

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université « Dr. Moulay Tahar » de Saïda
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire Élaboré en vue de l'obtention du diplôme Master
en Biologie

Option : Biotechnologie végétale

Présenté par

M^{lle} : Bensefia Kharfiya

Sur le thème

Recherche des souches d'actinomycètes productrices des enzymes
pectinolytiques à partir des sols aride de la wilaya d'Al Bayadh

Soutenus publiquement devant le jury

Mr. Hachem K.	M.C.B. Université de Saïda	Président
Mr. Benreguieg M.	M.C.B. Université de Saïda	Promoteur
Mr. Halla	M.A.A. Université de Saïda	Examineur

Année académique 2014/ 2015

Remerciements

« اللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك »

Tout d'abord, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université Dr. Moulay Tahar- Saïda-

Je tiens à remercier avant tous mon encadreur Benreguiég.M qui a accepté de superviser ce travail pour toute l'aide qui m'a apporté et sans laquelle ce travail n'aurait pas vu le jour

Pour mes instructeurs, surtout Mr Bin Mohammed, Melle chalane , Mr Halla, Mr Adli et Mr kaïd,

Mes amis :Somia ,Hayat et Bakhta

Nos remerciements s'adressent, également, aux membres du jury



Dédicace

Je dédie ce travail :

Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

A mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. A mes chers frères Mohammed et Abed Allah maarof et mes chères sœurs Fatima Zahra et aya. Aussi mon oncle Djamalle.B

A toute ma famille.

A mon encadreur Benreguieg.M, A mes profs. Surtout M r Bin Mohammed

A toutes mes chères amies, mes collègues. Surtout Naimi Somia

A tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du bien de près ou de loin.

En témoignage de ma profonde affection



Kharfiya

Résumé:

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Dans ce travail, nous sommes intéressés à la recherche des souches productrices d'enzymes dans les sols des zones arides.

Dans la première partie de ce travail, un isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols de la région d'Al Bayadh a été réalisé. Les résultats montrent que le traitement des échantillons de sol par le CaCO_3 , habituellement effectué dans les autres sols, favorise la croissance de ces microorganismes par rapport à d'autres germes envahissants.

Dans la deuxième partie, 21 souches actinomycétales ont été testées pour leurs activités enzymatiques. Deux isolats ont présenté une activité pectinolytique. Après extraction enzymatique, l'activité polygalacturonase et lyase a été déterminé par la méthode à l'acide thio-barbiturique (TBA) basée sur la mesure de l'absorbance par spectrophotomètre. Les résultats montrent que les souches A1 et A7 secrètes dans le milieu liquide une pectate lyase.

La nature des produits de dépolymérisation a été découvert par la technique de chromatographie sur couche mince CCM qu'a montré que les deux souches créer une seule tâche dont la distance de migration est la même.

Mots clés: Actinomycètes, activité pectinolytique, extraction enzymatique, CCM.

ملخص:

الفطريات الشعاعية هي البكتيريا المسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيا. في هذا العمل، ونحن مهتمون بالبحث عن السلالات المنتجة للأنزيمات في التربة القاحلة.

في الجزء الأول من هذا العمل، تم العزلة انتقائية للفطريات الشعاعية من التربة من منطقة البيض. أظهرت النتائج أن معالجت عينات التربة ب $Ca Co_3$ ، ساهمة في تعزيز نمو هذه الكائنات الدقيقة و تثبيط نمو الكائنات المجهرية الأخرى.

في الجزء الثاني، تم اختبار 21 سلالات الشعاعية لنشطها الأنزيمية. وأظهرت اثنين من السلالات المعزولة النشاط pectinolytic. بعد استخراج الأنزيمية، تم تحديد النشاط polygalacturonase و Iyase عن طريق اختبار حمض ثيو باربيتوريك (TBA) بناء على قياس الامتصاصية بواسطة spectrophotomètre. وأظهرت النتائج أن سلالة A7 وA1 منتجة لبكتين Iyase في الوسط السائل.

تم الكشف عن طبيعة المنتجات dépolymérisation بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM التي أظهرت أن لسلالتين بقعة واحدة وبنفس مسافة الهجرة .

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية ، نشاط pectinolytique، استخراج الانزيمي ، كروماتوغرافيا CCM

Abstract

Actinomycetes are bacteria responsible for producing most of bioactive molecules. In this work, we were interested in search of the producing origins of enzymatic molecules in the grounds of dry zones.

In the first part of this work, a selective isolation of actinomycetes from the grounds of Al Bayadh's region was realized. The results show that the treatment of the soil samples by CaCo_3 , usually made in the other grounds, favors the growth of these microorganisms with regard to compared with other intrusive germs.

In the second part, 21 Actinomycetales strains were tested for their enzymatic activities. Two isolates presented a pectinolytic activity, after enzymatic extraction, we determine the activity polygalacturonase and lose by the method in the Thio-barbiturate acid (TBA) and we measure the absorbance by spectrophotometer. The results show that the secret A1 and A7 strain in the liquid medium a pectate lyase.

The nature of the depolymerization products was discovered by the technique of thin layer chromatography TLC that showed that the two strains to create a single task whose migration distance is the same.

Keywords: Actinomycetes, the pectinolytic activity, enzymatic extraction, thin layer chromatography TLC.

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol.....page 06

Tableau0 2 : Description des échantillons.....page36

Tableau 03 : différents caractères morphologiques des souches d'Actinomycètes isolées.....page37

Tableau 04 : caractères physiologique et biochimique des souches d'actinomycètes....page38

Tableau05 : Diamètres des zones claires résultant de la dégradation de la pectine par les souches actinomycétales.....page41

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (**Dvorak, 1999**).....page09
- Figure 2**: Cycle de développement d'un Actinomycète (*Streptomyces*) sur milieu solide (**Hopwood et al, 1985**)page 09
- Figure 3** : Cycle de vie des actinomycètes (*Streptomyces*).....page 11
- Figure4** : nombre des actinomycètes isolés sur milieu Bennett et à partir des différents solspage35
- Figure 5**: aspect macroscopiques des isolats.....page36
- Figure 6**: observation microscopique des mycéliums des actinomycètes (G x 40).....page38
- Figure 07** : hydrolyse de la gélatine et l'amidon par A1 etA7.....page39
- Figure 8**: observation microscopique des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram.....page 39
- Figure 9** : utilisation des difrentes source de carbone.....page40
- Figure10** : Zones claires résultant de l'activité pectinolytique de la souche A1..... page42
- Figure11** : Mise en évidence d'une activité pectinase dans le filtrat de culture des souches (Test TBA).....page42
- Figure12** : Mise en évidence des produits de dépolymérisation dans les filtrats de culture par chromatographie de partage sur couche mince.page 43

Liste des abréviations

%: Pourcentage

°C: Degré.

ATCC: American **T**ype and Culture Collection

ATP: Adenine three phosphates

Ca⁺²: Calcium.

g: gramme

G+C: guanine +cytosine

h: heure

Kb: Kilo base

K₂HPO₄: phosphate dipotassique

KH₂PO₄: phosphate monopotassique

Mg⁺² : Magnésium.

ml: Millilitre.

mM: Milimolaire

nm: nanomètre

(NH₄)₂ SO₄: sulfate d'ammonium

rpm: rotations par minute

S : Spira

SCP1 : Stratégie de coopération avec les pays 1ère génération

SCP2: Stratégie de coopération avec les pays 2ème génération.

TBA: Acide Thiobarbiturique

µl: microlitre

TABLE DES MATIERES

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Introduction.....	01
❖ Synthèse bibliographique	
➤ Les actinomycètes	
I.1. Définition	03
I.2.Historique	04
I.3. Caractéristique des actinomycètes	04
I.3.1. Morphologie	04
I.3.2. Physiologie.....	05
I.3.3. Caractères chimiques	05
I.3.3.1. La paroi cellulaire	05
I.3.3.2. La structure de l'ADN	05
I.4. Ecologie et distribution des Actinomycètes.....	06
I.4.1. Sols	06
I.4.2. Eaux douces et marines	07
I.4.3. Air	07
I.4.4. Thermophile	07
I.4.5. Actinomycètes pathogènes	07
I.5. Classification des Actinomycètes	08

I.5.1. Mycobacteriacées	08
I.5.2. Actinomycétacées (ou Pro-Actinomycètes).....	08
I.5.3. Streptomycétacées.....	08
I.5.4. Actinoplanacées	09
I.6. Biologie du développement	09
I.6.1.Mycélium du substrat et Mycélium aérien	10
I.6.2. Formation des spores.....	11
I.6.3.La germination des spores	12
I.6.4.Structures particulières	12
I.6.5.Détermination des genres	13
I.7.Le matériel génétique	13
I.7.1.ADN chromosomique	13
I.7.2.ADN plasmique et ADN phagique	14

➤ **Métabolisme secondaire**

II.1. Vue générale du métabolisme.....	15
II.1.1 .métabolisme primaire	15
II.1.2. métabolisme secondaire.....	15
II.2.Importance dans le domaine industriel	17
II.2.1. Importance en biotechnologie	17
II.2.1.1. La production des antibiotiques	18
II.2.1.2.La production des enzymes	18
II.2.1.2.1. Les cellulases	18
II.2.1.2.2. Les ligninases	19
II.2.1.2.3. Les pectinases	19
II.2.1.2.4. Les xylanases	19
II.2.1.2.5. Les amylases	19
II.2.1.2.6. Les dextrinases	20
II.2.1.2.7. Les chitinases	20
II.2.1.2.8. Les lipases	20
II.2.1.2.9. Les protéases	20

II.3. Autre importance	21
II.4. Importance dans le domaine agronomique	21
II.4.1. Rôle des actinomycètes dans la biodégradation de la matière organique	21
II.4.1.1. La notion de biodégradation	21
II.4.1.2. Le processus impliqué dans la biodégradation des polymères organiques.....	22
II.4.1.2.1. La fragmentation	22
II.4.1.2.2. L'assimilation	22
II.4.1.3. La biodégradation des polymères naturels	23
II.4.1.4 La biodégradation des polymères de synthèse	24

❖ **Partie expérimentale**

III. MATERIEL ET METHODES

III. 1. Objectif	27
III.2. Isolement des souches d'Actinomycètes	28
III.2.1. Prélèvement des échantillons de sol.....	28
III.2.2. Mesure du pH des échantillons.....	28
III.2.3. Traitement.....	28
III.2.4. Préparation de la suspension mère des dilutions.....	29
III.3. Isolement, purification et conservation des actinomycètes	29
III.4. Etude phénotypique	29
III.4.1. Etude morphologique	30
III.4.1.1. les caractères cultureux et morphologiques	30
III.4.1.2. Etude macromorphologique.....	30
III.4.1.2.1. Observation au faible Grossissement	30
III.4.1.2.2. Observation au fort grossissement	30
III.4.2. Etude physiologique et biochimique	31
III.4.2.1. Hydrolyse de l'amidon	31
III.4.2.2. Hydrolyse de la gélatine.....	31
III.4.2.3. Utilisation des différents substrats carbonés et Production de l'H ₂ S	31
III.4.2.4. Utilisation du citrate comme source de carbone	32

III.4.2.5.La recherche de catalase	32
III.4.2.6.La recherche de l'Uréase	32
III.4.2.7.Recherche de la production d'indole.....	33
III.5.Recherche de l'activité pectinolytique des souches isolée	33
III.5.Fermentation submergée de pectinase.....	33
III.5.2.Détermination des activités polygalacturonase et lyase par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA).	33
III.6.Détection des produits de dépolymérisation par CCM	34

❖ **Résultat et Discussion**

IV. Isolement des souches d'actinomycètes	35
IV.1. Caractéristiques des échantillons.....	35
IV.2. Isolement des Actinomycètes	35
IV.3. caractéristiques macroscopiques des isolats	36
IV.4. Identification des souches d'actinomycètes actives	37
IV.4.1 Résultat de l'étude morphologique.....	37
IV.4.2.Etude physiologique et biochimique	38
IV.4.3.Résultat d'hydrolyse de l'amidon.....	39
III.4.4. Résultat de coloration de gram.....	39
IV.4.5.Résultat d'utilisation les différentes sources de carbone étudiées	40
IV.5. Recherche de l'activité pectinolytique des souches isolées	40
IV.6.Recherche des activités polygalacturonase et lyase par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA)	42
IV.7.Détection des produits de dépolymérisation par CCM	43
V. Discussion	45
IV.CONCLUSION	50

Référence

Annexes

Introduction



Introduction

Le sol est un environnement vivant et constitue un réservoir exceptionnel de microorganismes et de gènes différents qui déterminent des activités variées dont l'activité est en lien plus ou moins direct avec leur " fonctionnement " en général et certaines de leurs propriétés agronomiques en particulier.

Les sols du Sahara algérien bien que soumis à un climat aride à semi-aride ont montré une biodiversité surprenante des Actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif.

Ainsi le genre *Streptomyces* est le plus étudié parce que étant largement prédominant dans les sols (souvent plus de 90% des Actinomycètes) y compris les sols saharien (**Sabaou, 1992**).

Leur mode de vie saprophyte est possible grâce à leur capacité de dégrader plusieurs types de composés organiques cela est du en grande partie à leurs potentiel de produire une large gamme d'enzyme hydrolytiques y compris : des protéases, des nucléases, des lipases et des enzymes hydrolysant les polysaccharides (**Wolfgang, 1993**).

Parmi les polysaccharides dégradés par ces bactéries, les substances pectiques se présentent comme des macromolécules glucidiques constituées essentiellement par des polygalacturonanes de degré d'estérification variable (**Thibault et Petit, 1979**).

Ces biopolymères sont largement répandus dans le règne végétal où ils constituent avec l'hémicellulose et la cellulose, l'un des composants majeurs de la paroi des cellules végétales (**Chamier, 1982**).

Des enzymes de dépolymérisation secrétés presque exclusivement par les microorganismes (bactéries ou champignons), sont capables de scinder le polymère en oligomères de faible degré de polymérisation, assimilables par ces mêmes microorganismes (**Bonnin et al., 1997**)

Ces dépolymérases comprennent des hydrolases et des lyases qui catalysent la scission des liaisons osidiques par mécanismes de β élimination (**Albersheim et Killias, 1962**).

Chez les Actinomycètes les travaux de Kaiser (**Kaiser, 1971**) ont montré que plus de 70% de ces espèces étaient pectinolytiques dont la grande majorité dans le genre

Streptomyces. Quelques autres espèces de Streptomyces sécrétant des pectates lyases ont été étudiées (**Sato et Kaji, 1980 ; Ladjama et Taibi, 2004**).

Ainsi la recherche s'intéresse aux enzymes pectinolytiques qui jouent un rôle important en industrie alimentaire, c'est le cas par exemple des industries de jus de fruits qui sont confrontées aux problèmes de colmatage des filtres par les débris végétaux. L'utilisation des pectinases permet de clarifier en partie les préparations de jus (**Sarioglu et al., 2001**). Les pectinases sont également intéressantes à étudier dans le cadre de leur participation à la dégradation de la biomasse végétale contribuant ainsi à l'équilibre de l'environnement.

Ce travail vise l'isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substance bioactives ainsi que la recherche de la pectinase et la mise en évidence de l'activité enzymatique.

Synthèse bibliographique



Les actinomycètes



I. LES ACTINOMYCETES

I.1. Définition des Actinomycètes

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « Aktis » qui veulent dire rayon et « mykes » qui veut dire champignon. Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons. Maintenant, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes. Pourtant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons.

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (**Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des actinomycétales (**Mariat et Sebald, 1990**), sont des procaryotes à structure de bactéries à Gram positif (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) .

Ils ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (**Gazenko et al., 1998**) et aussi de leur morphologie fongicoïde : filament ramifiés, organe de sporulation,... etc (**Reponen et al., 1998**). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de micro-organisme est définitivement classé parmi les bactéries (**Becker et al., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**).

