

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈME

*Isolement de quelques souches des
actinomycètes productrices des amylases et
évaluation de leurs paramètres cinétiques*

Présenté par

M^{elle} Boudia Ahlem

Soutenue publiquement le 08/07/2019

DEVANT LE JURY

Président : Mr R. CHADLI Grade Docteur « Professeur » Université de Mostaganem
Encadreur : Melle F. TISSOURAS Grade Docteur « MCA » Université de Mostaganem
Examinatrice : Mr R. DJIBAOUI Grade Docteur « Professeur » Université de Mostaganem

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Avant toute chose,

Je remercie « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Le thème a été proposé par Dr Tissouras F. Maître de conférences à la faculté des SNV Université de Mostaganem. Sous sa direction le travail a été réalisé dans des laboratoires de Microbiologie 2 et de biochimie 2 du département de biologie, université de Mostaganem.

Je tiens à lui exprimer mes profondes gratitude pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité sans limite, qui ont contribué à ma formation et qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Nos sincères remerciements vont aux Messieurs :

- *Dr Djibaoui enseignant et professeur au département de biologie, de la faculté SNV, université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail et sa contribution dans la confirmation de l'identification des souches.*
- *Mr R. CHADLI Professeur au département de biologie de la faculté SNV université de Mostaganem d'avoir accepté de présider le jury.*
- *Que ce mémoire soit l'occasion d'exprimer nos sincères remerciements à toutes les personnes des laboratoires qui ont contribué de loin ou de près.*

DEDICACES

Je remercie ALLAH le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Je dédie ce modeste travail à :

La personne, le plus chère au monde que je ne remercierais jamais assez : leurs aides, l'encouragement, Soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie :

Ma chère maman

Ma chère sœur : Hanane

Mon cher frère : ABDELkader

La femme de mon frère

Mon fiancé : Mohamed Cherif

Toutes mes chères amies : Amina, Amel, souhila, Mansouria

Mes chères amies de la promotion de master en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur. Tous les étudiants, enseignants et personnels du département des Sciences Biologique.

Liste des abréviations

A1, A2 et A6 :	Les souches d'actinomycètes
AIA :	Acide Indole Acétique
BG :	β -glucosidase
CBH :	Cellobiohydrolases
CBM :	Carbohydrate-binding modules
CEC :	Capacité d'échange de cations
CMCase :	Carboxymethyl-cellulase
DO :	Densité optique
EC :	La commission des enzymes
KI :	Iodure de potassium
Km :	Constante de Michaelis
MA :	Mycélium aérien
MS :	Mycélium du substrat
NRI et NRII :	Réactif de Greiss de Test nitrate réductase
RM :	Rouge de Méthylène
Rpm :	Rotation per minute
[S] :	Concentration du substrat
TSI :	Triple Sugar Iron
UV :	Ultraviolet visible
Vi :	Vitesse initiale d'oxydation
Vmax :	Vitesse maximale d'oxydation
VP :	Vosge – Prokauer

Liste des tableaux

N° des tab		Page
Tableau 1	Dimension et propriétés des éléments minéraux composant le sol.	04
Tableau 2	Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm.	10
Tableau 3	La répartition des actinomycètes dans la nature.	16
Tableau 4	Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol.	17
Tableau 5	Différentes classes d'enzymes.	22
Tableau 6	Propriétés générale des enzymes amylolytiques.	23
Tableau 7	Paramètres physico-chimiques des enzymes produits par les actinomycètes.	29
Tableau 8	Caractérisation macroscopique des isolats.	43
Tableau 9	Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.	46
Tableau 10	Les paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats des actinomycètes.	58

Liste des figures

N°		Page
Figure 1	formation du sol.	02
Figure 2	Proportion des principaux composants de sol en volume.	03
Figure 3	Différentes structure de sol.	06
Figure 4	Diagramme triangulaire des classes texturales de sol après les dimensions des particules.	07
Figure 5	Evolution et décomposition de la matière organique fraîche dans le sol.	09
Figure 6	Principaux groupes d'actinomycètes.	14
Figure 7	Apparence d'isolats d'actinomycètes sur milieu caséine amidon.	15
Figure 8	Cycle de vie des streptomyces.	19
Figure 9	Mode d'action d'alpha-amylase.	23
Figure 10	Mécanismes d'actions des enzymes amylolytique.	24
Figure 11	Principale voies du métabolisme des protéines.	25
Figure 12	Catabolisme des triglycérides.	25
Figure 13	Hydrolyse de la cellulose par trois types cellulases.	27
Figure 14	Structure du xylane et mode d'action de xylases .	28
Figure 15	Mode d'actions du pectinases.	28
Figure 16	Protocole expérimentale générale.	31
Figure 17	Site des prélèvements des échantillons région d'Abdelmalek Ramdane (Ouilis) mostaganem.	32
Figure18	Les points des prélèvements des échantillons.	33
Figure 19	Préparation des dilutions de sol.	34
Figure 20	Protocole expérimental de l'extraction des extraits enzymatiques.	39
Figure 21	Les isolats des actinomycètes obtenus sur milieu amidon caséine.	43
Figure 22	Cultures pures d'actinomycète à différentes pigmentations diffusibles.	44
Figure 23	Observations à la coloration de Gram des mycéliums d'actinomycète (G100x).	45
Figure 24	Test d'hydrolyse de la caséine est positif pour les isolats des actinomycètes.	47
Figure 25	Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats des actinomycètes.	47
Figure 26	Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des actinomycètes.	48

Figure 27	Test positif d'hydrolyse de la lécithine en présence des isolats d'actinomycètes.	49
Figure 28	Tests positif de réduction des nitrites pour les souches des actinomycètes.	49
Figure 29	Test négatif pour la production d'H ₂ S des isolats d'actinomycètes.	50
Figure 30	Test de catalase positif pour les trois isolats des actinomycètes.	51
Figure 31	Les Résultats du test de la dégradation d'urée obtenus par les isolats d'actinomycètes.	51
Figure 32	Résultats de test de citrate obtenus par les trois isolats des actinomycètes.	52
Figure 33	Test de VP et RM des isolats des actinomycètes.	52
Figure 34	Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.	53
Figure 35	Quantités des extraits protéiques brutes des différentes souches d'actinomycètes.	54
Figure 36	Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur de glucose.	54
Figure 37	L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A1 au cours du temps.	55
Figure 38	L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A2 au cours du temps.	55
Figure 39	L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A6 au cours du temps.	56
Figure 40	Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A1.	57
Figure 41	Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A2.	57
Figure 42	Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A6.	57

Table des matières	
Introduction	1
Partie 1 : Etude bibliographique	
Chapitre I : Généralité de sol	
1. Définition du sol	2
2. Diverse phase du sol	2
2.1. La phase solide	3
2.2. La phase gazeuse	4
2.3. La phase liquide	4
3. Différents horizons d'un sol	5
4. Les caractéristiques et propriétés des sols	5
4.1. Propriétés physique du sol	5
4.1.1. La structure	5
4.1.2. La texture	6
4.2. Propriétés chimique du sol	7
4.2.1. La matière organique	7
4.2.2. La couleur du sol	8
4.2.3. Ph du sol	8
4.2.4. Evolution de la matière organique dans le sol	8
Chapitre II : Caractéristiques et importances des Actinomycètes	
1. Microflore du sol	10
1.1. Les champignons	10
1.2. Les algues	11
1.3. Les protozoaires	11
1.4. Les bactéries	11
1.5. Les actinomycètes	12
1.5.1. Généralité	12
1.5.2. Taxonomie	13
1.5.2.1. Mycobacteriacée	13
1.5.2.2. Actinomycétacées	14
1.5.2.3. Streptomycétacées	14
1.5.2.4. actinoplanacées	15

