

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : phosphate monopotassique

**LB** : Lauret Bertani

**LDC** : lysine; lysine décarboxylase

**M** : molaire

**MA** : mycélium aérien

**MAN** : mannose

**MEL**: melibiose

**MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O** : sulfate de magnésium sept fois hydraté

**MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O** : chlorure de manganèse quatre fois hydraté

**MS** : mycélium de substrat



**Na Cl** : chlorure de sodium

**NH<sub>4</sub>Cl** : chlorure d'ammonium

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>** : sulfate d'ammonium

**ODC** : ornithine décarboxylase

**ONPG** : ortho-nitro-phényle-galactoside; B-galactosidase

**RHA**: rhamnose

**S** : Souche

**SAC**: saccharose

**SOR**: sorbitol

**TDA**: tryptophane; tryptophane désaminase

**UFC** : unité formant colonie

**URE**: Urease

**VP**: pyruvate de sodium; production d'acétone

**ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O** : sulfate de zinc sept fois hydraté



# Intr0dUction



# INTRODUCTION

Les Actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positif que subissent des différentiation morphologique durant leur cycle de vie (**Prescott, 2003**). En réponse à des conditions défavorable, telle que la déficit en nutriment et en eau, les Actinomycète sporulent, c'est que lorsque les condition redevient favorable les spore peuvent germer et former des nouveaux le mycélium végétatif. cette propriété joue un rôle important dans leur large distribution dans la nature (**Djaballah, 2010**).

Le sol est le réservoir principale des Actinomycètes, dans le quelle les Actinomycètes joue un rôle important dans les décompositions de la matière organique, se qui rend le sol fertile. En plus de sol ils ont été isole dans des nombreux environnements aquatique ; à savoir l'écosystème marin, l'eau douce ...etc. (**Baldacci, 1962**).

Les Actinomycètes sont capable de métaboliser plusieurs et différent composés y compris les polysaccharides, les alcools, les acides aminées et les compose aromatiques par la production des enzymes extracellulaire (**Kitouni et al., 2005**). Leur aptitude de dégrader les pesticides et les herbicides et les hydrocarbures avait également été signalée, cette diversité métabolique est due à leur génome excrément large qui a une centaine de facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes qui leur permettent de répondre à leur besoin (**Boucheffa, 2011**). Actuellement Les bactéries de la famille des Actinomycètes retiennent particulièrement notre attention et semblent être un excellents candidats productrices des substances intéressantes essentiellement les antibiotiques (**Boughachiche, 2012**). On estime que les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les Actinomycètes, **Salman et Waksman** ont démontré la richesse des Actinomycètes dans ce domaine, Essentiellement isolés des premiers antibiotiques utiles : l'actinomycine (1940), antitumorale ; la streptomycine (1944), antibactérienne, y compris antituberculeuse ; la néomycine (1949), et la candidicine (1953), antifongique, ayant aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes en tant que ligand des stérols (**Djaballah, 2010**).

Parmi les espèces appartenant aux différents genres d'Actinomycètes, les *Streptomyces* sont les plus importants producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires (**Fernandez et al., 2002**). On peut estimer que 75 % des antibiotiques isolés des Actinomycètes sont produits par des *Streptomyces* (**Atta, 2009**).

L'objectif principal de notre étude consiste à la recherche de la biodiversité métabolique de différents isolats d'Actinomycètes afin d'établir les relations et la similarité entre les isolats quand a leurs aptitude de productions de biomolécules.

Pour répondre à cette problématique nous avons réalisé un travail de recherche

Portant sur cette thématique.

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie, (Département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Universités de Tébessa)

L'étude a portée sur les étapes suivantes :

- L'étude phénotypiques des siolats d'Actinomycètes ce qui implique la caractérisation micro-morphologique et macromorphologiques
- L'étude des caractéristiques physiologique qui consiste à l'étude de la tolérance de différent concentration de chlorure de sodium ainsi la croissance a différent valeurs de température et de pH.
- L'étude de la diversité métabolique par la mise en évidence de la production des différent type d' enzymes , et essentiellement leur activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries-tests.



## Partie bibliographique





## Chapitre i

# Généralité sur les actinomycètes



## I. Généralité sur les Actinomycètes

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « **Aktis** » qui veut dire rayon et « **mykes** » qui veut dire champignon, Ils ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryotes), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoides : filaments ramifiés, organes de sporulation...etc. Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques, permettent de les classer parmi les procaryotes (**Perry et al., 2004**).

Ceci est illustré dans leur nom, Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons, aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les procaryotes (**Lansing et al, 2003**), cependant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons (**Perry et al., 2004**).

### I.1. Similitude entre les Actinomycètes et les champignons

Un ensemble des caractères qui rapprochent les Actinomycètes à des champignons principalement la structure de leur mycélium présentant des ramifications, avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2 $\mu$ m) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium, parfois employé pour désigner cette structure. Ainsi la formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies, malgré ces analogies entre les Actinomycètes et les champignons mais il ya des différences fondamentales qui les séparent ; les Actinomycètes sont des procaryotes alors que les champignons sont des eucaryotes (**Perry et al., 2004 ; Shukla, 2010**).

### I.2. Similitude entre Actinomycètes et bactéries

Parmi les caractères qui rapprochent les Actinomycètes à des bactéries sont : des procaryotes, caractérisé par une morphologie typiquement bactérienne chez les formes simples (Mycobacteriacées), ainsi la sensibilité aux attaques des actinophages à des antibiotiques antibactériens et aux lysozymes, ceci confirme le bien-fondé de la classification des Actinomycètes parmi les bactéries (**Merizig et Naami, 2015**).

## I.2. Définition

Du point de vue taxonomique, les actinomycètes appartiennent au règne des procaryotes, défini comme des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, formant des colonies circulaires constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance ; cela explique leur dénomination «Actinomycètes» (**Dommergurs et Mangenot, 1970 ; Aouar, 2006**).

Les Actinomycètes sont des bactéries de coloration Gram positif dont le coefficient de Chargaff est supérieur à 55%, généralement compris entre 60-70 %, et sont des bactéries hétérotrophes, ainsi leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane contenant la lysine ou de l'acide diaminopimélique (**Prescott et al., 2010**).

La plupart des Actinomycètes sont toujours immobiles, certains types produisent des spores flagellés, permettant leur désertion dans les habitats aquatiques (**Boucheffa, 2011**).

Les Actinomycètes se caractérisent par une croissance lente par rapport aux autres bactéries, leur temps de génération moyenne est d'environ 2 à 3 heures. Durant leur croissance ils forment des filaments minces et ramifiés, 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, en formant un mycélium de substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) (**Prescott et al., 2010 ; Tighidet, 2011**).

## I.3. Taxonomie et critères de classification

La taxonomie est l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle s'est d'abord fondée sur des critères essentiellement physiologiques, morphologiques, biochimiques, et génétiques, à cette raison, la taxonomie des actinomycètes a évolué au cours des vingt à trente dernières années (**Tortora et al., 2003**).

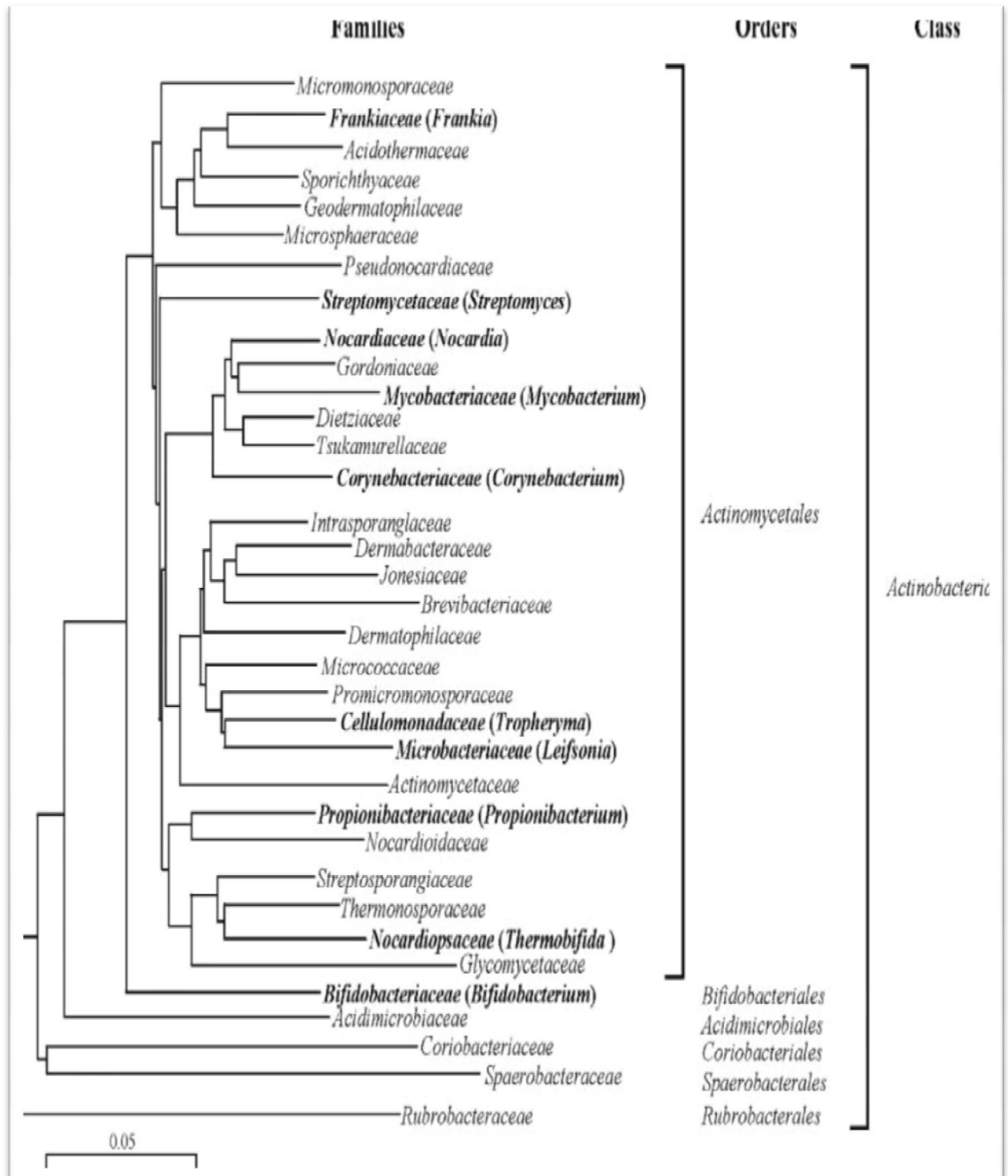
### I.3.1. Position taxonomique

Les Actinomycètes ont été classés dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), sont rattachées au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (**Figure 01**). Le classement en plusieurs familles reliées avec la biologie moléculaire et en particulier des séquences nucléotidiques de l'ARN ribosomal 16 S (**Leveau et Bouix, 1993**).

---



Le phylum *Actinobacteria*, déterminé par une seule classe : *Actinobacteria*, cette classe est subdivisée en 5 sous classes tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2007), 6 ordres, 13 sous ordres, 48 familles, 193 genres et près de 1711 espèces, tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, qui est supérieure à 55% chez certaines Corynebactéries, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie (**Ventura et al., 2007**).



**Figure 01 :** La classification du phylum des *Actinobacteria*. Les relations phylogénétiques entre les ordres, les sous-ordres et les familles sont basées sur les données de l'ARNr 16S (Ventura et al., 2007).

### I.3.2. Evolution des critères d'identification

La taxonomie des Actinomycètes caractérisée par une évolution périodique distincte en quatre périodes principales, dont chacune porte des nouveaux critères de classification (**Prescott et al., 2010**).

La première période (la période classique) qui s'est étendue jusqu'au début des années 1960, basée sur les caractéristiques macros et micro morphologiques; permettaient de distinguer les genres entre eux selon différents caractères telle que la couleur de mycélium aérien, et la présence des pigments mélanoïdes, la fragmentation de mycélium de substrat, la morphologie des chaînes de spores (**Tortora et al., 2003 ; Pridham et al., 1958**).

La seconde période (la période d'utilisation de la chimio-taxonomie), qui a débuté à partir des années 60, qui est basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels que: les acides aminés et les sucres cellulaires ; la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais elle est composée d'une Glycoprotéine contenant de la lysine et d'autres sucres (**Becker et al., 1964**), Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques : (Trois sortes de lipides sont étudiées : les acides gras à longues chaînes, les ménaquinones et les phospholipides), (**Mordarska et al., 1972**), et dernièrement La chimiotaxonomie (combinée aux descriptions morphologiques, constitue un outil très efficace pour l'identification des genres d'actinomycètes) (**Baldacci, 1962**).

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990, basée sur la taxonomie numérique combine l'outil informatique et des tests physiologiques, leur principe consiste à traiter par des logiciels les pourcentages de similitude des caractères (morphologiques, biochimiques et physiologiques) entre les espèces dont la position taxonomique a ainsi été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (**Athalye et al., 1985 ; Baldacci, 1962**).

La quatrième période a débuté durant les années 80 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle (**Merizig et Naami, 2015**), Elle consiste à l'application des données basées sur les acides nucléiques, aux problèmes de systématique, pour cela, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de Guanine-Cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, ...etc., ces derniers

serviront comme outil pour identifier spécifiquement les actinomycètes. (**Labeda et al., 2001 ; Tortora et al., 2003**).

#### I.4. Distribution des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires qui sont présents dans des habitats divers (**tableau 01**). Leur nombre dépend de nombreux facteurs, dont la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (**Dommergurs et Mangenot ,1970**).

**Tableau 01** : répartition des Actinomycètes dans la nature (**Williams et al., 1983**).

| Genre                    | Habitats.                                |
|--------------------------|--|
| <i>Actinomadura</i>      | Sol                                      |
| <i>Actinoplanes</i>      | Sol, eau, litière                        |
| <i>Frankia</i>           | Nodule de racines                        |
| <i>Microbispora</i>      | Sol                                      |
| <i>Micromonospora</i>    | Sol, eau                                 |
| <i>Nocardia</i>          | Sol, eau                                 |
| <i>Rhodococcus</i>       | Sol, eau, fumier, litière                |
| <i>Saccharomonospora</i> | Matière en décomposition                 |
| <i>Streptomyces</i>      | Sol, eau, litière                        |
| <i>Streptosporangium</i> | Sol                                      |
| <i>Thermomonospora</i>   | Matière en décomposition et fermentation |

##### I.4.1. Les sols

A l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes, le sol est le réservoir principal des Actinomycètes spécialement dans les sols alcalins et les sols fertiles riches en matière organique où ils constituent une part importante de la population microbienne. (**Lansing et al., 2003**), les premières souches d'actinomycètes avaient été isolées de sources humaines et animales respectivement par **COHN** en **1875** et **NOCARD** en **1888** (**Boucheffa, 2011**). Les Actinomycètes du sol sont généralement présentes en surface, entre 0 et 2 m de profondeur, de nombreux sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons (**Belyagoubi, 2015**).

Les Actinomycètes produisent principalement des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols. (Dommergurs et Mangenot ,1970). Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, principalement le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols (Tableau 02) (Leveau et Bouix, 1993).

**Tableau 02** : Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol. (Leveau et Bouix, 1993)

| Genre                    | 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>Streptosporagium</i>  | 0,10          |
| <i>Actinomadura</i>      | 0,10          |
| <i>Microspolyspora</i>   | 0,10          |
| <i>Pseudonocardia</i>    | 0,06          |
| <i>Microellobosporia</i> | 0,04          |

#### I.4.2. Le milieu marin

Certaines souches d'Actinomycètes ont été apparentées dans des environnements marins et dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur, et sont aussi présentes dans les fonds fluviaux ou lacustres. Il existe une flore d'Actinomycètes spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophile et vit à une température optimale faible, d'autre Actinomycètes isolées de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer (Leveau et Bouix, 1993 ; Xu et al., 1996), certaines souches *Nocardioformes* isolées à plus de 2000 m de profondeur se développent sous les pressions

hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°C (**Boucheffa ,2011 ; Dommergurs et Mangenot ,1970**).

### **I.4.3. Eaux douces**

Certains genres d'Actinomycètes préfèrent des habitats spécifiques, comme les *Micromonospara* qui sont abondants dans les lacs et on peut facilement isoler des souches d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangiu.* Ils se trouvent essentiellement dans les lacs extrêmement alcalins, les lacs salés, mais, ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH <1) et les sources thermales très chaudes d'origine volcanique. (**Boucheffa ,2011 ; Gerard et al., 2001**).

### **I.4.4. L'Air**

L'air n'est pas un habitat pour les Actinomycètes mais est un moyen de transport. Les Actinomycètes présentes dans l'air sous forme de propagules, Les spores des Actinomycètes proportionnelles aux poussières dispersées par le vent (**Michael et John, 2007**).

## **I.5. Propriétés générales des actinomycètes**

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et physiologiques et des caractères métaboliques. (**Aouar, 2006**).

### **I.5.1. Morphologie des Actinomycètes**

La morphologie des Actinomycètes est très variable, de formes simples bacilles à des formes mycéliennes complexes, le développement des Actinomycètes comprend des cellules filamenteuses appelées : Les hyphes, ainsi ils se caractérisent par la formation des spores (**Prescott et al., 2010, ; Kitouni, 2007**).

#### **I.5.1.1. Mycélium de Substrat et Mycélium Aérien**

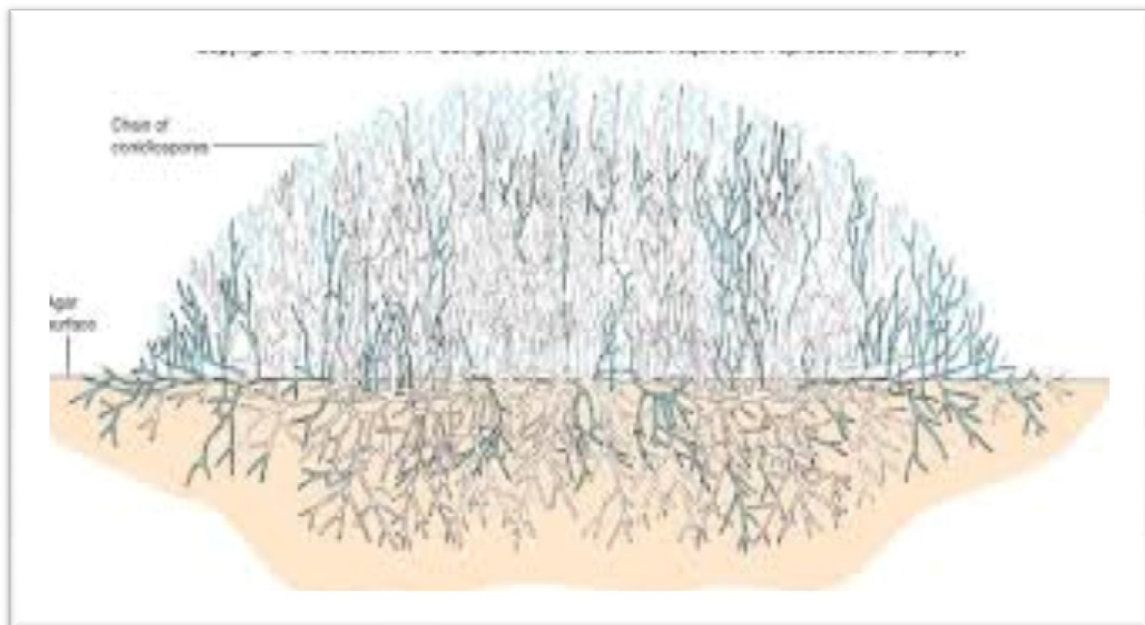
Les Actinomycètes possèdent une structure de procaryote mais un cycle biologique semblable à certains champignons (**Kitouni, 2007**), la croissance des actinomycètes sur un substrat solide (la gélose), caractérisée par la formation d'un réseau d'hyphes ramifié, leur largeur varie de 0.5 à 2 µm. Ce dernier est développé à partir du tube de germination des spores sur la surface et à l'intérieur du substrat pour former un mycélium végétatif et appelé aussi ; mycélium du substrat ou mycélium primaire (**Prescott et al., 2003 ; Belyagoubi, 2015**).

L'aptitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des Actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Lansing et al., 2003**). Chez certains groupes des actinomycètes, le mycélium du substrat est divisé en plusieurs éléments dont un chacun devient un centre de croissance (**Figure 02**) (**Prescott et al., 2003**).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes, dressés sur le mycélium du substrat, ils sont souvent pigmentés et sont enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe, Le mycélium aérien est aérobic stricte et plus épais et moins ramifié que le mycélium du substrat qui est hydrophobe et aérobic facultatif (**Merizig et Naami, 2015**), une fois le mycélium aérien développé ; il couvre les colonies de surface en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu, dans des nombreux cas, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou bien un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (**Prescott et al, 2003**).

Les caractères qui différencie le mycélium aérien du celui de substrat sont:

- ✚ il est habituellement de couleur foncée (à cause des pigments insolubles).
- ✚ il est moins ramifié.
- ✚ ne montre presque aucune tendance à pénétrer le milieu.
- ✚ sa couche aérienne est hydrophobe.
- ✚ il forme des spores par fragmentation (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).



**Figure 02:** Une coupe transversale d'une colonie d'Actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs) (**Prescott et al., 2003**).

### I.5.1.2. Structure particulière

Certain Actinomycètes forment des structure particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et n'ont pas toujours une fonction définie (**Gerard et al., 2001**).

-Le sclérote : trouvé chez les *Chainia* est déterminé par une masse des hyphes cloisonnée dans une vacuole et chargé de glycérides et d'acides gras ramifiés (**Prescott et al., 2003**).

-Les sporanges : sont des sacs contenant les spores, présents sur les mycéliums aériens bien développés ou sur la surface des colonies dépourvues ou ayons un mycélium aérien moins développé (**Figure 03**).

-Les synnemata : (corémies), sont des assemblages compacts d'hyphes dressées, parfois fusionnées et portant des conidies apicales ou latérales (**Leveau et Bouix ,1993**).

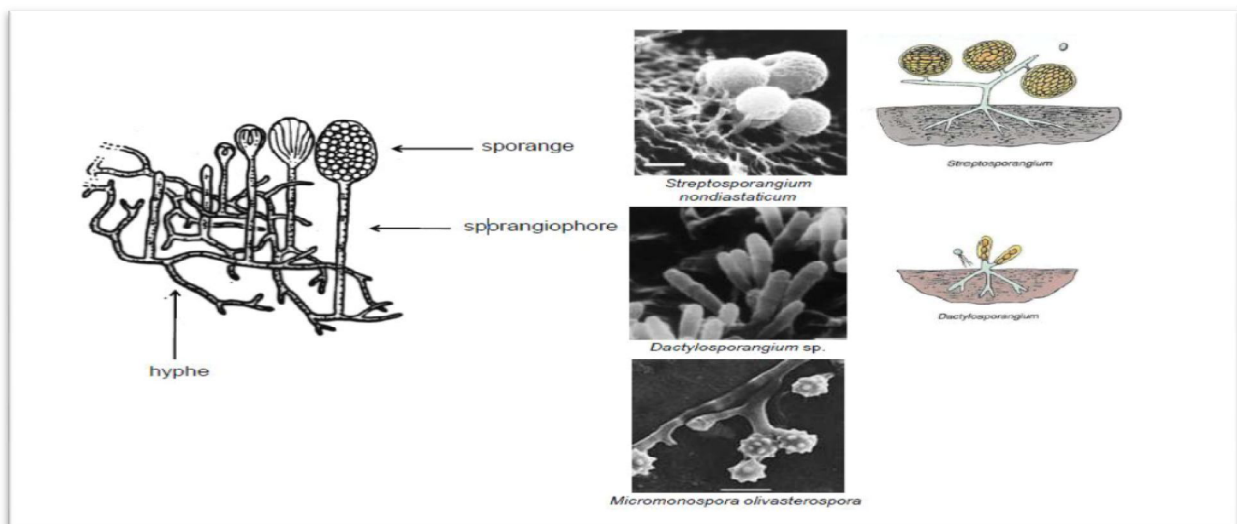
-Les conidies sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

-une seule conidie tel chez le genre (*Micromonospora*)

-une paire de conidies chez le genre (*Microbispora*)

-chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou bien égal à 20 spores par chaîne (*Actinomadura*).

-longues chaînes de conidies formées d'un nombre de plus de 20 spores par chaîne (*Streptomyces*) (**Prescott et al., 2007**).



**Figure 03** : Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'Actinomycètes (**Belyagoubi, 2013**).



### I.5.1.3. Formation des spores

Les différents groupes d'Actinomycètes peuvent sporuler, ces derniers peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores, ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Kitouni , 2007 ;Loucif , 2010).