❖ Similitude entre Actinomycètes et champignons (**Alexander, 1961**)

Il existe trois points qui rapprochent les Actinomycètes des champignons :

- Structure mycélienne présentant des ramifications chez les Actinomycètes typiques, avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2Y) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium parfois employé pour désigner cette structure ;
 - Formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies ;
 - En culture, absence de la turbidité caractéristique des bactéries unicellulaires et apparition des amas de cellules.

Les analogies entre les Actinomycètes et les champignons sont en fait superficielles ; il s'agit d'une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique, car une différence

fondamentale les sépare: les Actinomycètes sont procaryotes alors que les champignons sont eucaryotes.

❖ Similitude entre Actinomycètes et bactéries

D'autres caractères rapprochent les Actinomycètes des bactéries :

- Ils sont procaryotes;
- La morphologie typiquement bactérienne chez les formes simple (*Mycobacteriacées*);
- La sensibilité aux attaques virales.

I.2. Historique

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al., 1984**). Et c'est en 1943 que Waksman a pu isoler un genre d'Actinomycète à partir du sol. Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des Actinomycètes.

La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990.

La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis.

C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilnikov entre autre.

La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Selman Waksman lui est indissolublement lié (**Le minor, 1989**).

I. 3. Caractéristique des actinomycètes

I. 3.1. Morphologie

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes varie de simple bacille diphtéroïde à des formes mycéliennes complexes (**Gottlieb, 1973**) certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux : mycélium végétatifs, ou de substrat (**Michel et al., 1988**) constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface. Cette formation montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Locci, 1976**).

I. 3.2. Physiologie

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (**Locci, 1976, Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujilo, 1997**), généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif.

Organismes hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (**Ensign et al., 1993**). Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tels que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (**Crawford, 1993**) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine et les résidus des plantes dans le sol (**Lacey, 1997**).

I. 3.3. Caractères chimiques

I. 3.3.1. La paroi cellulaire

Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leur hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**).

I. 3.3.2. La structure de l'ADN

La composition de l'ADN nucléaire permet de définir les familles d'actinomycètes, pour cela on étudie le coefficient de Chargaff ou GC% qui présente le nombre de paires de bases guanine cytosine pour 100 paires de bases dans l'ADN (**Larpent et Sanglier, 1989**). Les actinomycètes dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est généralement compris entre 60 et 75% (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**).

I.4. Ecologie et distribution des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires, on les rencontre sur tous les substrats naturels courants (**Waksman, 1959**).

I.4.1. Sols

Les Actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2m de profondeur c'est-à-dire dans la rhizosphère. Le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans le sol, il couvre à lui seul 95% des souches d'Actinomycètes isolées (**Nonomura, 1969**). Le tableau 2 montre la fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol

Tableau 1: Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol

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

I.4.2. Eaux douces et marines

Les Actinomycètes sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Microspora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans les

Sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa saveur.

I.4.3. Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinomycètes sont des contaminants importants de notre environnement.

L'exposition à ces derniers peut causer des effets néfastes sur la santé (**Gazenko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998 ; Suutari et al., 2002**).

I.4.4. Thermophile

Des Actinomycètes ont été isolés entre 40 et 60°C de divers substrats ; sols variés, fumier, compost, foins, fourrages. Ce sont des souches plutôt thermotolérantes que thermophiles (Lacey, 1997).

I.4.5. Actinomycètes pathogènes

Certaines espèces d'Actinomycètes sont pathogènes pour les végétaux, les animaux et l'Homme (Mc Neil, 1994 ; Boiron, 1995). Parmi les exemples les plus connus, on peut citer :

- ❖ *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre ;
- ❖ *Actinomyces bovis*, responsable d'une actinomycose chez le bétail ;
- ❖ *Mycobacterium tuberculosis* agent de la tuberculose et *Mycobacterium leprae*, agent de la lèpre ;
- ❖ *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine ;
- ❖ *Micropolyspora faeni*, responsable d'une pneumonie allergique chez l'Homme.

I.5. Classification des Actinomycètes

En général, on peut subdiviser les Actinomycètes en 4 grandes familles (Tableau 1) :

I.5.1. Mycobacteriacées

Elles renferment les Actinomycètes dont la morphologie est voisine de celle des bactéries. Les mycobacteriacées diffèrent de toutes les bactéries et autres Actinomycètes par leur acido-résistance grâce à la présence de substance cireuse présente dans leurs cellules. Cette famille est représentée par le seul genre *Mycobacterium* qui renferme plusieurs espèces pathogènes, dont la plus connue est *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose (Krasilnikov, 1958).

I.5.2. Actinomycétacées (ou Pro-Actinomycètes)

Cette famille est représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces*. Le genre *Nocardia* comprend de nombreuses espèces très répandues dans le sol. Les colonies, difficiles à distinguer des colonies bactériennes, sont souvent confondues avec ces dernières lors des comptages. Le genre *Actinomyces* ne présente aucun intérêt en microbiologie du sol. (Alexander, 1961).

I.5.3. Streptomycétacées

Il existe deux genres dans cette famille : *Streptomyces* et *Micromonospora*.

- Le genre *Streptomyces* renferme plusieurs espèces très répandues dans le sol. Il se reproduit par des conidies en chaîne. L'examen des colonies de *Streptomyces* permet de discerner :

- Le mycélium végétatif très serré, implanté dans le milieu auquel il adhère (leurs colonies sont difficiles à prélever au fil de platine).
- Le mycélium aérien, lâche, d'aspect poudreux, formé d'hyphes portant à leurs extrémités des conidies (Williams, 1978).

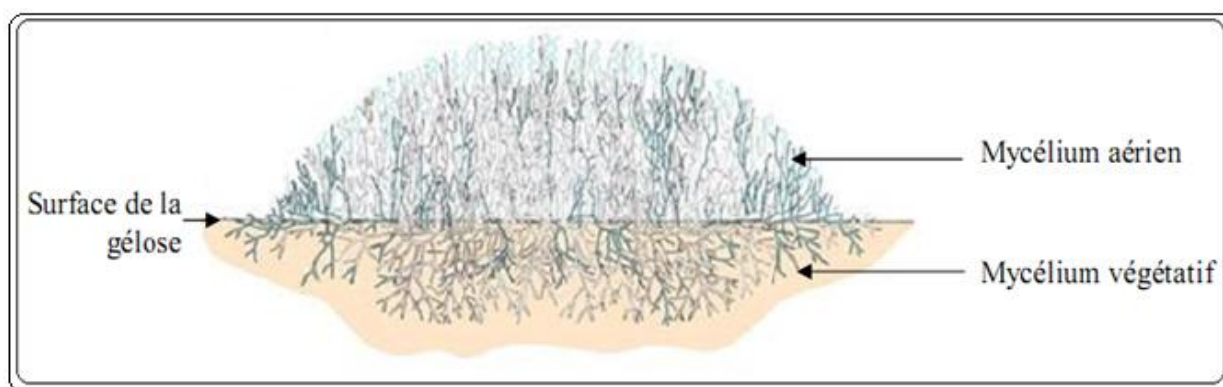


Figure 1 : Une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Dvorak, 1999)

- Le genre *Micromonospora* renferme plusieurs espèces dont la plupart sont thermophiles, et se développent surtout dans les fumiers.

I.5.4. Actinoplanacées

Cette famille est représentée par le genre *Actinoplanes* qui est aquatique.

6. Biologie du développement

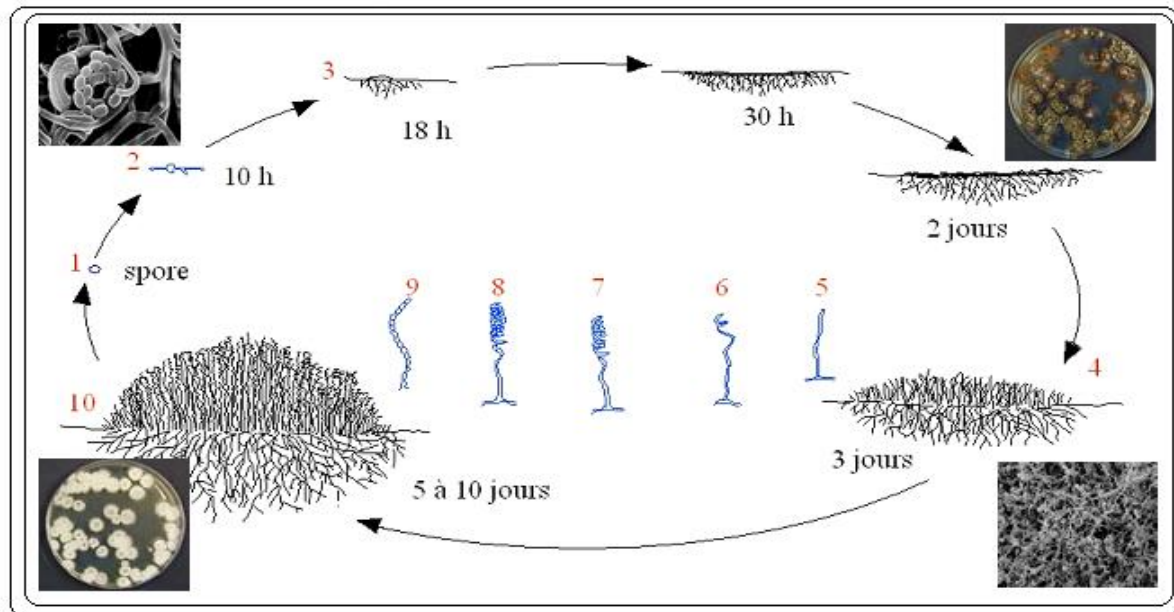


Figure 2: Cycle de développement d'un Actinomycète (*Streptomyces*) sur milieu solide (Hopwood *et al*, 1985)

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes. Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes.

Ainsi, les actinomycètes les plus différenciées développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distincts : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche.

I.6.1. Mycélium du substrat et Mycélium aérien

Le mycélium du substrat, également, dénommé mycélium végétatif ou primaire se développe à partir du tube de germination issu de la spore.

Chez quelques genres comme *Rhodococcus*, il n'y a pas de véritable mycélium mais seulement croissance d'une propagule originelle formant un filament plus ou moins long se fragmentant ensuite en petites unités et donnant parfois naissance à des ramifications élémentaires. Cette fragmentation des hyphes est présente chez des genres généralement dépourvus de spores ou n'en produisant qu'un petit nombre.

Les *sporoactinomycètes* produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié ou non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme *Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces*.

La largeur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2 μm . Leur ramification est très souvent monopodiale mais parfois dichotomique ou verticillée.

Le mycélium du substrat est ancré dans le support solide ou il puise ses nutriments. Sa croissance, de type apicale, est analogue à celle observée en milieu liquide.

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe.

Divers mutants de *Streptomyces* sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits (**Chater et Merrick, 1979**).

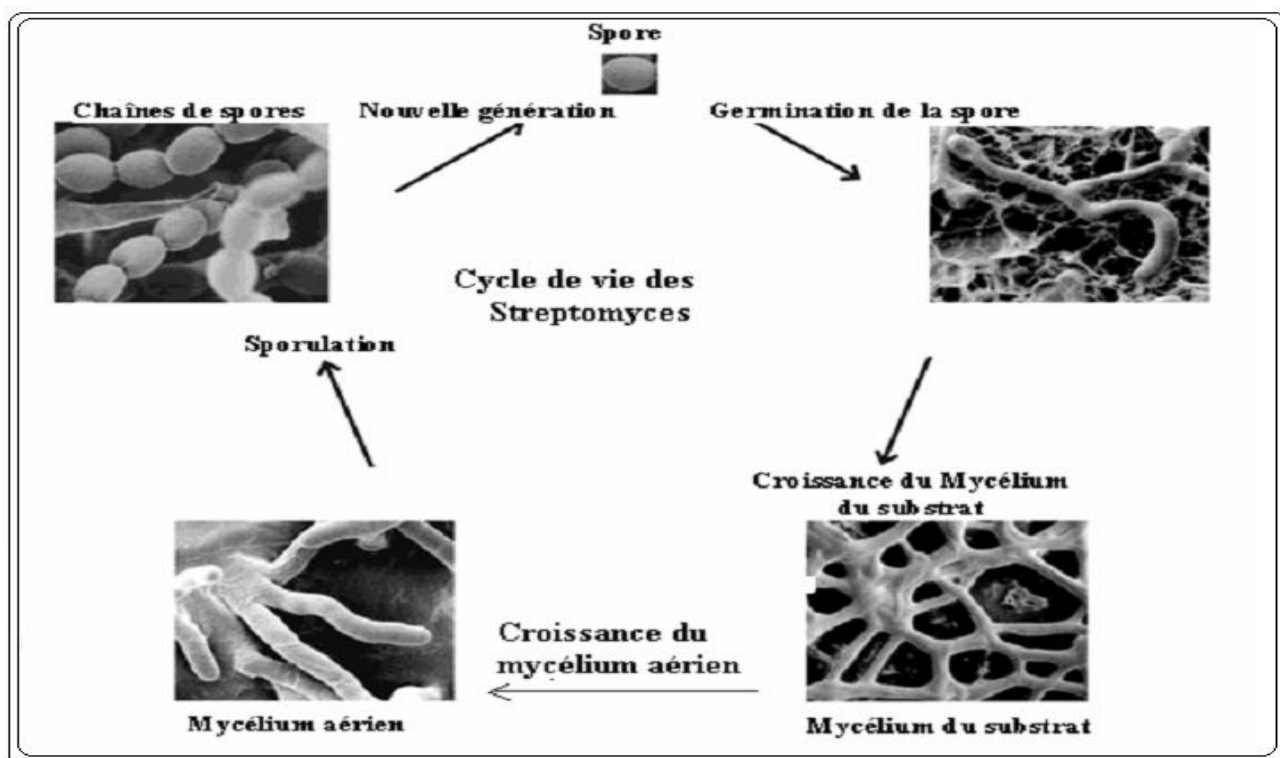


Figure 3 : Cycle de vie des actinomycètes (*Streptomyces*).

I.6.2. Formation des spores

Les spores d'actinomycètes ont une fonction de dispersion et de survie dans des conditions défavorables de croissance végétative. Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores.

- Les exospores sont le type le plus fréquent, elles sont formées par septation d'hyphe existants et séparation des éléments obtenus.
- Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles, elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant.

La viabilité des spores est fonction de leur type : des endospores de *Thermoactinomyces* ont survécu plusieurs centaines d'années dans des sédiments lacustres à 5 °C. Comparativement, des exospores sèches de *Streptomyces* survivent 20 à 30 ans comme les conidies de champignons.

La thermorésistance des endospores est nettement supérieure à celle des exospores en milieu sec ou humide (**Leveau et Buix, 1993**).

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

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (**Beppu, 1986, 1992 ; Grafe et al., 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitalis et al., 1986**).

I.6.3. La germination des spores

A l'issue d'une dormance dont la durée est fonction du type et des conditions du milieu, les spores germent pour donner naissance à un mycélium. On distingue généralement quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube de germination et la croissance de celui-ci.

Les exospores dont la dormance est de type exogène, sensible au milieu, germent après activation par un choc thermique qui peut être par exemple de 50 °C chez *S. viridochromogenes*, suivie d'une initiation en présence de L-alanine, d'adénosine, d'acide glutamique, d'acide para-aminobenzoïque, d'ions Ca^{+2} , Mg^{+2} et de CO_2 . L'oxydation des réserves de tréhalose fournit l'énergie nécessaire.

Les endospores de *Thermoactinomyces* ne germent dans des conditions de milieu favorable qu'avec une activation spécifique de nature physique. Un refroidissement à 20 °C de 2 à 48 h est nécessaire pour permettre aux spores de *Thermoactinomyces vulgaris* de répondre ensuite au choc thermique de 55 °C inducteur de la germination (**Leveau et Buix, 1993**).