1.5.3. Caractéristique des actinomycètes	15
1.5.3.1. Morphologie	15
1.5.4. La répartition et les exigences des actinomycètes dans la nature	16
1.5.4.1. la répartition des actinomycètes	16
1.5.4.2. Les exigences des actinomycètes	18
1.5.5. Mode de reproduction	18
1.5.6. Importance des actinomycètes	20
Chapitre III : les enzymes d'actinomycètes	
1. Définition des enzymes	22
2. Classification des enzymes	22
3. Les principaux enzymes synthétisés par les actinomycètes	23
3.1. Amylase	23
3.2. Les protéases	24
3.3. Les lipases	25
3.4. Cellulases	26
3.5. Xylanase	27
3.6. Pectinase	28
4. Caractéristique des enzymes synthétisés par les actinomycètes	28
5. Intérêts biotechnologiques des enzymes	29
Chapitre IV : Matériel et méthodes	
1. L'objectif global	31
2. Protocole expérimental général	31
3. Sites de prélèvement de l'échantillon	32
4. Isolement des actinomycètes	33
4.1. Les milieux de culture	33
4.2. Préparation des dilutions décimales	33
4.3. Ensemencement et incubation	34
5. Repiquage et purification des isolats	34
5.1. Conservation des souches	34
6. Caractérisations et identifications des actinomycètes	35
6.1. Caractérisations morphologiques des actinomycètes	35
6.1.1. Caractérisations macroscopiques	35
6.1.2. Caractérisations microscopiques	35
6.2. Caractérisations physiologique	36
6.2.1. Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase	36
6.2.2. Hydrolyse de la caséine : recherche de caséinase	36
6.2.3. La dégradation de l'urée	36
6.3. Caractérisation biochimique	37
6.3.1. Utilisation de citrate comme seul source de carbone	37
6.3.2. Production de H ₂ S	37
6.3.3. Recherche de catalase	37
6.3.4. Hydrolyse de la gélatine	38
6.3.5. les réactions Vp et RM	38
6.3.6. Production de nitrate réductase	38

6.3.7. Hydrolyse de la lécithine et les lipoprotéines	38
7. Production d'amylose par fermentation submergée	38
7.1. Sporulation des souches sélectionnées	39
7.2. Inoculation des milieux de fermentation	40
7.3. Extraction de la fraction soluble des enzymes d'amylases	40
8. Dosage colorimétrique de l'extrait enzymatique par la méthode de Biuret	40
9. Etude cinétique des extraits enzymatiques	41
9.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose	41
9.2. La cinétique des extraits enzymatiques	41
Chapitre V : résultats et discussion	
1. Isolement et purification des actinomycètes	43
2. Etude morphologique des actinomycètes	43
2.1. Aspect macroscopique	44
2.2. Aspect microscopique	45
3. Tests physiologiques et biochimiques	46
3.1. Hydrolyse de la caséine	46
3.2. Hydrolyse de l'amidon	47
3.3. Hydrolyse de la gélatine	48
3.4. Recherche de lécithinases et lipases	48
3.5. Réduction des nitrates	49
3.6. Production d'H ₂ S	50
3.7. Recherche de catalase	50
3.8. Dégradation de l'urée	51
3.9. L'utilisation de citrate	52
3.10. Les réactions de Vp et RM	52
4. Production des extraits enzymatiques des isolats des actinomycètes	53
4.1. Dosage des extraits enzymatiques par réactions de Biuret	53
4.2. Cinétique des extraits amyliques des isolats des actinomycètes	54
4.3. Mesure des paramètres cinétiques	55
Conclusion et perspectives	59
Références bibliographiques	61
Annexe	72
Résumé	

Introduction

Introduction

Les sols sont des habitats d'une grande diversité de microorganismes. Ils *sont* importants pour les fonctions qui entretiennent des écosystèmes (De Gannes *et al.*, 2015). Une gamme de micro-organismes peut établir des interactions entre les plantes soit bénéfiques ou nuisibles à la plante. Parmi ces microorganismes, on trouve les actinomycètes qui sont des bactéries à Gram positif et filamenteux qui se trouvent librement ou saprophyte dans différents habitats comme le sol, l'eau chaude, les sédiments marins etc. Les actinomycètes permettent de produire certains types de métabolites secondaires, antibiotiques anti-tumoraux, métabolites nutritionnels, pesticide et d'autres produits industriels primaires très importants et largement exploités les enzymes. Ces métabolites sont divers tels que les protéases, gélatinases, lécithinase, cellulase, uréases et surtout les amylases.

Toutefois, les amylases sont très utilisées dans les applications biotechnologiques et les domaines biomédicaux, les industries pharmaceutiques, alimentaire et chimique (Pandey *et al.*, 2000). Vu l'importance de ces enzymes, le choix du sujet a porté sur ses amylases d'origine bactérienne. Nous avons essayé d'étudier la capacité de quelques souches d'actinomycètes à produire les enzymes amylases et évalué leurs actions protéolytiques vis-à-vis leurs substrats. Une méthodologie bien définie a été suivie, afin d'atteindre les objectifs qui ont été tracés :

1. Isolements des actinomycètes à partir des échantillons du sol de la région de la Mostaganem.
2. Criblage du pouvoir protéolytiques des souches isolées.
3. Identification des isolats sélectionnés sur la base des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques.
4. L'utilisation des isolats dans la production d'amylases et la mise en évidence de leurs activités catalytiques.
5. Les résultats obtenus sont présentés et discutés avec certains travaux qui ont été réalisés.

Chapitre I :
Généralité sur le sol

I. Généralité sur le sol

1. Définition du sol

Le sol est la couche superficielle de la lithosphère terrestre, leur épaisseur varie de quelques centimètres à plusieurs mètres .Il est constitué d'un mélange de matériaux minéraux et organiques, qui sert de support naturel pour la croissance des plantes. Selon **Wild (1993)**, le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organisme formé par la désagrégation physique, chimique et biologique au cours du temps de plusieurs facteurs génétiques (fig.1) :

- ✓ La roche-mère sur laquelle s'est développé.
- ✓ Environnementaux tels que le climat, le relief et la végétation.

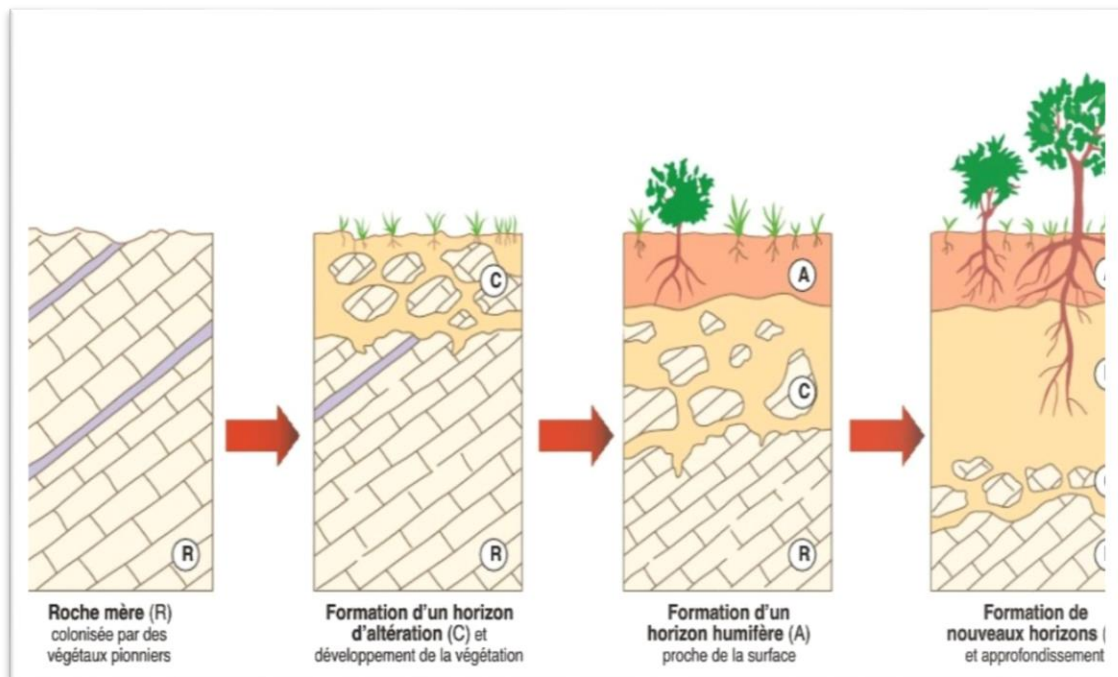


Figure 1 : formation du sol (Brady et al., 2002).

2. Diverse phase du sol

Le sol est de trois phases composées, la phase solide (minérale et organique), la phase liquide et la phase gazeuse (Fig. 2) (**White, 2006**).