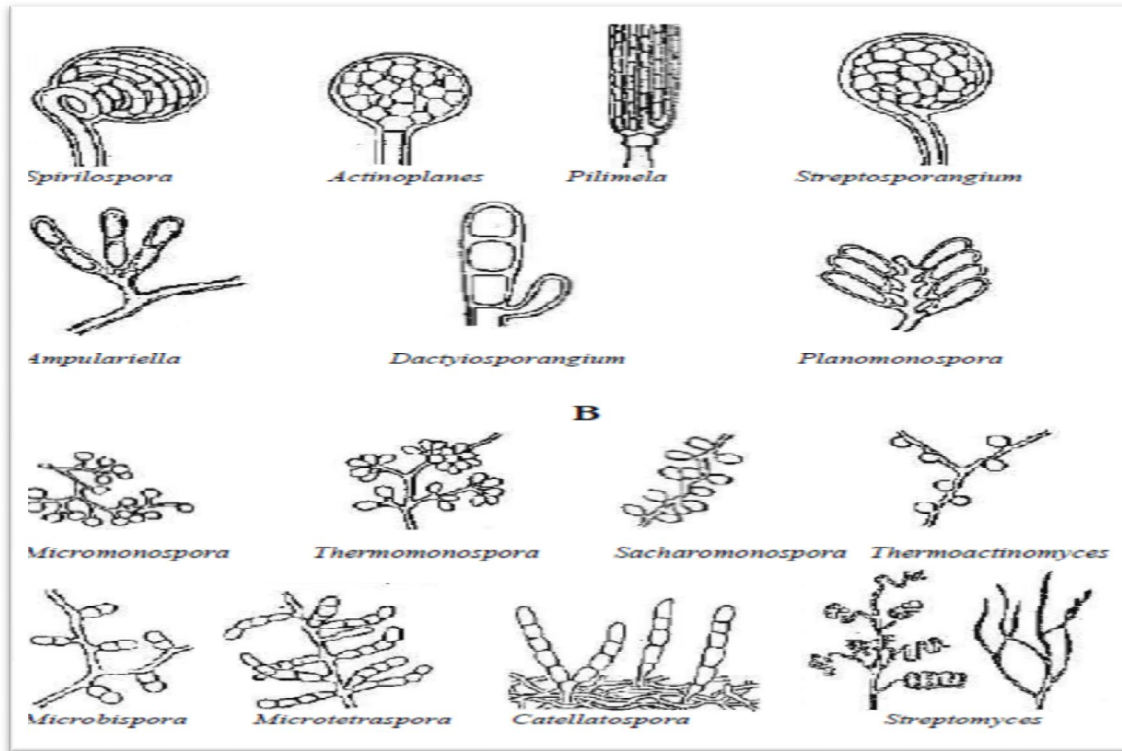
#### I.5.1.3.1. Les exospores

Les Actinomycètes forment des spores sur le mycélium aérien qui sont appelées les exospores, qui peuvent avoir des formes très variables, elles se développent par septation des extrémités des filaments, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs (Prescott et al., 2007 ; Boudemagh, 2007).

La plupart ne sont pas résistante à la chaleur, mais contient des quantités plus importantes de potassium, calcium, manganèse que dans le mycélium de substrat (Kitouni , 2007), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables à la croissance végétative (Prescott et al., 2007).

#### I.5.1.3.2. Les endospores

Les endospores sont produits par les Actinomycètes thermophiles, ils naissent d'une régénération du cytoplasme avec la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe, chez le genre *Thermoactinomyces*. à l'inverse des exospores, les endospores contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6,5 à 7 %, cet acide est probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique que est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives, ce dernier associe de grandes quantités d'ion de calcium et magnésium qui augmentent la résistance des spores à la chaleur. Chez les Actinomycètes *Actinoplanes* et *Pilimelia*, des zoospores mobiles (pourvues de flagelles) se forment à l'intérieur d'un sac fermé appelé sporange, les endospores sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant (Getha et al., 2005 ; Kitouni ,2007 ) (Figure 04).



**Figure 04** : Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Messaoudi, 2011).

#### I.5.1.3.3. Les critères des spores

Les chaînes des spores présentent des formes variables (rondes, ovales, ou en bâtonnets), avec une surface de différent aspect, soit lisse (type smooth), rugueuses (type warty), épineuse (type spiny) ou chevelue (type hairy) (**Figure 05**), la morphologie des spores peut être simple, droite à flexueuse (type RF), en crochet ou en boucles (type RA), ou en spirales (type S), comme elle peut être verticillée, Biverticillus (BIV), Biverticillus-Spira (BIV-S). Monoverticillus (MV), Monoverticillus - Spira (MV-S) (Leveau et Bouix, 1993; Baldacci, 1962).



**Figure 05 :** Morphologie des spores des Actinomycètes (Shirling & Gottlieb, 1966).

### I.5.2. Caractères biochimiques des Actinomycètes

Les Actinomycètes possèdent une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif, on trouve huit types de parois cellulaires selon leur base, leurs constituants, les principaux sont les quatre types (I, II, III, IV) (Tableau 03) (Aouar, 2006).

#### I.5.2.1. Les aminoacides

La glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustré par le genre *Actinomyces*, ainsi, contenant le plus souvent de l'acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP); ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, telles que les *Streptomyces*.

Les Actinomycètes avec des parois cellulaires de type I, possèdent principalement de l'acide diaminopimélique de forme LL, cependant, la forme méso de ce même acide est caractéristique des types II, III et IV (Leveau et Bouix, 1993).

#### I.5.2. 2. Les Glucides

Les Actinomycètes sont classées dans le type pariétal II, III et IV selon la présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) contenant du méso-DAP, le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*, les *Streptomyces* et les genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C), il en est de même pour les genres

*Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora* (Becker et al., 1965 ; Aouar, 2006).

**Tableau 03 :** Tableau déterminant les caractères biochimiques des Actinomycètes (L'acide diaminopimélique (DAP), et des Acides aminés et des sucres) (Boucheffa, 2011).

| Chimiotype | D.A.P |    | Gly | Lys | Orn | D.A.B | Sucres        |           |           |     |
|------------|-------|----|-----|-----|-----|-------|---------------|-----------|-----------|-----|
|            | LL    | DL |     |     |     |       | Ara.<br>+Gal. | Xyl.<br>+ | Rha.<br>+ | Mad |
| IC         | +     | -  | +   | -   | -   | -     | -             | -         | -         | -   |
| II D       | -     | +  | +   | -   | -   | -     | -             | +         | -         | -   |
| III B      | -     | +  | -   | -   | -   | -     | -             | -         | -         | +   |
| III C      | -     | +  | -   | -   | -   | -     | -             | -         | -         | -   |
| III E      | -     | +  | -   | -   | -   | -     | -             | -         | +         | -   |
| IV A       | -     | +  | -   | -   | -   | -     | +             | -         | -         | -   |
| V          | -     | -  | -   | +   | +   | -     | -             | -         | -         | -   |
| VI         | -     | -  | -   | +   | -   | -     | -             | -         | -         | -   |
| V II       | -     | -  | +   | v   | -   | +     | -             | -         | -         | -   |
| V III      | -     | -  | -   | -   | -   | +     | -             | -         | -         | -   |

+ : présent. - : absent. v : variable, DL : de l'acide diaminopimélique, Gly : glycine, Lys : lysine, Orn : l'ornithine, Ara : arabinose, Gal : galactose, Xyl : xylose, Mad : madurose, Rha : rhamnose

### I.5.2.3. Les lipides

Les lipides peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires (les phospholipides). Cinq profils phospholipidiques caractéristiques des Actinomycètes ont ainsi été définis (Leveau et Bouix, 1993), de même que quatre profils fondés sur les types d'acides gras présents, qui se présentent en des chaînes, peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées, ils sont caractérisées aussi par la présence des acides mycoliques (des composés pariétaux) constitués de 20 à 90 carbones, présents uniquement chez certains genres, tels que *Mycobacterium* (80 carbones), *Nocardia* (50 °C) et *Corynebacterium* (30 °C) (chimiotype IVA), et les ménaquinones présentes au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative (Yamaguchi, 1965 ; Leveau et Bouix, 1993).

#### **I.5.2.4. Acides nucléiques**

Les déterminations des acides nucléiques portent principalement sur le pourcentage de guanine et cytosine, et sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenu par la digestion par les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont différentes, au-delà de 70 % de similitude (l'hybridation ADN-ADN), deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce, le séquençage de l'ARNr 16S, constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (Melouah, 2015).

#### **I.5.3. Physiologie de développement**

Au niveau du sol, les Actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes, leur présence est influencée par plusieurs paramètres physiologiques (conditions environnementaux) en particulier: l'oxygène, le pH, la température...etc. (Djaballah, 2010).

##### **I.5.3.1. L'oxygène**

Les Actinomycètes sont divisées en deux groupes selon le type respiratoire, les premiers sont des formes fermentatives anaérobies strictes, telle que le genre *Actinomyces*, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, et l'autre sont des formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, et sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol (Huang et al., 2004 ; Prescott et al., 2007).

##### **I.5.3.2. Le pH**

La majorité des Actinomycètes se comporte comme des bactéries neutrophiles, et croit dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin, mais on peut observer certaines espèces acidophiles qui peuvent croître à des valeurs de PH compris entre 4.5 et 5.5 : comme le genre *Streptacidiphilus* (Wang et al, 2006 ; McKinney, 2004).

### I.5.3.3. La Température

Les Actinomycètes sont des microorganismes mésophiles, la température optimale de croissance est entre 25 à 30 °C, il existe des espèces thermophiles pouvant croître à des températures de 55 à 65 °C, telle que le genre *Thermoactinomyces* grâce à leurs spores qui résistent à une température de 90 °C pendant 30 minutes. *Saccharomonospora* et d'autres thermotolérants tels que *Microbispora*, *Micropolyspora* et *Pseudonocardia*, ce sont des souches plus thermotolérantes que thermophiles (Leveau et Bouix, 1993 ; Djaballah, 2010).

### I.5.3.4. L'activité de l'eau ( $A_w$ )

Les Actinomycètes présentent dans des sols, supportent des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, la phase de germination des spores, déterminée par des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0.67, également l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des Actinomycètes est égale à 0,98 (Zvyagintsev et al., 2005 ; Oskay et al., 2004).

### I.5.3.5. Tolérance en NaCl

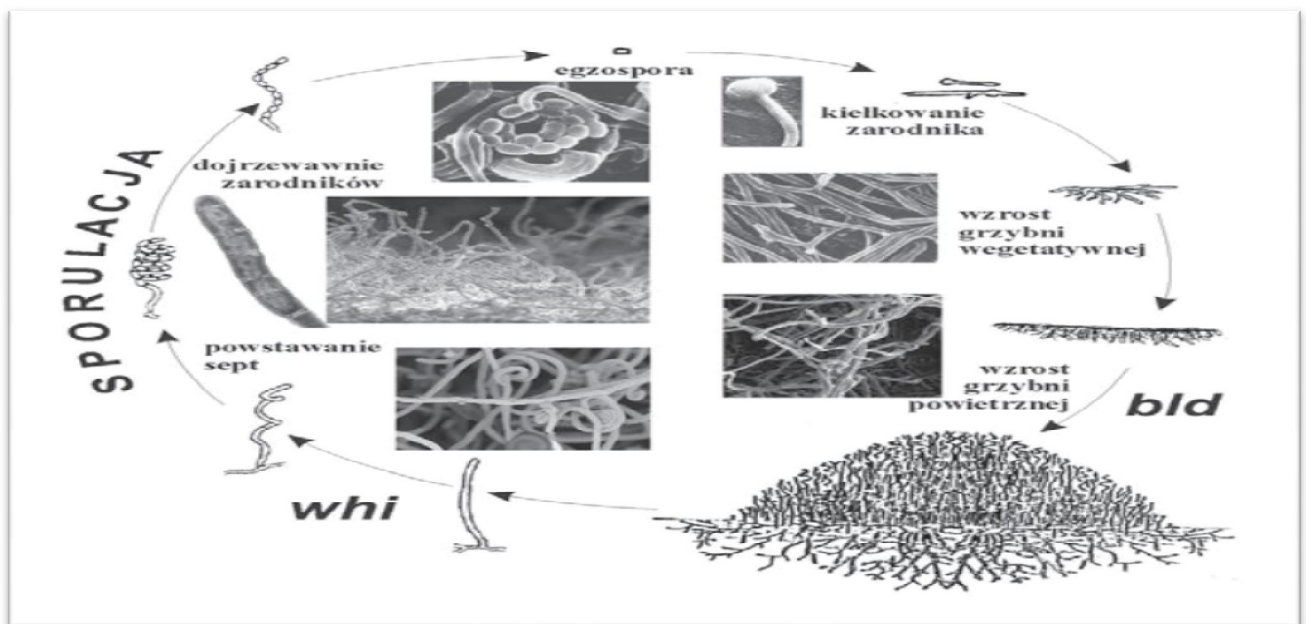
Les Actinomycètes peuvent vivre dans des environnements à salinité déférente et qui peuvent être divisées en quatre groupes selon leurs exigences en NaCl : Ces microorganismes peuvent être halophiles ; qui ont besoin de sel (NaCl) pour leur croissance, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les Actinomycètes halophiles extrêmes, ou sont des halotolérants ; elle tolèrent des concentrations de NaCl mais non obligatoires pour leur croissance, et présentent aussi quelques espèces légèrement tolérantes (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) ; et dernièrement les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (Merizig et Naami, 2015; Messaoudi, 2011)

### I.5.4. Cycle du développement des Actinomycètes

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les Actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe (Figure 06), qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation cellulaire puis la mort (Tighidet, 2010 ; Danilenko et al., 2005), leur cycle de vie commence par la germination des spores, ce processus nécessite la présence d'ions calcium. La germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié. (O'Gara et al., 2008).

Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat : en effet le mycélium de substrat donne des produits de lyse qui sont utilisés par le mycélium aérien (un ensemble de tissu porte le nom de thalle riche nucléotides), à cette phase, les Actinomycètes sont des produits des métabolites secondaires d'intérêt médical (**Smaoui, 2010**).

Le mycélium aérien est sporulé, se forme principalement de spores de type asexuées à paroi fine appelée conidies ou conidiospores, ces derniers naissent par séptation du mycélium primaire dans des conditions défavorables comme le manque de nutriment, ces spores sont bien résistantes à la dessiccation qui augmente leur adaptation mais ne sont pas résistantes à la chaleur (**Prescott et al, 2010**).



**Figure 06:** Cycle biologique d'un *Streptomyète* (**Jakimowicz, 2007**)



## Chapitre II

# DESCRIPTION DE QUELQUE GENRES DES ACTINOMYCETES





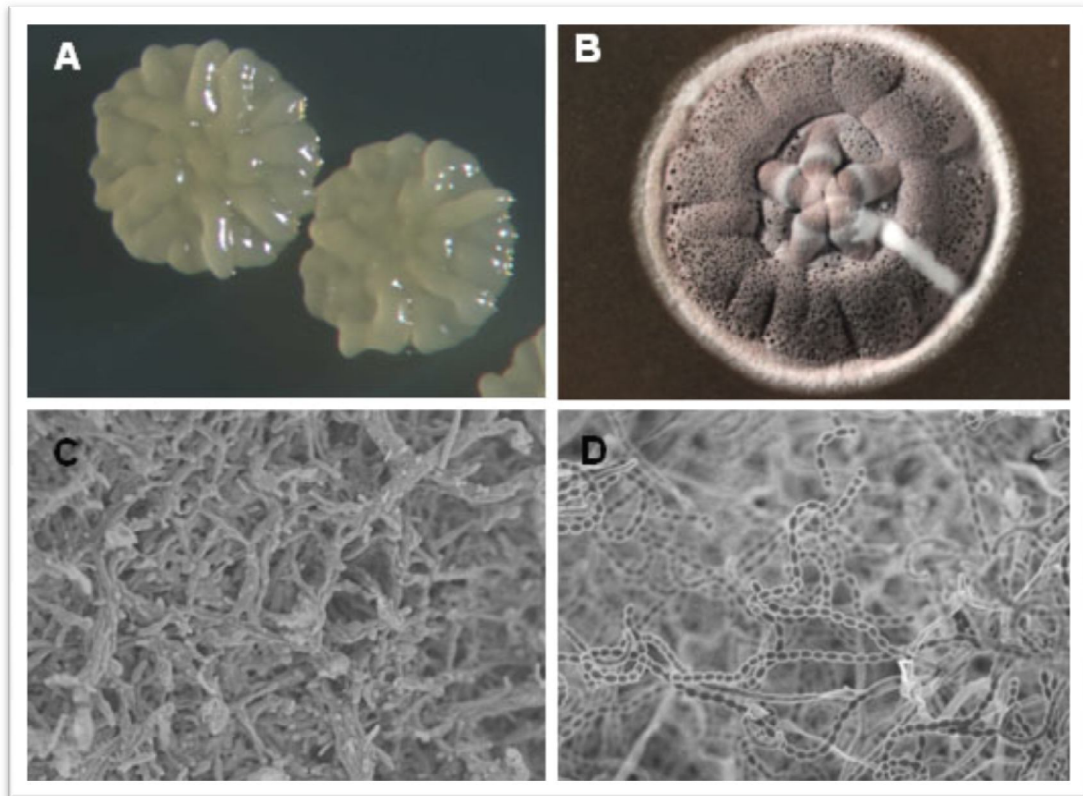
Les Actinomycètes constituent un groupe diversifié, il partage de nombreuses propriétés, depuis les formes bacillaires jusqu'aux formes filamenteuses ramifiées à mode de sporulation complexe (Leveau et Bouix, 1993).

## II.1. Description du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces*, proposé par Waksman et Henrici (1943) est classé dans l'ordre des *Streptomycetales*. La famille *Streptomycetaceae* contient actuellement trois genres: *Kitasatospora* et *Streptacidiphilus* dont le plus important est *Streptomyces* (Coombs et Franco, 2003 ; Hwang et al., 2001), l'utilisation de la taxonomie numérique qui est basée sur l'étude phénotypique (la résistance aux antibiotiques, la production de métabolites secondaires et le pouvoir de pathogénicité) permet de limiter le nombre des espèces et a clarifier la classification des *Streptomyces* dans 19 classes majeures, 40 groupes mineurs et 18 classes à souche unique (Anderson et al., 2001 ; Prescott et al., 2007 ; Williams et al., 1983).

Les *Streptomyces* sont des bactéries ubiquitaires, aérobies, rencontrées essentiellement dans le sol (Oskay, 2009), elles sont chimioorganotrophes, non acido-alcool-résistantes, elles forment des filaments ramifiés de 0,5 à 2µm de diamètre, souvent non septés et des colonies caractérisées par une surface lisse et produisent des pigments mélanoïdes de couleur variée : brune, rouge, jaune, verte, bleue ou violette (Figure 07) (Williams et al., 1983 ; Holt et al., 1994 ; Reddy et al., 2010).

Les *Streptomyces* secrètent des enzymes dans le sol qui dégradent les protéines, l'amidon, la cellulose et la lignine provenant des plantes de sol, cette action à une importance dans la dégradation des composts et des pollutions dues à l'activité de l'homme, elles sont également responsables des goûts et des odeurs terreuses dans les eaux douces par la production des composés volatiles (Xu et al., 1996 ; Reponen et al., 1998 ; Lakshmipathy et Kanabiran, 2009).



**Figure 07:** Représente les colonies de *Streptomyces* au stade du mycélium végétatif (A) et après différenciation morphologique et apparition des spores (B). Mycélium végétatif (C, gross. 2200×) et chaînes de spores (D, gross. 300×) (Madigan et Martinko, 2007).

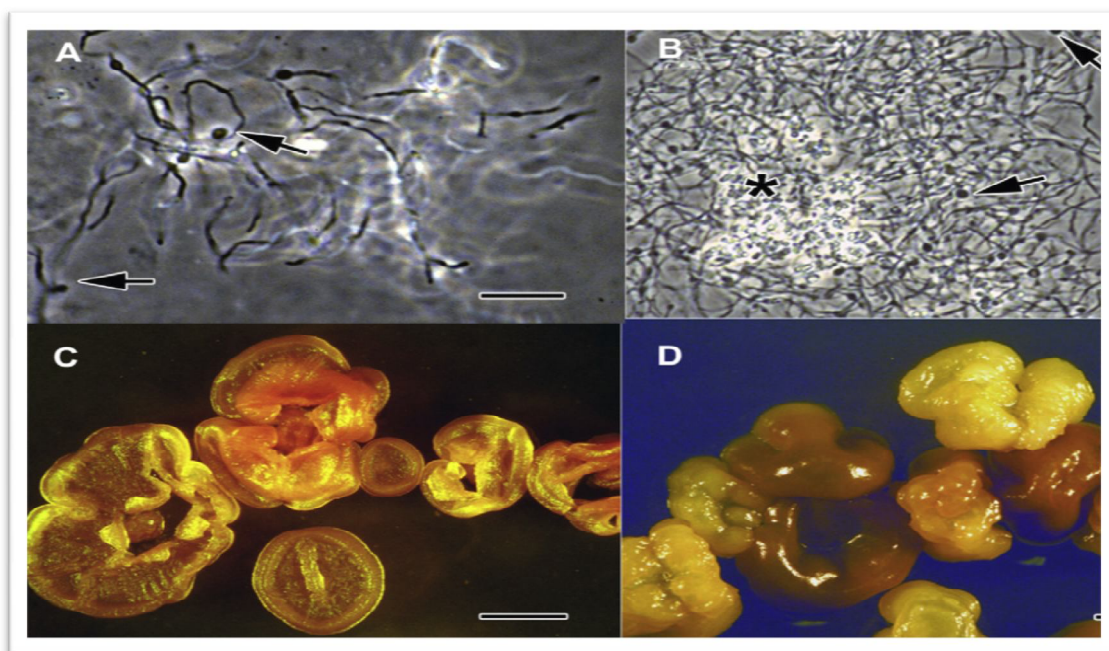
## II.2. Description du genre *Micromonospora*

Le genre *Micromonospora* a été décrit pour la première fois, sur la base de caractéristiques morphologiques (l'absence d'un vrai mycélium aérien), la croissance sur différents supports, et selon les sources de carbone utilisé (pentoses et d'hexoses et des acides organiques). *Micromonospora* est inclus dans la famille des *Micromonosporaceae*, dans l'ordre des *Micromonosporales* du sous-ordre *Micromonosporineae*. Ce genre comprend 53 espèces et 7 sous espèces, caractérisé par une espèce type *Micromonospora chalcea* (Holt et al., 1994 ; Martha et al., 2007 ; Zhang et al., 2012).

Les *Micromonospora* sont des bactéries, aérobies à microaérophiles, saprophytes, chimio-organotrophes, et sont réducteurs de nitrate qui peut produire l' $H_2S$ , (Hirsch et Maria, 2009). Ce genre est capable d'hydrolyser l'esculine, l'arbutine et l'amidon, donc ce genre possède un profil glucidique et ne possède pas d'acide mycolique, de cette manière il est différent des autres genres d'Actinomycètes.

Les bactéries de genre *Micromonospora* forment un mycélium de substrat septé, très abondant et non fragmenté, son diamètre est à la moyenne de 0,5 µm, mais ne sont pas produits de mycéliums aériens (**Figure 08**), cependant le genre *micromospora* ne produit pas des pigments mélanoides (**Zerizer H., 2014 ; Huang et al., 2008 ; Ann M et al., 2009** ).

Le genre *Micromonospora* est largement répandu dans les terres fertiles et les sédiments côtiers. Certains membres de ce genre sont également connus pour former une association intime avec des plantes, telles; les racines de riz, racines de blé, racine de nodule de fixation d'azote, les plantes actinorhiziennes filao et de nodules de la racine des plantes légumineuses *Lupinus angustifolius* (**Hirsch et Maria, 2009 ; Wang et al., 2011**).



**Figure 08:** (A) *Micromonospora aurantiaca*, (B) Phase microscopie à contraste de *M. aurantiaca*, (C) Les colonies de *Micromonospora aurantiaca*, (D) des colonies multicolores de *Micromonospora* (**Hirsch et Maria, 2009**)

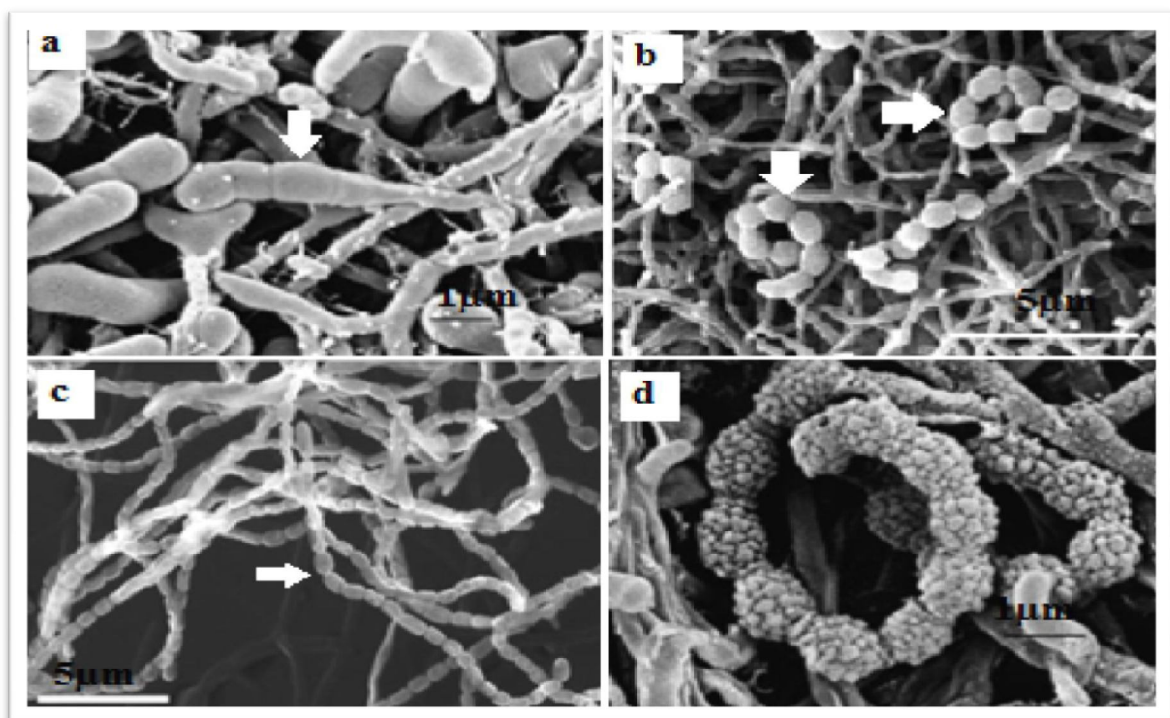
### II.3. Description du genre *Actinomadura*

Le genre *Actinomadura* appartient à la famille des *Thermomonosporaceae*, dans l'ordre des *Streptosporangiales* et sous-ordre des *Streptosporanginea* (**Lee et Lee, 2010**), le genre *Actinomadura* comprend 75 espèces et deux sous espèces décrites et validées (**Prescott et al., 2007**), la première apparition du genre *Actinomadura* a eu lieu en 1894, lorsque fut découverte la maladie du pied à Madura et préposé le nom *Streptothrix madurae* comme un agent causal de cette maladie. Cette proposition n'a pas été retenu et la souche a été classée dans le genre *Nocardia*, puis dans le genre *Streptomyces*, avec l'introduction de l'analyse de la paroi cellulaire

depuis l'année (1970), il a été réalisé que la souche diffère des membres du genre *Streptomyces* et établi le genre *Actinomadura* (Marilize et Meyers, 2007).