I.6.4. Structures particulières

Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

Ainsi les sclérotés trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*. Les sporanges sont des sacs contenant des spores.

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

- une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
- une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
- conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

I.6.5. Détermination des genres

La distinction entre les divers groupes d'actinomycètes est actuellement établie sur des critères morphologiques, physiologiques, physiques et biochimiques.

Les critères physiologiques se limitent au type de métabolisme oxydatif ou fermentatif. Le principal caractère physique considéré est la sensibilité des spores à la chaleur. Les caractères morphologiques et biochimiques sont les plus importants.

I.7. Le matériel génétique

Le matériel génétique des actinomycètes est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par de l'ADN plasmique ou de l'ADN phagique.

I.7.1. ADN chromosomique

Le cytoplasme des hyphes est compartimenté par des septa, L'ADN est présent dans ces compartiments sous une forme condensée nucléoïdique. Généralement, plusieurs copies coexistent dans chaque compartiment hyphal mais une seule est incluse dans chaque spore (**Hopwood et Glauert, 1960**).

A chaque nucléoïde correspondrait une molécule d'ADN continue et circulaire. Chez *Streptomyces*, ce chromosome circulaire contient environ trois fois plus d'ADN que chez

Escherichia coli ou *Bacillus subtilis*. Des séquences répétitives – environ quatre copies par génome haploïde – constituent 5% du génome (**Antonov et al. 1977**).

Un caractère majeur est la proportion élevée – environ 70% - de guanine et cytosine (G + C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes. Cette proportion élevée (G + C) explique que les enzymes de restriction reconnaissant des sites à G + C % important donnent naissance à des fragments d'ADN petits et nombreux.

La technique classique de conjugaison et d'étude des recombinants a permis de construire des cartes génétiques notamment chez plusieurs espèces de *Streptomyces* et chez *Nocardia mediterranei*. Plus de 100 gènes ont été ainsi localisés sur la carte génétique de *Streptomyces coelicolor* A 3(2), la souche d'actinomycète la mieux étudiée aujourd'hui.

Par ailleurs, les cartes génétiques de différentes espèces de *Streptomyces* montrent une similitude considérable.

Enfin, l'instabilité génétique et l'amplification de séquences génomiques, sur lesquelles nous reviendrons dans le cadre des mutations, sont deux caractéristiques importantes des *Streptomyces* (**Theilleux, 1993**).

I.7.2. ADN plasmique et ADN phagique

Des plasmides de tailles très diverse – de 2 Kb – et en nombre très variable de copies – de 1 à plusieurs centaines – ont été mis en évidence chez les *Streptomyces*. Ces plasmides généralement circulaires, dans quelques cas linéaires, sont impliqués dans le contrôle de caractères phénotypiques touchant notamment la différenciation, la fertilité, la production d'antibiotiques et la résistance à ceux-ci.

Ainsi, certains de ces plasmides sont des plasmides de fertilité capables de s'intégrer de façon réversible au chromosome hôte. C'est le cas des facteurs sexuels SCP1 et SCP2 de *S. coelicolor* A. Le plasmide SCP1 comprend d'autre part des gènes codant pour la biosynthèse de la méthylénomycine et la résistance à celle-ci.

Les actinophages sont largement répandus dans la nature et peuvent être isolés du sol difficulté. Les phages virulents ou tempérés à ADN décrits par Chater (1980) ont un génome variant de 40 à 100 Kb et un contenu G+C de 55% à 73%. Séquences d'insertion et transposons forment un dernier groupe d'éléments transposables (**Theilleux, 1993**).

Métabolisme secondaire



II. 1. Vue générale du métabolisme

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Ces bactéries filamenteuses sont connues pour la richesse de leur métabolisme secondaire.

II.1.1 .métabolisme primaire

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

II.1.2. métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont définis comme des composés de faible poids moléculaire, non essentiels à la croissance du microorganisme producteur. La production de ces métabolites est souvent associée à la croissance des microorganismes correspondant à la phase stationnaire de la courbe de croissance (**Demain, 1995**).

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire. Les gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la résistance des antibiotiques sont regroupés en clusters dont l'expression est finement régulée. Les gènes impliqués dans la production d'antibiotiques Ca^{+2} dépendant représentent plus de 1,1 % du génome de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (**Hodgson, 2000**).

Si l'homme trouve un intérêt pratique évident aux métabolites secondaires (antibiotiques, herbicides, anticancéreux ...), ses interrogations quand au rôle biologique de ces molécules pour la cellule bactérienne demeurent (C'est aussi le cas en botanique. Par exemple, le rôle biologique de la quinine, molécule très efficace contre la malaria, produite par l'arbre **cinchona** est inconnu).

Selon la littérature, il existe deux grandes hypothèses sur l'origine du métabolisme secondaire : la sélection par le produit final (final-product selectionist school) et le métabolisme du trop-plein (overflow metabolism). L'école de la sélection par le produit final explique l'apparition du métabolisme secondaire par un processus de sélection naturelle.

En effet, les métabolites secondaires, qui sont principalement des antibiotiques, pourraient servir à empêcher l'utilisation des produits de lyse du mycélium primaire (substrat) lors du processus de différenciation au cours duquel ce mycélium est utilisé par le mycélium aérien et auraient de ce fait, un rôle protecteur. Cette hypothèse n'explique pas plusieurs constatations. Ainsi, tous les métabolites secondaires ne sont apparemment pas des antibiotiques. Par exemple le rôle sélectif d'un immuno-modulateur dans le sol est inconnu à ce jour.

Certaines espèces d'actinomycètes produisent beaucoup d'antibiotiques et d'autres très peu, voire pas du tout. Les espèces qui en produisent plus devraient donc être avantagées d'un point de vue évolutif au détriment de celles qui en produisent peu or ce n'est pas le cas. Il n'existe pas d'explication sur les possibilités d'évolution au cours du temps de ces voies complexes de biosynthèse.

L'évolution étape par étape par un processus de sélection naturelle des voies du métabolisme secondaire n'est pas possible. Par exemple, bien souvent, le précurseur direct n'a pas d'activité antibiotique. De plus, il existe des antibiotiques, comme la streptomycine constitués d'assemblages de nouveaux sucres, unités n'ayant pas de rôle antimicrobien. Autrement dit, l'évolution ne peut pas regarder dans le futur. Par cette hypothèse, le métabolisme est un énorme paradoxe à lui tout seul.

L'autre grande hypothèse considère les métabolites secondaires comme des métabolites issus du trop-plein du métabolisme central. En effet, le métabolisme primaire fournit les précurseurs qui alimentent le métabolisme secondaire. Or, lorsque la croissance bactérienne est perturbée par une carence en phosphate par exemple, le métabolisme secondaire pourrait être induit pour permettre au métabolisme primaire de se maintenir au ralenti en attendant que la carence en question soit comblée. En fait, c'est plus le métabolisme secondaire dans son processus qui serait utile à la cellule bactérienne que le métabolite secondaire en tant que produit final de ce métabolisme.

Donc, dans cette hypothèse, le contrôle du métabolisme primaire aurait pour conséquence l'induction d'un métabolisme d'overflow, le métabolisme secondaire. Dans cette hypothèse de métabolisme d'overflow, le rôle biologique de ces métabolites se serait révélé par la suite, ce qui réconcilierait ces deux hypothèses (**Hodgson, 2000**)

II.2. Importance dans le domaine industriel

II.2.1. Importance en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique des actinomycètes, leur diversité écologique et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire (**Abbas, 2006**). Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent 50% de la population totale des actinomycètes telluriques, et 75-80% des antibiotiques dérivent de ce genre (**Mellouli et al., 2003**)

Les actinomycètes gagnent en importance, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (**Valan arasu et al., 2009**), ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique.

Ainsi, de nombreux métabolites sont synthétisés, qui peuvent être des : antibiotiques, enzymes telles que les enzymes alcalines (**Li et al., 2005**), les transglutaminases, les xylanases et cellulases utilisées dans le traitement des sous-produits (**Rawashdeh et al., 2005**), des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs (**Badji, 2006**), des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires (**Oskay et al., 2004**).

Actinomycètes sont de remarquables producteurs d'antibiotiques (figure), les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques (Oskay *et al.*, 2004). Ainsi, 80% des antibiotiques commercialisés proviennent de ce genre (Thakur *et al.*, 2007), à savoir : la streptomycine, la novobiocine, la nystatine, etc.

D'autres genres producteurs peuvent être cités : *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardiopsis*, et *Saccharothrix*. Parmi les molécules élaborées par les Actinomycètes, seulement 20% représentent des antifongiques (Sanglier *et al.*, 1993)

II.2.1.1. La production des antibiotiques

Les actinomycètes ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique. Ils sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques. On estime que les deux tiers des quelque six milles antibiotiques isolés jusqu'ici sont produit par les actinomycètes ils sont la source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine). Parmi les antibiotiques actuellement décrits, environs 70% sont synthétisés par les microorganismes, et près de 60% par les actinomycètes (Leclere *et al.*, 1986).

II.2.1.2. La production des enzymes

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes (Lopes *et al.*, 1999).

II.2.1.2.1. Les cellulases

Les actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, excrètent des enzymes qui dégradent la cellulose (Sanglier *et al.*, 1993 ; Mason *et al.*, 2001). D'autres espèces d'actinomycètes produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (Rivas *et al.*, 2003).

II.2.1.2.2. Les ligninases

Beaucoup d'espèces d'actinomycètes telles que *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces fusca* ont une activité lignocellulolytique et sont capables de produire l'hémepéroxydase, enzyme qui dégrade la lignine (Mason *et al.*, 2001).

II.2.1.2.3. Les pectinases

La production d'enzymes pectolytiques est élaborée par différents genres d'actinomycètes tels que : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.*, 1993).

II.2.1.2.4. Les xylanases

Elles sont élaborées par des espèces thermophiles du genre *Streptomyces* et des souches du genre *Promicromonospora*, ainsi que par différentes espèces de *Microbispora*, *Micromonospora* et *thermomonospora* (Demain et Solomon, 1985 ; Rivas *et al.*, 2003 ; Petrosyan *et al.*, 2003).

II.2.1.2.5. Les amylases

Elles sont produites par la majorité des actinomycètes, les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora curvata*, *Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.*, 1993).

II.2.1.2.6. Les dextrinases

Elles sont excrétées par de nombreuses souches d'*Oerskovia xanthineolytica* et *Actinomyces israeli* (Demain et Solomon, 1985).

II.2.1.2.7. Les chitinases

Elles sont produites par de nombreux genres d'actinomycètes tels que les genres *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* et par les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii* (Hsu et Lockwood, 1975 ; Demain et Solomon, 1985).

II.2.1.2.8. Les lipases

Les lipases endo et exocellulaires sont isolées à partir de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*. Des phospholipases sont également isolées avec un taux élevé à partir des espèces du genre *Streptoverticillium* et de l'espèce *Micromonospora chalcea* (Demain et Solomon, 1985).

II.2.1.2.9. Les protéases

Des protéases alcalines thermostables sont produites par les espèces thermophiles du genre *Micropolyspora*, d'autres protéases résistantes à la majorité des inhibiteurs de protéases, sont isolées à partir du genre *Oerskovia*, d'autres genres d'actinomycètes tel que les genres *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Planomonospora*, *Planobispora* sont capables de produire des kératinases. Les élastinases sont élaborées par plusieurs souches appartenant à 14 genres d'actinomycètes (Demain et Solomon, 1985 ; Chitte *et al.*, 1999).

II.3. Autre importance

Les actinomycètes sont utilisées également comme des insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinoctricine) et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (la rapamycine et le FK 500 (**Petrosyn et al., 2003**)).

II.4. Importance dans le domaine agronomique

La fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Les actinomycètes, fort nombreux dans les sols, se joignent aux autres bactéries et aux champignons comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus. Ils prolifèrent surtout quand l'action des bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action. Ils jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols (**Mariat et Sebald, 1990**).

II.4.1. Rôle des actinomycètes dans la biodégradation de la matière organique

II.4.1.1. La notion de biodégradation

La biodégradation consiste à décomposer un substrat organique comme, les hydrocarbures, les solvants, les composés organochlorés, etc. par l'action des microorganismes vivants. Les polluants sont digérés par les microbes et transformés en composés plus simples non toxiques.

On distingue la biodégradation en présence d'oxygène (en aérobiose), de la biodégradation en absence d'oxygène (en anaérobiose), par la nature des microorganismes dégradateurs et les produits de dégradation.

II.4.1.2. Le processus impliqué dans la biodégradation des polymères organiques

Le processus de biodégradation est généralement réalisé en deux étapes :

II.4.1.2.1. La fragmentation

Les microorganismes utilisent différents modes opératoires pour fragmenter les polymères en un mélange d'oligomères et/ou monomères, dont principalement, la sécrétion des enzymes spécifiques. Ces enzymes peuvent être :

- **Des hydrolases** comme : les cellulases, les amylases et les chitinases, qui sont des hydrolases facilement synthétisés par les microorganismes du sol pour hydrolyser les

polymères naturels abondants (par exemple la cellulose, l'amidon et de la chitine). Les lipases, les estérases et les endopeptidases.

- **Des oxydoréductases** comme : les mono-oxygénases, les di-oxygénases, les peroxydases et les oxydases qui sont produites par la plupart des micro-organismes lignolytiques (Lucas *et al.*, 2008).

II.4.1.2.2. L'assimilation

L'assimilation est l'événement unique dans lequel il ya une intégration réelle des atomes à partir des fragments d'un polymère à l'intérieur des cellules microbiennes. Les molécules transportées sont oxydés par 3 principales voies cataboliques (La respiration aérobie et anaérobie et la fermentation) qui conduisent à la production d'ATP et des éléments constitutifs de la structure cellulaire (Lucas *et al.*, 2008).

- **La respiration aérobie:** les micro-organismes sont capables d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Tout d'abord, les voies cataboliques de base (glycolyse, par exemple, β -oxydation, les réactions cataboliques des acides aminés, des purines et des pyrimidines) produisent une quantité limitée d'énergie. Deuxièmement, plus d'énergie est encore produite par la phosphorylation oxydative réalisée par des systèmes de transport d'électrons qui réduisent l'oxygène en eau. Le résultat est aussi la synthèse de plus grandes quantités de molécules d'ATP que dans l'oxydation incomplète.

- **La respiration anaérobie:** les micro-organismes utilisent des accepteurs finals d'électrons autres que l'oxygène (par exemple, NO^{-3} , SO_4^{-2} , S, CO_2 , Fe^{+3} et de fumarate) (Brock and Madigan, 1991). Le résultat est aussi la synthèse de plus grandes quantités de molécules d'ATP que dans l'oxydation incomplète.

- **La fermentation :** une voie d'oxydation incomplète dans laquelle les molécules organiques endogènes synthétisées par la cellule elle-même sont utilisées comme accepteurs finals d'électrons. Les produits de la fermentation peuvent être minérales et/ou organiques (le CO_2 , l'éthanol, le lactate, l'acétate et le butanediol) (Regnault, 1990; Brock and Madigan, 1991; Alcamo, 1998).

II.4.1.3. La biodégradation des polymères naturels

Les actinomycètes peuvent utiliser beaucoup de sources naturelles de carbone et d'azote. Les genres mésophiles et thermophiles et plus particulièrement : *Streptomyces* et *Thermomonospora* respectivement, ont la capacité de dégrader l'amidon par hydrolyse grâce à des complexes enzymatiques extra-cellulaires composés α et β amylases. L'amylase de *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces praecox* peuvent produire des concentrés de sirop de maltose à partir d'amidon (Martin *et al.*, 1998).