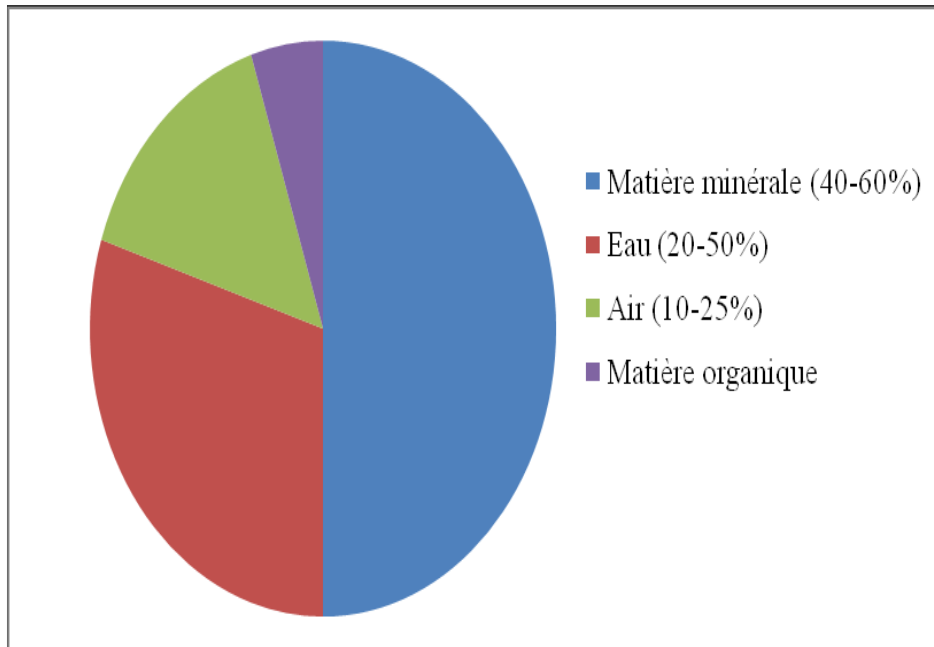


Figure 2 : Proportion des principaux composants de sol en volume (White, 2006).

2.1. La phase solide

Elle représente la moitié au deux tiers du volume du sol. Elle est constituée à plus de 90% de minéraux inorganiques primaires. La matière organique, représentant environ 0,5 à 10 % du sol, elle est un mélange complexe de composé solubles ou insolubles, provenant principalement des plantes, animaux et microorganismes. Cette matière organique est importante biologiquement, elle peut être une source d'énergie pour les organismes vivants. Chimiquement joue des rôles importants dans la sorption, les complexations et l'adsorption de cations. Physiquement, elle donne une grande stabilité au sol.

D'après Sposito (1989), on distingue deux fractions dans la phase solide :

- A. **La Fraction minérale** : elle provient de la dégradation superficielle de la roche mère et des processus physiques imposés par le climat (érosion par le vent, le gel, l'eau). Leur nature dépend à la fois des roches sur lesquelles les sols sont formés (tab.1).
- B. **La Fraction organique** : elle est définie comme le produit de l'altération biologique provenant du métabolisme d'être vivants (végétaux, animaux et microbiens). Cette matière carbonée est composée d'éléments principaux (C, H, O, N) et d'éléments secondaires (S, P, K, Ca, Mg) (Basile et D'urso, 1997)

Tab.1 : Dimension et propriété des éléments minéraux composant le sol (Hénin, 1976).

Éléments Minéraux	Diamètre (µm)	Absorption des ions	Rétention de l'eau	Perméabilité
Argile	< 2	Forte	Forte	Faible
Limon	2 – 20			
Limon grossier	20 – 50	Faible	Moyenne	Faible
Sable fin	50 – 200			
Sable grossier	200 – 2000	Nulle	Nulle	Forte

2.2. La phase gazeuse

La phase gazeuse (atmosphère du sol), occupe les pores du sol non envahis par la phase liquide. Il contient généralement de 18 à 20 % d'O₂, mais la teneur en O₂ peut chuter de 2 à 0 % au voisinage des racines. La teneur en CO₂ peut varier de 0,3 à 5 %, elle peut atteindre et même dépasser les 20 % dans certains cas. L'atmosphère du sol contient N₂, H₂O vapeur, mais elle contient aussi très souvent d'autres gaz produits biologiquement tels que : NO, N₂O, NH₃, H₂ ou CH₄. La composition de cette phase est déterminée par :

- ✓ Les échanges avec l'atmosphère par diffusion moléculaire couplée à la volatilisation et à sa dissolution.
- ✓ La respiration des organismes vivants,
- ✓ Les échanges avec la solution du sol.
- ✓ Les apports de diverses substances organiques volatiles, qu'ils soient volontairement (les traitements avec des pesticides gazeux) ou accidentels (dépôts de déchets industriels incontrôlés).

2.3. La phase liquide

Cette phase est désignée par la solution du sol. L'eau est retenue principalement dans les pores ou par interaction avec les minéraux argileux. La quantité d'eau retenue dépend de plusieurs facteurs : la nature est les constituants du sol, sa structure et des conditions climatiques (la température, humidité)

il occupe une partie importante de la porosité du sol , qui correspond à de l'eau infiltrée qui par percolation se charge en gaz dissous (O_2 , CO_2).

en substances minérales dissoutes et en particules en suspensions colloïdes (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- etc.). Elle véhicule les substances nutritives NO_3^- nécessaires aux organismes vivants (**Bruand et al., 1996**).

3. Différents horizons d'un sol

D'après **Michel et al. (2011)**, on distingue plusieurs types des horizons tels que :

- ✓ **L'horizon O** : Horizon organique formé en milieu aérobie. Située dans la partie supérieure du sol constitué de débris végétaux plus ou moins transformés
- ✓ **L'horizon A** : Horizon organo-minéral, il contient en mélange de la matière organique et de la matière minérale, située sous l'horizon O ;
- ✓ **L'horizon L** : Horizon labouré, dont la morphologie et le fonctionnement sont liés à une partie agricole ;
- ✓ **L'horizon J** : On distingue deux types d'horizon Js qui contient peu de matière organique et Jp dépourvu ;
- ✓ **L'horizon S** : Horizon structural, siège des minéraux primaires, de libération d'oxyhydroxydes de fer, et décarbonations ;
- ✓ **L'horizon E** : Horizon éluvial, appauvri en fer ou minéraux argileux ou aluminium, avec accumulation en minéraux résistants.

4. Les caractéristiques et propriétés des sols

4.1. Propriétés physiques du sol

4.1.1. La structure

Musy et al. (1991), définit la structure selon deux approches complémentaires : la première se base essentiellement sur le mode d'arrangement des éléments constitutifs de la phase solide du sol et la seconde s'oriente vers la description du réseau des agrégats générée par la structuration du sol. Pour les deux approches, l'analyse se base essentiellement sur des critères géométriques dont l'évolution se fait par des méthodes non destructives.

La structure selon leur mode de formation et d'arrangement des éléments sont classées en cinq grandes catégories (**Baize et Jabiol, 1995**).

- ✓ **Absence d'agrégats** : structures observées dans des matériaux organo-minéraux, on distingue la structure massive ou cohérente, la structure particulaire ou élémentaire (fig. 2).
- ✓ **Présence d'agrégat arrondis** : cette structure est favorable à la fertilité du sol, telle que la structure grumeleuse (fig. 2)

- ✓ **Présence d'agrégats à arêtes anguleuses** : Les structures de ce type résultent de processus physiques touchant les argiles, comme les alternances de gonflement. On a la structure

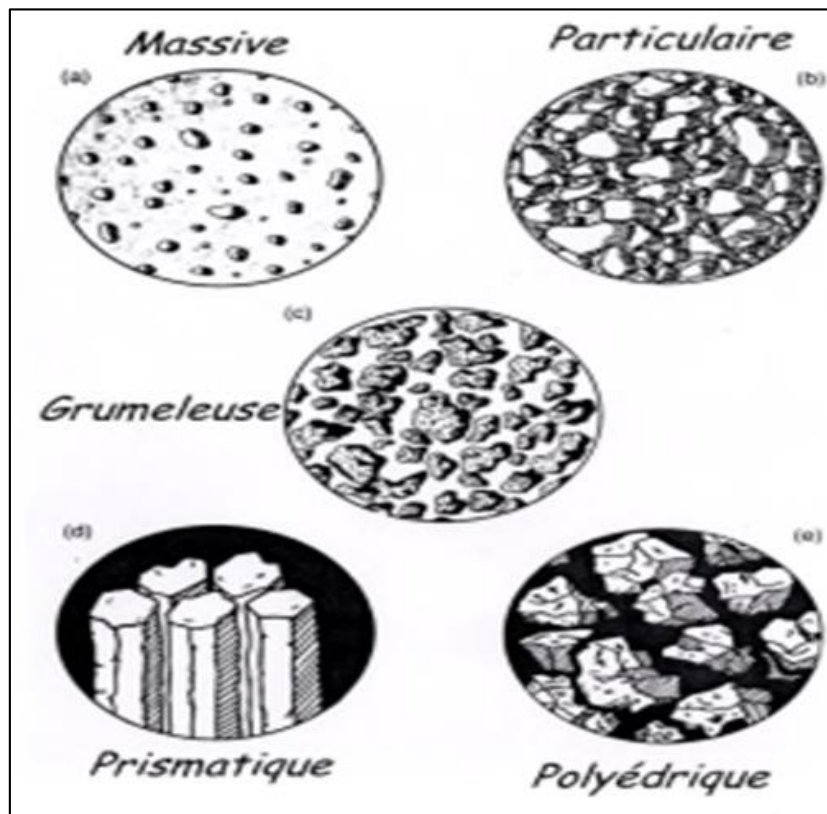


Figure 3 : Différentes structures de sol (Soltner et al., 2003).