Les espèces du genre *Actinomadura*, sont des bactéries aérobies, non mobiles (Prescott et al. 2007), les membres du genre *Actinomadura* possèdent une paroi de type III/B (contenant l'isomère méso de l'acide diaminopimélique et le madurose comme sucre caractéristique ainsi que le ribose, le xylose, le galactose, avec des structures de peptidoglycane type acétyle, l'application de ces caractères à la taxonomie polyphasique et le séquençage de l'ADNr 16S ont montré clairement la taxonomie de ce genre (Wang et al., 2007 ; Yassin et al., 2010 ; Lee, 2012).

Les *Actinomadura* sont caractérisés par la production d'un mycélium de substrat bien développé et non fragmenté avec des hyphes aériens qui forment des colonies, la surface des colonies (mycélium aérien) peut être blanche, jaune, blanc jaunâtre, jaune grisâtre, rose pâle, rose jaunâtre, vert bleuâtre ou grise; le dos de la colonie (mycélium de substrat) peut être crémeux, jaune clair, jaune ; ainsi, elles peuvent présenter des pigments diffusibles qui sont caractérisés par une couleur sombre, bronze ou bleue pâle (Figure 09) (Lu et al., 2003 ; Wink et al., 2003).



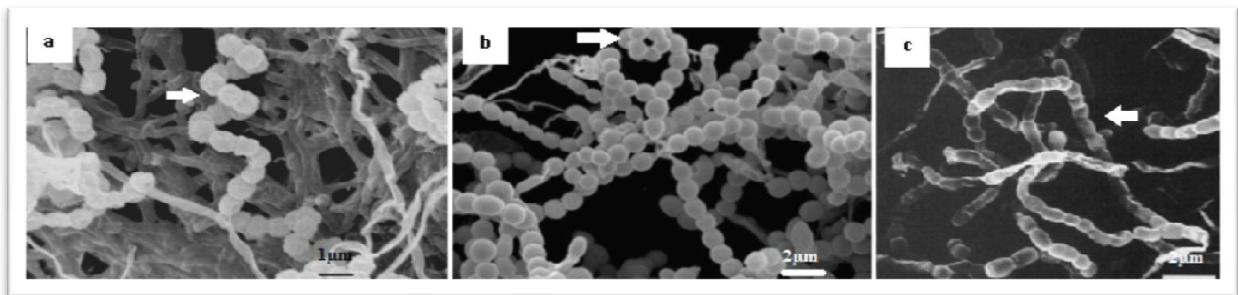
**Figure 09** : Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de quelques espèces d'*Actinomadura* (Lu et al., 2003).



#### II.4. Description du genre *Nonomuraea*

Le genre *Nonomuraea* est moins connu parmi les Actinomycètes, il a été proposé pour la première fois en 1988, sa position taxonomique fut l'objet de révisions successives, il appartenait au début, au genre *Actinomaduras* qui ont des caractères communs avec ce genre, puis au genre *Microtetraspora* (Quintana et al., 2003), cette classification basée sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S en 1998, de ce fait, on l'a transféré à un nouveau taxon appelé *Nonomuria*, et d'après des règles du Code international de la nomenclature des bactéries, le nom de *Nonomuria* fut remplacé par *Nonomuraea* comme orthographe correct (Rungroch et al., 2014). Le genre *Nonomureae* appartient à la famille des *Streptosporangiaceae*, dans l'ordre des *Streptosporangiales* et sous-ordre *Streptosporangineae*. le genre actuel (Novembre 2014) comprend environ 36 espèces et 2 sous-espèces connues et validées; *Nonomureae pusilla* représente l'espèce type de ce genre (Polpass et al., 2014 ; Jie et al., 2011).

Les espèces du genre *Nonomureae* sont aérobies, non mobiles (Jie et al., 2011), leur Paroi cellulaire de chémotypes IIIB et IIIC contient l'isomère méso de l'acide diaminopimélique. Elle forme un mycélium de substrat largement ramifié (dos de colonie) avec des variations de couleur blanche au jaune-brune, elle forme également un mycélium aérien (surface de la colonie) ken traces seulement, blanc, beige, rose, rose violacé ou bleu grisâtre. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien ont été bien développés sans fragmentation, leur pigments solubles peuvent se trouver chez quelques espèces, ils sont: bruns jaunâtre, jaunes, rouges ou violets, les hyphes du mycélium aérien se différencient en crochet, en spirale ou chaînes droites de spores (Figure 10) (Ara et al., 2007 a ; Ara et al., 2007 b ; Camas et al., 2013 ; Hisayuki et al., 2015).



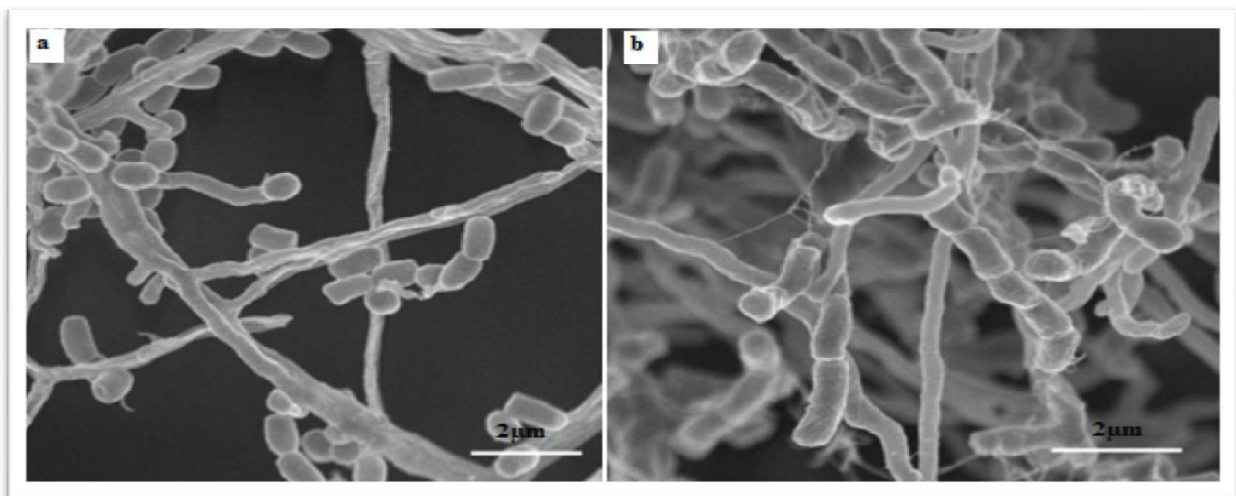
**Figure 10** : Photographies par microscope électronique des chaînes de spores de quelques espèces de *Nonomuraea* (Ara et al., 2007 a)

## II.5. Description du genre *Nocardia*

Les espèces du genre *Nocardia* sont classées dans la famille des *Nocardiaceae*, dans l'ordre des *Corynebacteriales* et sous-ordre *Corynebacterineae* et incluent plusieurs genres *Corynebactérium*, *Mycobactérium*, dont les trois genres les plus importants (**Prescott et al., 2007**), Le genre *Nocardia* a été isolé par le vétérinaire Trevisan entre 1954-1985, qui lui a donné le nom de *Nocardia farcinica*, est considéré comme l'espèce type du genre *Nocardia*. (**Yassin et al., 2000**). *Nocardia* est en extension rapide, plus de 30 espèces ont été décrites durant la dernière décennie; 89 espèces de *Nocardia* sont officiellement reconnues à ce jour à l'intérieur de ce genre, dont environ 25 qui sont pathogènes chez l'humain et sont responsables de la Nocardiose, tandis que plus de 30 espèces sont considérées comme étant des instruments médicaux d'importance (**Sullivan et Chapman, 2010 ; Lamm et al., 2009**).

Les espèces du genre *Nocardia* sont aérobies mais certaines espèces peuvent vivre en l'absence d'oxygène et en présence seulement de CO<sub>2</sub>, sont acido-alcool-résistantes, leur paroi cellulaire contient des acides tuberculostéariques comme chez les membres du genre *Mycobacterium*, et l'isomère méso de l'acide diaminopimélique. (**Cargill et al., 2010**)

Ce genre est caractérisé par la formation d'un mycélium primaire (mycélium de substrat) de diamètre 0,5-1,2 µm, fragmenté habituellement en éléments bacilliformes ou coccoïdes (**Figure 12**), puis, ces derniers jours, on a montré des hyphes aériens blanchâtres ramifiés de façon irrégulière (pléomorphes) et pénétrant dans la gélose ; sur lequel un mycélium aérien se développe en produisant dans quelques cas, de courtes chaînes de spores, cependant, les espèces de genre *Nocardia* ne donnent pas de pigments solubles ou Mélanoides ( **Catherine, 2013 ; Kageyama et al., 2004 ; Canet s et al., 2004** ).



**Figure 11:** Photographies par microscope électronique du mycélium aérien de deux espèces du genre *Nocardia* (**Zerizer, 2014**).



## Chapitre III

### Propriétés Métabolique des Actinomycètes



Les Actinomycètes sont connus par leur production de substances biologiquement actives telles que les antibiotiques, les vitamines, les enzymes et les pigments, certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore, d'autres sont impliquées aussi, dans le control phytopathologique et dans la production des composés antifongiques. (**Gebreselema, 2013 ; Hsu et Lockwood, 1975**).

### **III.1.Importance des Actinomycètes**

#### **III.1.1. Importance en agronomie**

Les Actinomycètes sont des microorganismes qui ont un rôle écologique majeur grâce à leur capacité de produire une large gamme d'enzymes ; telles que, les hydrolases extracellulaires, qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol. Ils sont caractérisés par leur grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes, tels que les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, qui sont difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, en plus, les Actinomycètes sont déterminées parmi la microflore importante de la rhizosphère, elles sont capables aussi de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (**Valois, 1996 ; Williams et al., 1983**).

#### **III.1.2. Importance en biotechnologie**

Les Actinomycètes présentent de grandes hétérogénéités biochimiques et ont une capacité de produire des métabolites secondaires qui sont intéressantes en industrie pharmaceutique et alimentaire (**Abbas, 2006**), c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (**Valan arasu et al., 2009**), certaines espèces d'Actinomycètes produisent jusqu'à 75-80% des antibiotiques (**Mellouli et al., 2003**) : ainsi, de nombreux métabolites synthétisées, qui peuvent être des enzymes telles que les enzymes alcalins, des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs (**Badji, 2006**), des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires (**Li et al., 2005**).

##### **III.1.2.1. Production des Antibiotiques**

Les Actinomycètes ont la capacité de synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs parmi lesquels on compte les antibiotiques (**Oskay et al., 2004**), ces propriétés traduisent la richesse du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien. Les Antibiotiques qui sont produits par les Actinomycètes manifestent des activités biologiques de nature principalement



antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale ou antiparasitaire (**Gebreselema, 2013 ; leveau et Bouix, 1993 ; Oskay et al., 2004**). Les antibiotiques présentent un intérêt significatif dans le domaine de la sante humaine, Animale, de l'élevage et de l'agriculture (**Leveau et Bouix, 1993**).

#### **III.1.2.1.1. La production des Antibiotiques par le genre *Streptomyces***

Les Streptomycètes ont la capacité de produire une large gamme des métabolites qui présente une importante application en santé humaine et animale, les plus répandus sont les antibiotiques (**Colombié, 2005**), ils produisent différents types d'antibiotiques environ plus de 80% à l'heure actuelle telle que ; les oligosides, de  $\beta$ -lactamines, de tétracyclines, d'anthracyclines, d'ansamycines, de macrolides, de polyènes, de nucléosides et de la fosfomycinen (**Tableau 04**) (**Demain, 2000**) ; ainsi la néomycine et la streptomycine sont parmi les antibiotiques produits essentiellement par *Streptomyces griseus* et *Streptomyces fradiae*, qui sont caractérisés par leur propriété bactéricide, fongicide et herbicide contre les streptocoques multi-résistants et les bactéries à Gram positif (**Rudi et al., 2012**).

Jusqu'à présent, environ 10 % de ces molécules sont largement utilisées dans le domaine thérapeutique humain et vétérinaire, ainsi qu'en agriculture et en industrie agroalimentaire, le type de composé synthétisé est propre à chaque espèce productrice (**Demain, 2000 ; Colombié, 2005**).

**Tableau 04:** Antibiotiques courants synthétisés par les *Streptomyces* (Germain, 2000).

| Classe chimique | Antibiotique       | Producteur             | Cible                                      |
|-----------------|--------------------|------------------------|--|
| Aminoglycosides | Streptomycine      | <i>S. griseus</i>      | la plus par des Grams –                    |
|                 | Spectomycinee      | <i>S. spp</i>          | M. tuberculose                             |
|                 | Néomycine          | <i>S. fradiae</i>      | Large spectre                              |
| Tétracycline    | Tétracycline       | <i>S. aureofaiens</i>  | Large spectre gram +et -                   |
|                 | chlorotétracycline | <i>S. aureofaiens</i>  |  |
| Macrolide       | Spiramycine        | <i>S. Ambofaciens</i>  | <i>Streptocoque, nesperai</i> et           |
|                 | Erythromycine      | <i>S. erythreus</i>    | <i>mycoplasme</i>                          |
|                 | clindamycine       | <i>S. lincolnensis</i> | Et la plus par des gram+ anaérobie stricte |
| Polyéne         | Nystatine          | <i>S. noursei</i>      | Champignon : <i>candidat</i>               |
|                 | Emphocitine B      | <i>S. nodosus</i>      | Champignon                                 |
| Sans classe     | Chloemphynicol     | <i>S. venezulae</i>    | Large spectre de candidat                  |

### III.1.2.1.2. Production des antibiotiques par le genre *Micromonospora*

Le genre de *Micromonospora* est généralement classé en deuxième position (après les *Streptomyces*) comme source de substances actives, connues pour diverses activités métaboliques essentiellement les antibiotiques (Mcneil et Brown, 1994).

La plupart des espèces de *Micromonospora* ont la capacité de produire des variétés d'Antibiotiques telle que l'espèce *Micromonospora purpurea* productrice de l'aminoglycoside (la gentamicine). Cet évènement a ouvert la voie pour le screening des antibiotiques à partir des espèces de ce genre qui sont devenues depuis, une source prolifique de métabolites bioactifs.

Les bactéries de ce genre, peuvent produire plusieurs types d'antibiotiques, parmi les plus importants; les Aminoglycosides, la gentamicine, La sisomicine et la fortimicine, elles ont aussi la capacité de produire les macrolides comme: le mycinamicine, la rosamicine; et les anticancéreux (Kirby et Meyers, 2010).

### III.1.2.1.3. Production des antibiotiques par le genre *Nocardia*

Les souches de genre *Nocardia* sont utilisées pour la production de nombreux types d'antibiotiques telle les antibactériens de types terpénoïdes, macrolides et lactones, parmi les souches responsables de ce type de production sont *Nocardiosis dassonvillei*, *Nocardia mutabilis* et *Nocardia syringae* *Nocardia alba*, ces espèces sont essentiellement actives contre des bactéries à Gram négative pathogènes (Zerizer, 2014).

Le nargénicine A1, est un antibiotique isolé à partir de *Nocardia sp*, de la région de Corée du Sud il possède essentiellement une forte activité antibactérienne contre le *Staphylococcus aureus* résistant (Maharjan et al., 2011).

### III.1.2.2. Production d'Enzymes

Essentiellement, les Actinomycètes synthétisent de nombreux enzymes telles que les chitinases, les glucanases (Tokala et al., 2002), les peroxydases et les glutaminases, ainsi que d'autres espèces qui ont la capacité de produire; des amylases, des cellulases et des hémicellulases et de dégrader la lignine. (Divya et al., 2014), certain genre comme les *Streptosporangium sp* est isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (Hasegawa et al., 2006).

Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycetales, ces enzymes hydrolysent des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras (Sommer et al., 1997).

D'autres espèces telles que *Streptomyces albovinaceus*, *Streptomyces. caviscabies*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces setonii* et *Streptomyces virginiae* produisent des enzymes chinolytiques (chitinases et cellulases), ces derniers sont considérés comme l'action antagoniste la plus efficace dans le contrôle de certaines maladies fongiques en raison de leur action directe sur les chitinases. (Macagnan et al., 2008).

Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides. (Thumar et Singh, 2007).

### III.1.2.2.1. Production des enzymes par le genre *Streptomyces*

Les *Streptomyces* produisent différents types d'enzymes telles que; les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases et les xylanases (la xylose isomérase issue d'un Streptomycète thermophile) ...etc., qui sont très intéressantes en biotechnologie (Colombié, 2005). Les protéases sont le groupe le plus important des enzymes industrielles et représentent, environ 60% des enzymes bactériennes totales, qui sont produites principalement par les *S. clavuligeru*, *S. griseus*, *S. rimouses*, *S. thermoviolaceus*, *S. thermovulgaris*). Les protéases d'origine bactérienne qui sont produites par les Actinomycètes, sont les plus importantes par rapport aux protéases fongiques (Jayashree et al., 1995).

Principalement, la protéase alcaline est d'un intérêt certain du point de vue biotechnologique tel que dans les domaines alimentaire, les détergents, les industries pharmaceutiques, les industries du cuir les tanneries...etc. (Jayashree et al., 1995).

### III.1.2.2.2. Production des enzymes par le genre *Micromonospora*

Le genre de *Micromonospora* est appliqué dans la production de l'enzyme protéolytique qui réalise la dégradation de la cellulose, la chitine, la lignine aussi bien l'hydrolyse des complexes polysaccharides, l'activité de la dégradation des polysaccharides est bien observée dans les composts (la décomposition des matières végétales, de fumier, de la paille et les tiges ... etc.).

Parmi certaines espèces de ce genre, celle qui se trouve dans les tripes des termites ou le rumen des bovins, où elles ont la capacité de dégrader les différents composants organiques et les fibres végétales (Hirsch M et al., 2009), en plus des enzymes protéolytiques, ces microorganismes ont la capacité de produire des enzymes hydrolytiques qui jouent un rôle actif dans la dégradation de divers composés organiques très compliqués, Parmi lesquelles, on rencontre l'espèce de *Xylanimonas cellulosityticus* que est isolée à partir d'un cariee et dans les arbres, (*Micromonospora aurantiaca*). La capacité de produire ces enzymes hydrolytiques peut permettre à ces bactéries de se développer dans plusieurs foyers saprophytes ainsi que les endophytes au sein des usines, ainsi, et grâce à cette activité enzymatique, ces microorganismes colonisent la surface des feuilles des plantes (Hirsch et al., 2009 ; Daduang, 2015) .

### III.1.2.3. Production de Sidérophores

Le fer est considéré comme le micro-élément le plus important utilisé par les bactéries, il joue également le rôle de cofacteur de nombreuses enzymes et protéines (Djibaoui et Bensoltane, 2005). Cet élément est retrouvé dans la nature sous des formes insolubles qui ne peuvent pas être assimilées par les plantes et les bactéries, pour cette raison, les bactéries et les

champignons ont développé de nombreux systèmes de chélation de fer qui utilisent le plus souvent les sidérophores (Pérez-Mirinda et al., 2007). Ils solubilisent et transportent le fer vers la cellule microbienne à travers des récepteurs spécifiques (Cabrera et al., 2001). Les streptomycètes du sol sont capables de produire les sidérophores *Streptomyces fulvissimus* ATCC 27431 et en accumule un taux avoisinant à 94% (Muller et al., 1984).

#### III.1.2.4. production des vitamines

Les Actinomycètes sont pratiquement absents de ce domaine, mais on peut mentionner à titre historique, la production de vitamine B 12 par *Streptomyces olivaceus* qui furent remplacées depuis longtemps par d'autres bactéries bien plus productrices (Leveau et Bouix, 1993).

#### III.1.2.5. Production des métabolites secondaire par différent autres genre des Actinomycètes

La plupart des espèces du genre *Nonomuraea* a été trouvé dans les sols et les sédiments aquatiques, certains de ces membres révèlent un grand potentiel pour la production de composés bioactifs précieux, la plupart de ces composés bioactifs présente un intérêt médical (moyen d'une évaluation clinique) et agricole, certains sont considérés comme des produits industriels et commerciaux (Rungroch et al., 2013).

Certaines espèces comme, *Nonomuraea pusilla* et le *Nonomuraea rubra* sont responsables de la production des substances Antimicrobiennes telle que la Maduramycine, ainsi que le *N. dietziae* qui peut hydroxyler certains antibiotiques de type Novobicin (un agent anti-staphylococcique) et capable de modifier leur structure pour réduire son efficacité. C'est ce qui justifie les avantages du genre *Nonomuraea* qui, non seulement est une bactérie productrice de composés bioactifs, mais aussi capable de transformer biologiquement certains Antibiotiques découverts précédemment (Polpass et al., 2014).

Plusieurs membres du genre *Nonomuraea* produisent des pigments colorés à la fois solubles et insolubles, Certains de ces pigments possèdent une activité antagoniste contre certains organismes cibles, connus aussi comme pigments antibiotiques tels que Maduramicine qui est produite par *Nonomuraea rubra* (Rungroch et al., 2013).

Parmi les Actinomycètes rares, on a le genre d'*Actinomadura*, rapporté pour être le plus prédominant, ce genre attire une attention croissante et est considéré comme un microorganisme plus important dans les programmes de dépistage pour les métabolites bioactifs, des études antérieures sur le genre *Actinomadura* rapporte l'abondance des activités antifongiques contre divers champignons pathogènes et toxigènes (Maharjan et al., 2011),

généralement, les bactéries du genre *Actinomadura* sont d'excellente candidates productrices d'enzymes dans la plus importante est le xylanase (**Haberra, 2014**), elles ont aussi, la capacité de produire de nombreuses enzymes lytiques extracellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases et les lipases (**Maharjan et al., 2011**).

Les bactéries de l'espèce *Nocardiosis sp.* ont une activité antifongique efficace vis-à-vis de nombreux champignons tels que ; *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. de plus, elles sont actives contre certaines levures comme les *Candida cruzi*, *Candida tropicans* et *Candida albicans* (**Zerizer, 2014 ; Kageyama, 2004**).



Partie

ExpérimEntal E



## **I. Matériels utilisés**

### **I.1. Grands matériels**

- Agitateur
- Balance
- Microscope
- Etuves réglables
- Plaque chauffante.
- Autoclave
- Bain marie
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex
- Table à niveaux
- Pied à coulisse
- Loupe binoculaire
- La Hotte

### **I.2. Petits matériels**

- Anse de platine
- Bec bunsen
- Boîtes de Pétri (boîtes compartiment, des mini boîtes)
- Portoirs
- Virerai : béchers gradués, éprouvettes gradués, tubes à essai stériles, et les flacons
- les lames
- Pipettes Pasteur
- Spatule
- Barreaux magnétique
- Picette
- film photographique
- papier whatman



### I.3. Matériels biologiques

- Les 13 isolats d'Actinomycètes
- Bactéries-tests : *E.coli* ATCC25422, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Micrococcus luteus* et *E.coli* DH5a.
- Des bactéries d'origine clinique : IC 1 : *Morganella morganie*, IC 2 : *Proteus mirabilis*, IC 3 : *Entérobacter cloacae*, IC 4 : *Serratia oderifera 1*, IC 6 : *Serratia ficaria 1*, IC7 : *Serratia ficaria* IC 8 : *Citrobacter koseri*, IC 9 : *Serratia oderifera 1*, IC10 : *Klebsiella terrigena*, IC 11 : *Entérobacter sakazakii*, IC 14 : *Klebsiella ornitholytic*, IC 15 : *Serratia oderifera 1* (**Tableau 13**). et les souches IC3, IC5, IC12 ont été préalablement identifiées comme des *Pseudomonas*.sp.
- **I.4. Les milieux de cultures**
  - La gamme des ISP (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7).
  - Bouillon nitrate ISP8
  - ISP9 (liquide et solide)
  - Gélose nutritif
  - ISP2 à différente concentration de NaCl : 0%, 2.5%, 5%,7%, 10%.
  - Citrate de Simmons
  - Gélose Cos
  - Gélose à base d'amidon 1 %
  - Gélose à base de Caséine 5 %
  - Lait écrémé 10 %
  - Milieu à base de Tween 80.
  - Sang de cheval.
  - Les sucres : xylose, arabinose, glucose, galactose, fructose, ribose, sorbitol, manitole
  - La gélose de Chapman
  - La gélose nutritive
  - Le milieu Muller Hinton(MH)

**NB :** La composition de chaque milieu est présentée dans la partie annexe.

### I.5. Les solutions et colorants utilisés

- L'eau distillée stérile
- L'eau physiologique stérile
- Solution saline standard

- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool
- Fuchsine

### **I.6.Réactifs et autre produits**

- Api 20 E (Bio Mérieux),
- Les réactifs spécifiques pour la révélation des réactions du système API 20 E sont le réactif de TDA, le réactif de Kovax. les réactifs VP1 et VP2, et les réactifs de Griess Nit 1 et Nit II, poudre de Zinc.
- Huile de paraffine
- Huile à immersion

## **II. Méthode de Travail**

### **II.1. Origine des souches**

Ce travail est basé sur l'étude de la biodiversité métabolique de 13 isolats d'Actinomycètes qui proviennent d'une collection de souches d'Actinomycètes du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

Ces isolats sont représentés par les codes suivants : (S129a, S129b, S171, S211, S 386, S403, S417, S418, S419, S428, S429, S430, S431), notre étude est basée sur une caractérisation de ces isolats du point de vue morphologique, physiologique et métabolique.