Ils sont capables également d'attaquer tous les composants lignocellulotiques, y compris la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Il a été montré que *Thermomonospora fusca* peut convertir les déchets des usines de pâte hautement cellulosiques et à lignine faible, en un

produit protéique à haute valeur nutritionnelle, utilisé comme complément alimentaire dans le régime alimentaire des poussins (Martin *et al.*, 1998).

La présence de grandes quantités de chitine dans les sols et dans les environnements marins a permis l'évolution d'une grande diversité de microorganismes capables de décomposer cette substance, dont les principaux sont les actinomycètes (Jerome *et al.*, 2004) tel que les genres *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* et les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii* (Hsu et Lockwood, 1975 ; Demain et Solomon, 1985) par deux principaux enzymes : La chitinase et la chitobiase (Jerome *et al.*, 2004).

II.4.1.4 La biodégradation des polymères de synthèse

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques de synthèse, tel que : les hydrocarbures, les phénols, les pesticides et d'autres composés récalcitrants (Kimura et Urushigawa, 2001 ; Lin *et al.*, 2005 ; De Schrijver et De Mot, 1999).

Il a été démontré que les souches de *Nocardia* peuvent dégrader une variété d'alcane tels que le 1 -phénylalcane et 1 cyclo-hexylalcane, des cycloalcane et cycloalcène, des hydrocarbures aromatiques tels que le biphenyle, la benzidine (Martin *et al.*, 1998), le xylène, le p-nitrophénol (PNP) et de nombreux autres composés phénoliques (Hanne *et al.*, 1993).

Le genre de *Nocardia* est efficace dans la dégradation des huiles (Jirasripongpun, 2002), du kérosène (Edelvio *et al.*, 2009) et du caoutchouc (Emo and Roberto, 2003). Il est capable aussi de dégrader certains pesticides, tel que : l'herbicide « dalapon », et l'acide 2,2-dichloropropionique (Martin *et al.*, 1998).

De nombreuses espèces isolées du genre *Rhodococcus* dégradent un large spectre de composés récalcitrant. Par exemple, *R.opacus* SAO101 est capable de croître sur le phénol, le benzène, le 4-nitrophénol, le biphenyle, le naphthalène, le dibenzofurane et le dibenzo-p-dioxine (Kimura et Urushigawa, 2001). *R.opacus* M213 dégrade le naphthalène, le toluène, le phénol et l'hydroxybenzoate (Uz *et al.*, 2000).

Certains pesticides persistants comme le thiocarbamate et le s-triazine (De Schrijver et De Mot, 1999), ainsi que le 2-mercaptobenzothiazole peuvent être catabolisés par des actinomycètes appartenant aux genre *Rhodococcus* (Haroune *et al.*, 2004).

La dégradation versatile du genre *Rhodococcus* est due à la présence de larges plasmides linéaires portants des gènes codant pour la dégradation de différents composés (Van der Geize et Dijkhuizen, 2004 ; Konig *et al.*, 2004).

Le genre *Mycobacterium* a également un grand pouvoir dégradant. Mrozik *et al.*, (2003) ont montré que la majorité des isolats capable de croître sur les HAPs appartiennent à ce

genre. Les *Streptomyces* sont très répandus dans la nature et jouent un rôle très important dans la biodégradation des composés naturels et aromatiques (Anurag *et al.*, 2005), et également des pesticides et des plastiques (Byungtae L *et al.*, 1991 ; Ei-Shafei *et al.*, 1998).

Un actinomycète halotolérant *Streptomyces albiacialis* est capable de croître sur le pétrole brute et l'utiliser comme source unique de carbone et d'énergie dans une gamme de salinité de 3-10% de NaCl (Kuznetsov *et al.*, 1992).

Il a été démontré que 17 souches, identifiées comme *Streptomyces* sp ont été capables de dégrader le diuron (4 mg/l), qui est un puissant biocide qui - jusqu'à son interdiction - a été très utilisé comme désherbant pour tuer les graminées indésirables et d'autres mauvaises herbes (Castillo *et al.*, 2006).

Une souche appartenant au genre *Streptomyces* est capable de dégrader le lindane : un insecticide organochloré commercialisé depuis 1938, longtemps utilisé en agriculture et dans les produits pharmaceutiques pour le traitement de la gale et l'élimination des poux.

Chez l'homme, le lindane atteint principalement le système nerveux, le foie et les reins, et il est peut-être un agent cancérigène et / ou perturbateur endocrinien (Benimeli *et al.*, 2006).

Des espèces de ce genre peuvent aussi dégrader certains pesticides résistants comme le DDT et la simazine. Dans des travaux récents, une étude réalisée sur la biodégradation du pesticide, carbofuran par 319 actinomycètes isolés à partir d'un sol salin, prouve que seul sept isolats de ces actinomycètes ont été capables de résister au pesticide, à une concentration de 20µg/ml, et ils ont été identifiés comme : *Streptomyces alanosinicus*, *Streptoverticillium album*, *Nocardia farcinia*, *Streptomyces atratus*, *Nocardia vaccini*, *Nocardia amarae* et *Micromonospora chalcea* (Jayabarath *et al.*, 2010).

Plusieurs rapports ont été publiés sur les souches du genre *Gordona* appartenant aux actinomycètes, possèdent un pouvoir dégradant des composés xénobiotiques. Plusieurs isolats de ce genre utilisent le benzène, le toluène, le xylène, le pyrène et le diester de phthalate comme seule source de carbone et d'énergie (Zermane, 2008).

Partie expérimentale



III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Objectif

L'objectif principal de notre étude était de rechercher la production des enzymes à intérêt technologique chez des actinomycètes. La réalisation de ce travail a nécessité :

- ❖ L'isolement des souches d'actinomycètes à partir des sols des zones arides
- ❖ Les isolats purifiés seront criblés pour leur activité enzymatique
- ❖ L'extraction des enzymes pectinolytique
- ❖ Recherche des lyases et/ou polygalacturonases
- ❖ Détection des produits de dépolymérisation par CCM

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques de l'université Dr. MOULAY TAHAR – Saida, faculté des sciences Département de biologie, pendant la période allant de Février à Mai 2015

III.2.ISOLEMENT DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES

III.2.1. Prélèvement des échantillons

Cette étape a pour but d'isoler et d'avoir le maximum de souches d'Actinomycètes contenues dans les échantillons de sol (**Donhann, 2007**).

Les Actinomycètes sont des microorganismes faciles à cultiver. Par ailleurs, leur croissance lente et leur faible nombre dans les échantillons de sol sont souvent masqués par les bactéries et les champignons à croissance rapide lors de l'isolement.

Les échantillons de sol des zones arides ont été prélevés selon la technique de Pochon et Tardieux dans la région d'Al Bayadh à partir des sites suivants (El Kheiter 100 Km au nord du chef-lieu de la wilaya, Sidi Khalifa 105 Km au nord d'Al Bayadh et Ghar Sidi Khlifa 4 Km à l'ouest d'el-Kheiter)

Après l'élimination des premiers 5cm du sol superficiel et à l'aide d'100 g de sol ont été prélevés dans une profondeur située entre 10cm et 20cm. Les échantillons ont été mis dans des sachets stériles et conservés à température ambiante jusqu'au laboratoire (**Pochon et Tardieux, 1962**)

III.2.2. Mesure du pH des échantillons

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée des échantillons au laboratoire. La technique consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol en eau distillée (5g de sol pour 12,5 ml d'eau distillée) (**Pochon et Tradieux, 1962**).

III.2.3. Traitement

Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO₃ et incubé à 28°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavala et Eberlin, 1994**).

III.2.4. Préparation de la suspension mère des dilutions

La méthode d'isolement utilisée est celle des suspensions dilutions. Les échantillons de sols sont d'abord broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre. Ainsi 5g de sol sec sont suspendus dans 45ml d'eau distillée stérile, se qui représente la dilution 10^{-1} après agitation au vortex pendant 10 minutes, une série de dilutions au 1/10 jusqu'au 10^{-8} sont réalisées (Williams et Cross, 1971 ; Williams et Wallington, 1983 ; Hilali L et al., 2002).

III.3. Isolement, purification et conservation des actinomycètes

0.1 ml des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} en eau physiologique (NaCl 9g/l) des échantillons de sols d'arbres sont étalée à la surface de milieu de culture Bennett .les boite de pétri sont alors incubées à 28°C. Les boites sont observées leur après deux, trois et quatre semaine d'incubation.

A l'aide d'un microscope optique, les colonies *actinomycétales* sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique. Elles sont purifiées sur le milieu Bennett.

Par la suite, conservées par :

-En gélose inclinée à 4 °C après incubation de 21jours à 28°C un repiquage est effectué tous les deux mois (Hilali et al., 2002).

- Une congélation à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu Bennett sont remplis de L'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation (Isik et al., 1999).

III.4. Etude phénotypique

Les souches *actinomycétales* représentatives isolées de sol sont soumises à une étude des différents caractères morphologique cultureux, physiologique, biochimique dans le but de leur identification

III.4.1. Etude morphologique

III.4.1.1. les caractères cultureux et morphologiques

Ces caractères sont déterminés sur le milieu Bennet. Le milieu stérilisé et réparti en boîtes de pétri qui sont incubées 24 heures à 28 °C afin de contrôler leur stérilité. Les boîtes sont ensemencées par la méthode de stries avec une goutte de chaque suspension d'inoculum déposée en bordure de la gélose. Après 7, 14 jours d'incubation à 28 °C, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur le milieu sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence des pigments diffusibles dans la gélose autre que les pigments mélanoïde sont notés (Shirling et Gottlieb, 1966).

III.4.1.2. Etude micro morphologique

III.4.1.2.1. Observation au faible Grossissement

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (Grossissement x40) (Suzuki, 2001).

III.4.1.2.2. Observation au fort grossissement

Est une observation au microscope optique (Grossissement x100), après coloration de Gram.

La coloration de Gram est une double coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utilisées ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Procédure de cette coloration

- Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen ;
- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Rincez à l'eau distillée ;
- Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) pendant 1 minute. Puis rinçage à l'eau distillé ;

- Décoloration par l'alcool pendant 30secondes, Rincer à l'eau ;
- Recoloration à la fuschine pendant 1minute, rinçage à l'eau puis séchage ;
- Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement ×100).

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (Camille, 2007).

III.4.2.Etude physiologique et biochimique

III.4.2.1.Hydrolyse de l'amidon

Les souches sont ensemencées sur le milieu gélose nutritif contenant 1 % (P/V) d'amidon soluble, après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (Geraldine et al., 1981).

III.4.2.2.Hydrolyse de la gélatine

La souche est cultivée sur milieu gélose nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine pendant 14 jours à 30 °C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996).

III.4.2.3. Utilisation des différents substrats carbonés et Production de l'H₂S

Des tubes contenant le milieu TSI (three Sugar iron) Sont ensemencés par piqure centrale et en surface puis incubés pendant 7 à 14 jours à 30°C (Marchal et al., 1991).

Les résultats se manifestent comme suit :

-Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune.

-Glucose positif : Culot jaune.

La production de l'H₂S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu.

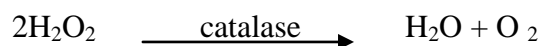
III.4.2.4. Utilisation du citrate comme source de carbone

Des tubes contenant le milieu citrate de Simmons sont ensemencés en strie longitudinale.

L'incubation s'effectue à 30°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (Marchal *et al.*, 1991).

III.4.2.5. La recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie (Dunod, 1999).



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ à 10 volumes : une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulle : catalase – (Camille, 2007).

III.4.2.6. La recherche de l'Uréase

Uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée, (NH₂)₂.CO, en dioxyde de carbone et ammoniac.

Cette réaction consiste à versé 4goutte d'urée-indole dans 4,5ml d'eau physiologique et par la suit ensemencées par la suspension bactérienne. la lecture effectuée après 48heures d'incubation à 30°C (Marchal *et al.*, 1991).

-si la couleur vire vers le rouge : uréase positive.

-si la couleur reste inchangé : uréase négative.

III.4.2.7. Recherche de la production d'indole

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes d'urée-indole sontensemencées. La lecture est effectuée après incubation à 30°C pendant 48heurs. 2 à 3 gouttes de réactif de Kovac sont ajoutés à 1ml de la culture une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface (**Marchal et al., 1991**).

III.5. Recherche de l'activité pectinolytique des souches isolées

Pour la recherche des activités pectinolytiques, les souches isolées sont d'abord repiquées sur milieu **Gélose Trypticase soja (TSG)** supplémenté de 1% citrique pectine. Après incubation, les boîtes sont recouvertes par une solution Lugol 10mL.

L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Van Der Sand et al. 2014**).

III.5.1. Fermentation submergée de pectinase

La production de pectinase de l'actinomycète isolé sélectionné a été effectuée dans un bouillon contenant de la pectine. La fermentation a été effectuée dans un Erlenmeyer contenant 250 ml de milieu de production avec 1% (p / v) inoculum et incubé à 30 ° C dans des conditions sous agitation pendant 5 jours.

La culture bouillon a été centrifugée à 8000 rpm pendant 30 min à 4 ° C. Le surnageant a été soumis à Pectinase dosage (**Angayarkanni et al ., 2002**).

III.5.2. Détermination des activités polygalacturonase et lyase par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA).

L'activité polygalacturonase et ou lyase, par le biais de ses produits de dépolymérisation, est mise en évidence par la mesure des absorbances à des longueurs d'onde allant de 450nm à 555nm par le test spécifique TBA.

Ainsi, 0.4ml de filtrat de culture (sur pectine) sont additionnées de 0.6ml d'acide thiobarbiturique (0.04M) et 0.3ml d'HCl (N) ainsi que 0.7ml d'eau distillée. Le tout est

maintenu dans un bain-Marie bouillant durant 30minutes puis refroidis. Les absorbances sont aussitôt mesurées. **(Boumendjel. 2009).**

III.6.Détection des produits de dépolymérisation par CCM

Des cultures non-ensemencées (témoins), ainsi que les filtrats de culture sont déposés à raison de 20µl/dépôt sur une plaque de gel de silice (Schlicher Schull F15000) 10 x 10 cm.

La migration différentielle des produits de dépolymérisation dure 3 heures dans un mélange solvant : Butanol1-Acide acétique-H₂O (2, 3, 1 V/V/V). La plaque est séchée puis pulvérisée d'acide sulfurique à 5% dans l'éthanol à 95%. Enfin elle est chauffée à 100°C pendant 5 à 10 min. **(Shevchik et al., 1997).** Les produits de dépolymérisation apparaissent sous forme de taches noires sur la plaque de chromatographie, selon la réaction fulfuralique basée sur la déshydratation des oses en milieu acide fort et à chaud.

Résultat
Et
Interprétation



IV. ISOLEMENT DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES

IV.1. Caractéristiques des échantillons

Les caractéristiques et pH des échantillons des sols prélevés sont récapitulés dans le tableau 2. L'ensemble des échantillons examinés appartiennent aux zones arides. Ils se caractérisent par des pH presque neutre ou légèrement alcalin.

Tableau 2 : Description des échantillons.

Echantillon	Site de prélèvement	Description	pH
E1	(Al-kheiter)	Sol dur se forme des morceaux bruns-noirs, riche en humus.	8.50
E2	(Sidi Khalifa)	Sol sableux, jaune	8.24
E3	(Ghar sidi Khalifa)	Sol sableux, marron clair	7.25

IV.2. Isolement des Actinomycètes

A partir de 3 échantillons de sol rhizosphérique collectés sur les 3 différents sites dans la wilaya d'El Bayedh, 21 souches d'Actinomycètes sont isolées. Les nombres de souches isolées sur les différents milieux sont regroupés dans le tableau 04.