4.1.2. La texture

D'après Gobat et al.(2003) et Girard et al.(2005), la texture renseigne sur la gamme de tailles des particules élémentaires du sol d'une manière qualitative (matériau, sol grossier et rugueux ou fin et moelleux) et quantitative (proportion des divers tailles des particules). Deux catégories sont respectivement désigner :

- ✓ Un sol à texture fine ou légère si les particules sont petites ($<2 \mu\text{m}$).
- ✓ Un sol à texture grossière ou lourde, comportant des particules suffisamment grandes (Hillel, 1984) comprises entre 2 et $50\mu\text{m}$ (Gras, 1988).

Les matériaux du sol peuvent être classés selon la nature organique ou minérale et selon le type de l'altération qu'il a subis (Gobat et al, 2003).

Chaque matériau est désigné par sa classe texturale déterminé sur la base des rapports de masse de trois fractions : sable, limon et argile (fig.4) (Gigard et al., 2005).

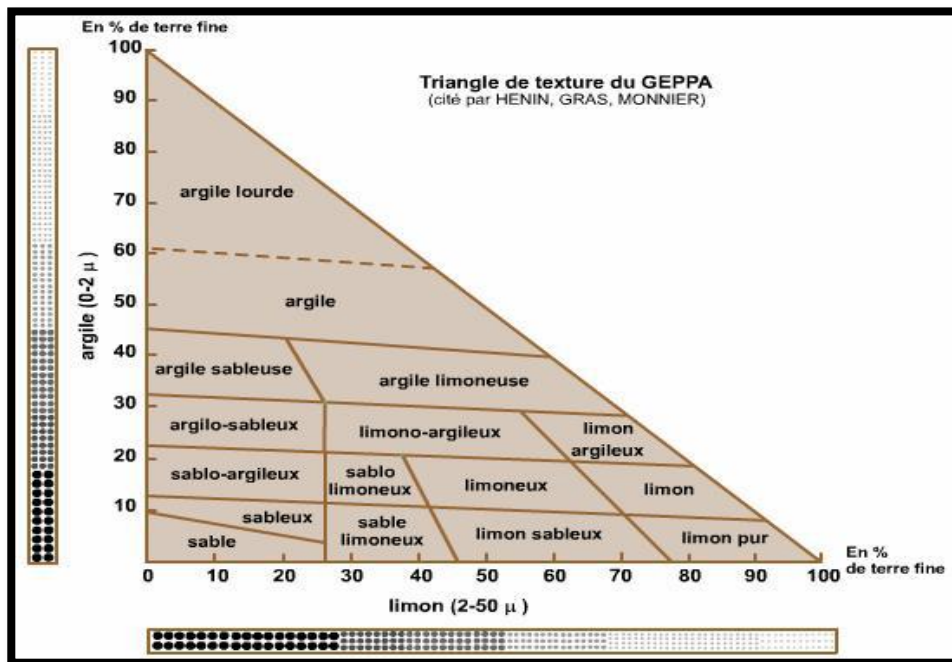


Figure 4 : Diagramme triangulaire des classes texturales de sol d'après les dimensions des Particules (Univa, 2005).

4.2. Propriétés chimique du sol

4.2.1. La Matière organique

D'après **Duchaufour (1984)**, la matière organique est l'ensemble des composés carbonés et azotés issus de la dégradation des produits de la faune et de la flore de la surface et du sous-sol. Elle englobe toute substance organique, vivante ou morte, fraîche ou décomposée, simple ou complexe, à l'exclusion des animaux des racines vivants dans le sol. Selon les auteurs suivants **Mustin, (1987)**, **Musy et al. (1991)**, **Soltner, (2003)**, **Petit et Jobin, (2005)** et **Anonyme, (2010)**, il existe différents types de matière organique tels que :

- ✓ **Le fumier** : Fermentation d'un mélange de litière et de déjections animales ;
- ✓ **La litière** : Résidus végétaux et animaux qui se déposent à la surface du sol ;
- ✓ **Le lisier** : Mélange des déjections solides et liquides des animaux qui ne contient pas de litière ;
- ✓ **L'engrais vert** : Source d'éléments nutritifs azoté pour les plantes ;
- ✓ **Le compost** : Produit riche en humus, issu de la décomposition rapide de toutes les matières organiques

4.2.2. La couleur du sol

La couleur des sols provient le plus souvent des couleurs des oxydes de fer ou de la matière organique qui recouvrent les surfaces des particules du sol. Les surfaces des sols en couleurs foncées (noir) présentent un indicateur de la fertilité. Toutefois, la couleur de la matière organique est plus foncée (brune à noir), cette couleur domine en surface que celle des oxydes de fer dont leurs couleurs varient du jaune, rouge à brune. Vers le bas, les couleurs des oxydes de fer et parfois des oxydes de manganèse sont très noirs et dominant (**Wopereis et al., 2008**).

4.2.3. PH du sol

Le pH renseigne sur le processus pédogénétique, ainsi que sur son état trophique. C'est une grandeur utilisée en foresterie ou agronomie (**Antoni, 2014**). Il a un objet de quantifier la concentration des ions H^+ dans les solutions de sol. On peut déterminer deux mesures de pH pour chaque échantillon de terre : Le premier nous renseigne sur l'acidité effective de la solution ; le second a pour objectif est de déloger les ions H^+ de la CEC, et renseigne sur l'acidité potentielle.

4.2.4. Evolution de la matière organique dans le sol

L'évolution de la matière organique dans le sol passe par plusieurs étapes. Chaque étape joue un rôle important dans décomposition et la transformation, on distingue :

A. Minéralisation primaire (M1) : Elle concerne la minéralisation de la matière organique fraîche. Les molécules organiques sont transformées en éléments simples : gaz carbonique (CO_2), azote minéral et éléments minéraux (K^+ , Ca^{++} , NO_3^- etc.). La majeure partie de cette décomposition est réalisée par des microorganismes hétérotrophes (**Feller, 1994**) (fig.5).

B. Humification : Selon **Duchaufour (1968)**, l'humification s'effectue en deux phases : La première est une transformation « biochimique » plus ou moins rapide de la matière organique fraîche qui donne naissance à un humus « labile » à liaison peu étroite avec la matière minérale, souvent faiblement polymérisée (**Duchaufour, 1968**). La seconde phase est une évolution lente, liée aux conditions extérieures, en particulier au facteur climatique (fig. 5).

C. Minéralisation secondaire (M2) : Elle aboutit à la libération de substances nutritives par désagrégation et dépolymérisation successives des matières organiques stabilisées (Duchaufour, 1984) (fig. 5).

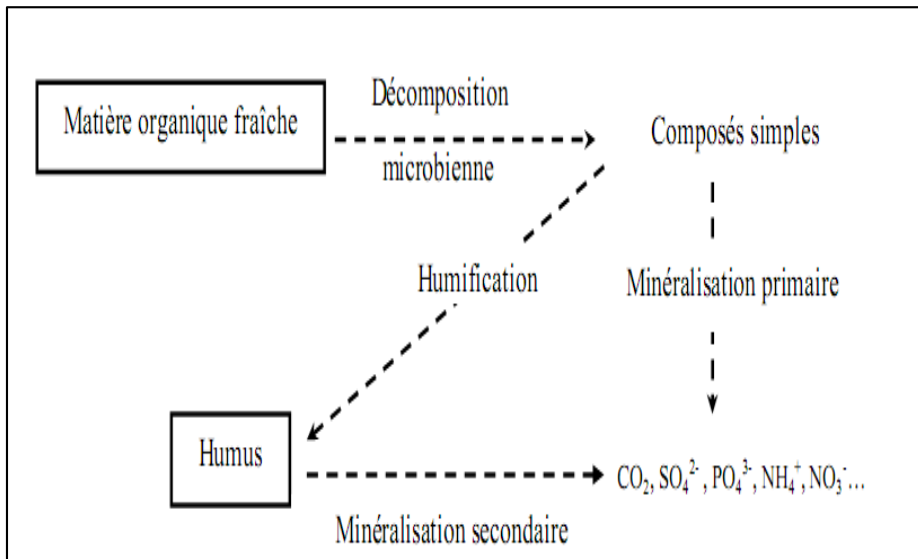


Figure 5 : Evolution et décomposition de la matière organique fraîche dans le sol (Calvet, 2003).