### **II.2.Repiquage et purification des isolats**

La purification des isolats est une étape essentielle dans notre travail, elle permet d'obtenir des colonies bien isolées et pures ; pour obtenir ces colonies, on doitensemencer successivement des boîtes de Pétri coulées dans un milieu ISP2, par la réalisation de la méthode de strie d'épuisement pour chaque isolat. Ensuite, ces boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 7 jours, car les Actinomycètes sont caractérisées par une croissance relativement lente par rapport aux autres bactéries (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

### **II.3. Etude des caractéristiques morphologiques**

#### **II.3.1.Etude micromorphologique**

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, qui a été mise au point en 1884 par un bactériologiste Danois Hans Christian Gram. (William et al., 2010).

Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu sur les différents milieux ISP2, ces frottis sont colorés, après observation à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x100), ce dernier permet de déceler les formes morphologiques des différentes bactéries et précisé le Gram + et Gram- (Tendolkar et al., 1998).

### II.3.1.2. Technique

Sur un frotti fixé à la chaleur.

- ✚ Recouvrir la lame de violet de gentianes 1 minute, puis laver à l'eau distillée.
- ✚ Ensuite, recouvrir du lugol 1 minute.
- ✚ Décolorer bien à l'alcool pendant une période, puis rincer à l'eau.
- ✚ Recouvrir la lame de fuchsine diluée, laisser 30 secondes, laver à l'eau.
- ✚ sécher entre deux feuilles de papier buvard.
- ✚ puis observer sous un objectif à immersion (X100) d'un microscope optique (Prescott et al., 2010), à partir de cet examen, nous pouvons déterminer quelques caractères morphologiques des Actinomycètes, concernant le type de Gram+ et des indications sur leurs formes (principalement la forme des filaments) et présence ou absence de spores isolées. (William B et al., 2010).

### II.3.2. Etude macromorphologique

L'étude macromorphologique permet de déterminer les différents caractères de mycélium de substrat (MS) et le mycélium aérien (MA), qui varient selon les milieux, ce test consiste à ensemercer différents milieux d'identification (la gamme des ISP : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 et SP7 « l'International *Streptomyces* Project ») (Shirling et Gottlieb, 1969), les milieux sont coulés dans des boîtes pétries puis ensemencés par touche à partir d'une culture pure mature de chaque isolat et à raison de deux répétitions qui sont notées (R1, R2). Cette répétition est considérée comme un test confirmatif, et permet ainsi, de récupérer la boîte lorsqu'elle est contaminée et remplacée par la seconde boîte, ces milieux sont incubés à 30°C pendant 7, 14 et 21 jours, et on vérifie leur croissance.

Ce test permet d'évaluer l'importance de la croissance (très importante, importante, moyenne, faible ou absente, ces caractères sont notés par des significations (+/-), la couleur de mycélium de substrat et du mycélium aérien : qui varie d'une souche à une autre et d'un milieu

à un autre , ainsi la production des pigments solubles, caractère qui se détermine par le virage de la couleur du milieu par rapport a sa couleur initiale, dans le cas des Actinomycètes, plusieurs couleurs des pigments solubles ont été décrites (**Shirling et Smith, 1953 ;Kitouni, 2007**).

## **II.4.Etude de la biodiversité physiologique**

### **II.4.1.Croissance à différentes températures**

Ce test est effectué pour déterminer la croissance des isolats à cinq températures différentes, (**4, 25, 30, 37, 44°C**) sur le milieu ISP2, à raison de deux boites par souche pour chaque température d'incubation, la croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation et la température qui permet une bonne croissance est notée (**Smaoui, 2010**).

### **II.4.2.Tolérance à différents degrés du PH**

Ce paramètre physiologique est réalisé par l'utilisation de milieu ISP2 gélosé mais à des différents degrés de pH (**5, 7, 9, et 10**), seul le pH3 est réalisé dans le milieu ISP2 liquide, ces milieux avec les différents degrés de pH, sont ensemencés à partir des cultures pures des isolats, ces résultats sont notés après un temps d'incubation de 14 à 21 jours à 30°C.

### **II.4.3. Tolérance à différentes concentrations de NaCl**

Ce test permet la détection des espèces d'Actinomycètes halophiles ou d'origines marines, sur un milieu spécifique (Voir l'annexe) à différentes concentrations de NaCl (**2,5%, 5%, 7%, 10%**) et en utilisant un témoin, c'est le milieu à 0% de NaCl, ce test consiste à ensemencer chaque souche d'Actinomycète à différentes concentrations de NaCl, ces boites sont incubées à 30°C pendant 14 à 21 jours (**Boucheffa, 2011**).

## **II.5.Etude de la biodiversité métabolique**

### **II.5.1.Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase**

Ce test est réalisé sur la gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble, le milieu est réparti dans des boites de Pétri stériles, puis ensemencés par touche, les boites sont incubés à 30 C°, après 14 jours, le milieu est recouvert d'une solution de lugol, l'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies, à l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Gordon et Smith, 1953**).

### **II.5.2.Hydrolyse de la caséine : recherche de caséinase**

Ce teste est étudié sur une gélose (voir annexe) contenant 5% de caséine soluble, après une période d'incubation de 7 jours à température 30C°, l'hydrolyse de la caséine est témoinnée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (**Gordon et Smith, 1953 ; Kitouni, 2007**).

### **II.5.3.Hydrolyse de la gélatine : recherche de gélatinase**

La production de gélatinasse par les bactéries est étudiée à partir de tubes qui contiennent de l'eau physiologie stérile,ensemencées pour réaliser une suspension bactérienne à laquelle une bandelette de film photographique (1cm de largeur) est ajoutée, un tube non ensemencé contenant une bandelette servira de témoin négatif. Après une période d'incubation de 7 jours à 30 C°, apparait un éclaircissement du film photographique, signe de l'attaque de la gélatine par la bactérie qui indique une réaction positive (**Morakchi, 2011**).

### **II.5.4.Action sur le lait écrémé**

Ce test consiste à préparer des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10% dans l'eau distillée, ces dernier sont ensemencés et incubés à 30°C, des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation du lait provoquée par les souches (**Kitouni, 2007**).

### **II.5.5.Test de dégradation des acides gras : recherche d'estérase**

Ce test est effectué par l'utilisation de milieu spécifique à base de tween 80 (voir annexe), comme seule source de carbone, après l'ensemencement et incubation à 30°C, la lecture est basée sur l'apparition d'une croissance sur le milieu de culture et par la présence d'un halo autour des colonies indique la dégradation des acides gras (**Gordon et Smith, 1953**)

### **II.5.6.Dégradation des sels de sodium**

Ce test est réalisé dans le milieu de citrate de Simmons, dans lequel on ensemence la ponte, par une strie longitudinale au moyen d'une anse, l'incubation s'effectue à 30 °C, pendant 14 à 21 jours, le virage de couleur du milieu vers le bleu indique la positivité de test (**Gordon et Smith, 1953**).

### **II.5.7.La recherche de Nitrate réductase**

La mise en évidence du nitrate réductase se fait sur un bouillon nitrate (ISP8), les souches sont ensemencées par une anse de platine et incubées à 30°C pendant 7 jours.

Le virage de couleur rose vers le rouge clair suite à l'addition des réactifs (Nit I et Nit II) signe la réduction du nitrate en nitrites, dans le cas de l'absence de coloration rouge, on ajoute le poudre de zinc ; l'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche) et en l'absence de coloration, le test est considéré comme positif (Guiraud et Duriod, 2003).

#### II.5.8.Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone

Le milieu de base utilisé est l'ISP9 additionné d'une solution sucrée à raison de 1% et un témoin négatif ne contenant pas une solution sucrée, les glucides utilisés dans cette étude sont : galactose, fructose, xylose, sorbitol, mannitol, ribose, Arabinose ; Le Milieu contenant du glucose sert de témoin positif, ces derniers sont considérés comme une seule source de carbone, la lecture est réalisée par comparaison de la croissance des Actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif), le milieu contenant du glucose sert de témoin positif (Boucheffa, 2011).

#### II.5.9.Dégradation de Cellulose: recherche de cellulase

On utilise dans ce test, des tubes contenant 5 ml de milieu ISP9 liquide, on trompe des bandelettes de papier Wattman N°1 stériles, comme seule source de carbone, puis ensemencées avec des souches d'Actinomycètes l'isolat, un tube non ensemencé sert de témoin négative, les tubes sont incubés à 30C° pendant 14 jours au plus, un développement de croissance sur le papier est considéré comme résultat positif (Yugal, 2014).

#### II.5.10.La recherche de l'activité hémolytique

Elle est réalisée sur la gélose de Columbia (900ml) additionnée de 100 ml de sang de cheval à raison de 5% (COS), si les Actinomycètes possèdent une activité hémolytique, ils produisent différentes zones d'hémolyse sur la gélose au sang. (Tableau 05) (Guérin et al., 1992).

**Tableau 05:** les différents types d'hémolyse (Dellars, 2007).

| Zone d'hémolyse  | Type d'hémolyse      |
|--|----------------------|
| Colonies à large auréole claire, à bord net, Hémolyse complète                               | $\beta$ hémolytique  |
| Colonie à halo étroit, avec verdissement (formation de méthémoglobine), hémolyse incomplète. | $\alpha$ hémolytique |
| Colonie sans zone d'hémolyse   | $\gamma$ hémolytique |

## II.6. Identification par le système Api 20E

L'API 20 E (BioMérieux), est un système standardisé d'identification des *Enterobacteriaceae*, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, cela permet d'aborder parallèlement des aspects du métabolisme bactérien (permet de mettre en évidence l'assimilation de certains sucres ainsi que la recherche de la production de certaines enzymes caractéristiques de certaines voies métaboliques), d'après ces caractères, il peut être utilisé pour le groupe des Actinomycètes (**Stanckebrandt et al., 2001**).

### II.6.1. Principe

La galerie Api 20E se compose de 20 microtubes contenant un substrat déshydraté, on inocule chaque microtube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile par une suspension préparée à partir des cultures pures jeunes de chaque souche d'Actinomycètes à identifier, et incubée sous 7 à 30 C°. Les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs ; la lecture et l'identification s'effectuent à l'aide d'une base de données (**Voir tableau 19**) (**Stanckebrandt et al., 2001**).

### II.6.2. Mode opératoire galerie Api 20E

#### ➤ Préparation de la galerie

- Répartir un peu d'eau dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Déposer la galerie de façon stérile dans la boîte.

#### ➤ Inoculation de la galerie

- Ensemencer la galerie avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule.
- Tenir la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles.
- Pour les caractères encadrés (CIT, VP, GEL) : remplir entièrement la cupule (tube et orifice) pour mise en aérobiose.
- Pour les autres caractères, ne remplir que le tube.
- Pour les caractères soulignés (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE) : remplir l'orifice de la cupule avec de l'huile de vaseline stérile mise en anaérobiose

- Refermer la boîte et mettre à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. (**Stanckebrandt et al., 2001**).

### II.6.3. Interprétation

- L'identification est obtenue à partir du profil numérique.
  - Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés en groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est attribuée pour chaque test.
  - La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres.
  - Pour les isolats d'Actinomycètes, on a utilisé la galerie biochimique comme un test confirmative, d'une part et pour rajoutés d'autres résultats aux activités de biodégradation notamment sur l'assimilation des sucres d'autre part.

### II.7. Identification numériques

La lecture des galeries d'identification biochimiques, et les tests physiologiques, métaboliques des isolats d'Actinomycètes, ainsi que la détermination de la similarité entre ces souches, repose sur l'établissement d'un dendrogramme qui rapporte sous forme binaire (0,1), respectivement, la négativité ou la positivité de ces tests avec chaque souche, qui a été effectuée à l'aide du logiciel XLstat. Les résultats sont ainsi obtenus sous forme d'un Dendogram.

### II .8. Étude de l'activité antibactérienne des Actinomycètes

Ce test est effectué pour la mise en évidence de la production des métabolites bioactives tels que les antibiotiques vis-à-vis de différentes bactéries Tests,

#### II.8.1. Culture des Bactéries-tests en milieu solide

L'activité antibactérienne des souches Actinomycétales est recherchée contre des bactéries-tests, qui sont des souches de référence , elles sont constituées de bactéries à coloration de Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 , *Micrococcus luteus* , *Bacillus subtilis* ATCC6633 et des bactéries de coloration de Gram négative *E.coli* ATCC25422,, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853et *E.coli* DH5a et une autre collection d'isolats cliniques, ces derniers sont ensemencés sur un milieu de Laureat Bertani (LB) solide par la méthode de strie d'épuisement à l'aide d'une pipette pasteur afin de vérifier la pureté de chaque souche puis incubés à 37 °C pendant 24 heures.



### II.8.2. Préparation de l'inoculum (des bactéries-tests)

Chaque bactérie test estensemencée dans des tubes coniques contenant 10ml de milieu LB liquide pour l'obtention d'un inoculum d'une densité optique (DO) de 0,04.

### II.8.3. Application des cylindres d'Agar

Les souches d'Actinomycètes sontensemencées sur différents milieux (ISP2, GYEA, Bennet), ces milieux présentent des milieux de production afin de mettre en évidence le ou les meilleurs milieux de production de biomolécules par stries serrées a partir de culture pure d'actinomycètes et incubées à 30°C ; après une période d'incubation des cylindres d'Agar de culture d'Actinomycètes de 6mm de diamètre sont prélevés de chaque milieu de production à l'aide d'un emporte-pièce et déposés à la surface du milieu LB gélose mole (voire annexe), préalablementensemencé dans la masse par les bactéries-tests (DO 0,04) (**Kitouni, 2007**), les boîtes sont alors mises à 4°C pendant 1 heure, pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis incubées à 37 C° pendant 24 heures. Après incubation, les diamètres (mm) des zones d'inhibition apparus autour des cylindres d'actinomycètes sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (**Boughachiche, 2005**), ce test a été effectué après 3 jours d'incubation vis-à-vis de trois bactéries tests (IC1,IC2,I C3), après 7 jours d'incubation, vis-à-vis de cinq souches indicatrices *Micrococcus luteu* , *Psoudemonas aeruginosa ATCC27853* , *Bacillus subtilis ATCC6633*, *Staphylococcus aureus ATCC25293* , *E.coliDH5α* et au dixième jour vis-à-vis de l'ensemble des bactéries tests (22 bactéries tests).

### II.9. Identification des Bactéries-tests d'origine clinique

L'identification des bactéries-tests d'origine clinique, a été effectuée au moyen de l'Api 20 E pour les bactéries-tests, ensuite incubées à 37 C° pendant 24 heures, alors que pour les bactéries Gram négatif, les Bactéries à Gram positive, ont été préalablement identifiées par les services cliniques.

### III. Résultats et Discussion

Dans le cadre de ce travail, on a étudié la biodiversité de 13 isolats d'Actinomycètes, du point de vue phénotypique, physiologique et plus particulièrement, on s'est intéressé à l'étude des propriétés métaboliques de ces isolats afin de démontrer s'il existe une diversité métabolique par la mise en évidence des activités de biodégradation et la recherche de la production de biomolécules à activité antibactérienne.

#### III.1. Repiquage et vérification de la pureté des isolats

Après repiquage successif sur le milieu ISP2 (milieu de conservation), (voir matériel et méthode), on a pu obtenir des colonies pures des isolats, qui sont caractérisées par une croissance moyenne au bout de 3<sup>ème</sup>, sauf les deux souches S 171 et S 211 qui montrent une croissance importante, tandis qu'aux 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours, la croissance de la plupart des souches est importante.

Les isolats S171, S211, S403, S430 et S431 ont des Mycéliums de substrat identiques de couleur marron et des MA de couleur marron claire, sauf que les deux isolats S171, S211, possèdent un Mycélium aérien gris ; la souche S417, présente une couleur de MA orange et crevette, l'isolat S129a MA blanc, à l'exception de S386 à une de couleur de MS et MA orange, alors que les autres souches restantes : S418, S419, S428 ont une couleur de MS différente l'une de l'autre; jaune, blanc (**Planche 1**).

L'isolat S418 produit des pigments diffusibles sur le milieu ISP2, de couleur jaune, la pigmentation diffusible produite par cet isolat d'Actinomycètes peut être des substances bioactives et ceci d'après **Margalith, 1992** qui rapporte que les Actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés.



**Planche 1** : photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur le Milieu ISP2

## III.2. Etude morphologique des isolats d'Actinomycètes

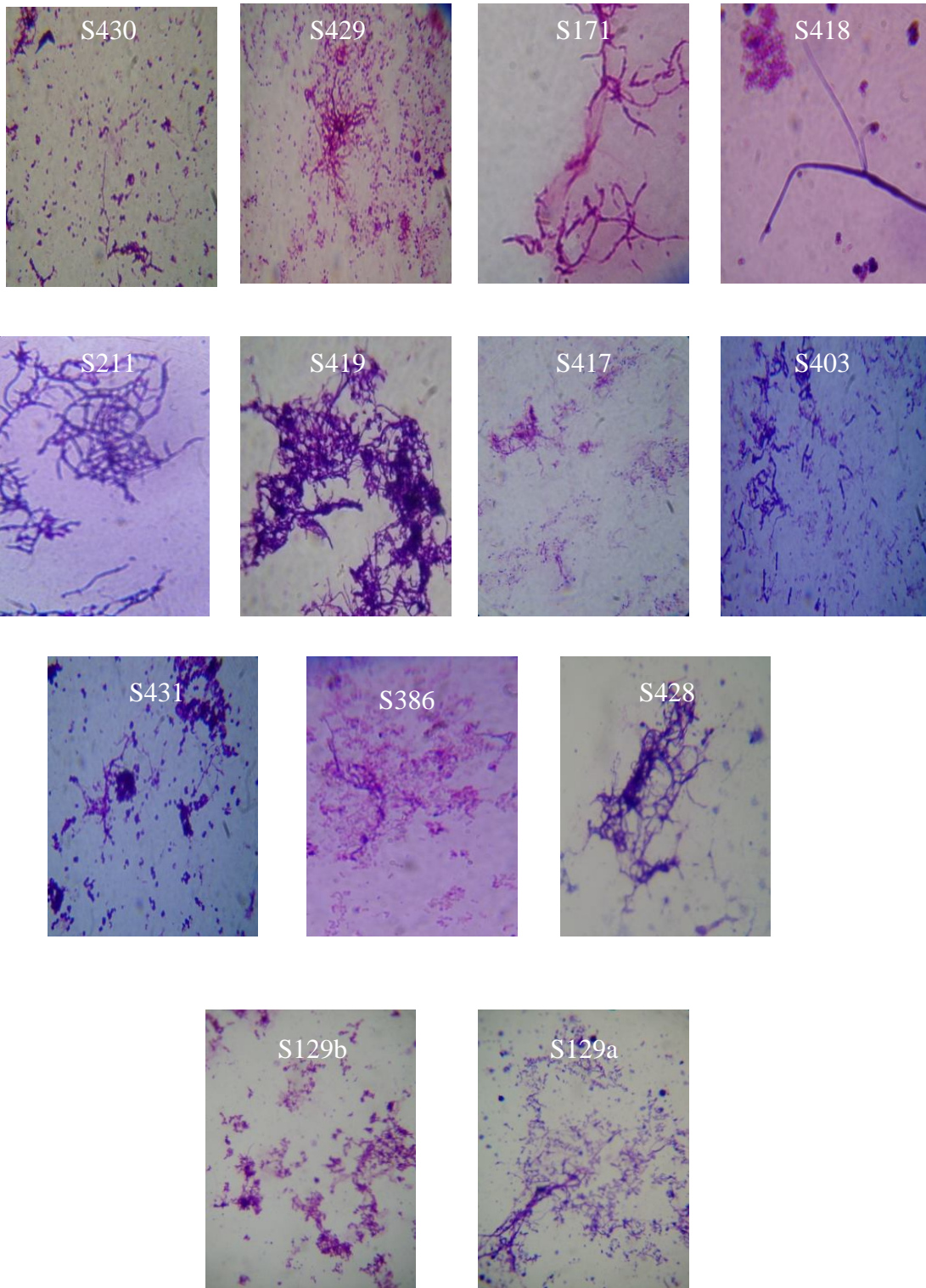
### III.2.1. Etude micromorphologique

Les résultats des observations microscopiques des isolats après coloration de Gram confirment l'appartenance de ces isolats aux groupes des bactéries Gram positif, ce test a permis d'apprécier un certain nombre de caractères tels que l'aspect des filaments et l'agencement des spores qui contribuent à l'identification des Actinomycètes (**Tableau 06**).

**Tableau 06:** Résultats des caractères micromorphologiques des 13 isolats

| N° de Souche | Observation microscopique après coloration de Gram                     |
|--------------|--|
| <b>S129a</b> | Long filament, avec la présence de spores en amas à courte chaîne      |
| <b>S129b</b> | Court filament, avec la présence de spores en amas et en courte chaîne |
| <b>S171</b>  | Long filament linéaire   |
| <b>S211</b>  | Long filament enchevêtré   |
| <b>S386</b>  | Long filament linéaire et présence de spores isolées                   |
| <b>S403</b>  | Court filament, avec la présence des spores à longue chaîne            |
| <b>S417</b>  | Court filament, et la présence des spores isolés                       |
| <b>S418</b>  | Long filament linéaire et la présence isolée ou bien en groupe         |
| <b>S419</b>  | Cercle de filament et enchevêtré                                       |
| <b>S428</b>  | Court filament avec la présence de spores en amas                      |
| <b>S429</b>  | Long filament avec la présence regroupée en amas                       |
| <b>S430</b>  | Court filament avec des spores isolées dispersés                       |
| <b>S431</b>  | Court filament, avec la présence des spores regroupé                   |

L'étude microscopique montre, que tous les isolats présentent un aspect filamenteux avec présence des spores isolés ou en amas qui sont parfois à court ou à longues chaînes, ce qui confirme leur appartenance au groupe majeur des Actinomycètes (**Planche 2**).



**Planche 2 :** photos des résultats de l'observation microscopique optique après la coloration de Gram ( $\times 100$ )



### III.2.2. Etude macromorphologique

L'étude macromorphologique est importante en taxonomie microbienne, et est basée sur l'étude des caractéristiques culturales à savoir : la croissance, la description de l'aspect des colonies (rond à plat, poudreuse, la couleur de MA, MS) et la production ou pas de pigments par les isolats d'actinomycètes cultivés sur la gamme des ISP (**ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 et ISP7**), après une période d'incubation, on remarque que la majorité de ces isolats se développe sur tous les milieux utilisés, avec différents degrés de croissance, allant d'une croissance moyenne à une croissance importante au bout de 7<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jours, (**Tableau 07**).

Par contre, il y a quelques isolats qui ne se développent pas sur certains milieux des ISP comme : S129a et S129b et ne croissent pas sur ISP3 et ISP5, S418 sur le milieu ISP3 et ISP4, (**Tableau 07**), donc on suppose qu'ils appartiennent à des genres autres que le genre *Streptomyces*.