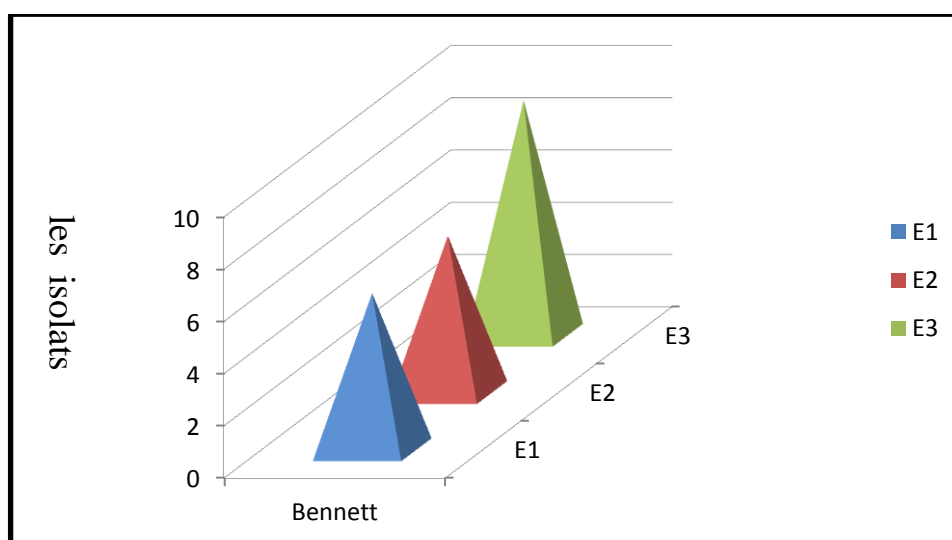


Figure 4 : nombre des actinomycètes isolés sur milieu Bennett et à partir des différents sols.

L'échantillon du sol du site Ghar Sidi Khelifa apparaît le plus riche en actinomycètes par rapport aux autres zones de prélèvement avec 9 colonies. Pour les deux autres échantillons, 6 souches d'actinomycètes sont obtenues dans chacun.

IV.3. caractéristiques macroscopiques des isolats

La figure 05 indique l'aspect macroscopique de quelques souches des actinomycètes isolées sur milieu de culture Bennett.

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines présentent seulement un mycélium du substrat.

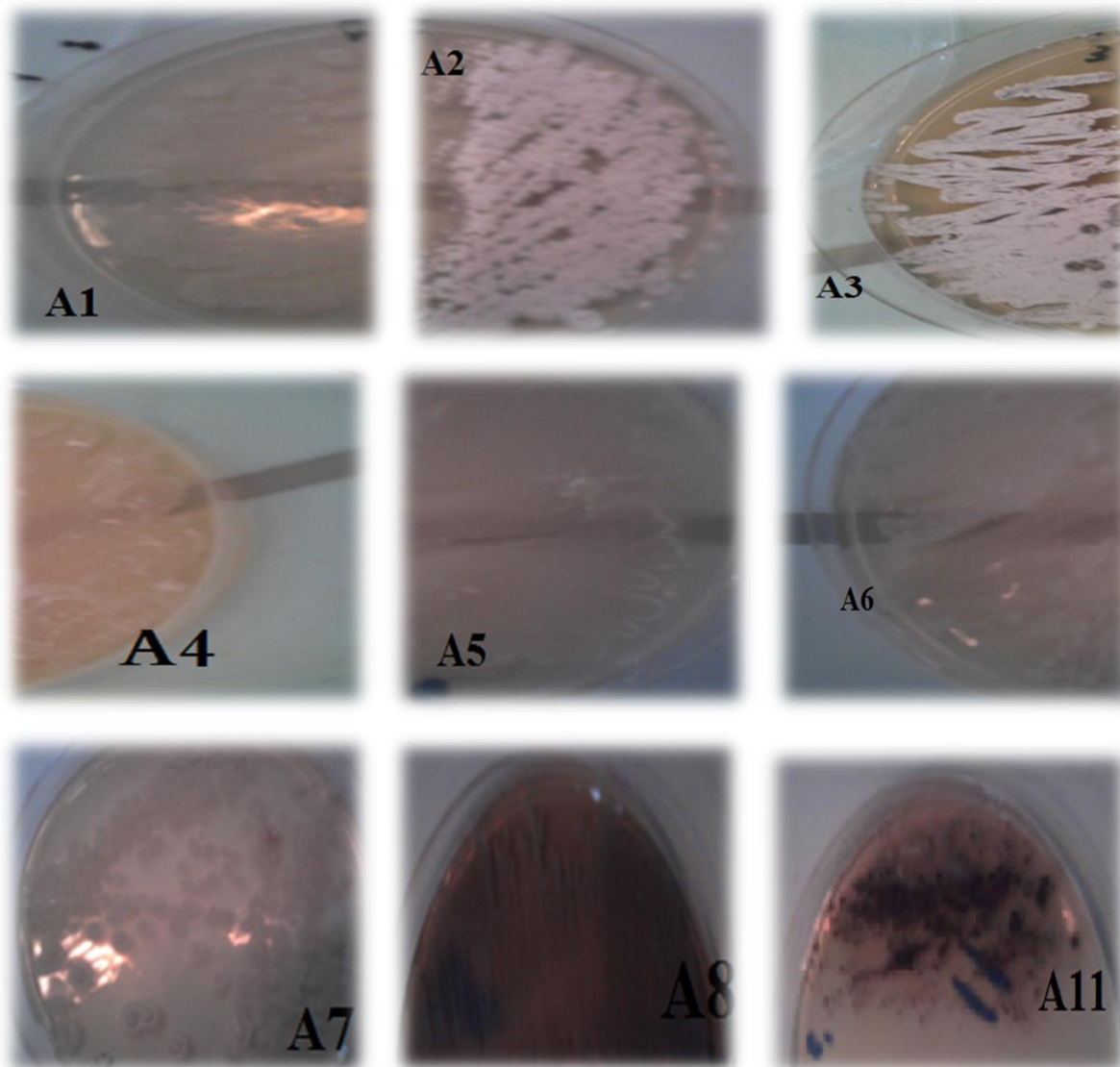


Figure 05 : aspect macroscopiques des isolats

IV.4. Identification des souches d'actinomycètes

Les tests d'identification sont réalisés seulement sur les souches qui ont montrées une activité pectinolytique.

IV.4.1 Résultat de l'étude morphologique

Les colonies des souches d'actinomycètes isolées sont toutes opaques, de forme arrondie, à bords irréguliers et incrustées dans le milieu de culture. La différence est remarquable dans la couleur du mycélium aérien, celle du mycélium végétatif, leurs tailles et la production de pigments. Les caractéristiques de chaque souche d'actinomycètes sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 3 : différents caractères morphologiques des souches d'Actinomycètes isolées.

souche	Milieu de culture			
de souche	Bennett			
	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Pigments diffusibles	Taille des colonies
A1	Marron	Marron	marron claire	Moyenne
A2	Blanc	Marron	-	Moyenne
A3	Blanc-Gris	Gris	-	Petite
A7	Blanc	Marron	marron claire	Moyenne
A8	Gris	Rouge	Rouge	petite
A11	Noir-Gris	Noir	Rouge	Petite

(MA) : Mycélium aérien, (MS) : Mycélium de substrat

Après l'ensemencement sur milieu gélosé Bennett, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. Au 14^{ème} jour la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes tailles et de couleurs de mycélium aérien (blanc, beige, marron, noir, gris, rouge-cerise). L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (marron, beige, noir, brun).

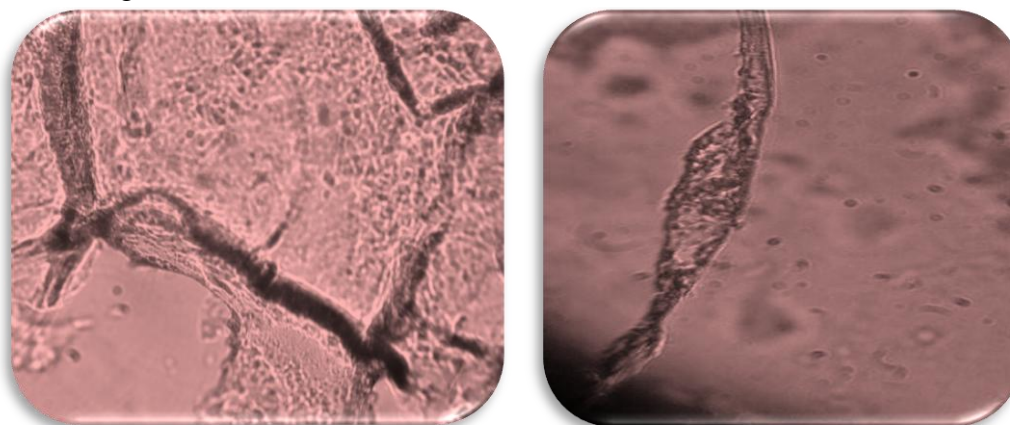


Figure 06 : observation microscopique des mycéliums des actinomycètes (G x 40).

IV.4.2. Etude physiologique et biochimique

Les résultats des caractéristiques physiologiques et biochimiques sont regroupés dans le tableau 06.

Tableau 4 : caractères physiologique et biochimique des souches d'actinomycètes

N° de Souche	Coloration Gram	Test Catalase	Caractéristique									
			Glucose	Lactose	Saccharose	Citrate	Hydrolyse de l'amidon	Hydrolyse de la caséine	Hydrolyse de la gélatine	Production d'H ₂ S	Dégradation de l'urée	Production de l'indole
A1	+	-	-	-	-	+	+	-	ND	+	+	+
A7	+	-	+	+	+	+	+	-	ND	+	-	-

(-) : test négatif, (+) : test positif, (ND) : Non déterminé.

D'après les résultats regroupés dans le tableau 06, il est apparent que les deux souches sont Gram positif et catalase négatif. Les souches A1 et A7 hydrolysent l'amidon, elles produisent de l'H₂S et utilisent le citrate de Simmons comme seule source de carbone alors qu'elles n'hydrolysent pas la caséine.

La souche A1 dégrade l'urée et produit l'indole. D'autre cas la souche A7 se développe sur les différentes sources de carbone étudiées.

IV.4.3. Résultat d'Hydrolyse de l'amidon

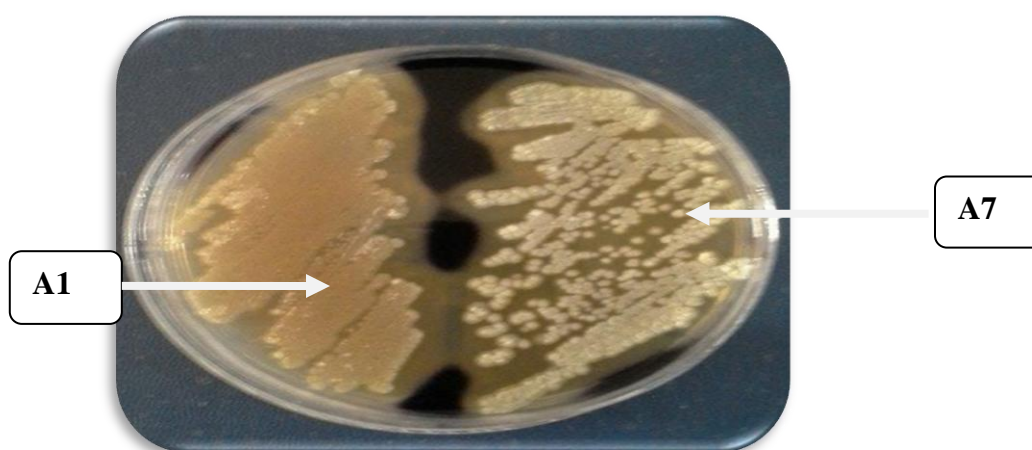


Figure 07: hydrolyse de la gélatine et l'amidon par A1 et A7

IV.4.4. Résultat de coloration de Gram

Les actinomycètes sont de bactéries filamenteuses à Gram positif

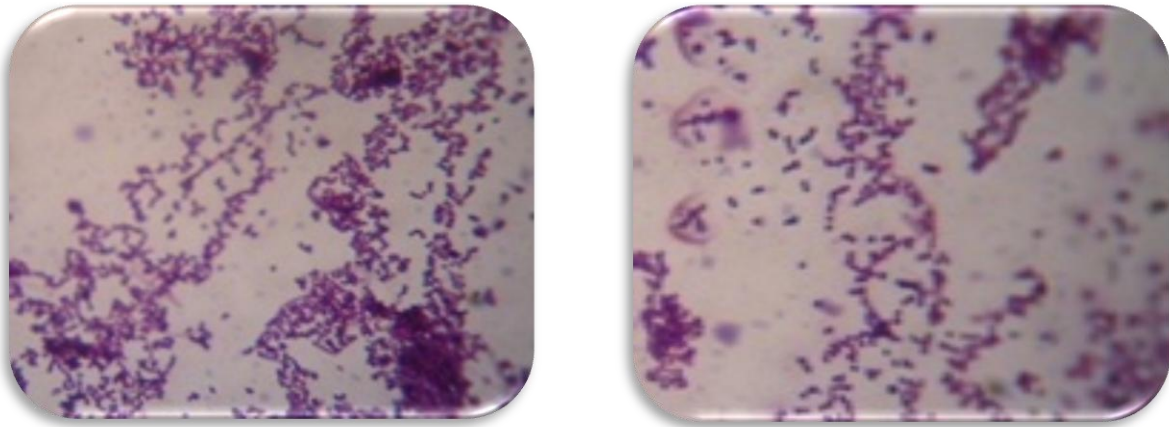


Figure08 :observation microscopique des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram.

IV.4.5.Résultat de utilisation les différentes sources de carbone étudiées



Figure 09 : utilisation des difrentes source de carbone.

IV.5. Recherche de l'activité pectinolytique des souches isolées

Pour la recherche des activités pectinolytiques les 21 souches *Actinomycétales* isolées ont été testées.

Les souches sont d'abord repiquées sur un milieu **Gélose Trypticase soja (TSG)** additionné de 1% citrique pectine. Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Dégradation de la pectine par les souches actinomycétales.

souche	Diamètres des zones claires (mm)	souche	Diamètres des zones claires (mm)
01	33	11	-
02	-	12	-
03	-	13	-
04	-	14	-
05	-	15	-
06	-	16	-
07	35	17	-
08	-	18	-
09	-	19	-
10	-	20	-
21	-		

(-) pas de croissance.

Sur l'ensemble des Vingt et une souche actinomycétales isolées et après l'incubation à 30°C pendant 7 jours, deux souches seulement (A1 et A7) ont montré une croissance sur le milieu GTS à base 1% citrique pectine.

Les deux souches ayant croissance sur milieu GTS à base de pectine sont entourées par des zones claires après la couverture des cultures, sur milieu gélosé contenant de la pectine, lugol 10ml.

L'isolat A7 a donné une zone claire d'un diamètre 35 mm tandis qu'une zone de 33 mm de diamètre a été obtenue avec la souche A1 (figure 10).