Chapitre II :
Caractéristiques
et importances des
actinomycètes

II. Caractéristiques et importances des Actinomycètes

1. La microflore du sol

D'après **Henri et al. (1969)**, le sol constitue l'habitat de la plus grande diversité d'organismes vivants. Plusieurs milliers d'espèces de microorganismes et vivent dans les sols, à partir des les microorganismes invisibles à l'œil nu, jusqu'à la macrofaune.

Selon **Hoorman et Islam (2010)**, la microflore tellurique est principalement dominée par les bactéries dont les actinomycètes représentent un groupe important, suivie par les champignons, les algues et les protozoaires (tab.2).

Tableau 2 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm.

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Actinomycètes	10 ⁷ -10 ⁸	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ -10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	Variée

1.1. Les champignons

Les champignons du sol peuvent être des champignons supérieurs (basidiomycètes et ascomycètes), des levures ou des champignons inférieurs regroupés sous le nom de moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, etc.). Ils sont hétérotrophes et leur nombre varie de 10⁵ à 10⁶ cellules/g de sol (**Maier et al., 2000**). Les populations fongiques exigent la richesse du sol en matière organique. Dans les sols riches, elles oscillent entre 1 et 2 tonnes à l'hectare. Les champignons interviennent principalement dans la dégradation des sucres complexes (cellulose, lignine) et dans les processus d'ammonification (dégradation des matières azotées).

La grande majorité de ce groupe microbien est saprophyte, mais un bon nombre d'espèces sont des parasites redoutables. Certaines espèces vivent en symbiose avec les plantes supérieures (ex : les mycorhizes). Ils leur apportent des éléments nutritifs, essentiellement comme le phosphore très utiles à leurs croissances et d'autre part, ils renforcent leurs défenses naturelles vis-à-vis le stress biotique ou abiotique (**Alexander, 1977**)

1.2. Les algues

Les algues sont photo-autotrophes et sont surtout présentes sur la surface du sol pour recevoir un minimum d'éclairage nécessaire pour la photosynthèse. Certaines sont hétérotrophes (Euglènes) peuvent vivre plus profondément. De nombreuses algues sont entourées d'une couche mucilagineuse abritant de nombreuses bactéries. Elles sont de l'ordre de 5000 à 10000 cellules/g de sol (**Maier et al., 2000**).

Selon, **Wild (1993)**, quatre groupes majeurs des algues sont retrouvés dans le sol, il s'agit des algues vertes, vert-jaune ou rouges et des cyanobactéries. Elles participent aux processus de formation de sol, certaines espèces ont la capacité de fixer l'azote. Leurs formes dans le sol sont généralement plus petites que celles des aquatiques, la plupart sont cosmopolites (ex : *Hantzschia amphioxys*, des espèces de *Nostoc*, *Chlamydomonas*, *Stichococcus*, *Zygonium*, *Phormidium*).

1.3. Les protozoaires

Ce sont des premières formes animales les moins évoluées. Ils présentent une diversité morphologie (de dimensions, de structure et de fonctions). Elles sont caractérisées par leur forme unicellulaire et la mobilité de la plupart d'entre eux (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Les formes les plus nombreuses sont aquatiques, d'autres végètent dans le sol et d'autres peuvent se développer sur un autre organisme vivant. Ce sont donc des parasites qui peuvent être soit utiles (symbiose), soit nuisibles, soit indifférents à l'hôte qui les héberge (**Henri, 1969**). La plupart sont hétérotrophes ; ils se nourrissent de bactéries, de levures, de champignons et d'algues, ils peuvent être impliqués dans la décomposition de la matière organique (**Wild, 1993 ; Maier et al., 2000**).

1.4. Les bactéries

Les bactéries aérobies du sol participent essentiellement dans les réactions d'oxydation de la matière organique. En outre, les anaérobies assurent les réactions de réduction au cours de fermentations. Les hétérotrophes peuvent être saprophytes, elles minéralisent la matière organique morte (nécromasse), d'autres sont appelées « humifiantes » (**Vitousek, 1991**).

Les bactéries autotrophes sont capables de tirer leur énergie et leurs éléments nutritifs essentielles à partir de substances minérales. Dans le sol, un nombre considérable de ces dernières jouent un rôle important, en particulier dans les cycles biogéochimiques. Parmi celles intervenant dans le cycle de l'azote, on peut citer les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*), nitriques (*Nitrobacter*) et Certaines bactéries dénitrificatrices qui respirent les nitrates en anaérobiose en libérant le N₂. Les bactéries semi-autotrophes assimilent une source d'azote minérale et une source de carbone organique et fixent l'azote. Certaines sont libres dans les sols (*Azotobacter*, *Clostridium*), d'autres vivent en symbiose, par exemple avec les légumineuses (*Rhizobium*). Quelles les bactéries soient autotrophes, hétérotrophes, aérobies ou anaérobies, toutes exigent des conditions abiotiques assez strictes : un pH

neutre, une humidité moyenne, une température plutôt basse (bactéries psychrophiles) et différents oligoéléments (**Vitousek, 1991**).

1.5. Les actinomycètes

1.5.1. Généralité

Les actinomycètes sont défini comme des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, formant des colonies circulaires constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du centre de développement, cela explique leur dénomination «Actinomycètes» (**Dommergurs et Mangenot, 1970 ; Aouar, 2006**).

Étymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « **Aktis** » qui signifie rayon et « **mykes** » qui veut dire champignon. Généralement, ils sont souvent été confondus avec les champignons (eucaryotes), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoïdes. Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques, permettent de les classer parmi les procaryotes (**Perry et al., 2004**). Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons, avec toutefois des filaments «des pseudos mycélium» qui ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2µm) que ceux des champignons. Ces procaryotes, sont caractérisés par une morphologie typiquement bactérienne telle que les formes simples Mycobacteriacées, ainsi que, leurs sensibilités aux attaques des actinophages, aux antibiotiques antibactériens et aux lysozymes. Actuellement, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les procaryotes (**Lansing et al., 2003**), toutefois, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons (**Perry et al., 2004**).

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

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

Elles constituent une proportion importante de la microflore tellurique respectivement (10^4 - 10^6 UFC/ml) et (10^7 - 10^8 UFC/ml) (**Shrivastava et al., 2008 ; Hoorman et Islam, 2010**). Une grande difficulté de la classification des actinomycètes existe, elle est généralement basée sur les caractères morphologiques et la couleur du mycélium aérien et végétatif.

1.5.2. Taxonomie

Les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à l'ordre des actinomycétales, ce dernier est divisé en 10 sous ordres *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae* (Larpen, 2000).

En se basant sur les caractéristiques de la paroi : le type de l'acide diamino-pimélique, la présence de la glycine dans les ponts inter-peptidiques et le contenu en sucres du peptidoglycane (Lechevalier, 1980).

D'autres propriétés morphologiques et génétiques précieuses sont utilisées dans la taxonomie des actinomycètes, telles que, la couleur des mycéliums et des sporanges, la disposition des conidiospores, le pourcentage en GC de l'ADN, la composition en phospholipidique des membranes cellulaires et la résistance des spores à la chaleur (Prescott *et al.*, 2003).

Les bactéries associées au groupe des actinomycètes filamenteux sont toutes très proches d'un point de vue phylogénétique (Madigan et Martinko, 2007). Des techniques plus nouvelles ont été appliquées à la taxonomie des Actinomycètes, la comparaison des séquences de l'ARNr 16S s'est révélée précieuse (Prescott *et al.*, 2003). Une autre technique consiste à extraire des fragments d'ADN digérer par des enzymes de restriction, séparer et comparer par la technique d'électrophorèse en champ pulsé (Prescott *et al.*, 2003).

Cependant, la classification traditionnelle, comportait quatre grandes familles à été profondément remaniée par les techniques nouvelles citées ci-dessus.