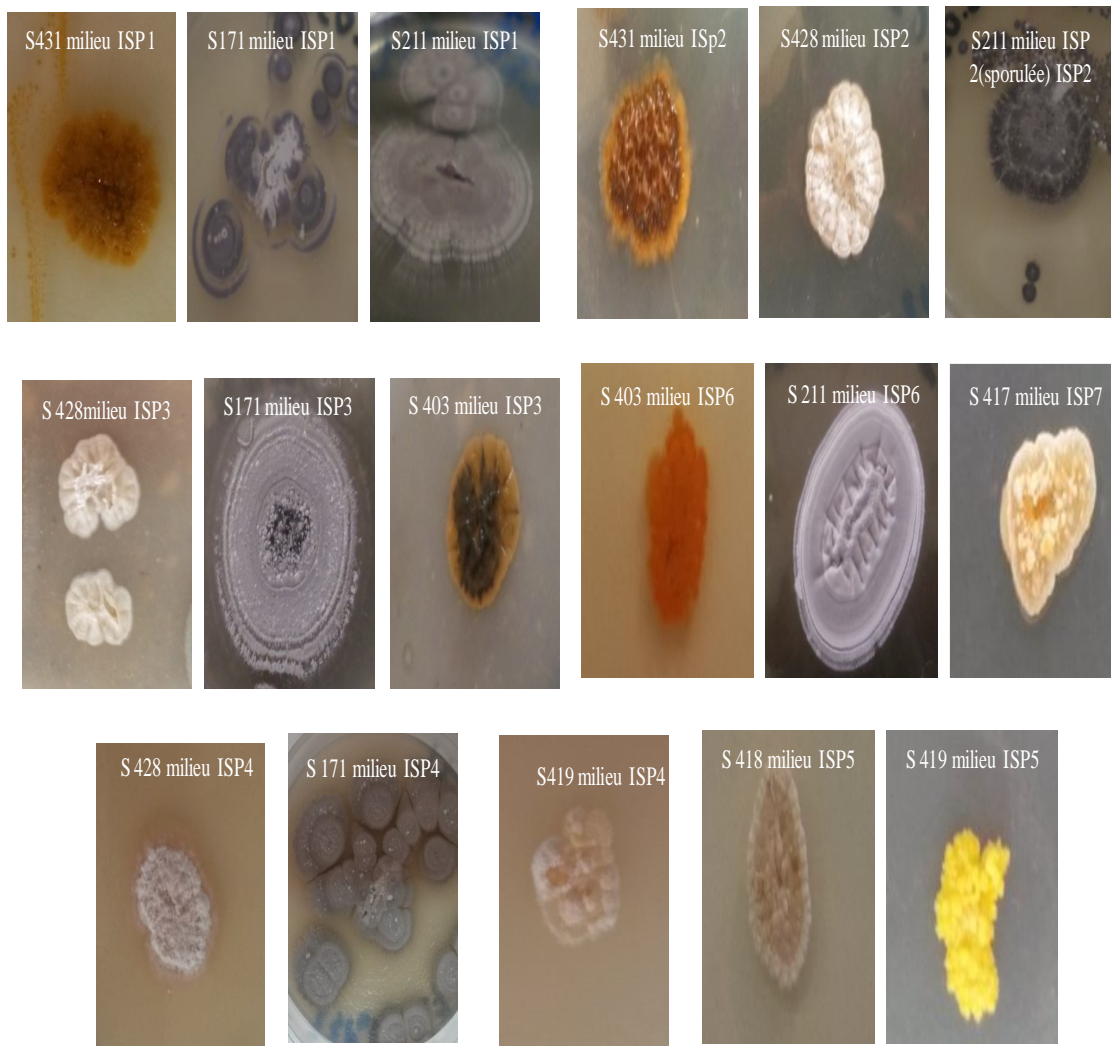
La croissance de tous les isolats débute par la formation d'un mycélium très ramifié dans le milieu et aussi à la surface de la gélose, la couleur de Mycélium aérien (MA) varie d'un isolat à un autre, qui peut être marron, orange pour la majorité, ou bien grise, blanchâtre et crevette pour certains isolats cultivés sur la gamme des ISP, la couleur de MA varie d'un milieu à un autre (**Planche 3**), donc, la composition de milieu peut être responsable de cette différenciation sur cette base **Oskay et al., (2004)**, on rapporte que la composition de milieu est importante pour le développement de MA pour certains genres d'Actinomycètes comme les *Streptomyces*.

Le MA peut prendre 2 ou 3 couleurs chez le même isolat sur les différents milieux par exemple : la souche S431 d'une couleur de MA marron sur le milieu ISP2, orange sur ISP1 et la souche S429, présente une couleur orange de MA sur milieu ISP1, marron sur ISP2, jaune sur ISP6. Par contre, d'autres isolats ont un MA où, la couleur ne change pas sur les différents milieux, comme le cas de : S428, leur MA et MS est blanc.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les isolats S211, S171 et S417 produisent des pigments de couleur brunâtre sur ISP6 et ISP7, cette couleur est caractéristique des pigments mélanoides, ces derniers ont une relation avec le métabolisme secondaire des Actinomycètes (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Selon **Murie et al., 2008**, les milieux de culture utilisés pour l'identification des Actinomycètes, ont un impact sur les caractéristiques physiologiques comme la production des pigments mélanoides (**Mocheva et al., 2002**).

Sur la base des observations phénotypiques (croissance, aspect des colonies et coloration de Gram), les deux isolats S171 et S211 présentent une bonne croissance sur la gamme des ISP, ce qui montre les traits typiques liés aux *Streptomyces*. D'après **Locci et al., (1989)**, les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de ISP, montrent généralement une morphologie typique des *Streptomycètes*.

Par ailleurs, les autres isolats présentent une croissance faible avec une absence de sporulation, ce qui explique qu'ils appartiennent à d'autres genres. Les isolats S386, S403, S430 et S431 ont l'aspect des colonies de couleur orange caractéristique du genre *Micromonospora*. Cependant les isolats S129a, S129b, S418, S428 ont des caractéristiques différentes des deux genres cités précédemment et appartiennent à d'autres genres du groupes des Actinomycètes, d'autres techniques, telle que l'identification moléculaire permettent de mieux préciser le rattachement par rapport au genre.



**Planche 3:** Photos des caractères cultureux de quelques isolats sur les différents milieux

**Tableau 07 :** Les caractères morphologiques des 13 isolats sur les différents milieux ISP Après 14 jours d'incubation.

| N° de Souche | Milieu | Croissance      | MS      | MA          | P       |
|--------------|--------|-----------------|---------|-------------|---------|
| S129 a       | ISP1   | moyenne         | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP2   | importante      | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP3   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP4   | faible          | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP5   | moyenne         | orange  | beige       | absence |
|              | ISP6   | moyenne         | blanc   | blanc       | absence |
|              | ISP7   | faible          | orange  | blanc       | absence |
| S129 b       | ISP1   | faible          | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP2   | importante      | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP3   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP4   | faible          | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP5   | faible          | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP6   | faible          | orange  | blanc       | absence |
|              | ISP7   | faible          | orange  | orange      | absence |
| S171         | ISP1   | importante      | marron  | Blanc, gris | absence |
|              | ISP2   | très importante | marron  | gris        | absence |
|              | ISP3   | très importante | marron  | gris        | absence |
|              | ISP4   | très importante | marron  | gris        | absence |
|              | ISP5   | importante      | marron  | blanc       | absence |
|              | ISP6   | importante      | marron  | blanc, gris | brune   |
|              | ISP7   | importante      | marron  | gris        | brune   |
| S211         | ISP1   | important       | marron  | gris        | absence |
|              | ISP2   | important       | marron  | gris        | absence |
|              | ISP3   | important       | marron  | gris        | absence |
|              | ISP4   | important       | marron  | gris        | absence |
|              | ISP5   | important       | marron  | gris        | absence |
|              | ISP6   | important       | marron  | blanc, gris | brune   |
|              | ISP7   | important       | marron  | jaune       | brune   |
| S386         | ISP1   | moyenne         | orange  | orange      | absence |
|              | ISP2   | importante      | orange  | orange      | absence |
|              | ISP3   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP4   | faible          | orange  | orange      | absence |
|              | ISP5   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP6   | moyenne         | orange  | orange      | brune   |
|              | ISP7   | faible          | orange  | jaune       | absence |
| S403         | ISP1   | moyenne         | orange  | orange      | absence |
|              | ISP2   | importante      | marron  | orange      | absence |
|              | ISP3   | moyenne         | marron  | orange      | absence |
|              | ISP4   | faible          | orange  | orange      | absence |
|              | ISP5   | faible          | orange  | orange      | absence |
|              | ISP6   | moyenne         | orange  | orange      | absence |
|              | ISP7   | faible          | orange  | orange      | absence |
| S417         | ISP1   | importante      | marron  | orange      | absence |
|              | ISP2   | importante      | marron  | marron      | marron  |
|              | ISP3   | faible          | orange  | orange      | absence |
|              | ISP4   | faible          | jaune   | jaune       | absence |
|              | ISP5   | faible          | jaune   | jaune       | absence |
|              | ISP6   | important       | orange  | orange      | absence |
|              | ISP7   | faible          | marron  | orange      | absence |
| S418         | ISP1   | moyenne         | Jaune   | jaune       | absence |
|              | ISP2   | importante      | Jaune   | jaune       | jaune   |
|              | ISP3   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP4   | absence         | absence | absence     | absence |
|              | ISP5   | moyenne         | jaune   | jaune       | absence |
|              | ISP6   | importante      | jaune   | jaune       | absence |
|              | ISP7   | importante      | jaune   | jaune       | absence |



Suite de Tableau 07

| N° de Souche | Milieu   | Croissance   | MS  | MA   | P   |
|--------------|--|--|---|--|---|
| S419         | ISP1<br>ISP2<br>ISP3<br>ISP4<br>ISP5<br>ISP6<br>ISP7 | moyenne<br>importante<br>faible<br>moyenne<br>moyenne<br>faible<br>faible      | Blanc<br>blanc<br>jaune<br>jaune<br>blanc<br>blanc<br>blanc         | blanc<br>beige<br>blanc<br>blanc<br>beige<br>blanc<br>beige                                    | absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence |
| S428         | ISP1<br>ISP2<br>ISP3<br>ISP4<br>ISP5<br>ISP6<br>ISP7 | faible importante<br>moyenne<br>moyenne<br>faible<br>important<br>faible       | blanc<br>blanc<br>blanc<br>jaune<br>jaune<br>blanc<br>blanc         | blanc<br>blanc<br>blanc<br>blanc<br>blanc<br>blanc<br>blanc                                    | absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>brune<br>absence   |
| S429         | ISP1<br>ISP2<br>ISP3<br>ISP4<br>ISP5<br>ISP6<br>ISP7 | Moyenne<br>moyenne<br>faible<br>faible<br>faible<br>moyenne<br>faible          | orange<br>marron<br>orange<br>orange<br>orange<br>jaune<br>orange   | orange<br>marron<br>orange<br>orange<br>orange<br>jaune<br>orange                              | absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>jaune<br>jaune     |
| S431         | ISP1<br>ISP2<br>ISP3<br>ISP4<br>ISP5<br>ISP6<br>ISP7 | moyenne<br>moyenne<br>faible<br>faible<br>faible<br>important<br>faible        | orange<br>marron<br>orange<br>absence<br>orange<br>orange<br>marron | orange<br>marron<br>orange<br>absence<br>orange<br>orange<br>marron                            | absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence |
| S430         | ISP1<br>ISP2<br>ISP3<br>ISP4<br>ISP5<br>ISP6<br>ISP7 | importante<br>importante<br>moyenne<br>moyenne<br>absence<br>moyenne<br>faible | orange<br>marron<br>marron<br>marron<br>absence<br>marron<br>marron | orange<br>marron claire<br>marron claire<br>jaune<br>absence<br>marron claire<br>marron claire | absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>absence<br>brune<br>absence   |

### III.3. Etude des caractères physiologiques

#### III.3.1. La croissance à différentes températures

Les résultats de croissance à différentes températures de 13 isolats d'Actinomycètes étudiés sont résumés dans le **tableau 08**.

**Tableau 08:** Les résultats de test des croissances des 13 isolats à différentes températures

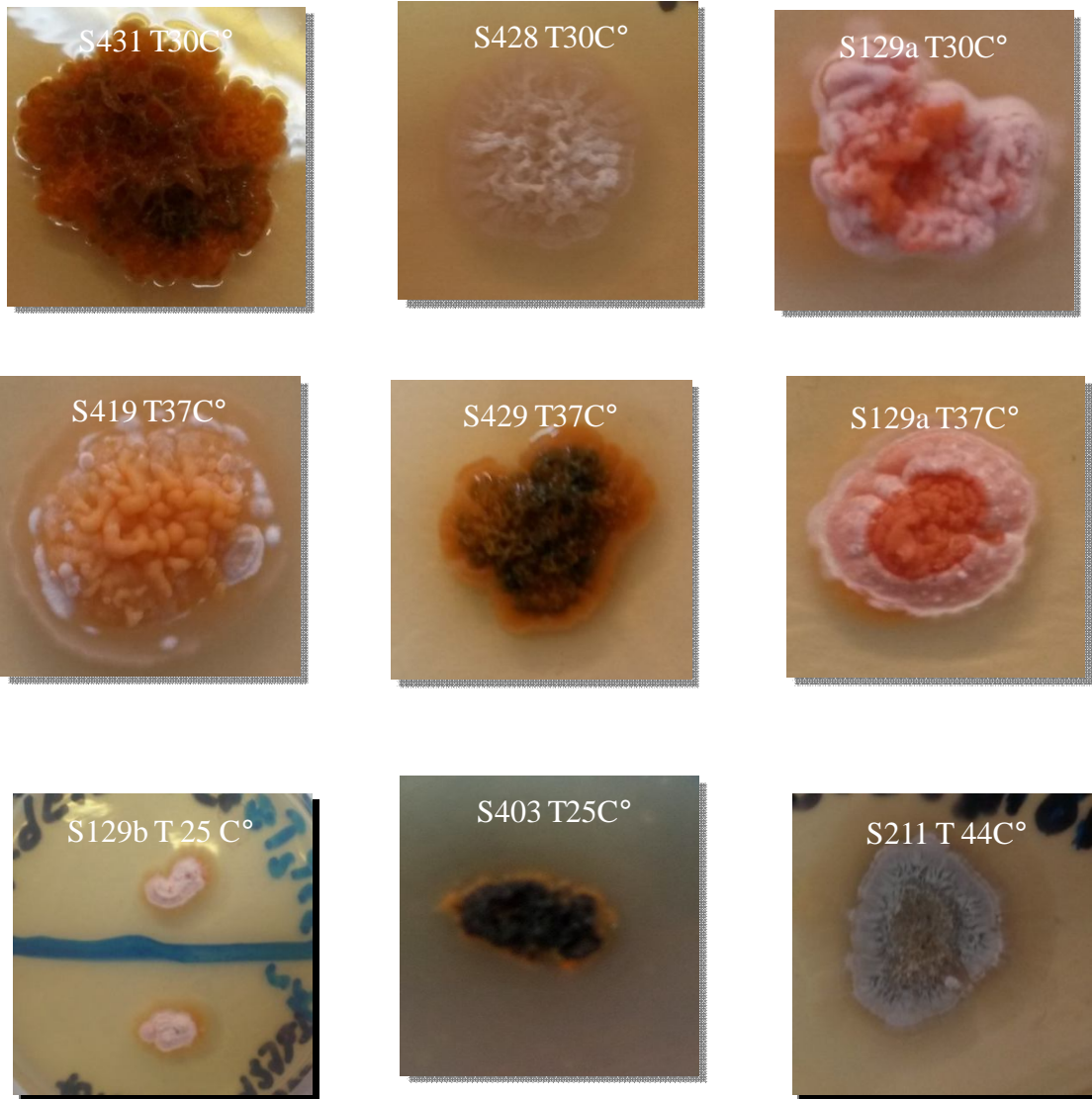
| Température<br>N° de Souche | 4C° | 25C° | 30C° | 37C° | 44C° |
|-----------------------------|-----|------|------|------|------|
| S129 a                      | -   | +    | ++   | ++   | +/-  |
| S129 b                      | -   | +    | ++   | +/-  | +/-  |
| S171                        | -   | ++   | +++  | ++   | +    |
| S211                        | -   | ++   | +++  | ++   | +    |
| S386                        | -   | +    | ++   | ++   | +/-  |
| S403                        | -   | +    | ++   | ++   | +/-  |
| S417                        | -   | +    | ++   | ++   | -    |
| S418                        | -   | +    | ++   | +/-  | -    |
| S419                        | -   | +/-  | ++   | +/-  | -    |
| S428                        | -   | +/-  | ++   | ++   | -    |
| S429                        | -   | +/-  | ++   | +    | -    |
| S430                        | -   | +/-  | ++   | +    | +/-  |
| S431                        | -   | +    | ++   | +/-  | +/-  |

**(-): Pas des Croissance, (+/-): Faible, (+): Moyenne, (++): Importante, (+++): très Importante**

Selon les résultats exprimés dans ce tableau, nous avons discerné une meilleure croissance à température 30 C°, essentiellement les souches S171et S211 caractérisées par une croissance très importante qui se traduit par un développement plus important du MA, tandis qu'elle est moyenne à 37 C° et pour d'autres, elle est importante comme S386et S403 mais elle est faible à 44 C°, sauf que les souches S417, S418, S419, S428, S429 ne se développent pas à cette température ; ainsi, on a constaté une absence totale de leur croissance à 4C° (**Planche 4**).

Ces résultats sont analogues à des notions mentionnés dans le travail de **Smaoui, 2010** qui consistent à ce que les Actinomycètes qui croient à des températures comprises entre 30 et 40°C sont des Actinomycètes mésophiles (**Kitouni,2007**) et les thermophiles (**Leveau et Bouix,**

1993 ) se développent à une température de 55°C, à partir de cette comparaison, on peut dire, que nos isolats sont des Actinomycètes mésophiles (30 à 37°C).



**Planche 4:** Photos du test de croissance à différentes températures.

### III.3.2. La tolérance à différentes concentrations de NaCl

**Tableau 09** : Résultats de test des croissances des 13 isolats à différentes concentrations de NaCl % aux 14 jours

| N° de Souche \ Na Cl | % aux 14 jours |              |            |            |            |
|----------------------|----------------|--------------|------------|------------|------------|
|                      | Na Cl (0%)     | Na Cl (2,5%) | Na Cl (5%) | Na Cl (7%) | Na Cl(10%) |
| S129 a               | +/-            | +/-          | +/-        | -          | -          |
| S129 b               | +/-            | +/-          | +/-        | +/-        | -          |
| S171                 | ++             | ++           | ++         | ++         | +/-        |
| S211                 | ++             | ++           | ++         | ++         | +/-        |
| S386                 | +/-            | +/-          | -          | -          | -          |
| S403                 | +              | +            | +/-        | +/-        | -          |
| S417                 | +              | +/-          | +/-        | -          | -          |
| S418                 | ++             | ++           | +          | +          | +/-        |
| S419                 | +              | -            | -          | -          | -          |
| S428                 | ++             | +            | +          | +/-        | -          |
| S429                 | ++             | ++           | +          | +/-        | -          |
| S430                 | +              | +            | +/-        | -          | -          |
| S431                 | +              | +            | +          | -          | -          |

**(-): Pas des C, (+/-): Faible, (+): Moyenne, (++): Importante**

D'après les résultats du **tableau 09**, on remarque que tous les isolats se développent sur le milieu où la concentration de NaCl est nulle (**0%**), ce qui explique que ce ne sont pas des isolats halophiles (**Messaoudi, 2011**), et la majorité de ces isolats tolère jusqu'à une concentration de 10 % de NaCl.

Par ailleurs, l'isolat S386 est inhibé par une concentration de 5%, ce qui correspond que cette souche ne tolère pas plus que 2.5 % de NaCl. (**Planche 5**).

Les études de **Tang et al., (2003)**, montrent que les Actinomycètes halophiles extrêmes exigent le NaCl pour leur croissance et capables de pousser à une concentration de (14,63 – 30,4%) NaCl et les Actinomycètes halotolérantes qui n'exigent pas le NaCl pour leur croissance et tolèrent (1,77 à 14,63%) de NaCl, donc, lorsqu'on compare ces notions avec nos résultats, on peut supposer que la majorité de ces isolats sont des Actinomycètes halotolérantes qui n'exigent pas le NaCl pour leur croissance, et certaines tolèrent jusqu'à 10% de NaCl, tels que les isolats S171et S211.



**Planche 5:** Photos de résultats du test tolérance à différentes concentrations de NaCl pour quelques isolats.

### III.3.3.La tolérance à différents degrés de pH

Selon les résultats représentés dans le tableau 10, on remarque que toutes les souches croient à un pH neutre comme les souches, et la majorité tolère jusqu'à pH(10), (**Planche 6**).

Il faut noter que tous ces souches ne se développent pas un pH acide à l'exception d'une souche S171, qui présente une tolérance majeure à pH(3), pH(5) (**Tableau 10**).

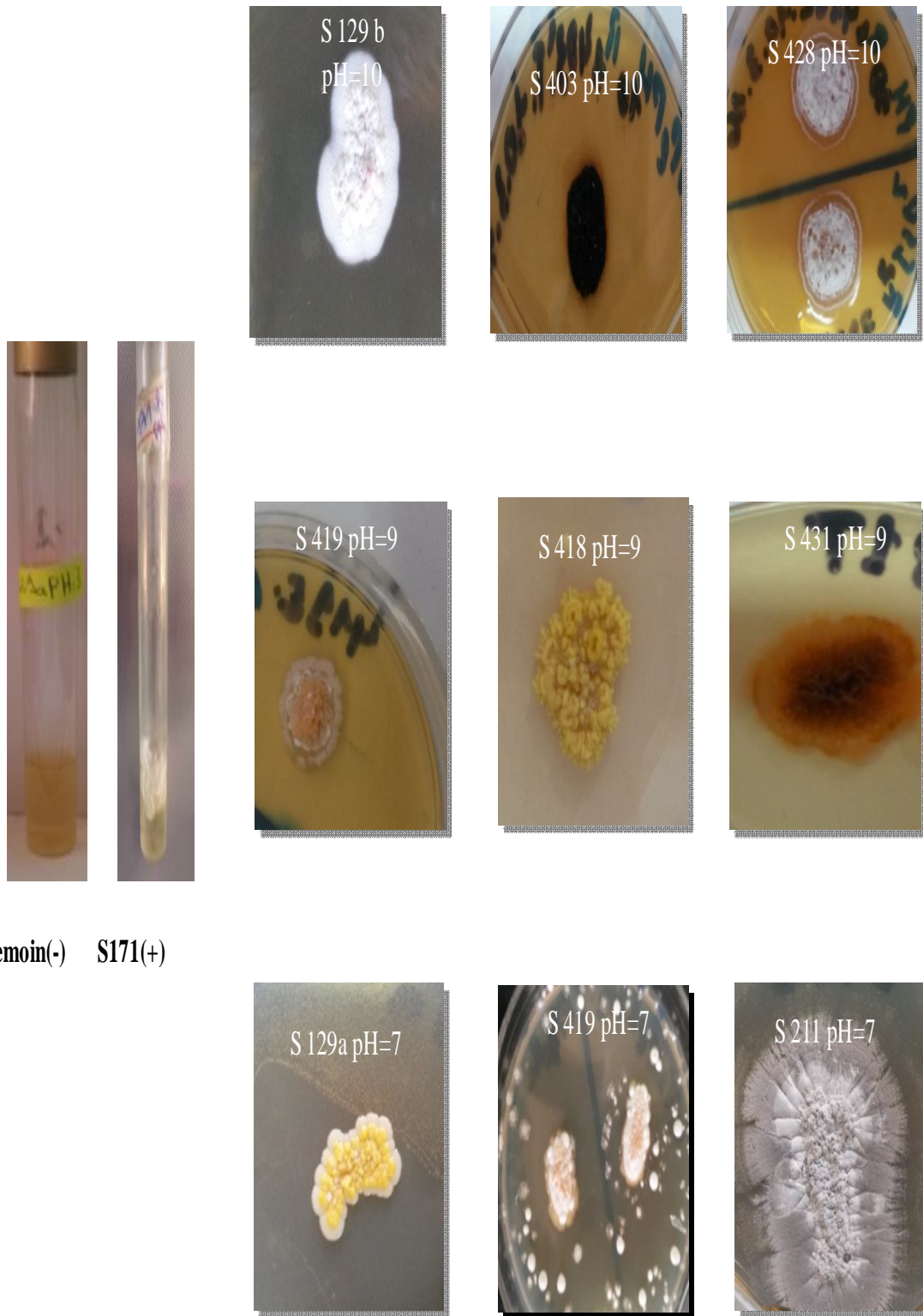
**Tableau 10:** Résultats de test de croissances des 13 isolats à différents pH

| N° de Souche \ pH | pH (3) | pH(5) | pH(7) | pH(9) | pH(10) |
|-------------------|--------|-------|-------|-------|--------|
| S129a             | -      | -     | ++    | +     | +      |
| S129b             | -      | -     | +     | +     | +      |
| S171              | +      | +     | ++    | ++    | ++     |
| S211              | -      | -     | ++    | ++    | ++     |
| S386              | -      | -     | +     | +     | +/-    |
| S403              | -      | -     | ++    | ++    | +      |
| S417              | -      | -     | ++    | ++    | +/-    |
| S418              | -      | -     | ++    | +     | +/-    |
| S419              | -      | -     | ++    | ++    | +      |
| S428              | -      | -     | ++    | ++    | ++     |
| S429              | -      | -     | ++    | +     | +      |
| S430              | -      | -     | +     | +     | +      |
| S431              | -      | -     | ++    | ++    | +      |

(-): Pas de croissance, (+/-): Faible, (+): Moyenne, (++) : Importante.

D'après Wang et al.,(2006), ils citent que les Actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et croissent dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin, ce qui concorde avec nos résultats : que la plupart de nos isolats sont neutrophiles et basophiles telles que les souches S129a, S129b, S431, mais, on peut observer certaines espèces acidophiles qui peuvent croître à des valeurs de pH compris entre 3 et 5 avec un optimum situé entre 5 et 5,5 : comme la souche S171.





**Planche 6:** Photos des résultats du test de tolérance à différents pH de quelques isolats.

### III.4. Etude de la biodiversité métabolique

Ce travail est réalisé pour la mise en évidence de la capacité métabolique de ces isolats telle que la production des différents types d'enzymes essentielles, comme l'amylase, la gélatinase, lipase et nitrate réductase...etc. ainsi, on a testé la capacité d'assimiler certains types de sucres ensemencés sur le milieu ISP9 (Boucheffa, 2011).

Ces tests reposent sur la culture des isolats d'Actinomycètes dans des milieux de culture appropriés pour chaque test (voir matériel et méthode), ce qui permet de déterminer après, la présence ou l'absence de l'activité enzymatique pour chaque isolat (Tableau 11).