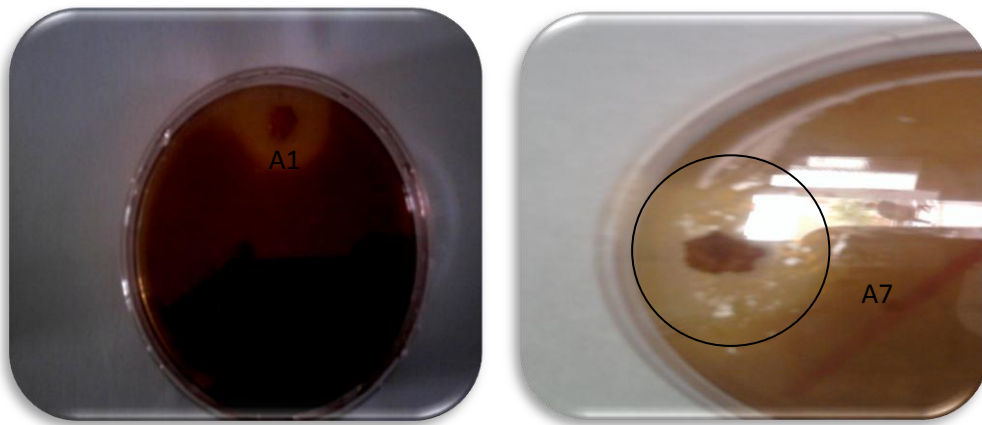


Figure10 : Zones claires résultant de l'activité pectinolytique

IV.6. Recherche des activités polygalacturonase et lyase par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA)

Les pectinases peuvent être des polygalacturonases ou des lyases ou un mélange d'estérase et de dépolymérase.

La recherche des oligomères galacturoniques insaturés issus d'une activité lyase (pectines lyases ou pectates lyases), est détectée à l'acide thiobarbiturique.

La présence de ces oligomères galacturoniques insaturés dans les filtrats de cultures est mise en évidence en défilant les longueurs d'onde de 450 à 600 nm, les lyases absorbent à 550 nm alors que les polygalacturonases absorbent à 515 nm. Les absorbances obtenues sont portées sur des courbes représentatives (figure 10).

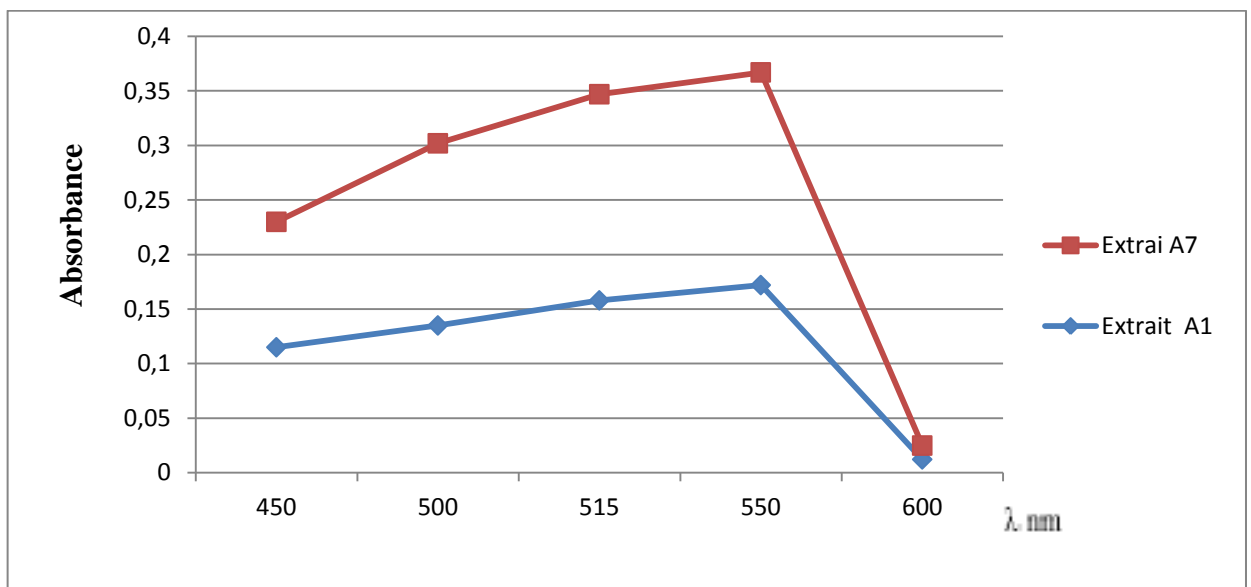


Figure11 : Mise en évidence d'une activité pectinase dans le filtrat de culture des souches (Test TBA).

La courbe montre qu'il y a un maximum d'absorption situé à 550 nm et cela pour les deux souches.

L'isolant A7 semble être la plus active avec un pic maximal à 550 nm et une absorbance de 0.35. Cette absorbance est caractéristique de la présence d'oligomères

insaturées, dans notre cas l'isolant A1 représente une absorbance moyenne (0.172) que l'autre souche dans la même longueur d'onde.

Il s'agit d'un mécanisme de catalyse par β élimination. Les deux souches sécrètent dans le milieu de culture des lyases (pectines lyases ou pectates lyases), capables de scinder l'acide pectique en oligomères insaturés de masse moléculaire relativement faible.

Ce résultat confirme la présence dans les filtrats de culture des dépolymérase de type lyases (pectines lyases ou pectates lyases).

IV.7. Détection des produits de dépolymérisation

Les produits de polymérisation ont été aussi mis en évidence par Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M.). La figure 12 représente les résultats des produits de dépolymérisation dans les filtrats de culture par chromatographie de partage sur couche mince.

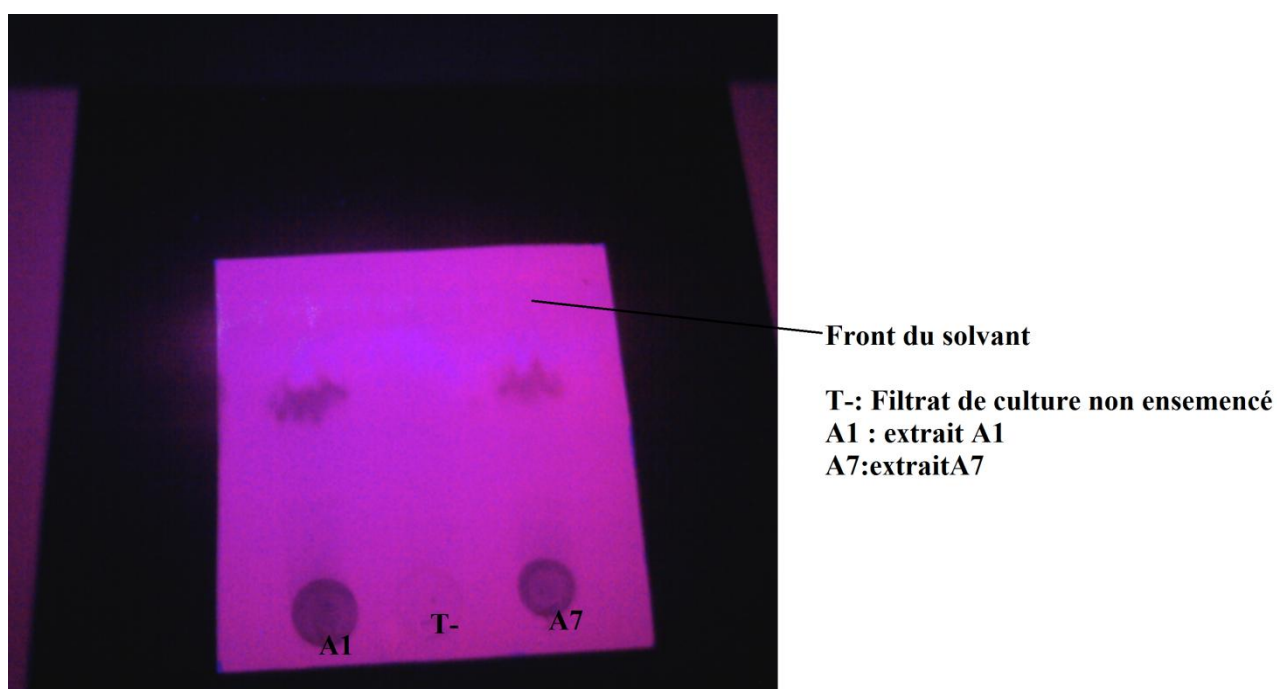


Figure 12: Mise en évidence des produits de dépolymérisation dans les filtrats de culture par chromatographie de partage sur couche mince.

D'après la figure 12, les extraits (A1 et A7) forment des tâches noires résultant de la réaction furfuralique basée sur la déshydratation des oses en milieu acide fort et à chaud.

Cet examen fait constituer une seule tâche dont la distance de migration pour les deux souches. Le calcul de Rf des bilans finaux est de 0.75.

Dans tous les cas, l'unité terminale reste majoritaire. Le produit final est donc l'acide galacturonique usé directement par le microorganisme cultivé sur milieu à base de pectine.

Ceci confirme donc la capacité de production de pectinases par cette souche d'actinomycètes locale.

Discussion



❖ Discussion

Les Actinomycètes en général, et plus particulièrement les *Streptomyces* ont une importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de *Streptomyces*, y compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (**Goodfellow et Williams, 1983**).

A ces antibiotiques dans le champ d'application s'étend non seulement aux divers domaines thérapeutique humaine et vétérinaire mais aussi à l'agriculture, s'ajoutent d'autres produits comme des enzymes et lorsque ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extracellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Et des inhibiteurs d'enzymes dont certains manifestent des activités pharmacologiques soulignant encore l'intérêt de ces microorganismes (**Theilleux, 1993**).

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence des nouvelles souches d'actinomycètes dans les sols de la zone aride et sélectionner les souches à activité enzymatique.

L'écosystème étudié dans ce travail a été choisi pour ces caractéristiques physicochimiques extrêmes. La présence des actinomycètes dans divers échantillons de sol aride de la région d'Al Bayadh avec un nombre important nous a ouvert le chemin vers des études avancées dans le domaine pour sélectionner les souches à activité pectinase.

Nos échantillons sont caractérisés par :

1. Sol de al-kheiter: sol aride dur se forme des morceaux bruns noirs, riche en humus et présente un pH de 8.50.
2. Sol de sidi Khalifa: aride, sol sableux a un pH de 8.24.
3. Sol Ghar sidi Khalifa: aride de nature sableuse, présente un pH de 7.24

Les actinomycètes en général préfèrent les sols neutres ou alcalins dans un pH entre 5-9 (**Goodfellow et Williams, 1983**).

L'isolement de ces bactéries doit passer par l'élimination des autres microorganismes, qui par leur facultés d'envahissement, gênent la croissance des actinomycètes (**kitouni, 2007**).

Plusieurs techniques de prétraitement des échantillons du sol, ont été appliquées dans les différents programmes de screening des actinomycètes dans le sol, ils ont tous comme objectifs à faciliter l'isolement sélectif des actinomycètes, qui ont une croissance lente, par rapport aux bactéries et aux champignons, qui gênent par leurs croissances rapides, la multiplication des actinomycètes. Afin d'augmenter le rapport actinomycètes / microorganismes, trois stratégies sont suivies:

- Prétraitement chimique ou physique comme : l'utilisation des agents sporosides (phenol, gluconate de chlorhexidine et le chlorure de benzéthonium) (**Thiemann, 2012**) ; le chauffage des échantillons du sol (**Baskaran et al., 2011**), la centrifugation, séchage...etc. (**Yamamura et al., 2012**).
- Utilisation dans le milieu de culture de certaines sources de carbone ou d'azote qui rende le milieu plus sélectif pour l'isolement des actinomycètes, comme : caséine, chitine, amidon, glycérol, asparagine...etc.).
- Utilisation des antibiotiques qui empêchent la croissance des bactéries et les champignons (**Zhang, 2011**).

Dans notre travail nous avons utilisé deux prétraitements, l'un physique c'est le séchage, et l'autre chimique c'est l'enrichissement par le bicarbonate de calcium (CaCO₃).

Le séchage des échantillons du sol à l'air libre pendant sept jours, a pour but la réduction de la flore bactérienne contaminante. En effet les conidiospores des actinomycètes résistent bien à la dessiccation par rapport aux autres bactéries de coloration de Gram positif et négatif (**Khanna et al., 2011**).

Les travaux de **Fan et al., 2010**, indiquent qu'un séchage des échantillons du sol pendant 7 à 21 jours réduise considérablement le nombre des champignons ainsi que les bactéries.

L'enrichissement des échantillons du sol par le bicarbonate de calcium est une technique décrite par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**. Cette technique a permis non seulement une augmentation du nombre des colonies des actinomycètes par un facteur de 100 ou plus par comparaison aux échantillons non traités par le bicarbonate de calcium. Mais, aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération court et qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinomycètes (**Gurung et al., 2009**).

Alferova et Kerekhova (1988) ont montré que le traitement des échantillons avec CaCO₃ favorise la sporulation et par conséquent augmente considérablement (jusqu'à 100 fois) le nombre des actinomycètes par rapport au témoin non traité, en même temps entraîne une diminution de la flore fongique.

Kitouni, 2007 a aussi remarqué que le plus grand nombre d'actinomycètes est isolé à partir des échantillons traités par le CaCO₃ (16,199.10⁵ UFC par gramme de sol traité contre 7,809.10⁵ UFC par gramme de sol non traité).

La présence dans le milieu d'isolement, de la chitine, de l'amidon, du glycérol, de l'arginine, de l'asparagine, de la caséine et des nitrates conduit à un isolement sélectif des

actinomycètes alors que les bactéries et les champignons poussent faiblement (**Williams et Davies, 1965**).

Le milieu Bennett a été utilisé dans cette étude, il contient des substrats sélectifs pour la croissance des actinomycètes (peptone) et il est utilisé dans de nombreux travaux d'isolement d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés (**Allaoueddine, 2007 ; kitouni, 2007 ; Boussabe et al., 2012**).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le plus grand nombre d'actinomycète a été isolé à partir de la dilution 10^{-3} . Ceci est en accord avec ceux obtenus par **kitouni (2007)**.

Les résultats d'isolement indiquent que 21 actinomycètes ont été isolés à partir de 03 échantillons du sol prélevés dans les différentes régions de wilaya d'Al Bayadh. Ce nombre faible d'actinomycètes isolés peut-être expliqué par la période d'échantillonnage réalisé en Hiver (le début de Mars).

Selon les études de **Hiltner et Stromer (In Loqman, 2009)**, les actinomycètes représentent 20% de la flore microbienne du sol au printemps, alors qu'en automne la densité des actinomycètes dépasse les 30%, cet accroissement est lié à la disponibilité des aliments pour les germes ; tandis qu'en Hiver, période d'échantillonnage, le pourcentage chute à 13% à cause du gel. Ce nombre est important en comparaison avec celui obtenu par **Messaoudi (2013)** qui a obtenu 9 isolats seulement sur le milieu Bennett et à **Djaballah (2010)** où aucune colonie d'actinomycètes n'est obtenue sur le même milieu.

Les deux souches d'actinomycètes actives qui ont été retenues sont repiquées sur les milieux de cultures pour les identifier. Après 48 heures d'incubation, elles développent des colonies, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide, en effet **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*.

Après 14 jours d'incubation des souches actives, le mycélium aérien a présenté une gamme de couleur assez variée : blanc, marron, noir, gris. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Williams et Wallington, 1983 ; Sabaou, 1988**).

Selon **Boiron et al. (1993)**, les colorations cellulaires, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinomycètes avec une plus grande précision.

Les deux souches A1 et A7 produisent des pigments marron clair. Ces pigments peuvent être des substances bioactives selon **Margalith (1992)** et **Horinouchi et Beppu (1994)** qui ont rapportés que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune.

L'activité pectinolytique des souches actinomycétales est mise en évidence par méthode semi-quantitative qui permet d'estimer l'activité pectinolytique des souches actives en comparant les diamètres des zones claires autour des colonies actives.

Le principe de cette méthode est la précipitation de la pectine non hydrolysée sous l'action de lugol dans le milieu gélosé, la pectine hydrolysée par les enzymes secrétées (pectinases) ne précipite pas, ainsi des zones claires sont apparues autour des colonies actives.

Parmi les 21 isolats d'actinomycètes obtenus, de caractéristiques différentes et de divers sols, sont testées pour leurs activités pectinase. Deux isolats ont présentés cette activité.

En effet les travaux de Kaiser (1971) sur les Actinomycètes ont montré que plus de 70% des espèces était pectinolytiques dans plus de 80% dans le genre *Streptomyces*.