Actuellement, dans l'ordre des Actinomycétales, plus de trentaine familles telles que *Mycobactériacées*, *Actinomycétacées* (ou *Proactinomycètes*), *Streptomycétacées*, *Actinoplanacées* (fig. 6) (Henri, 1969).

1.5.2.1. Mycobacteriacée

D'après Krasilnikov, (1958), 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 un seul genre *Mycobacterium* qui renferme plusieurs espèces pathogènes, dont la plus connue est *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose.

1.5.2.2. 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 (fig. 6) (Alexander, 1977).

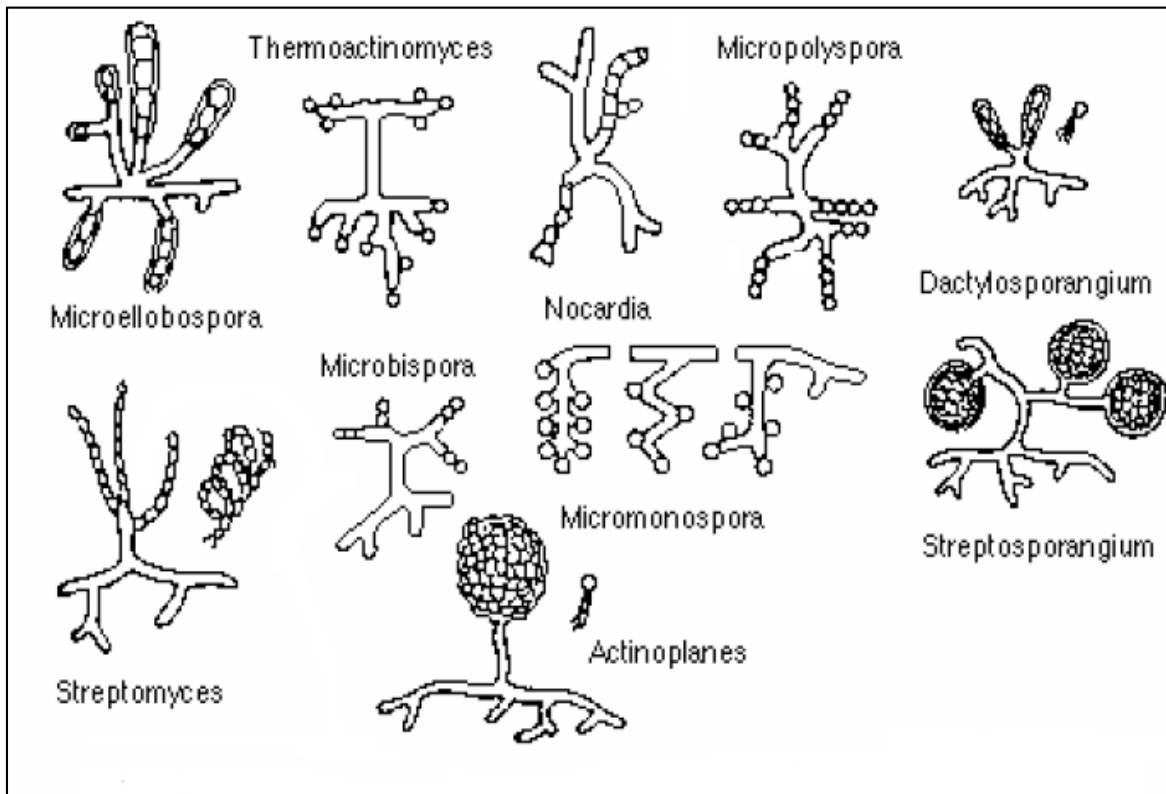


Figure 6 : Principaux genres dans les Actinomycètes (Stanier, 1965).

1.5.2.3. Les streptomycétacées

Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente souvent 70 à 90 % des actinomycètes. Il se distingue des *Nocardia* par leur mycélium végétatif persistant quel que soit le stade de développement et une reproduction par des conidies en chaîne. Les colonies de *Streptomyces* comprennent un mycélium végétatif très serré, implanté dans le milieu et un mycélium aérien, plus lâche, d'aspect poudreux, formé d'hyphes terminés par des conidies en chaînes. Le genre *Micromonospora* est caractérisé par un développement faible ou nul du mycélium aérien ; les conidies, isolées ou en grappes, sont portées directement par le mycélium végétatif (fig.6 cité ci-dessous). Les différentes espèces, pour la plupart thermophiles, se développent surtout dans les fumiers et les composts (Stanier, 1965).

1.5.2.4. Les actinoplanacées

Les espèces appartenant à cette famille ont un cycle qui présente un stade mobile (sporangio spores mobiles). Le genre *Actinoplanes* est aquatique (fig. 6) (Stanier, 1965).

1.5.3. Caractéristique des actinomycètes

1.5.3.1. 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 développant sur et dans les milieux. Mycélium végétatifs, ou de substrat constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface ainsi quela présence ou non de mycélium aérien (MA) (Michel *et al.*, 1991). Les couleurs du MA, du MS et de des pigments diffusibles (en cas de production) sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Kelly et Judd, 1976).

Le mycélium de substrat est dénommé mycélium primaire. Sa couleur varie du blanc ou pratiquement incolore. Cette formation montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (fig.7) (Locci, 1976).

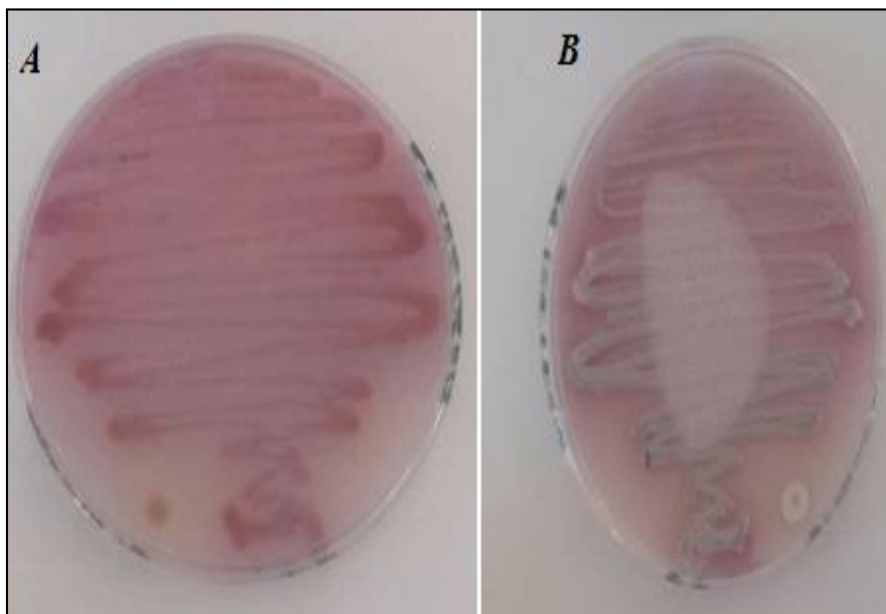


Figure 7: Apparence d'isolats d'Actinomycètes sur milieu caséine amidon (Boudia, 2019).

A : Mycélium de substrat (MS).

B : Mycélium aérien (MA).

1.5.4. La répartition et les exigences des actinomycètes dans la nature

1.5.4.1. La répartition des actinomycètes

Le tableau 3 montre que les actinomycètes colonisent une large variété d'habitats. Ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats (Williams et al., 1983 ; Lechevalier, 1986).

Tableau 3 : La répartition des Actinomycètes dans la nature (Williams et al., 1983).

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

- ✓ **Dans le sol** : Contrairement aux sites exposés à des conditions trop extrêmes, le sol reste le réservoir principal des Actinomycètes spécialement dans les sols alcalins et les sols fertiles riches en matière organique (Lansing et al., 2003). Les premières souches d'actinomycètes ont été isolées par COHN en 1875 et NOCARD en 1888 (In Boucheffa, 2011) de sources humaines et animales respectivement. Le tableau ci-dessous montre la fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol (Leveau et Bouix, 1993). Ces Actinomycètes produisent principalement des substances spécifiques responsables de l'odeur caractéristique des sols, telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol (Dommergurs et Mangenot, 1970).