#### III.4.1. Résultats d'Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase

D'après les résultats du tableau 11, on observe que 47 % de ces isolats présentent une activité amylolytique sur le milieu à base d'amidon, après addition du Lugol, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie traduite par la dégradation de l'amidon comme les souches S171, S211 et S386 (planche 7 a) cela montre que les souches testées possèdent une amylase, alors que l'apparition d'une couleur brune des souches S129a, S129b, S417 signifie que l'amidon n'a pas été hydrolysé (Kuo et Hartman 1966 ; Chao et Wen, 2007).

#### III.4.2. Résultats d'hydrolyse de la gélatine

Après 7 jours d'incubation, l'éclaircissement de la bandelette de film photographique est apparu chez 77% des isolats, ce qui traduit l'hydrolyse de la gélatine par une enzyme extracellulaire qui est la gélatinase, (Planche 7b), sauf dans le cas de la souche S418, la couleur de bandelette ne change pas comme dans le cas du témoin négatif durant la période d'incubation (Tableau 11). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Djaballah (2010) dont il a assigné que la liquéfaction de la gélatine par des souches halophiles et halotolérantes isolées de la sebkha d'Ain M'Lila qui sont proches des genres *Actinopolyspora*, *Streptoaloteichus*, *Streptosporagium*, *Kitasatospora*. Ce test a été confirmé par le résultat du test de l'Api 20. (Tableau 12).



### III.4.3. Résultats d'hydrolyse de la caséine

Les résultats de ce test apparaissent après une culture de 7 jours sur un milieu à base de caséine voir (Matériel et méthode) l'hydrolyse de caséine est témoinnée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (**Planche 7 a**), qui représente 47 % de ces isolats (**Tableau 11**).

Ces résultats concordent avec ceux présentés par **Gulve et Deshmukh (2011)**, pour l'étude des activités enzymatiques des Actinomycètes, où, ils ont montré que les genres *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolypora* possèdent une activité protéolytique, ainsi que les travaux de **Kurup et al., (1975)** qui montrent la capacité d'une nouvelle souche d'Actinomycètes thermophiles à dégrader la caséine (**Harvey, 1999**).

Dans ce milieu, on remarque que certaines souches produisent des pigments diffusibles, tel que la souche S211 caractérisé par un pigment de couleurs rose, la S129 à un pigment de couleur orange (**planche 8**), **Shirling et Gottlieb (1966)** recommandent, que ces pigments sont des substances bioactives produites par les Actinomycètes.

### III.4.4. Résultats de test de l'action sur le lait écrémé

Les résultats du **Tableau 11** montrent que la coagulation de lait écrémé est apparue chez 54% de ces souches (**Planche 7b**). Les Actinomycètes sont connu pour la production des coagulases (**Gordon et al., 1974**).

### III.4.5. Résultat de Test de dégradation des acides gras

La dégradation des acides gras est traduite par l'apparition d'un halo opaque autour de colonies, ce qui traduit la présence des estérases (**Sierra, 1957**), elle a été détectée chez 85 % de ces isolats (**Planche 7a**), ces résultats ressemblent à ceux présentés par **Sztajer et al., (1988)** qui ont montré la production des lipases appartenant principalement chez *Streptomyces fradiae* et *Streptomyces coelicolor* (**Hou et al., 1994 ; Alkama, 2014**).

Nos résultats montrent également, que parmi les souches qui ont donné un résultat positif, à savoir les isolats S211 et S171 qui est rattachées au genre *Streptomyces* possèdent une activité lipasique (**Tableau 11**).

### III.4.6. Résultats de test de dégradation des sels de sodium

La dégradation de sel de sodium est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du vert au bleu ou bleu-vert (alcalinisation) sur le milieu Citrate de Simmons, après la durée d'incubation, 47 % de ces souches comme S171, S417, S419, alors 53 % pour ces souches, le milieu garde sa couleur (verte) (**planche 7b**), indique que ces souches ne poussent pas sur ce milieu, (**Gordon et al., 1974**). Ces résultats sont confirmés par le système Api 20E où, on trouve les mêmes résultats **Tableau 12**.

### III.4.7. Résultats de test de production de Nitrate réductase

Les résultats de la réduction du nitrate par les souches d'Actinomycètes testées, figurent dans le **Tableau 11**, on constate que 77 % des souches testées présentent une réduction du nitrate, cette activité est traduite par une réaction colorée en rouge après l'ajout des deux réactifs qui sont le nitrate réductase 1 et le nitrate réductase 2, chez les souches S171, S211, S129a, S129b (**planche 7b**) (**Guérin, 1992**), sauf que les deux isolats (S386, S429) n'ont donné aucune coloration rouge qu'après l'addition de poudre de Zinc, et sont incapables de réduire le nitrate en nitrite.

A partir de ces résultats, on peut conclure que la majorité de ces isolats possèdent une nitrate réductase (**Planche 7b**), en effet, chez *Streptomyces*, **Hopwood (2003)** on a montré qu'il existe trois gènes qui codent les quatre sous unités de l'enzyme nitrate réductase, ce qui indique la capacité des Streptomycètes de croître dans des conditions microaérobies, donc on peut rapprocher ces isolats au genre *Streptomyces* (**Tableau 11**).

### III.4.8. Résultats d'hémolyse : recherche d'hémolysine

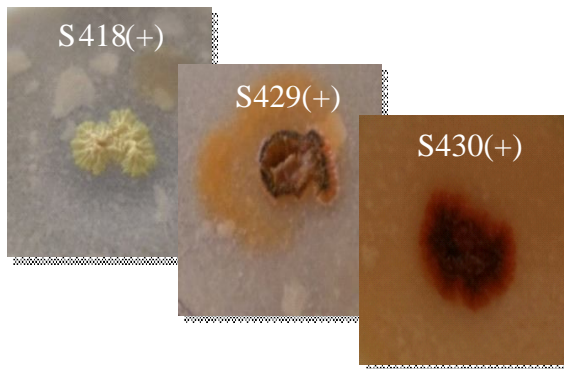
D'après le **tableau 10**, On remarque que 46 % de ces souches ont une activité hémolytique, 38% ont une activité  $\beta$  hémolytique et 8% présentent une zone verdâtre de type  $\alpha$  hémolytique (voir matériel et méthode) (**Planche7a**). Ces résultats sont similaires à ceux représentés par **Guérin et al (1992)** qui ont montré que la production de l'enzyme hémolysine par des souches  $\beta$  hémolytique sont des *Actinomyces pyogènes*.

**Tableau 11** : Résultats de tests de la biodiversité métabolique des 13 isolats

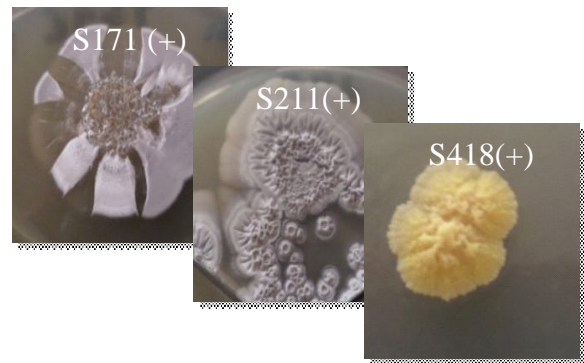
| Test<br>N° Souche | Amidon | Caséine-<br>ase | Lait<br>écrém<br>é | Estér-ase | Citrate<br>de<br>Simmon<br>s | ISP8<br>BN | Hém-<br>olyse | Gélat-<br>inase | Témoin-<br>négatif | Gluc-<br>ose | Arab-<br>inose | Fruct-<br>ose | Gala-<br>ctose | Man-<br>nitol | Ribose | Sorb-<br>itol | Xylul-<br>ose | Cellu-<br>lose |
|-------------------|--------|-----------------|--------------------|-----------|------------------------------|------------|---------------|-----------------|--------------------|--------------|----------------|---------------|----------------|---------------|--------|---------------|---------------|----------------|
| S129a             | -      | □<br>P :orange  | -                  | +         | -                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | +              | +             | -              | +             | +      | -             | -             | +              |
| S129b             | -      | □               | -                  | +         | -                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | -              | -             | -              | -             | +      | -             | -             | +              |
| S171              | +      | □<br>P : rouge  | +                  | +         | +                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | -              | +             | +              | +             | +      | -             | +             | +              |
| S211              | +      | □<br>P : rose   | +                  | +         | +                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | -              | +             | +              | +             | +      | -             | +             | +              |
| S386              | +      | □               | -                  | -         | -                            | -          | β             | +               | -                  | +            | -              | +             | -              | -             | -      | -             | -             | +              |
| S403              | -      | □               | +                  | +         | -                            | +          | β             | +               | -                  | -            | -              | +             | -              | +             | -      | -             | -             | -              |
| S417              | -      | □               | +                  | +         | +                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | -              | +             | -              | +             | +      | +             | +             | -              |
| S418              | +      | +               | +                  | +         | -                            | -          | γ             | -               | -                  | -            | -              | -             | -              | -             | -      | -             | -             | -              |
| S419              | +      | +               | -                  | +         | +                            | +          | γ             | +               | -                  | +            | -              | -             | -              | -             | +      | -             | +             | -              |
| S428              | +      | -               | +                  | -         | -                            | +          | α             | -               | -                  | +            | -              | -             | -              | -             | -      | -             | +             | -              |
| S429              | -      | □<br>P :orange  | +                  | +         | -                            | -          | β             | +               | -                  | +            | +              | -             | -              | +             | -      | -             | -             | -              |
| S430              | -      | □<br>P:marron   | -                  | +         | +                            | +          | β             | +               | -                  | -            | +              | +             | +              | +             | -      | -             | +             | -              |
| S431              | -      | +               | -                  | +         | +                            | +          | β             | +               | -                  | +            | -              | +             | +              | -             | -      | -             | +             | -              |

(-) : Absence, (+) : Présence, (α): Verdâtre, (β):Claire, (γ): Absence, (P) : pigmentation

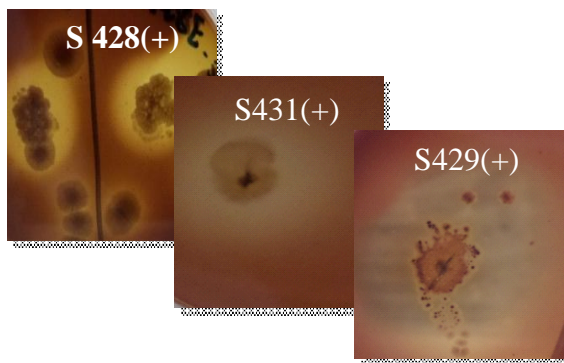
### Test Casiénase



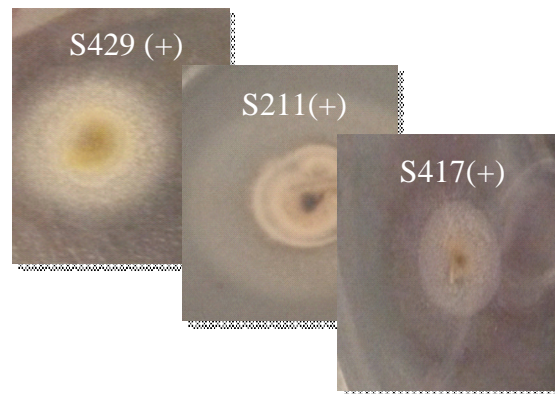
### Test amidon



### Test d'hémolyse



### Test d'estérase

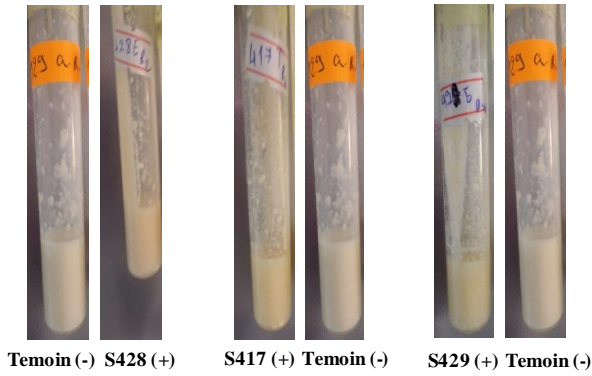


### Test de dégradation des sucres

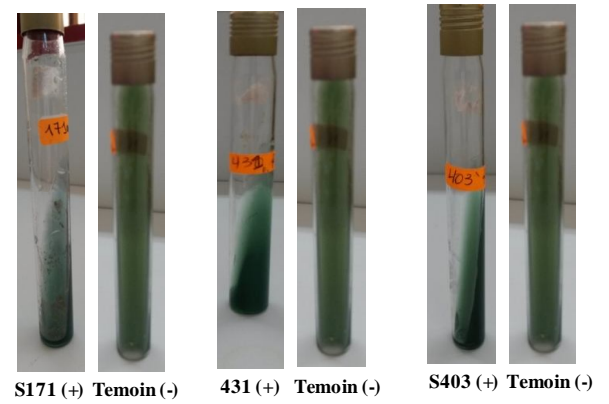


**Planche7a:** Photos des résultats de différents tests métaboliques.

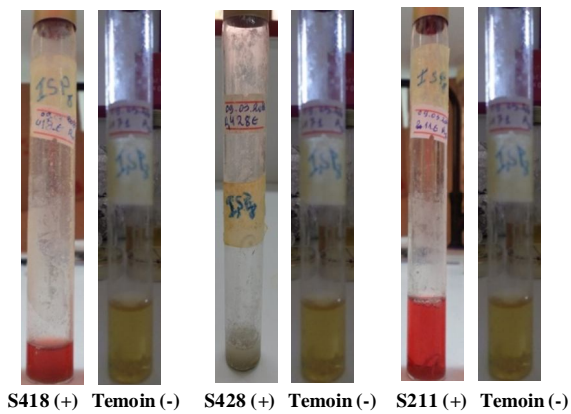
### Test de l'action sur lait écrémé



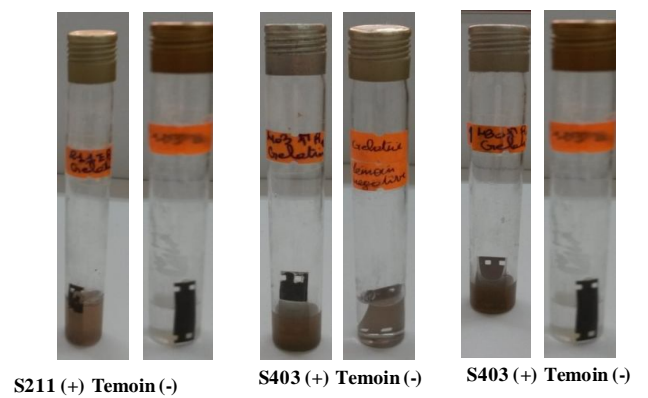
### Test de citrate de simonce



### Teste de Bouillon Nitrate



### Test de gélatinase



### Test cellulase

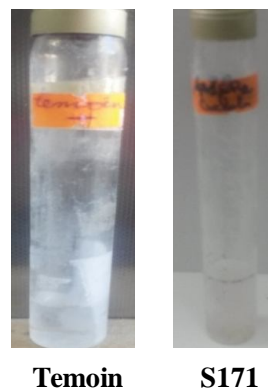


Planche 7b: Photos des résultats de différents tests métaboliques.

### **III.4.9. Résultat de test d'utilisation des composés glucidique**

D'après le **tableau 11**, on remarque une absence de croissance en milieu (**ISP9**) à concentration des glucides 0 %, ce qui correspond au témoin négatif, par ailleurs 78 % des souches des Actinomycètes utilisent le glucose comme source de carbone, ce qui correspond au témoin positif, et la majorité de ces isolats présentent une croissance moyenne, voir importante, sur le milieu à base de Fructose, Ribose, Mannitol, xylose et Galactose.

La croissance des isolats S171, S211 en présence de différentes sources carbonées, a démontré leur capacité à assimiler la plupart de ces glucides, cependant les souches S430, S431, S428 ont poussé seulement en présence de trois glucides à savoir : le galactose, xylose Fructose. Tous les isolats n'ont pas poussé sur le milieu à base de sorbitol à l'exception de la souche S417 (**Planche 7a**).

Les résultats de **tableau 11**, montrent que 39 % des souches d'Actinomycètes se développent sur la bandelette de papier Wattman, ce qui explique que ces isolats présentent une activité cellulolytique (**Planche 7b**).

Il faut noter que ces tests sont confirmés et complétés par le système Api 20E, les résultats de galerie biochimique sont reportés dans les **tableau 12**, qui montre que la plupart des isolats des Actinomycètes, ont la capacité de produire certains types d'enzymes, essentiellement la gélatinase (**Planche 8**) ; ainsi on résulte que ces isolats ont utilisé les sucres comme une source de carbone de façon différente, ce qui est analogue à des résultats obtenus précédemment (**Planche7**).

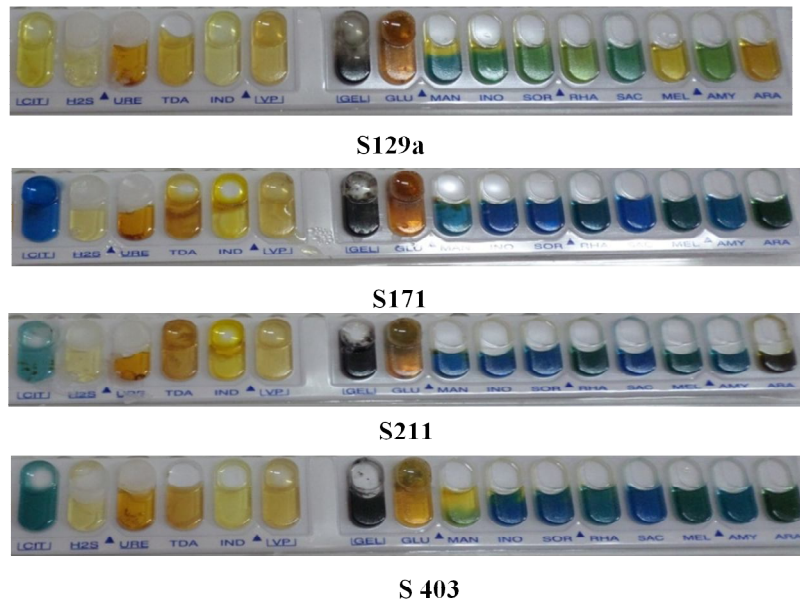
Ces résultats sont similaires avec ceux qui se trouvent dans les travaux de **Boudjalleb (2009)**, qui utilisent le système Api 20E, on trouve que les différentes souches d'Actinomycètes sont capables d'utiliser des différentes sources carbonées et produisent certaines enzymes nécessaires pour leur métabolisme. Ces enzyme ont été utilisées dans plusieurs domaines en biotechnologie comme dans les industries alimentaires, l'industrie du textile, la bioconversion des déchets cellulosiques (**Ando et al., 2002 ; Sukumaran et al., 2005**).

**Tableau 12:** Résultat de l'Api 20E pour les enzymes produites par les 13 isolats

| Paramètre   | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H <sub>2</sub> S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |
|-------------|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S 129a      | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   |
| S 129b      | +    | -   | -   | -   | -   | -                | +   | +   | -   | -  | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 171       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 211       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 386       | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 403       | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 417       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   |
| S 418       | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | +   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 419       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 428       | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | +   | -   | -  | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| S 429       | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | +   | -   | -  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| S 430       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |
| S 431       | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| %des testes | 7%   | 0%  | 0%  | 0%  | 46% | 0%               | 7%  | 40% | 0%  | 0% | 77% | 77% | 38% | 15% | 7%  | 15% | 7%  | 15% | 7%  | 23% |

k



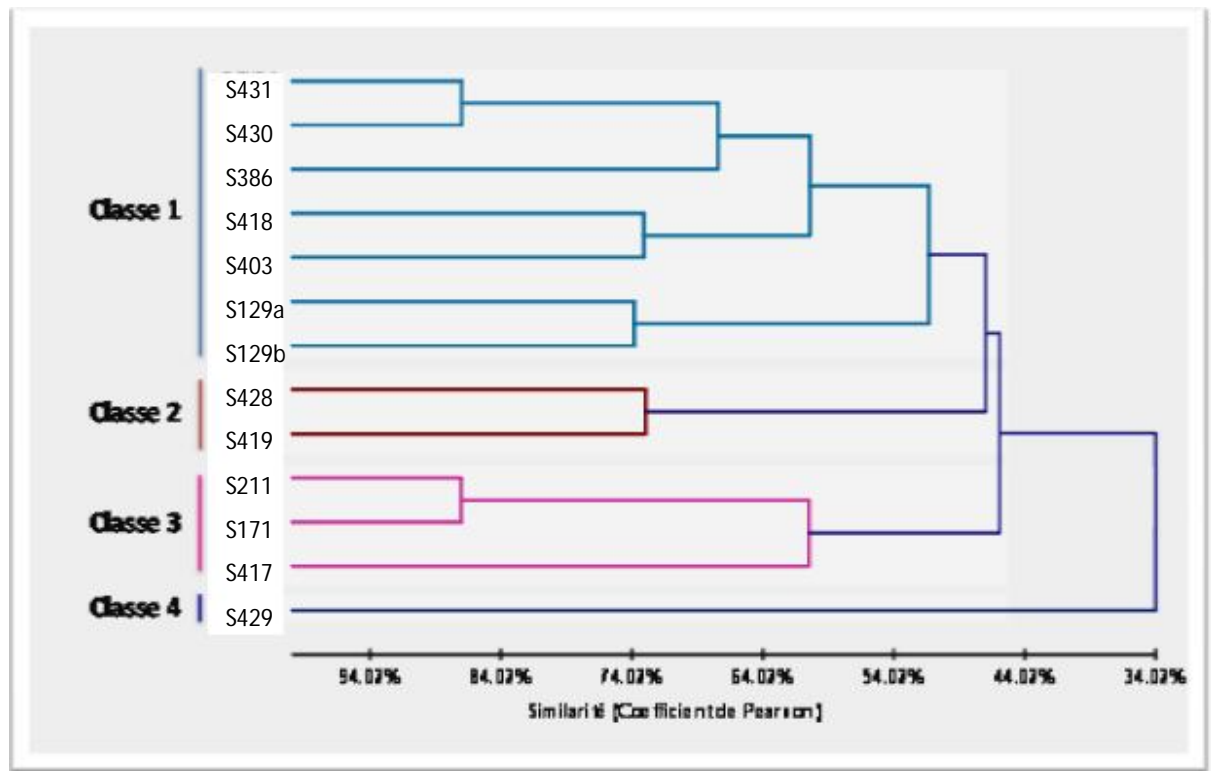


**Planche 8 :** Photos des résultats de système Api 20E des quelques isolats.

### III.5. L'identification numérique

Les résultats de l'identification numérique sont représentée sous forme d'un Dendrogram (Figure 12) , ce dernier illustre la relation entre les isolats d'Actinomycètes ordonnées, regroupées en fonction de leur similitude en quatre classes : chaque classe se caractérise par des propriétés métaboliques et des aspects morphologiques similaires entre eux, ce qui les rapprochent dans le même genre d'Actinomycètes comme , La classe 1 : qui est composée de 7 souches (S431, S430, S386, S418, S403, S129b, S129a) déterminées comme des *Micromonospora* , , la classe 3 regroupe : (S171,S211,S417), sont rapprochés aux genres des *Streptomyces*, alors que la classe 2 : contient 2 souches (S428, S419) et la classe 4 regroupe seulement la souche S429, ont des caractères différents des autres groupes. Ces tests confirment les résultats obtenus lors de la caractérisation phénotypique.



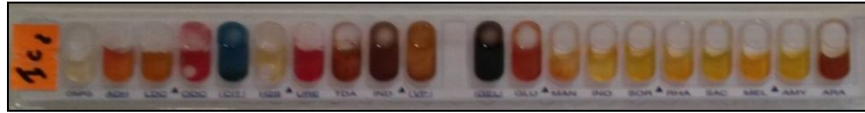


**Figure 12** : Dendrogramme représentatif de similarité des isolats d'Actinomycètes

### III.6. Résultats d'identification des bactéries-test

Pour les bactéries test d'origine clinique la lecture s'effectue après une période d'incubation (24 heures), on effectue la lecture des Api 20E ensemencés, à base de tableau de référence (voir annexe), on détermine le profil numérique spécifique pour chaque souche, ces résultats sont consultés par un logiciel d'identification.

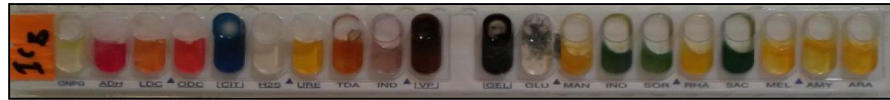
Les bactéries-tests sont identifiées comme suit : IC 1 : *Morganella morgani*, IC 2 : *Proteus mirabilis*, IC 3 : *Entérobacter cloacae*, IC 4 : *Serratia oderifera 1*, IC 6 : *Serratia ficaria 1*, IC7 : *Serratia ficaria* IC 8 : *Citrobacter koseri*, IC 9 : *Serratia oderifera 1*, IC10 : *Klebsiella terrigena*, IC 11 : *Entérobacter sakazakii*, IC 14 : *Klebsiella ornithinolytic*, IC 15 : *Serratia oderifera 1* (**Planche 9**) (**Tableau 13**). Mais les souches IC3, IC5, IC12 ont été préalablement identifiées comme des *Pseudomonas.sp.*



*Proteus mirabilis*



*Serratia oderifera 1*



*Citrobacter koseri*



*Klebsiella ornithinolytic*

Planche 9 : Photo des résultats du système Api 20E des Bactéries-tests.