Les *Streptomyces* sont largement impliquée dans le processus de biodégradation de composés organiques aussi bien naturels que synthétiques, de ce fait beaucoup d'espèce appartenant à ce genre ont été isolées et étudiées. *Streptomyces lydicus* isolé des sédiment marins de l'inde ayant un grand potentiel de production des polygalacturonases (**Nicemol et al., 2006**).

Pour rechercher ces enzymes, un test à l'acide thiobarbiturique (TBA) a été utilisé. Les résultats de ce test montre qu'il y'a un maximum d'absorption situé à 550nm et cela pour les deux souches, ce test montre que les souches de Actinomycetes secrètent des lyases (pectates lyases ou pectines lyases).

Les pectates lyases attaquent préférentiellement l'acide polygalacturonique ou la pectine moyennement estérifiée. Le milieu de culture de production contient comme source de carbone, pectine hautement estérifiée à 72.8% ce qui normalement favorise les pectines lyases (**Rexova-Benkova et Markovic , 1976 ; Baron et Thibault, 1985**).

Les pectines lyases sont produites beaucoup plus par les champignons tel que *Aspergillus* et *Penicillium* (**Edstrom, 1964 ; Kawano et al., 1999 ; HadjTaïeb, 2002**) avec comme site spécifique de fixation la présence de groupements méthoxylés.

Aussi, le milieu liquide à base de pectine utilisée pour la production des pectinases est plus ou moins neutre, les polygalacturonases agissent généralement à des pH relativement acides, alors que les lyases agissent en milieu basique. Le milieu liquide utilisé est de pH 7.2 (pH optimum de croissance des souches), ce pH est neutre et favoriserait plutôt la production des lyases. Cela est confirmé par divers travaux de recherches où des lyases sont isolées et caractérisées chez plusieurs espèces de *Streptomyces* : *Streptomyces coelicolor*A(3)2, chez qui l'ensemble des gènes qui codent pour la production des lyases a été isolé et entièrement décodé (**Bentley et al., 2002**).

Les travaux de Ladjama ont montré également que des souches de *Streptomyces* SK et G isolées d'un sol tunisien Gabes (sud de la Tunisie) et Skanes sont actives sur leur substrat pectiques par sécrétion de pectate lyases (**Ladjama. 1991**) (**Ladjama et al., 1991**).

Cela est confirmé par divers travaux de recherches où des lyases sont isolées et caractérisées chez plusieurs espèces de *Streptomyces* : *Streptomyces coelicolor*A(3)2, chez qui l'ensemble des gènes qui codent pour la production des lyases a été isolé et entièrement décodé (**Bentley et al., 2002**) également chez *Streptomyces SK*, *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147 (**Ladjama et al., 1991**), *Streptomyces nitosporeus* et *Streptomyces massaporeus* *Streptomyces fradiae* (**Sato, 1975; 1977 a; 1977b ; 1980 a, 1980 b**) *Streptomyces thermovulgaris* (**Rao et Dhala . 1981**) et *Streptomyces thermocarboxydus* (**Kazuo et al.,2004**).

L'examen du chromatogramme fait apparaître une seule tâche dont la distance de migration est légèrement même pour deux souches avec $R_f = 0.75$.

Le monomère n'apparaît pas dans le milieu de culture et cela est dû à des réactions de transfert, mécanisme connu chez les *Streptomyces* (**Coulombel, 1972**).

Aucune tache intermédiaire n'a été observée, Cela est en faveur d'un mélange d'endo et d'exo pectates lyases. En effet, les endo pectates lyases attaquent l'acide pectique pour libérer des oligomères de taille élevée, qui à leurs tours seront dégradés par les exopectate lyases en libérant dans le milieu le dimère insaturé.

Ces résultats sont comparables à ceux de **Sato (1980)**, **Collmer (1981)**, **Collmer et al., (1986)** et **Ladjama et al. (1991)** qui ont travaillé sur d'autres souches de *Streptomyces* ou d'*Erwinia*.

Le même résultat a été obtenu par **Fenghour (2002)** et **Boumendjel (2009)** qui ont travaillé sur des souches de champignons et qui ont montré que ces souches secrètent des lyases attaquant le polymère par mécanisme de β élimination et libéraient dans le milieu le dimère insaturé métabolisable par la bactérie.

CONCLUSION



Ce travail a permis d'isoler, à partir d'un sol de la zone aride, 21 souches d'actinomycètes dans le but de la recherche de l'enzyme pectinase.

De ce fait, trois échantillons de sols des zones arides dont le sol El Kheiter, Sidi Khalifa et Ghar Sidi Khelifa dans la wilaya d'Al Bayedh, ont été prélevés. L'isolement des actinomycètes a été effectué sur le milieu Bennett.

L'identification est effectuée essentiellement, en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques sur des milieux spécifiques. Aucune identification chimio taxonomique, numérique ou moléculaire n'a été utilisée dans ce travail.

L'utilisation de la pectine par ces souches est appréciée par leur capacité à croître sur le milieu GTS à base de pectine et par l'apparition de zones claires aux tours des colonies actives après la couverture des cultures sur le milieu pectine agar par le lugol.

Parmi les 21 souches actinomycetes isolées, Deux souches présentent une activité pectinolytique. Après l'extraction enzymatique et suite à l'utilisation de la méthode de l'acide thiobarbiturique (TBA) qu'est mise en évidence par la mesure des absorbances à des longueurs d'onde spécifiques. Nos avons constaté que l'isolats A7 est le plus actif et secrète dans le milieu liquide une pectate lyases.

La nature des produits de dépolymérisation a été découvert par la technique de chromatographie sur couche mince CCM qu'a montré que les deux souches créer une seule tâche dont la distance de migration est la même.

L'importance de ces souches sur le plan biotechnologique et biochimique nous a orienté de fixer les objectifs suivants :

- Effet des différentes conditions sur la production enzymatique.
- Extraire et purifier les molécules bioactives produites (enzymes).
- Etude des propriétés physico-chimique et la cinétique de ces enzymes.
- Et enfin l'utilisation de ces enzymes dans les domaines de biotechnologie (industrie alimentaire, textile, dépollution biologique,...).

Référence



A

- **Abbas I.H., (2006).** A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res.* 2.10:809-815.
- **Albersheim .P et Killias U. (1962)** “studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase”, archives of biochemistry and biophysics .97: 107-115.
- **Alcamo I.E. (1998).** Theory and Problems of Microbiology. Schaum’s Outline Series., Inc. McGraw-Hill Companies, New York.
- **Alexander (1961).** Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York
- **Alferova, I. V., and L. P. Terekhova.** 1988. Use of the method of enriching of soil samples with calcium carbonate for isolation of *Actinomyces*. *Antibiot Khimioter* 33:888-90.
- **Allaoueddine B. (2007)** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 128p.
- **Antonov P.P., Ivanov I. G., Markov G. G.(1977).** Heterogeneity of *Streptomyces* DNA. *FEBS Letter*, 79: 151-154.
- **Anurag pandey., Anupam shukla. and Majumdar S.K. (2005).** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology*. 4 (9), 909-910.
- **Angayarkanni J., Palaniswamy M., Murugesan S. and Swaminathan K., (2002)** Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase, *J Biosci. Bioeng.*, 94, 299- 303.

B

- **Badji B., (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d’actinomycètes d’origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou p 226.
- **Baron A., Thibault J.F. (1985)** “Les enzymes pectolytiques „” dans : „hydrolases et dépolymérasés, enzymes d’intérêt industriel „” A.Moranche, C.Costes .eds. Gauthier-Villars, Paris, pp143-164.
- **Baskaran, R. Vijayakumar, R. & Mohan, P. M. 2011.** Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 7. N°1. Pp. 26-32.

- **Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965).** - Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, 236-242.
- **Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P. and Amoroso M.J. (2007).** Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7 . *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59 (2), 148-155.
- **Bentley SD, Chater K. F., & 42 other Authors. (2002)** “Complete genome sequence of the model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)” *Nature* 417,141-147.
- **Beppu T. (1986).** Regulatory substances and genes for differentiation and antibiotic synthesis in actinomycetes. In: *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of actinomycetes*. Eds: G. Szabo, S.Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 15-23.
- **Beppu T. (1992).** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Genes*. 115, 159-165.
- **Boiron P. (1995).** Nocardia et nocardiose: actualités épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques. *La lettre de l'infectiologue*. 10: 328-334.
- **Boiron P., Provost P. and Dupont B. (1993).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Paris. 107-126.
- **Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducro P.(1997)** “Les enzymes de dégradation des parois végétales : Mode d’action et utilisations alimentaire” dans “Enzymes en agroalimentaire” Larrata-Garde.V. Tech & documentation. Lavoisier. pp.168-200.
- **Boussabe E., Issam M. K., Hilali L., Hilali A. (2012).** Isolement des souches d’Actinomycètes productrices de substances antifongiques. Volume 4N° 120801.
- **Brock T.D. and Madigan M.T. (1991).** *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc.
- **Byungtae Lee., Pometto A.L., Fratzke A. and Bailey T.B. (1991).** Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and environmental microbiology*. 57, 678-685.

C

- **Castillo M.A., Felis N., Aragón P., Cuesta G. and Sabater C. (2006).** Biodegradation of the herbicide diuron by Streptomyces isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58 (3-4), 196-202.
- **Chamier A.C., Dixon P.A.(1982).**”Pectines in leaf degradation by aquate Hyphomycetes” *J.Microbiol.*128; 2469-2483.

- **Chater K.F., Merrick M.J. (1979).** Streptomycètes, in: *Developmental Biology of prokaryotes*. Ed: J.H. PARISH. University of California press, Berkeley and Los Angeles. 93-114.
- **Chitte R.R., Nalawade V.K. and Dey S. (1999).** Keratinolytic activity from the broth of a featherdegrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 131-136.
- **Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int., J. Syst. Bacteriol.* 47, 492-498.
- **Collmer A., Bateman D.F. (1981).** Impaired induction and selfcatabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutants deficient in oligogalacturonide lyase., *Microbiology*.78: 3920-3924.
- **Collmer A., Keen N.T. (1986)** “The role of pectic enzymes in plant pathogenesis”, *Annu.Rev.Phytopathol* .24; 383-409.
- **Collmer A., Bateman D.F. (1981)**“Impaired induction and self-catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* mutants deficient in oligogalacturonide lyase“, *Microbiology*.78;3920-3924.
- **Coulombel C., Foglietti MJ & Percheron F. (1972).** Identification and Kinetic of an inductible mannokinase from a *Streptomyces* strain., *Biochem Biophys Acta.*, 706:117-122.

D

- **Djaballah. Chamsseddine.(2010).** biodiversite des actinomycetes halophiles et haltolerants isoles de la Sebkhah de AIN M’LILA.
- **De Schrijver A., De Mot R. (1999).** Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical reviews in microbiology.* 25, 85-119.
- **Demain A.L. and Solomon N.A. (1985).** *Biology of industrial microorganisms.* The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. pp 291-357.
- **Demain A.L. (1995).** Emerging concepts of secondary metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologica.* 9:98-117
- **Ducroo P. (1982).** Utilisation industriel des enzymes. *Ind.Alim.Agaric.* 99: 401-416.
- **Dvorak A., Johnston A. (1999).** *Actinomycetes and Streptomyces.* New York.23p.

E

- **Edelvio de Barros G., Adriana U.S., Rita de Cássia Mendonça de Miranda., Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa. and Nei Pereira J.r. (2009).** Biodegradation of Stored jet

Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated from Contaminated Soil *Biology and technology.* 52 (5), 1279-1284.

- **Edstrom R.D., Phaf H.J. (1964).** 'Eliminative cleavage of pectin and of oligogalacturonide methyle ester by pectin transeliminases' , *J.Biol.Chem.*239 ; 2409-2415.
- **Ei-Shafei H.A., Abd el-Nassser N.H., Kansoh A.L. and Ali A.M. (1998).** Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces* species. *polymer degradation and stability.* 62, 361-365.
- **El-Nakeeb, M., Lechevalier, H. 1963.** Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol.* Vol: 11. N°: 2. Pp. 75-77.
- **Emo C. and Roberto S. (2003).** Biodegradable polymers and plastics. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York. 395p.
- **Ensign J.C. (1978).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev.Microbiol.* 32, 185-219.
- **Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144, 657-660.
- **Eskin NA.(1990).**Biotechnology enzymes in Food industry in *Biochemistry of foods.* Academic press.Inc.1990 pp467-487.
- **Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor.* A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbial.* 129, 2029-2036.

F

- **Fan. L, Zheng J, Yang. X. 2010.** The effect of natural air-dry time on actinomycetes Isolation from sample soil. *Journal of Hainan Medical University.*
- **Fenghour H. 2002** *Tech. Avancées*, 14, 6.In *Journal de la Société Algérienne de Chimie.* 2009, 19(1), 153-157.
- **Fenghour H., Ladjama A., Taibi Z. (2002)** "Recherche de l'activité pectinolytique chez des souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'el kala", *TechnologiesAvancées.*14 ; 55-60.

G

- **Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A. and Willeke K. (1998)** Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environm. Microbiol.* 64 (11), 4410-4415.
- **Goodfellow et Williams WilliamsS.T. (1983).**Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 189-216.

- **Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.
- **Grafe U., Eritt I., Fleck W.F. (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. *Actinom.* 18, 220-246.
- **Gurung. T. D. Sherpa. C. Agrawal. V. P. & Lekhak.. B. 2009.** Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology.* Vol 10. Pp:173 -182.

H

- **Hankin L., Zucker M & Sands D.C. (1971).** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied Microbiology.* 22: 204-209.
- **Hanne L.F., Kirk L.L., Appel S.M., Narayan A.D. and Bains K.K. (1993).** Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. *Appl Environ Microbiol.* 59 (10), 3505-3508.
- **Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Kloepfer A., Reemtsma T., De Wever H. and Delort A.M. (2004)** Metabolism of 2-mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6315-6319.
- **Honda. S, Nishimura .Y, Takahashi. M, Chiba. H, Kakehi .K. (1982)** A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2–cyanoacetamide, *Anal. Biochem.* 119. p194–199.
- **Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C. P., Ward J.M. and Schremph H. (1985)** Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- **Hopwood et Glauert, (1960).** In Theilleux J. 1993. In Levreau J. Y., Bouix M. O. *Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel.* TEC & DOC-Lavoiser. France. Ch 6:451-452.
- **Horinouchi S. and Beppu T. (1994).** A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 12, 859-864.
- **Hsu S. C. and Lockwood J.L. (1975).** Powdred chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29(3), 422-426.

I

- **ITAB, 2002.** Activités biologique et fertilité du sol, 23p.

J

- **Jayabarath .J., Asma Musfira S., Giridhar R., Shyam sundar., Arulmurugan R. (2010).** Biodegradation of Carbofuran Pesticide by Saline Soil Actinomycetes. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 6 (2), 187–192.
- **Jerome J. P., James T.S., Stephen Lory. (2004).** « Microbiologie, Cours et questions de révision ». Ed: Dunod. paris.
- **Jirasripongpun. K. (2002)** .the characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. *Applied Microbiology*. 35 (4), 296–300.
- **Joslyn.M.A., Mist.S & Lambert.E.(1952).**The clarification of apple juice by fungal pectic enzyme preparation.*Food.Technol.*, VI, 133-139.

K

- **Kaiser P. (1971)**”L’activité Pectinolytique des Actinomycetes“ *Ann. Inst. Pasteur*.121; 389-404
- **Khanna. M, Solanki. R & Lal. R. 2011.** Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. Vol: 2. N°: 3. Pp: 357-375.
- **Kazuo M., Ai O., Akio T., Kouzou H., Makiko K., Toshikatsu O (2004).** Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*.*Journal of Applied Glycoscience*.51 :1-7
- **Khokhlov A.S. (1986).** Actinomycete autoregulators. In : *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Eds : G. Szabo S. Biro M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 791-798. 4
- **Kimura N. and Urushigawa Y. (2001).** Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzop-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 138-143
- **Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d’antibiotiques à partir d’écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie.