Tableau 4 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol (Leveau et Bouix, 1993)

Genres	Pourcentages %
<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>Microellobospora</i>	0,04

- ✓ **Dans le milieu marin** : Selon certains auteurs, les souches d'actinomycètes isolées des milieux marins présentent que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau. D'autres part, il existe une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophile à une température optimale faible. Certaines souches *Nocardioformes* isolées à plus de 2000 m de profondeur se développent sous les pressions hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°C (Weyland, 1981).
- ✓ **Eaux douces** : Certains genres d'Actinomycètes préfèrent les eaux douces, comme les *Micromonospora* qui sont abondants dans les lacs. Des souches d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium* ont été facilement isolées, ils se trouvent essentiellement dans les lacs extrêmement alcalins, les lacs salés. Par contre, ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH <1) et les sources thermales très chaudes d'origine volcanique. (Boucheffa, 2011 ; Gerard et al., 2001).
- ✓ **Air** : L'air est un moyen de transport. pour les Actinomycètes, mais il n'est pas un habitat. A l'aide des spores des Actinomycètes dispersées dans la poussière dans l'air, elles se déplacent par le vent (Michael et John, 2007).
- ✓ **Les composts** : La décomposition biologique thermophile de déchets organiques en présence d'oxygène et dans des conditions contrôlées, sous l'action de micro et macro-organismes produit du compost. Ce dernier est composée essentiellement de la matière organique de type humique stable et de composés minéraux (Mustin, 1987). Certaines actinomycètes thermophiles sont isolés de ces composts, comme le genres *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autre thermotolérants tels que *Microbispora*, *Microspolyspora*, *Pseudonocardia* (Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997 ; Song et al., 2001)

Les actinomycètes sont très actifs dans les attaques des polymères résistants comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine en stades finale du compostage.

1.5.4.2. Les exigences des actinomycètes

Dans le sol, les actinomycètes sont influencée par les conditions abiotiques et abiotiques telles que l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (**Basilio, 2003**).

- ✓ **Le taux d'humidité** : à des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité dans des sols, des actinomycètes ont été isolés, ce qui explique leurs présence dans les sol semi-arides (**Oskayet al. 2004 ; Prescott et al., 2007**).
- ✓ **La température** : Les actinomycètes sont des mésophiles et thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est de 50 à 60°C. Ils ont été observés grâce à leurs spores qui résistent à une température de 90°C pendant 30 minutes et par la résistance à la novobiocine (25 µg/ml). Le genre streptomyces comporte aussi des espèces thermophiles comme *Streptomyces thermocoprophilus* et même psychrophiles (**Holt et al., 1994 ; Kim et al., 2000**).
- ✓ **Le pH** : La majorité des actinomycètes du sol présentent une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin, ils peuvent se développent dans un pH compris entre 5 et 9 (**Lee et Hwang, 2002**). Certains travaux ont montré l'existence d'actinomycètes acidophiles qui différent morphologiquement des espèces neutrophiles comme *Streptacidiphillus jiangxiensis* et *Streptacidiphilus oryzae* (**Basilio, 2003 ; Huang et al., 2004**) (**Wang et al., 2006**).
- ✓ **Rapports avec l'oxygène** : Les actinomycètes sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies stricts comme est le cas du genre *Actinomyces* (*Actinomyces meyeri*, *Actinomyces israelii*).
- ✓ **Matière organique** : Le taux des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de la matière organique, quelque soit le taux de la salinité. Cela a été rapporté par plusieurs auteurs tels que **Henis en 1986** et **Lee et Hwang en 2002**

1.5.5. Mode de reproduction

Les actinomycétales présente un cycle biologique qui ressemble à certains champignons. Ce cycle est composé de plusieurs étapes (fig. 8) (Floyd *et al.*,1987 ; Sanglier et Trujillo,1997).

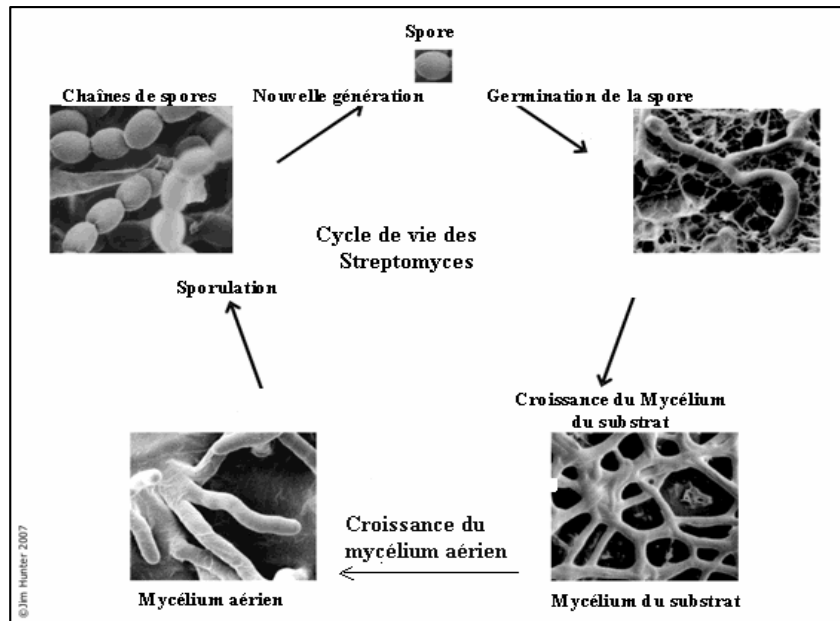


Figure 8 :Cycle de vie des *Streptomyces* (Jim Hunter, 2007).

- ✓ **Germination des spores** : On distingue l'étape de l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance.
- ✓ **Mycélium primaire** : Le tube de germination donne des hyphes qui se ramifient, ce développant sur et dans le substrat. Il est dénommé mycélium primaire, mycélium végétatif ou mycélium de substrat. Il peut être pigmenté et forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. Il peut se fragmenter chez certaines bactéries du genre *Nocardioformes*.
- ✓ **Mycélium secondaire** : Ce mycélium secondaire aérien va se développer sur le mycélium primaire. Ces hyphes sont peu ramifiées et pourvues d'une enveloppe hydrophobe, elles sont plus épaisses que les hyphes primaires, ou se forment des spores. Ce mycélium est peut être pigmenté en gris, vert, rouge etc.
- ✓ **Formation des spores** : Les spores des Actinomycètes peuvent être classé en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores, ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Kitouni , 2007 ;Loucif, 2010).

- a) **Les endospores** : Les Actinomycètes thermophiles développent des endospores, à l'inverse des exospores, les endospores contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6,5 à 7 %. Cet acide peut être associé à des ions de calcium et magnésium ce qui confère une résistance à la chaleur des spores. Les endospores sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphes existant. chez les Actinomycètes *Actinoplanes* et *Pilimelia*, des zoospores mobiles (pourvues de flagelles) se forment à l'intérieur d'un sac fermé appelé sporange (**Getha et al., 2005 ; Kitouni, 2007**).
- b) **Les exospores** : Les exospores formées sur le mycélium aérien des Actinomycètes peuvent avoir des formes très variables, elles se développent par septation des extrémités des filaments, en réponse à une privation en éléments nutritifs (**Perscott et al., 2007 ; Boudemagh, 2007**). La plupart ne sont pas résistante à la chaleur, mais contiennent des quantités plus importantes de potassium, calcium, manganèse que dans le mycélium de substrat (**Kitouni, 2007**), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (**Perscott et al., 2007**).

1.5.6. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes possèdent des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes, également pour la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique (**Conn, 2005**). Il a été estimé que sur 16500 antibiotiques connus, 8700 (53%) sont produits par les actinomycètes dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces* (**Choulet, 2006**). En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés

d'une large gamme d'activités, tels que des inhibiteurs d'enzymes, immunosuppresseurs, toxines et pesticides (Dairi, 2005 ; Pizzul, 2006).

✓ **Production d'enzymes**

Les actinomycètes sont capables de synthétiser certaines enzymes d'intérêts industrielles telles que les chitinases, des glucanases, des peroxydases et des glutaminases (Tokala *et al.*, 2002 ; Divya *et al.*, 2013). Des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases peuvent être aussi produites par quelques espèces de *Streptomyces*. Toutefois, l'espèce *Streptosporangium* sp. isolé à partir des feuilles de maïs produit des gluco-amylases exploitées en industrie pour dégrader l'amidon, d'autres sont capables de dégrader la lignine. Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycètes, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, monoglycérides, glycérol et en acides gras (Sommer *et al.*, 1997 ; Hasegawa *et al.*, 2006).