**Tableau 13:** Résultat de l'Api 20E pour les bacteries-testes

| Les paramètres | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H <sub>2</sub> S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | identification                 |
|----------------|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------------|
| IC1            | -    | +   | +   | +   | -   | -                | +   | +   | +   | -  | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | <i>Morganella morganie</i>     |
| IC2            | -    | +   | +   | +   | +   | -                | +   | +   | -   | -  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | <i>Proteus mirabilis</i>       |
| IC4            | +    | -   | +   | +   | -   | -                | +   | +   | +   | -  | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | <i>Serratia oderifera 1</i>    |
| IC6            | +    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | -   | -   | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Serratia ficaria 1</i>      |
| IC7            | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -   | -   | -   | -  | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Serratia ficaria</i>        |
| IC8            | +    | +   | +   | +   | +   | -                | -   | +   | +   | -  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Citrobacter koseri</i>      |
| IC9            | +    | +   | +   | +   | +   | -                | +   | +   | +   | -  | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Serratia oderifera 1</i>    |
| IC10           | -    | -   | +   | -   | -   | -                | -   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Klebsiella terrigena</i>    |
| IC11           | +    | +   | -   | +   | +   | -                | -   | +   | -   | -  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Entérobacter sakazakii</i>  |
| IC14           | +    | -   | -   | +   | +   | -                | +   | +   | +   | +  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Klebsiella ornitholytic</i> |
| IC15           | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -   | -   | +   | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | <i>Serratia oderifera 1</i>    |

### III.6. Résultats des tests d'activités

L'activité antibactérienne de nos souches, a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar, cette technique nous a permis, de détecter l'effet inhibiteur des souches d'Actinomycètes envers les bactéries-tests utilisées (**Tortora et al., 1979**), la faible concentration de l'inoculum des bactéries-tests reconnue aussi comme un des facteurs intervenant dans l'augmentation de la sensibilité de la technique (**Brook et al., 1995**). Dans le but d'accroître encore la sensibilité de la détection, une pré-diffusion des molécules actives dans la gélose ensemencée, a été favorisée par un séjour d'une heure à 4° C avant l'incubation comme le préconise (**Totora et al., 1979**), ces tests d'activités nous permettent également de faire un criblage sur les souches productrices des biomolécules et sur le meilleur milieu de production pour cela, les souches d'Actinomycètes ont été cultivées dans différents milieux de production (milieu ISP2, Bennet et GYEA).

Les résultats de ce teste montre une absence d'une activité inhibitrice des souches d'Actinomycètes vis-à-vis des bactéries-testes , durant le 3ème jour , mais on remarque que ces isolats d'Actinomycètes commencent leur production des molécules bioactives a partir du 7ème jours jusqu'à de 10ème jours (**tableau14**), notamment la souche S171 qui semble être la meilleure en ce qui concerne son activité pour les trois souches de bactéries tests à Gram positif : *Microcoques luteus* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 et *Staphylococcus,sp* (IC13), et deux souches bactériennes à Gram négatif *Serratia ficaria* (IC7) , *Entérobacter sakazakii* (IC11) , avec des diamètres d'inhibition variables d'un milieu à un autre, ce qui laisse supposer, que cet isolat qui est rattaché au genre *Streptomyces* produit une variété de molécules bioactives.

L'isolat S211 à une forte activité inhibitrice contre *Serratia ficaria* (IC7), *E.coli* ATCC 25422, *Microcoques luteus* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, cette production est plus importante sur le milieu de Bennet ainsi, cet isolat produit sur le milieu GYEA une molécule de faible activité vis-à-vis de la bactérie-test *Citrobacter koseri* (IC8).

Les isolats S419, S430, ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus.sp* (IC13) , *Staphylococcus* ATCC, *Morganella morganie* (IC1), *Proteus mirabilis* (IC2), *Serratia oderifera* I(IC4), mais l'isolat S430 cultivé sur ISP2 est le plus actif, car les diamètres des zones d'inhibition sont plus importants de ceux de la souche S419 qui produit moins sur le milieu Bennet, ce qui suppose que la souche S430 à une forte concentration de molécules bioactives libérées, ou forcement des molécules de structures chimiques différentes puisque ces molécules sont produites dans des milieux différents (ISP2 et Bennet) (**Koch, 1999**).

En outre, les résultats de ce screening montrent aussi une activité antimicrobienne des isolats S417, S418, S403, 129b vis-à-vis des trois Bactéries-tests : comme les isolats S417, S418 qui présentent un spectre d'activité contre *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus.sp* (IC13), *Micrococcus luteus* ATCC le plus important sur le milieu Bennet, d'un autre coté, les différents isolats S428, S386, présentent une activité contre seulement 2 bactéries-tests qui sont *Citrobacter koseri* (IC8), *Klebsiella terrigena* (IC10). Cependant la souche 129a, n'est active que contre *Staphylococcus.sp* (IC13), et la souche S429 cultivée sur ISP2 à une activité inhibitrice contre *E.coli* (**planche 10**).

Les résultats ont prouvé que cinq isolats d'Actinomycètes ont une activité contre *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition qui se situe entre 20 et 30 mm de diamètre, les travaux de **Fourati-Ben Fguira et al., (2005)**, ont montré que les *Streptomyces* isolés du sol d'Oasis Tunisien, possèdent une activité inhibitrice entre 21 et 32 mm sur ce germe.

On constate également que dix isolats des Actinomycètes ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus.sp* (IC13) d'un diamètre d'inhibition variant de 15 à 30, cela concorde avec les résultats de **d'Aouiche et al., (2011)**, qui ont démontré que l'isolat PAL111 qui est proche phylogénétiquement de l'espèce streptomyces ambofaciens a une activité contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 avec un diamètre 18 mm.

La souche à Gram négatif, *E. coli* ATCC présente aussi une résistance à l'exception de deux Souches d'Actinomycètes S403, S429, S430 avec des zones d'inhibition respectivement de 15 et 20 mm, des résultats similaires sont mentionnés par **Şahin et Uçur (2003)** où deux souches parmi les 15 souches de *Streptomyces* isolées du sol, sont actives avec des zones d'inhibition entre 10 et 20 mm de diamètre, le même résultat est rencontré dans les travaux de **Oskay et al., (2004)** où, sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm, en effet, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des Actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, ceci a été également constaté par **(Hasavada et al., 2006 ; Atta et al., 2009)**.

Aucune activité n'a été observée pour la bactérie-test *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, en effet, les travaux de **Şahin et Uçur, (2003)**, confortent nos résultats, de même ; **Boudjella et al. (2006)** ont remarqué une absence d'effet de la souche *Streptosporangium* sur *P. fluorescens*.

**Tableau 14 :** Les résultats de test d'activité des 13 isolats d'actinomyces contre 22 souches

| les souches<br>Actinomycète | <i>Morganella morganie</i> (IC1) |     |   | <i>Porteus mirabilis</i> (IC2) |    |   | <i>Pseudomona s.sp 1</i> (IC3) |   |   | <i>Serratia oderifera 1</i> (IC4) |      |   | <i>Pseudomon as.sp 2</i> (IC5) |   |   | <i>Serratia ficarai 1</i> (IC6) |   |   | <i>Serratia ficaria</i> (IC7) |       |   |
|-----------------------------|----------------------------------|-----|---|--------------------------------|----|---|--------------------------------|---|---|-----------------------------------|------|---|--------------------------------|---|---|---------------------------------|---|---|-------------------------------|-------|---|
|                             | I                                | B   | G | I                              | B  | G | I                              | B | G | I                                 | B    | G | I                              | B | G | I                               | B | G | I                             | B     | G |
| Les milieux                 |                                  |     |   |                                |    |   |                                |   |   |                                   |      |   |                                |   |   |                                 |   |   |                               |       |   |
| S129a                       | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S129b                       | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | +++++ | - |
| S171                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | ++                            | -     | - |
| S211                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | +++   | - |
| S386                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S403                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | +++   | - |
| S417                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S418                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S419                        | -                                | +++ | - | -                              | ++ | - | -                              | - | - | -                                 | ++++ | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S428                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S429                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S430                        | ++++                             | -   | - | ++++                           | -  | - | -                              | - | - | +++                               | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | -                             | -     | - |
| S431                        | -                                | -   | - | -                              | -  | - | -                              | - | - | -                                 | -    | - | -                              | - | - | -                               | - | - | +++++++                       | -     | - |

(-):Resistance, (+): Sensible, (0-5 mm): +, (5-10mm): ++, (10-15 mm):+++, (15-20mm) +++++, (20-30 mm): ++++++, (30-40mm): ++++++

Suite de Tableau 14

| souche<br>Actinomycète | <i>Citrobacter Koseri</i> (IC8) |      |      | <i>Serratia oderifera</i> I(IC9) |   |   | <i>Klebsiella terrigena</i> (IC10) |      |   | <i>Entérobacter sakazakii</i> (IC11) |    |      | <i>Pseudomona. sp 3</i> (IC12) |   |   | <i>Staphylococcus. Sp</i> (IC13) |       |       | <i>Klebsiella ornithinolytic</i> (IC14) |   |   | <i>Serratia oderifera</i> I(IC15) |   |   |
|------------------------|---------------------------------|------|------|----------------------------------|---|---|------------------------------------|------|---|--------------------------------------|----|------|--------------------------------|---|---|----------------------------------|-------|-------|---|---|---|-----------------------------------|---|---|
|                        | I                               | B    | G    | I                                | B | G | I                                  | B    | G | I                                    | B  | G    | I                              | B | G | I                                | B     | G     | I                                       | B | G | I                                 | B | G |
| S129a                  | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | +++                                  | -  | -    | -                              | - | - | -                                | +++++ | +++++ | -                                       | - | - | -                                 | - | - |
| S129b                  | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | ++++ | -                              | - | - | -                                | -     | +++++ | -                                       | - | - | -                                 | - | - |
| S171                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | ++                                   | -  | ++   | -                              | - | - | -                                | +++   | +++++ | -                                       | - | - | -                                 | - | - |
| S 211                  | -                               | -    | ++   | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | -                                | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S386                   | -                               | ++++ | ++   | -                                | - | - | -                                  | -    | - | ++                                   | -  | -    | -                              | - | - | +++++                            | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S403                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | ++                               | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S417                   | -                               | -    | ++++ | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | ++                               | +++++ | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S418                   | -                               | -    | ++   | -                                | - | - | -                                  | -    | - | ++                                   | -  | -    | -                              | - | - | +++++                            | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S419                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | -                                | -     | ++++  | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S428                   | ++++                            | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | ++++ | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | -                                | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S429                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | -    | -                              | - | - | -                                | -     | -     | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S430                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | -                                    | -  | +    | -                              | - | - | -                                | -     | ++++  | -                                       | - | - | -                                 | - |   |
| S431                   | -                               | -    | -    | -                                | - | - | -                                  | -    | - | ++                                   | ++ | -    | -                              | - | - | -                                | +++   | ++++  | -                                       | - | - | -                                 | - |   |

(-):Resistance, (+): Sensible, (0-5 mm): +, (5-10mm): ++, (10-15 mm):+++, (15-20mm) +++++, (20-30 mm): ++++++, (30-40mm): ++++++

Suite de Tableau 14

| souche<br>Actinomycète | <i>E.coli</i><br>ATCC25422 |     |   | <i>E. coli</i> |       |   | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25293 |      |   | Staphylococcus aureus<br>ATCC43300 |     |   | <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |   |   | <i>Micrococcus luteus</i> |        |   | <i>Bacillus. Subtilis</i><br>ATCC6633 |   |   | <i>E.Coli</i><br>DH5α |   |   |
|------------------------|----------------------------|-----|---|----------------|-------|---|--|------|---|------------------------------------|-----|---|-----------------------------------|---|---|---------------------------|--------|---|---------------------------------------|---|---|-----------------------|---|---|
|                        | I                          | B   | G | I              | B     | G | I  | B    | G | I                                  | B   | G | I                                 | B | G | I                         | B      | G | I                                     | B | G | I                     | B | G |
| S129a                  | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - | - |
| S129b                  | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | ++++++ | - | -                                     | - | - | -                     | - | - |
| S 171                  | -                          | -   | - | -              | -     | - | +++  | +++  | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | +++++  | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S 211                  | -                          | +++ | - | -              | -     | - | -  | ++++ | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | ++++++ | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S386                   | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S403                   | -                          | -   | - | -              | +++++ | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S417                   | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | ++   | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S418                   | +++                        | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S419                   | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | +++ | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S428                   | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S429                   | -                          | -   | - | +++++          | ++    | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S430                   | -                          | -   | - | -              | ++    | - | -  | -    | - | ++                                 | -   | - | -                                 | - | - | -                         | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |
| S431                   | -                          | -   | - | -              | -     | - | -  | -    | - | -                                  | -   | - | -                                 | - | - | ++++                      | -      | - | -                                     | - | - | -                     | - |   |

(-):Resistance, (+): Sensible, (0-5 mm): +, (5-10mm): ++, (10-15 mm):+++, (15-20mm) +++++, (20-30 mm): ++++++, (30-40mm): +++++++



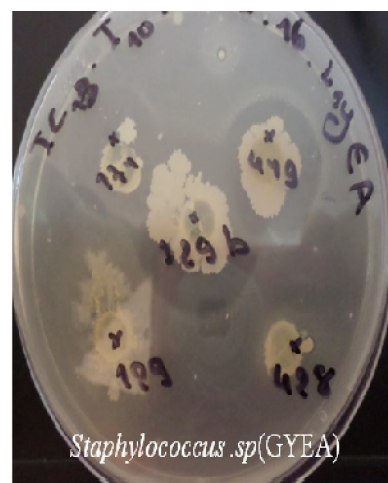
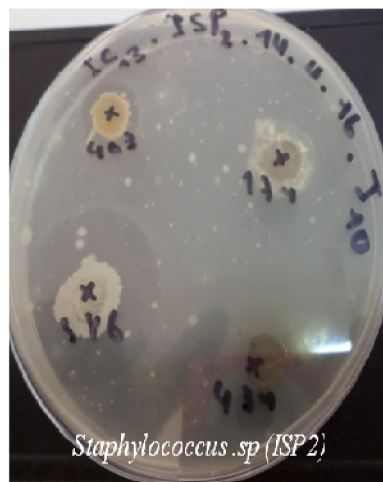
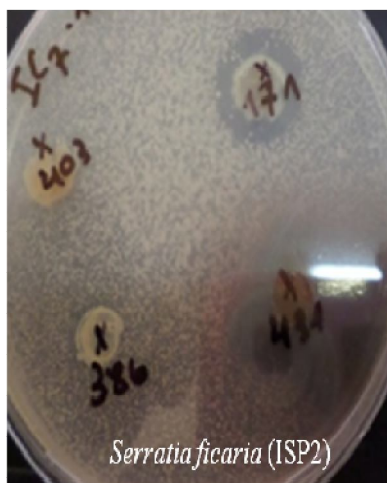
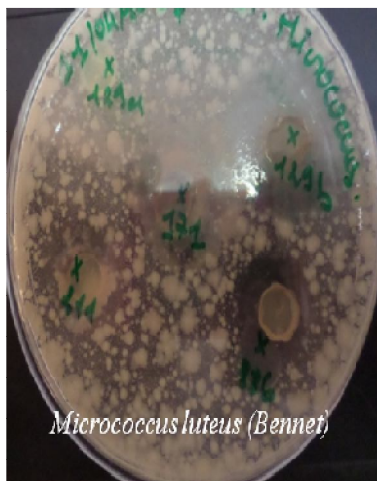
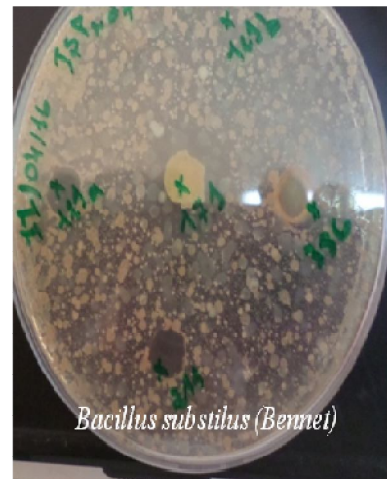
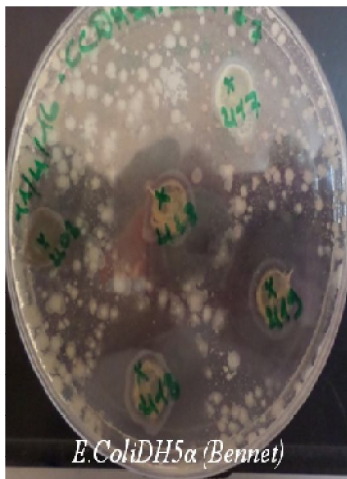


Planche10 : Photos des résultats de test d'activité.

Suite à l'ensemble des tests réalisés, les milieux de Bennet et GYEA semblent les meilleurs milieux de production cependant, l'efficacité du milieu Bennet dans la production d'antibactériens, a été prouvée par plusieurs chercheurs tels que **Awad et al. (2009)**. Ce milieu donne des diamètres d'inhibition importants bien qu'ils renferment des composés complexes comme l'extrait de levure connu dans la littérature comme une source d'azote adéquate pour la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* (**Pandey et al., 2005 ; Zhu et al., 2007**).

Les souches d'Actinomycètes ont une activité qui diffère d'une souche à une autre, d'un milieu de production à un autre, et également d'une bactéries-test à une autre, ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie Actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (**Boughachiche et al., 2005**), ceci concorde avec les résultats précédents, ces isolats appartiennent à différents genres, ce qui explique la variabilité des molécules produites.

Nos résultats indiquent que les isolats d'actinomycètes étudiés dans notre travail, sont une source potentielles intéressantes des substances antimicrobiennes

# Conclusion et perspective

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la mise en évidence de la biodiversité métabolique secondaire biologiquement active de treize isolats d'Actinomycètes qui proviennent d'une collection du laboratoire de la Microbiologie appliquée de l'Université de Badji Mokhtar Annaba.

Dans ce travail Nous sommes intéressés aux aspects phénotypiques (macromorphologiques et micro-morphologiques), physiologiques, et essentiellement la biodiversité métaboliques. Les caractères phénotypiques montre que tous les isolats sont des bactéries Gram positif, présente un aspect filamenteux caractéristique des Actinomycètes (**Kitouni et al., 2005**), Ainsi on a pu constaté une diversité culturelle sur la gamme des milieux ISP qui est apprécié par la couleur de Mycélium arein et Mycélium de substrat aussi la présence ou pas des pigments solubles (**Prescott et al., 2003**).

A partir des études physiologiques, on résulte que la plupart des isolats sont mésophiles, halotolérants et neutrophiles. Les résultats des études métaboliques a révélé le pouvoir de biodégradation de différents molécules par certain isolats étudié qui possèdent une activité cellulolytiques, amylolytique, on la capacité de dégradé le Amidon, le Caséine, la gélatine ...etc.

L'étude de l'activité microbienne des nos isolat a déterminer que la majorité des souches ont la capacité des produire quelque molécule active contre certain Bactéries-tests, essentiellement le *Micrococcus luteus* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, le *E.coli* ATCC25422 et *Citrobacter Koseri* ...etc.

Ces résultats on permet de rapproché certain isolats des actinomycètes aux genres de *Streptomyces* et *Micromonospora*.

Dans ce travail on peut conclure que les isolats des Actinomycètes présent une large diversité métabolique.

En perspective, il serait intéressant de :

- Recherche et étudier l'activité antibactérienne sur une gamme plus large des Bactéries-tests, et on appliquant différents méthodes tels que la technique des puits, la Technique des stries croisées.

- Recherche et mise en évidence de l'activité antifongiques vis-à-vis des

Champignons et des levures pathogènes comme *Aspergillus niger*, *Candidas albicans*...etc.

- Faire un screening sur les souches les plus active on vu de leur utilisation pour l'extraction des métabolites secondaire.
- Completer les études des activités de biodégradation pour différents source de carbone.
- L'extraction et la purification des molécules bioactive
- Identifications moléculaire des isolats ont étudié, par séquençage des gènes codant

L'ARN16s.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [01] Abbas I.H (2006) , A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *Appl. Sci. Res.* 2.10 .P:809-815
- [02] Allaoueddine.B (2007) , Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productricesde molécules antifongiques ,identification moléculaire de souches actives.144.P :22-26.
- [03] Athalye, M. ; M. Goodfellow ; j . Lacey ; & P. White (1985) , Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35.P:86-98.
- [04] Aouar .L (2006) , Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Mémoire de Magister. En Biochimie et Microbiologie appliquées. Université Mentouri Constantine. P : 4-8
- [05] Ann M. ; Hirsch & ;M .Valdés( 2009) , Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol. Biochem.* 42(4). P: 536–542
- [06] Anderson S.A. & ; E.M.H.Wellington (2001),The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Inter J of Syst Evol Microbiol.* 51 .P: 797-814.
- [07] Ara I. ; T. Kudo ;A.Matsumoto ;Y. Takahashi ;&S, Omura 2007, *Nonomuraea bangladeshensis* sp. Nov . and *Nonomuraea coxensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1504–1509. (a)
- [08] Ara I. ; T .Kudo ;A .Matsumoto ;Y. Takahashi ;& ;S.J.Omura (2007), *Nonomuraea maheshkhaliensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from Gen. *Appl. Microbiol.* 53 .P: 159–166. (b)
- [09] Avilala J . ;P.K . Arthala ;V . Buddolla ; D. V. R. Saigopal ; & G . Narasimha , 2014, Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties,( 26).P :1-26

- [10] Badji B.; A ;Zitouni ;A . Mathieu, F; Lebrihi, A;& N. Sabaou 2006, Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil, 52.P : 373- 382
- [11] Becker B, ;M .P. Lechevalier & H.A. Lechevalier (1965) , Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol* .P:236-242.
- [12] Baldacci .E (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc Belge Méd Trop*. (4).P : 633–646.
- [13] Belyagoubi ,L(2015). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. THÈSE. Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P : 7-23
- [14] Boucheffa ,K (2011). Criblage de souches d’actinomycètes productrices d’antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire de Magister. En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira Bejaia. P : 3-15
- [15] Canet, S & al 2004. La nocardiose est-elle plus fréquemment observée depuis l’introduction des nouveaux immunosuppresseurs en transplantation rénale. Service de néphrologie et transplantation rénale, 1Département de radiologie, Hôpital Lapeyronie, Montpellier. 25. P : 43-48.
- [16] Catherine ,D 2013. FICHE TECHNIQUE : *Nocardia farcinica*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique.3 :3-3
- [17] ChaoHsun Y & ; L , Wen-Hsiung (2007). Cloning and characterization of a maltotrioseproducing  $\alpha$ -amylase gene from *Thermobifida fusca*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34 (4).P: 325-330.
- [18] Coombs T ;& M, Franco Christopher (2003). Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 69 .P : 5603–5608
- [19] Danilenko V.N; Mironov & S.M Elizarov (2005) Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *App. Biochem. Microbiol*. 41(4).P :319–329

- [20] David H ; G, John ; R, Holt & H, APeter (1994 ) Sneath, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, P:54
- [21] Dellaras C (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de controle sanitaire, Tec & doc Lavoisier.P: 492
- [22] Dhanasekaran D ; S ,Selvamani ;A, Panneerselvam & N, Thajuddin (2009) Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary, Annagkoil, Tamil Nadu. *Afr J Biotechnol.*8 (17) .P: 4159-4162.
- [23] Divya D, N. Harsha, S. Satya Vishala, P. K & Santhosha Lakshmi (2014) Production od L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. *Int. J. Adv. Res.* 2 (1).P: 485-491.
- [24] Djaballah C. (2010).Biodiversité des Actinomycètes Halophiles et Halotolérante Isolat de la sebkha de Ain Mlila .Mémoire de Magister. Ecologie Microbienne. Université Mentouri Constantine. P : 4-9
- [25] Dommergurs Y & F, Mangenot (1970) Ecologie microbienne du sol. 3<sup>eme</sup> édition Paris. P : 24-28.
- [26] Doumbou C.L ;M.K. Hamby Salove ;D .L Crawford & C,Beaulieu (2001) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82(3) .P: 85-102.
- [27] Fernandez M. & J ,Sanchez (2002) Nuclease activity and cell death processes associated with development of surface culture of *Streptomyces antibioticus* ETH7451. *Microbiology.* 148 .P: 405-412.
- [28] Gebreselema .G ;S.Samuel & R. Nagappan (2013) Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 6. P: 426-435
- [29] Getha K & S .Vikineswary S. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* P:24-32.
- [30] Gerard T & et al (2001). Microbiologie. 2eme édition. Canada. P : 152-154
- [31] Gordon RE ;D A Barnett ; J EHanderhan & C, Hor-Nay Pang 1974) *Nocardia coeliaca*, *Nocmdia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int.J. Syst. Bacteriol-* 1 974 . P;24: 54-63
- [32] Gordon R.E & RE Smith(1953)Rapidly growing,acid fast bacteria I.Species descriptions of *Mycobacterium phlei*.*J.Bacteriol.* 66.P:41-48.