- **Konig C., Eulberg D., Groning J., Lakner S., Seibert V., Kaschabek SR. and Schlomann M. (2004).** A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiol.* 150, 3075-87.
- **Krasilinikov.(1958).** Soil Microorganisms and higher plants office of technical services. US. Dept of commerce. Washington
- **Kuznetsov V.D., Zaitseva T.A., Vakulenko L.V. and Filippova S.N. (1992).** *Streptomyces albiacialis* sp . Nov. A new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo and halotolerant *Streptomyces*. *Microbiology.* 61, 62–67.

£

- **Lacey J. (1997).** Actinomycetes in compost. *Ann Agric Environ Med.* 4: 113–121.
- **Ladjama A., (1991).** Isolement, purification, et caractérisation d'une endopectate lyase d'une souche de streptomyces, Thèse doctorat. Université René Descartes de paris, 168p
- **Ladjama A., Chardron-Loriaux I., Foglietti M.J. (1991)** " On the pectolytic activity of two streptomyces strains ,, "FEMS. *Microbiol. Lett.* 79; 279-284.
- **Ladjama.A,Taibi.Z,et Meddour.A (2007).** Production of pectinolytic enzyme using *Streptomyces* strains isolatated from palm grove soil in Biskra area(Algeria).In African crop science conference proceeding .Printed in El-Minia ,Egypt Vol.8.pp 1155-1158
- **Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris.
- **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales. In: The procaryotes, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. *Springer-Verlag. Berlin.* 2, 1915-1922.
- **Leclere H.,Meyer.,Deiana J.(1986)** Cours Microbiologie générale.Doin éditeurs.Paris.
- **Leveau J.Y. and Buix M. (1993).** Les Actinomycètes. In. : Les microorganismes d'intérêt industriel. Eds : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. pp 424-480.
- **Liao C H. (1989)** "Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. " *Appl. Environ. Microbiol.*55; 1677–1683.
- **Li S., Chena C., Zhang H., Guo H., Wang H., Wang L., Zhang X., Huac S., Yu J.,Xiao P.,Li R., Tan X. (2005).** Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiv. Res.*, 67, 18–23
- **Lin T.C., Young C.C., Ho M.J., Yeh M.S., Chou C.L., Wei YH. and Chang JS. (2005).**Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *J. Biosci.Bioengin.* 99, 466-472.
- **Locci. R. (1976).** "Developmental micromophology of actinomycetes". In: Actinomycetes the boundry microorganisms : Arai. TED,. Tokyo. 170-180.

- **Lopes A., Coelho R.R., Meirelles M. N. I., Branquinha M. H. and Vermalho A. B. (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 94, 763-770.
- **Loqman. S. 2009.** La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.
- **Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F. and Nava-Saucedo J.E. (2008).** Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*. 73, 429–442.

M

- **Mariat F. et Sebald M. (1990).** Les actinomycètes. In: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France. pp 935-949.
- **Margalith P.Z. (1992).** Pigment microbiology. Shapman and Hall. London. p 5,114.
- **Martin H., van A., Sytze K. and Dick B.J. (1998).** Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- **Mason M.G., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. and Wilson M.T. (2001).** Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes: A case of Mistaken identity. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(10), 4512-4519.
- **Messaoudi .Omar (2013).** Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bachar).
- **Mc Neil M.M., Brown J.M. (1994).** The medically important aerobic Actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol. Rev*; 7: 357-417.
- **Mellouli L, Mehdi RB, Sioud S, Salem M, Bejar S. (2003).** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol*; 154:345—52.
- **Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Labuzek S. (2003).** Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pol. J. Environm. Stud.* 12, 15-25.

N

- **Nasuno S., Star M.P (1967)** “Polygalacturonic Acid trans-eliminases of *Xantomonas campestris*” *Biochem.J.* 104;178-185.

- **Nicemol Jacob K.N., Niladevi G.S. and Anisha, P. (2006).**Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research*,(article in press)
- **Nodwell J.R. and Losick R. (1998).** Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180 (5), 1334-1337
- **Nonomura, H. and Ohara, Y. (1969).** The distribution of Actinomycetes in soil. VI. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part I. *J. Ferment. Technol.* 47: 463–469.

O

- **Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, 3(9), 441–446.

P

- **Peczynska-Czoch W., Mordarski M., 1988.**“Actinomycetes enzymes” in *Actinomycetes* in Biotechnologie. Goodfellow M., Williams S.T., Mordarsky M., (Eds). Academic Press. London. p.p.219-283.
- **Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C., Flores M. E.(2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., axylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* p 53, 269-273. .

R

- **Rao RN & Dhala SA.(1981).**Endo polygalacturonate lyase of *Streptomyces thermovulgaris* CR42. *Journal of food science and technology.*18:171-175.
- **Rawasheh R., Saadoun I., et Mahasneh A., (2005).** Effect of culturel conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) an dits potential to utilize tomato pomace. *Afri. J. of Biotechnol.* 4: 251-255.
- **Regnault J.P. (1990).** Microbiologie Générale. Décarie Editeur Inc., Montreal. *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiol.* 150, 3075-87.
- **Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. *Appl. Environm. Microbiol.* 64, 3807- 3812.
- **Rexova-Benkova L & Markovic O. (1976).** ”Pectic enzymes”, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38: 323-385.

- **Reymond D & Bush D.A. (1972)** .Les pectines trans-éliminases et leurs possibilités d'application en technologie des jus de fruits., Ann.Technol.Agric. 21 : 545-553.
- **Rivas R., Sanchez M., Trujillo M. E., Zurdo-pineiro J.L., Mateos P.F., Martinez-Molina E. and Velazquez E. (2003)**. *Xylanimonas cellulosityca* gen. Nov., sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 99-103.

S

- **Sabaou (1988)**. Contribution à l'étude des Actinomycetes des sols des palmeraies Algeriennes: systématique et ecologie. Thèse de Doctorat Es sciences Naturelles, Option Microbiologie des sols, USTHB, Alger. p 192.
- **Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. (1993)**. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, 144 (8), 633-642.
- **Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997)**. Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 12, 13.
- **Sarioglu K, Demir N, Acar J & Mutlu M. (2001)**.The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase.*Journal of Food Engineering* 47: 271-274.
- **Sato, M. & Kaji, A.(1975)**.Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces fradiae* IFO3439. *Agric. Biol. Chem.* 39,819-824.
- **Sato M & Kaji A. (1977a)**. Purification and properties of pectate lyase produced by *Streptomyces nitosporeus.*, *Agric.Biol. Chem.* 41,2193-2197.
- **Sato M & Kaji A. (1977b)**. "action pattern of pectate lyase produced by *Streptomyces nitosporeus.*, *Agric. Biol. Chem.*41: 2199- 2203.
- **Sato M & Kaji A. (1980a)**. "Exopolygalacturonate lyase produced by *Streptomyces massaporeus.*, *Agric. Biol. Chem.*44:717-721.
- **Sato M. & Kaji A.(1980b)**.Another pectate lyase from *Streptomyces nitosporeus.*, *Agric. Biol. Chem.*4:1345-1349.
- **Schoedel C., Collmer A (1986)**."Evidence of Homology between the Pectate lyase-Encoding pelB and pelC Genes in *Erwinia chrysanthemi* ,," *J.Bacteriol.*167; 117-123
- **Shirling et Gottlieb (1966)** .Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst Bacterio.* p 22, 265-394.
- **Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A. (2002)**. Media for cultivation of indoor *streptomyces*. *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.

- **Struebi P., Escher FE & Neukom H. (1978).** Use of macerating pectic enzyme in napple nectar processing. *J. Food. Sci.* 43: 260-263.

T

- **Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., et Bora T.S., (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.
- **Thibault J.F. (1980)** “Les substances pectiques” dans : „Les polymère végétaux, polymère pariétaux et alimentaires non azotés”, B. Monties Ed Gauthier-Villars Paris. pp232-251.
- **Thiemann J. E. 2012.** A direct screening method for the investigation of microbial biodiversity. *International Research Journal of Microbiology*. Vol. 3(1). Pp. 36-38.
- **Theilleux J., (1993).** Les actinomycètes *In* : *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Lavoisier, Tech et Doc, V 612p, pp 425.
- **Trigui-Lahiani H., Gargouri A. (2004)** “ Analyse moléculaire du gène codant pour une pectine lyase fongique et analyse comparative des protéines intracellulaires entre la souche sauvage et le mutant CT1’ , Abst, Quatrième journées biotechnologique de l’association Tunisienne debiotechnologie Sfax.

U

- **Uz I., Duan Y.P. and Ogram A. (2000).** Characterization of the naphthalenedegrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS. Microbiol. Lett.* 185, 231-238.

V

- **Valan Arazu. M; Duraipandiyar. V; Agastian. P; Ignacimuthu. S. (2009).** In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India).
- **Van Der Sand ., Elisandra Minotto., Luciana Pasqualini Milagre., Martha Trindade Oliveira., Sueli Teresinha (2014).** in *Journal of Advanced Scientific Research*. 5(2): 16-23
- **Van der Geize R. and Dijkhuizen L. (2004).** Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 255-261.
- **Vitalis S., Vallu G., Bekesi I., Szeszak F. and Szabo G. (1986).** Effect of factor C on the differentiation of *Streptomyces griseus*. In: *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Eds : G.Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiad, Budapest. 799-806.

W

- **Waksman S.A., (1959).** The Actinomycetes: nature, occurrence and activities. Baltimore. v1:29-46.
- **Williams S.T., et Davies F.L, 1965 .** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. J. Gen. Microbiol. **38**: 251 -261.
- **Williams S.T., Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of Actinomycetes. In: M. Goodfellow. The biologie of the Actinomycetes. London: 481-528.
- **Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West.M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144**, 653-656
- **Wolfgang P(1993).** *Streptomyces* and Corynebacteria.p434-447.in Biotechnology.V1: Biological fundamentals.Weinheim Germany VCH. New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- **Williams ST. (1978).** Streptomyces in soil ecosystem. In Mordarski M, Kuryłowicz W, Jeljaszewicz J, J (eds) Nocardia and Streptomyces. Warsaw. October 1976. Gustav fischer Verlag, Stuttgart; 137-142..

Y

- **Yamamura. H, Shimizu. A, Nakagawa. Y, Hamada. M, Otoguro .M , Tamura. T & Hayakawa. M. 2012.** Actinoplanes rishiriensis sp. nov., a novel motile actinomycete isolated by rehydration and centrifugation method. J Antibiot (Tokyo). Vol 6. N°: 5. Pp :249-53.

Z

- **Zermane F. (2008).** Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de synthèse. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine.
- **Zhang. J. 2011.** Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. Modern Applied Science. Vol. 5 (2). Pp : 124.

Annexes



Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne

Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,2	

Milieu de Bennett

D- Glucose anhydre	10g
Casaminoacides	2g
Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,3	

Gélose nutritive

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar	15-20g
Eau distillée qsp	1000ml
pH= 7,2	

Eau physiologique

Chlorure de sodium	9g
Eau distillée qsp	1000ml

Bouillon contenant de la pectine

Extrait de levure	1g
La pectine	5g
KH ₂ PO ₄	4g
NaCl	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
MnSO ₄	0,05g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2g
NH ₄ Cl	2 g
d'eau distillée qsp	1000ml
pH 7,3.	

TSE

Tryptone	1g
NaCl	8,5 g
Eau distillée qsp	1000ml

Gélose TSI (Triple Sugar Iron.)

Peptone de viande	15g
Protéose peptone	5g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Lactose	10g
Citrate de fer ammoniacal	0,3g
Chlorure de sodium	5g
Sodium thiosulfate	0,3g
Rouge de phénol	0,05g
Agar	18g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 7,2

Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

pH 6,8

Urée-indole

L-tryptophane	3g
Phosphate de dipotassique	1g
Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Rouge de phénol	2,5g
Eau distillée qsp	1000ml
pH	6,8

Les colorants**Lugol**

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300m

Violet de gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90	10g
Phénol	2g
Eau distillée	1000ml

Fuchsine

Fuchsine basique	02g
Acide phénique	10g
Alcool absolu	20ml

Résumé:

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Dans ce travail, nous sommes intéressés à la recherche des souches productrices d'enzymes dans les sols des zones arides.

Dans la première partie de ce travail, un isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols de la région d'Al Bayadh a été réalisé. Les résultats montrent que le traitement des échantillons de sol par le $Ca Co_3$, habituellement effectué dans les autres sols, favorise la croissance de ces microorganismes par rapport à d'autres germes envahissants.

Dans la deuxième partie, 21 souches actinomycétales ont été testées pour leurs activités enzymatiques. Deux isolats ont présenté une activité pectinolytique. Après extraction enzymatique, l'activité polygalacturonase et lyase a été déterminé par la méthode à l'acide thio-barbiturique (TBA) basée sur la mesure de l'absorbance par spectrophotomètre. Les résultats montrent que les souches A1 et A7 secrètes dans le milieu liquide une pectate lyase.

La nature des produits de dépolymérisation a été découvert par la technique de chromatographie sur couche mince CCM qu'a montré que les deux souches créer une seule tâche dont la distance de migration est la même.

Mots clés: Actinomycètes, activité pectinolytique, extraction enzymatique, CCM.

ملخص:

الفطريات الشعاعية هي البكتيريا المسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيا. في هذا العمل، ونحن مهتمون بالبحث عن السلالات المنتجة للأنزيمات في التربة القاحلة.

في الجزء الأول من هذا العمل، تم العزلة انتقائية للفطريات الشعاعية من التربة من منطقة البيض. أظهرت النتائج أن معالجت عينات التربة ب $Ca Co_3$ ، ساهمة في تعزيز نمو هذه الكائنات الدقيقة و تثبيط نمو الكائنات المجهرية الأخرى.

في الجزء الثاني، تم اختبار 21 سلالات الشعاعية لنشاطها الأنزيمية. وأظهرت اثنين من السلالات المعزولة النشاط pectinolytic. بعد استخراج الأنزيمية، تم تحديد النشاط polygalacturonase و lyase عن طريق اختبار حمض ثيو باربيتيوريك (TBA) بناء على قياس الامتصاصية بواسطة spectrophotomètre. وأظهرت النتائج أن سلالة A1 وA7 منتجة لبيكتين lyase في الوسط السائل.

تم الكشف عن طبيعة المنتجات dépolymérisation بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM التي أظهرت أن لسلالتين بقعة واحدة وينفس مسافة الهجرة.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية، نشاط pectinolytic، استخراج الانزيمي، كروماتوغرافيا CCM

Abstract

Actinomycetes are bacteria responsible for producing most of bioactive molecules. In this work, we were interested in search of the producing origins of enzymatic molecules in the grounds of dry zones.

In the first part of this work, a selective isolation of actinomycetes from the grounds of Al Bayadh's region was realized. The results show that the treatment of the soil samples by $Ca Co_3$, usually made in the other grounds, favors the growth of these microorganisms with regard to compared with other intrusive germs.

In the second part, 21 Actinomycetales strains were tested for their enzymatic activities. Two isolates presented a pectinolytic activity, after enzymatic extraction, we determine the activity polygalacturonase and lyase by the method in the Thio-barbiturate acid (TBA) and we measure the absorbance by spectrophotometer. The results show that the secret A1 and A7 strain in the liquid medium a pectate lyase.

The nature of the depolymerization products was discovered by the technique of thin layer chromatography TLC that showed that the two strains to create a single task whose migration distance is the same.

Keywords: Actinomycetes, the pectinolytic activity, enzymatic extraction, thin layer chromatography TLC.