- [33] Guiraud .J & P .Duriod 2003 Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod .P : 188-193
- [34] Guérin F. S ; B, Karray & Y, RICHARD (1992) Actinomyce pyogènes : étude bactériologique conventionnelle et sur galleries Api de 103 souches isolées chez les ruminants. (23) : 151-160.
- [35] Gulve R. M & A MDeshmukh (2011) Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Reserch in Science and technology. 3(5).P:80-83.
- [36] Harvey .I (1999) Sélection de tests discriminants pour l'identification Rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans L~alvéolitea llergiquif. Extrinsèque. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (*M.Sc.*). Médecine expérimentale. Faculté de médecine université laval. P : 22-26
- [37] Hasavada S. H ; TJ Thumar & S.P Singh (2006) Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science*. 91(10) .P: 1393-1397.
- [38] Hirsch M & V Maria ( 2009 ) *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology & Biochemistry*.7 :1-7
- [39] Hisayuki K & al (2015) Draft Genome Sequence of *Nonomuraea* sp. TP-A0861, a Producer of Myxochelin A. Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NBRC).3 .P: 1-3.
- [40] Holt J.G ; NRKrieg ; PHA Sneath ;JT Staley ;STWilliams (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, P: 2340–2343.
- [41] Hou C. T (1994).PH dependence and thermostability of lipases from cultuira floui
- [42] Huang H ;J Lv ; YHu ;Z Fang ;k Zhang &S Bao (2008) *Micromonospora rifamycinica* sp. Nov a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 58: 17–20.
- [43] Jakimowicz D (2007)Chromosome segregation and cell division durind the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Hig.Med.Dosw*. (61): 565-575
- [44] Jerome J.Perry. James T. Staley. Stephen Lory. 2004 Microbiologie. Paris. P:550.
- [45] Jie L & al ( 2011)*Nonomuraea endophytica* sp. nov. an endophytic actinomycete isolated from *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 : 77–761
- [46] Kalakoutskii LV & NS Agre (1976) Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev*. 40 (2), 469–524.



[47] Kampfer P ; HJ Busse ; BJ Tindall ;M Nimtz & W Grün (2010) *Nonomuraea rosea* sp. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1118–1124.

[48] Kageyama A ;K Torikoe ;M Iwamoto ;JI Masuyama J-I ;Y Shibuya ;H Okazaki ;K Yazawa ;S Minota ;R M Kroppenstedt & Y Mikami ( 2004) *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. J. Clin. Microbiol. 42(6): 2366–2371.

[45] Katsifas EA ; EP Gianoutsou &AD Karagouni (1999) Diversity of Streptomycetes among specific greek terrestrial ecosystems. Let App Microbiol. 29: 48-51

[46] KavitaT & K Rajinder (2014). Bioactive Metabolites from Rare Actinomycetes. School of Biotechnology.41 :419-512

[45] 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. P: 15-17.

[45] Kuo M.J &PA Hartman (1966). Isolation of amylolytic stains of *Thermo-actinomyces*-Kurup V. P. Barboriak J. J. Fink J. N. and Lechevalier M. P., (1975).

*Thermoactinomyces* candidus, a new species of thermophilic actinomycètes. *International vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases, J. Bacteriol. Vol. 92.No.3

[46] Lansing M & al (2003)Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition .Française. P : 599-541

[47] Leveau .J .Y &M Bouix (1993). Microbiologie Industrielle. Paris. P : 424-439

[48] Lansing M ;P John ;A Donald (2007). Microbiologie. 2<sup>ème</sup> Edition. P:537.

[49] Larpent J.P & JJSanglier (1989) Biotechnologie Des Antibiotiques. Ed. Masson,Paris. P: 481

[50] Loucif K (2010). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives.139.P :05-10.

[51] Lakshmi D. T & K Kannabiran (2009) A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. isolated from Saltpan environment. *Am J Infect Dis.* 5 (3): 207-213

[52] Loria R ;RA Bukhalid ;BA Fry & RP King (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease.* 81(8): 836-846.-Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. et Moon S.S. (2001). Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid

and sodium phenyl acetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3730-3745.

[53] Lee D.W & SD Lee (2010) *Actinomadura scrupuli* sp. nov., isolated from rock. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2647–2651.

[54] Lu Z ;LWang ;Y Zhang ;Y Shi ;Z Liu ;ET Quintana & MGoodfellow (2003) *Actinomadura catellatispora* sp. nov. and *Actinomadura glauciflava* sp. nov., from a sewage ditch and soil in southern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 137–142.

[55] Lee S.D (2012). *Actinomadura rupiterrae* sp. nov., isolated from cliff soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 990–995.

[56] Li S ;C Chena ;H Zhang H ;H Guo ;H Wang ;L Wang ;X Zhang .S Huac ;J Yu ;P Xiao & R,X Tan (2005). Identification of natural compounds with antiviral

[57] Larpent J. P&JJSanglier (1990). *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson. Paris. P : 211-215

[58] Locci R (1989). *Streptomycetes and related genera*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie*. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 4, 2451-2508

[59] Alkama M (2014). Etude de quelques activités enzymatiques des actinomycètes isolés de deux écosystèmes extrêmes dans le sud Algérien. Mémoire de master. *Microbiologie Générale et biologie moléculaire des microorganismes*. Université Constantine I.P :42-50

[60] MarthaE ; STrujillo ;M Reiner ; Kroppenstedt ;FNM Carmen &Eustoquio Martí'nez-Molina(2007) *Micromonospora lupini* sp. nov. And *Micromonospora saelicesensis* sp. Nov. isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .57 : 2799–2804

[61] Messaoudi .O (2011). Contribution a la caractérisation des souches d'Actinomycètes productrices de métabolites Antibactériens isolée de la sebkha Kenadsa (Bechar). Mémoire de Magistère. *Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien (MQMDM)*. Université Abou bakr belkaid de Tlemcen. P : 20-25

[62] Madigan M. T &JM Martinko (2007) *Biologie des microorganismes*. *Pearson Education France*, 11e édition : 331-423, 686-718.

[63] Michael M& M John (2007) *Biologie des microorganismes*. 11<sup>eme</sup> édition. France. P : 594

- [64] McKinney R.E (2004) Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448.
- [65] MELOUAH R (2015) *Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des actinomycètes*. Mémoire de MASTER ACADEMIQUE. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA P : 7-10
- [66] Merizig H, Naami F. (2015). Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de Ouargla. Mémoire de MASTER. En Microbiologie fondamentale et appliquée. Université kheldi Merbah ouargla.P :3-29
- [67] Mordarska H ;M Mordarski & M Goodfellow (1972) Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 71, 77-86.
- [68] Miguelez E.M ;C Hardisson & MB Manzanal (2000).Streptomycete : a new model to study cell death. *Inter Microbiol.* 3: 153-158.
- [69] MELOUAH R (2015) Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des actinomycètes. Mémoire de MASTER. Microbiologie appliquée. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.P : 9-10
- [70] Mellouli L ;RB Mehdi ; S Sioud ;M Salem ;S Bejar (2003) Isolation, purification And partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces sp. US24 strain. *Res Microbiol*; 154:345-52
- [71] MELOUAH R (2015) Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des actinomycètes. Mémoire de MASTER. Microbiologie appliquée. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.P : 9-10
- [72] Mellouli L ;RB Mehdi ;S Sioud ;M Salem & S BejarS (2003) Isolation, purification And partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces sp. US24 strain. *Res Microbiol*; 154:345-52
- [73] Mocheva P ;S Tishkov ;N Dimitrova ;V Chipeva Antonova-Nikolova & N Bogatzevska N. (2002). Characteristics of actinomycetes from Antarctica *J. Cult. Collect.* 3, 3-14.63
- [74] Morakchi H (2011) isolement et identification de souche d'Actinomycètes productrices de molécules Bioactives au niveau du lac Oubeira : Etude morphologique, physiologique,moléculaire et spectre d'activitéThèse de Doctorat. Microbiologie Appliqué. Université BADJI MOKHTAR-ANNABA.P : 33-39
- [75] Matan. N & Matan. N(2008) Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Inter*

*Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 75–78.

[76] Muiru W.M ;EW Mutitu &DM Mukunva (2008) Identification of selected actinomycetes isolated and characterisation of their metabolites. *J. Biol. Sci.*, 8 (6), 1021-1026

[77] Naami F (2015) *Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de ouargla*, p : 33-39

[78] O'Gara. F. Dowling. D. N, Boesten. B. 2008. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. John Wiley & Sons: Weinheim. P: 192

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

[80] Oskay M ; AU Tamer & C.Azeri (2004) *antibacterial activity of some actinomycètes isolated from farming soils of Turkey*. *African Journal of Biotechnology*. Vol, 3(9), P: 441-446.

[80] Prescott & al (2010) *Microbiologie*. 3<sup>ème</sup> édition. Paris. P : 589-603

61-Perry J. J.; Staley J. T.; Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod, Pais. 497–498.

[81] Pine L (1970) Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int J Bacteriol.* 20: 445-474

[82] Prescott L & J Harley (2003). *Microbiologie*. 2<sup>ème</sup> édition P: 1164.

[83] Prescott L.M ;JP Harly ;DA Klein (2007). *Microbiologie*. Edition de la Boeck. P: 06-08

[84] Pridham T.G ;CW Hesseltine &RG Benedict (1958). A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.*, 6, 5-79.

[85] Polpass A & al 2014. Characterization of Antibiotic Producing Rare Actinomycete *Nonomuraea* sp. JAJ18 Derived from an Indian Coastal Solar Saltern. Department of Molecular Microbiology, School of Biotechnology, Madurai Kamaraj University.7 : 1-7

[86] Qiu D ; J Ruan &Y Huang Y (2008) Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Appl. Env. Microbiol.* 74(17): 5593–5597.

[87] Quintana E ;L Maldonado & M Goodfellow (2003) *Nonomuraea terrinata* sp. nov., a novel soil actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84: 1–6.

- [88] Reddy T.V.K. ; S Mahmood ; M Mohamme & S Ciesielski (2010) *Streptomyces osmaniensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1755–1759.
- [89] Reponen T.A ; SV Gazenko ;K Grinshpun ;K Willeke & EC Col (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol.* 64 : 3807-3812.
- [90] Rungroch S & N Nareeluk (2014) The genus *Nonomuraea*: A review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. 55 : 554–565
- [91] Smaoui. S 2010 Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doc : Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). Pp : 207.
- [92] Stackebrandt E & al(2001) *Nonomuraea dietzii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51 : 1437–1441
- [93] Sullivan D.C & SW Chapman (2010) Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis and nocardiosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7: 216–221.
- [94] Shukla G ( 2010) *Soil Enzymology* . Springer: Berlin. Pp: 384.
- [95] Shirling. E. B & D Gottlieb (1966). Methods for characterization of streptomyces species. *International journal of systematic bacteriology.* Vol. 16. N° 3. Pp : 313-340.
- [96] Stackebrandt E. & BM Goebel (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 846-849.
- [97] Sora N ;L Arsalane ;Y Ouhdouch & L Louzi (2009) Abces cerebral à *Nocardia*: a propos d'un cas. *Rev. Tun. Infectiol.* 3(2): 29–33.
- [98] Schlaberg R ;RCHuard & P Della-Latta ( 2008) *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 46 : 265–273.
- [99] Sierra, G (1957).A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antoni Van leeuwenhoeck* ., 23, 15-22.
- [100] Sztajer H ; L Maliszewska & J Weiczorek (1988) Production of exogenous lipase by bacteria, Fungi and actinomycetes enzyme. *Microbiol. Technol.* 10: 492-7.
- [101] Tang. S. K (2003) Studies of the biological characteristics of some halophilic
- [102] Thakur D ; A Yadav ;BK Gogoi : & TS Bora (2007) Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi.*, 17 : 242-249.

[103] Tighidet S (2011) Caractérisation d'antifongiques non polyéniques produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production. Mémoire de Magister. Microbiologie Appliquée. Université Abderrahmane Mira Bejaia. P : 3-7

[104] Tortora FC (2003) Introduction à la microbiologie. Canada. 2eme édition.P : 332

[105] 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

[105] Valois D ; K Fayad K ;T Barasubiye ;M Garon M &C Beaulieu C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthorafragariae* var. *rubi*, the causl agent raspbrrry root rot. *Applied and Environment Microbiol.* 62. 5 : 1630-1635

[106] Valan Arazu. M; V Duraipandiyan. ; PAgastian. ; S Ignacimuthu. (2009)In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India).(14) : 211-286

[107] Ventura. M; Canchaya. C; Tauch. A; Chandra. G; Fitzgerald. G.F; Chater. K.F; and van Sinderen.D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71 (3), 495–548.

[108] Viollier P ;W Minas ;G Dele ;M Folcher &C Thompson (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* : Morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol.* 183(10): 3184-3192.

[109] Wang C ; XX Xu ; Z Qu ; HL Wang ; PH Lin ; Xie Q.-Y., Ruan J.-S. and Hong K. 2011. *Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 320–324.

[110] 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. Pp: 1257-1261

[111] Wang Y.X ; XY Zhi ;HH Chen ; SK Zhang ; Cl Jiang ;LH Xu & L Wen-Jun (2007) *Actinomadura alba* sp. nov., isolated from soil in Yunnan, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1735–1739

[112] William B. R Whitman ; T Krieg ; T James ; R Daniel ;P Brian Hedlund & J. Paster ;L (2010) Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Springer New York Dordrecht Heidelberg London p : 25-49

[113] William S M ;G Goodfellow ; EMH Alderson ;PHA Wellington (1983) Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology* .129 : 1743-1813

[114] Xu L.H ; R Li Q & CL Jiang (1996) Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol.* 62: 244-248.

[115] Yamaguchi T (1965) Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 89: 444-453.

[116] Yassin A.F ;C Spröer ;C Siering & HP Klenk (2010) *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 149–153.

[117] Yugal K M (2014).Isolation of Cellulose-Degrading Actinomycètes and Evaluation of their Cellulolytic Potential. *Bioengineering and Bioscience.* (5): 1-5.

# ANNEXE

## I. Les milieux des cultures

### 1. Les compositions des milieux utilisés pour l'étude morphologique des actinomycètes

#### 1.1. Les milieux ISP

##### ISP1

Tryptone.....5g  
Extrait de levure .....3g  
Agar .....20g  
H2O distillée .....1000ml

**PH : 7.0 a 7.2**

##### ISP 2

Extrait de levure.....4g  
Extrait de malt.....10g  
Glucose.....4g  
Agar.....20g  
H2O distillée.....1000ml

**PH : 7.2**

##### ISP 3

Solution d'avoine .....1000ml  
Solution saline standard.....1ml  
Agar.....18g

**PH : 7.2**

##### L'ISP 4

Amidon .....10g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1g  
MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O .....1g  
Na Cl.....1g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .....2g  
CaCO<sub>3</sub>.....2g  
Solution saline standard.....1ml  
H2O distillée.....1000ml



Agar. ....20g

**PH : 7.0 a 7.4**

**L'ISP 5**

Glycérol.....10g

L-Asparagine.....1g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1g

Solution saline standard.....1ml

H<sub>2</sub>O distillée .....1000ml

Agar. ....20g

**PH : 7.0 a 7.4**

**L'ISP 6**

Peptone.....20g

Extrait de levure.....1g

Citrate ferrique ammoniacal..... 0.5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1g

Thiosulfate de sodium .....0.08g

Agar. ....15g

H<sub>2</sub>O distillée.....1000ml

**PH : 7.2**

**L'ISP 7**

Glycérol .....15g

L-Tyrosine.....0.5g

L-Asparagine .....1g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0.5g

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O .....0.5g

Na Cl.....0.5g

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.01g

Solution saline standard.....1ml

Agar .....20g

H<sub>2</sub>O distillée.....1000ml

**PH : 7.2**

## **2. Composition des milieux utilisés pour l'étude physiologique**

### **2.1 Test Tolérance au Na Cl**

Peptone de caséine.....10g/l  
Extrait de levure.....5.0g/l  
H2O distillée .....1000ml  
Agar.....20.0g/l

**PH : 7.0 a 7.4**

## **3. Composition des milieux utilisés pour l'étude de la biodégradation**

### **3.1 Milieu amidon 1%**

GN.....100ml  
Amidon .....1g

### **3.2 Milieu caséine 5%**

Eau distille.....100ml  
Agar .....2g  
Caséine soluble .....5g

**PH : 6 à 6.5**

### **3.3 Milieu de test action sur le lait écrémé 10%**

Eau distille .....100ml  
Lait écrème.....10g

### **3.4 Milieu de test d'estérase**

NaNO<sub>3</sub>.....1g  
Extrait de levure .....5g  
Solution saline .....50ml  
Ca Cl 2 2H<sub>2</sub>O.....0.1g  
Tween 80.....10ml  
Agar .....18g  
Eau distille.....1000ml

### **3.5 Citrate de Simmons**

Citrate de Simmons.....28.29g  
Eau distillée .....1000ml

**PH : 6 à 6.2**

### **3.6 bouillon nitrate « ISP 8 »**

Bouillon nitrate .....21g

Eau distillée.....1000ml

**PH** : 7.2 a 7.2

### **3.7 ISP 9 liquide**

(NH<sub>4</sub>)<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

Eau distillée.....1000ml

**PH** : 6.8 a 7

### **3.8Milieu Mueller-Hinton**

Infusion de viande .....300g

Hydrolysate de caséine .....17.5g

Amidon .....1.5g

Agar .....17g

**PH** : 7.4

### **3.9Gélose Columbia au sang de cheval à 5% « COS »**

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcine).....10g

Hydrolysate de protéine animales (bovin ou porcine).....10g

Peptone de coeur (bovin ou porcine) .....3g

Amidon de maïs .....1g

Chlorure de sodium .....5g

Agar .....13.5g

Sang de cheval .....5ml

**PH** : 7.3

## **4. Composition des milieux utilisés pour l'étude de la bioactivité**

### **4.1 Milieu Bennet**

Glucose .....10g

Extrait de levure.....1g

Tryptone.....2g

Extraits de viande.....1g

Agar.....18g

Eau distille .....1000ml

PH: 7,3

#### **4.2 Milieu GYEA**

Extrait de levure .....10g

Glucose.....10g

Agar.....18g

Eau distille .....1000ml

PH: 6,8

#### **4.3 Milieu LB solide**

Treptone .....10g

Extrais de levure .....5g

Na Cl.....10g

Agar.....20g

Eau distilles .....1000ml

PH : 7,2

#### **4.4 Milieu LB mole**

Trepton .....4g

Extrais de levure .....2g

Na Cl .....2g

Eau distille .....800ml

PH:7.2

#### **4.4 Milieu LB Liquide**

Treptone .....10g

Extrais de levure .....5g

Na Cl.....10g

Eau distilles .....1000ml

PH : 7,2

## **II. Les solutions et Réactifs**

### **1-Solution saline standard**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0.25g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.125g

Na Cl .....0.125g

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.....0.001g

Mn SO<sub>4</sub>.....0.001g

Eau distille .....50ml

## **2-Solution saline1**

FeSo4 7H2O.....0.1g  
Mn Cl2 4H2O.....0.1g  
ZnSO4 7H2O.....0.1g  
Eau distille.....100ml

## **3-Solution saline 2**

CuSo4 7H2O.....0.64 g  
FeSo4 7H2O.....0.11g  
Mn Cl2 4H2O.....0.79g  
ZnSO4 7H2O.....0.15g  
Eau distille .....100ml

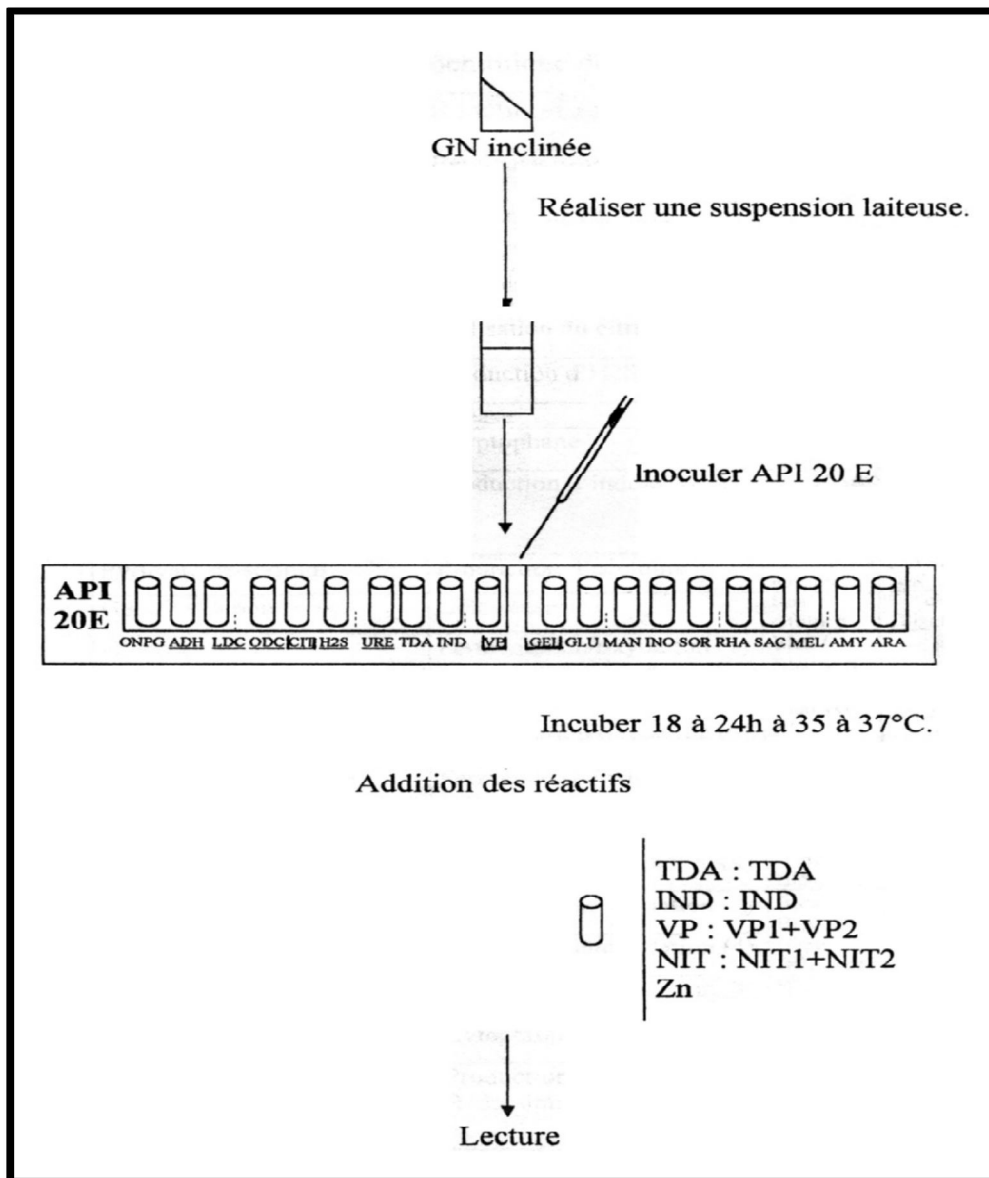
## **4-Eau physiologique**

Na Cl .....8.5 g  
H2O distillée.....1000 ml

## **5-Solution d'avoine**

Faite bouillir 20g d'avoine dans 1000ml d'eau distillée pendant 20 minutes.  
Filtrer a l'aide d'une gaze. Compléter le volume du filtrat a 1000 ml.

### III .Technique de Utilisation de l'Api20E



**Figure 13** : Mode opératoire du système API 20 E.

Tableau 13: lecture du système API 20E

| TESTS            | COMPOSANTS ACTIFS                  | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES  | RESULTATS                     |  |
|------------------|------------------------------------|---------------|--|-------------------------------|--|
|                  |                                    |               |  | NEGATIF                       | POSITIF                                  |
| ONPG             | 2-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0,223         | β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase) | incolore                      | jaune (1)                                |
| ADH              | L-arginine                         | 1,9           | Arginine DiHydrolase                                       | jaune                         | rouge / orangé (2)                       |
| LDC              | L-lysine                           | 1,9           | Lysine DeCarboxylase                                       | jaune                         | rouge / orangé (2)                       |
| ODC              | L-ornithine                        | 1,9           | Ornithine DeCarboxylase                                    | jaune                         | rouge / orangé (2)                       |
| CIT              | trisodium citrate                  | 0,786         | utilisation du Citrate                                     | vert pâle / jaune             | bleu-vert / bleu (3)                     |
| H <sub>2</sub> S | sodium thiosulfate                 | 0,075         | production d'H <sub>2</sub> S                              | incolore / grisâtre           | dépôt noir / fin liseré                  |
| URE              | urée                               | 0,76          | UREase   | jaune                         | rouge / orangé (2)                       |
| TDA              | L-tryptophane                      | 0,38          | Tryptophane DésAminase                                     | jaune                         | TDA / immédiat<br>marron-rougeâtre       |
| IND              | L-tryptophane                      | 0,19          | production d'INDole  | incolore<br>vert pâle / jaune | JAMES / immédiat<br>rose                 |
| VP               | sodium pyruvate                    | 1,9           | production d'acétolne (Voges Proskauer)                    | incolore                      | VP 1 + VP 2 / 10 min<br>rose / rouge (5) |
| GEL              | gélatine (origine bovine)          | 0,6           | Gélatinase (GELatine)                                      | non diffusion                 | diffusion du pigment noir                |
| GLU              | D-glucose                          | 1,9           | fermentation / oxydation (GLUCose) (4)                     | bleu / bleu-vert              | jaune / jaune gris                       |
| MAN              | D-mannitol                         | 1,9           | fermentation / oxydation (MANnitol) (4)                    | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| INO              | inositol                           | 1,9           | fermentation / oxydation (INOsitol) (4)                    | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| SOR              | D-sorbitol                         | 1,9           | fermentation / oxydation (SORbitol) (4)                    | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| RHA              | L-rhamnose                         | 1,9           | fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)                    | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| SAC              | D-saccharose                       | 1,9           | fermentation / oxydation (SACcharose) (4)                  | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| MEL              | D-melibiose                        | 1,9           | fermentation / oxydation (MELibiose) (4)                   | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| AMY              | amygdaline                         | 0,57          | fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)                  | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| ARA              | L-arabinose                        | 1,9           | fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)                   | bleu / bleu-vert              | jaune                                    |
| OX               | (voir notice du test oxydase)      |               | cytochrome-OXYdase   | (voir notice du test oxydase) |  |