✓ **Production d'antibiotique**

De nombreuses substances antimicrobiennes sont synthétisées par les microorganismes du sol environ 23000 métabolites secondaires bioactives qui jouent un rôle antagoniste important. Entre autre, 10000 métabolites secondaires de ces substances sont produits par les actinobactéries et représentent 45%. Les espèces du genre *Streptomyces* produisent environ 7600 de métabolites bioactives dont la plupart sont des antibiotiques exploités par les industries pharmaceutiques (Valli *et al.*, 2012). D'autres produits sont synthétisés également par les actinomycètes comme l'acide indole acétique (AIA) et les sidérophores, ils peuvent même solubiliser le phosphore du sol (Ben Ameer *et al.*, 2006).

Chapitre III :
Les enzymes d'actinomycètes

III. Les enzymes d'actinomycètes

1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs de nature protéique qui exercent une activité catalytique spécifique d'un très grand nombre de réactions chimiques, et sont après les antibiotiques les plus importants produits des actinomycètes (Navarre et Françoise, 2010). Les principaux facteurs qui contrôlent la fonction des enzymes dans un milieu sont la température, le pH, la salinité et l'activité de l'eau etc. En générale, leur activité croît de manière exponentielle avec l'élévation de la température du milieu réactionnel jusqu'aux températures optimales situées entre 60-70°C. Au-delà de cet intervalle, elles perdent leur activité catalytique. Leurs pH optimum varient avec la nature des enzymes et des réactions. Le plus souvent est compris entre 4 et 9 (Pierre, 2000).

Les actinomycètes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter des molécules complexes à l'intérieur de leurs cytoplasmes. Ils synthétisent des enzymes extracellulaires pour décomposer ces molécules en nutriments utiles et essentiels. Ces sources de substances bioactives possèdent une capacité hydrolytique extracellulaire importante, qui trouve des applications dans les industries, de textile, des bio-raffineries, d'agroalimentaires, papèteries et pharmaceutiques (Janaki., 2017).

2. Classification des enzymes

Les enzymes sont classées en fonction des réactions qu'elles catalysent, on distingue six classes (tab.5)

Tableau 5 : Différentes classes d'enzymes (Pierre, 2000).

Classes	Réactions catalysées
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction (transfert des ions H ⁺ et des électrons) ex : oxygénase, oxydase...ect.
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels ex : lipoylesynthase
EC 3 Hydrolases	Coupe une molécule avec fixation d'eau (hydrolyse) ex : estérases, peptidases ...ect.
EC 4 Lyases	Coupe des différentes liaisons chimiques par d'autres moyens que l'hydrolyse ex : Cystathionine gamma-lyase
EC 5 Isomérases	Remaniement interne d'une molécule ex : mutase, prostaglandine-E synthase.
EC 6 Ligases	Synthèses de nouvelles molécules par addition d'éléments ex : synthétase

3. Les principaux enzymes synthétisés par les actinomycètes

3.1. Amylase

Les amylases sont des enzymes capable d'hydrolyser les molécules d'amidon en une variété de produits comprenant des **dextrines** et des **polymères** composés de plus petits d'unités de glucose qui donne des petites unités telle que le fructose, glucose et maltose (fig.9).

Il a été rapporté par **Kar et Ray (2008)** et **Janaki, (2017)**, que les actinomycètes tels que les *Streptomyces erumpens* sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules pour effectuer une digestion extracellulaire.

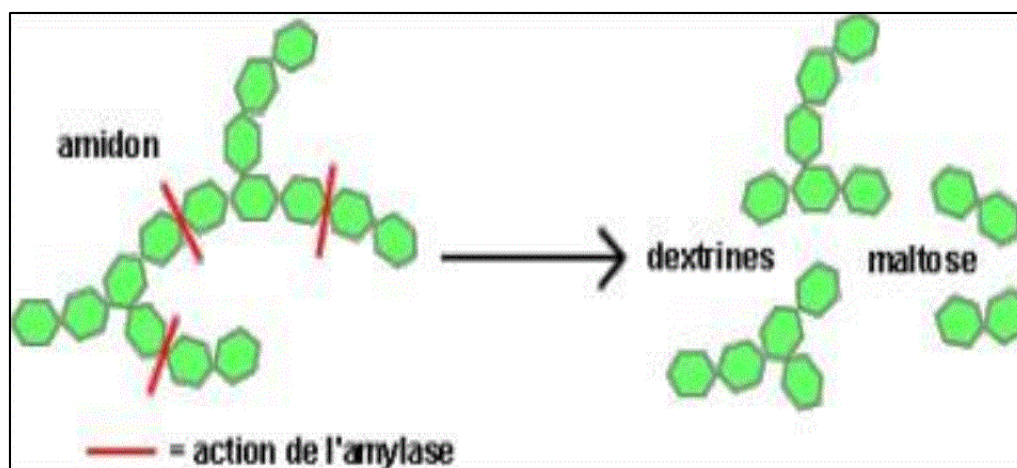


Figure 9: Mode d'action de l'alpha-amylase (in **Meziani et Mahcene, 2017**)

Il existe différents type d'amylases, on distingue les alpha-amylases produit par les *Nocardiosis sp*, les bêta-amylases secréter par les *Streptomyces sp*, les pullulanases et les amylo glucosidases (Tab.6, fig.10)(**William et al., 2012**).

Tableau 6 : Propriétés générale des enzymes amylolytiques (**Pierre, 2000**).

Enzymes	Liaison	Mode d'action	Produit de fin de réactions
Alpha-amylase	Alpha-(1,4)	Endo amylases	Glucose,maltose,oligosides
Beta-amylase	Alpha-(1,4)	Exo amylases	Maltose, dextrines
Pullulanases	Alpha-(1,6)	Endoamylases	Chainelinéaird'anhydroglucose
Amyloglucosidases	Alpha-(1,4) et (1,6)	Exo amylases	Glucose

--	--	--	--

Les amylases se différencient par leur mode de coupure des liaisons glycosidiques alpha 1,4 ou alpha 1,6. Soit par action au hasard à l'intérieur de la chaîne d'unités de glucosyles (endo-enzymes) ou à partir des extrémités non réductrices (exo-enzymes) (fig.10) (Pierre, 2000 ; Ragnathan et Padhmadras, 2013).

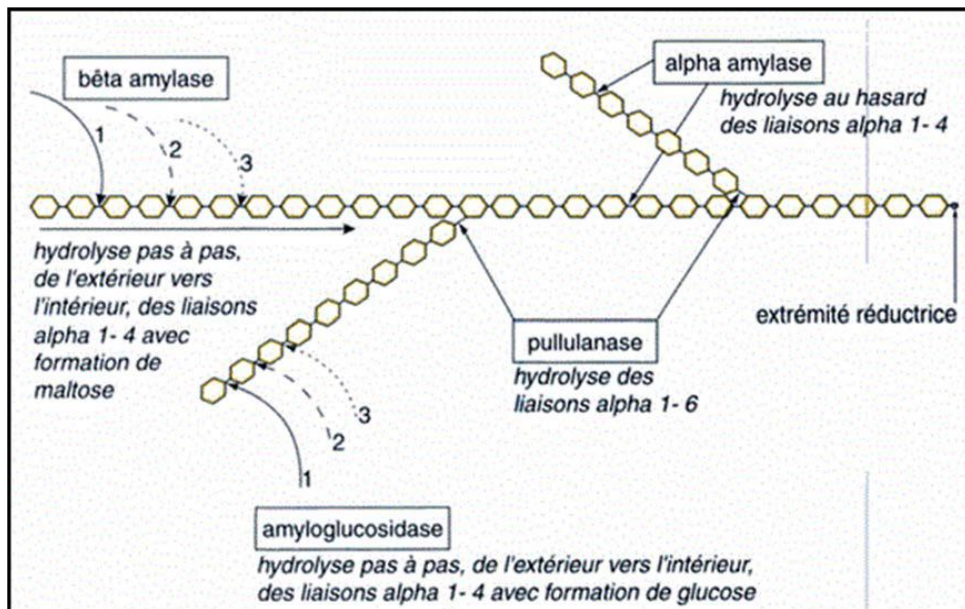


Figure 10 : Mécanismes d'action des enzymes amylolytiques (Pierre, 2000).

3.2. Les protéases

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des catalyseurs des réactions d'hydrolyse des protéines. Ce groupe d'enzymes hydrolyse les liaisons peptidiques entre deux acides aminés des peptides et des protéines en libérant des acides aminés ou des petits peptides (Fig. 11) (Navarre, 2010 ; Jean *et al.*, 2004).

En effet, plusieurs bactéries du genre *Streptomyces* comme *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. rimosus*, *S. thermoviolaceus* secrètent une multitude de protéases dans leurs milieux de culture. Les *S. moderatus* et *S. griseus*, synthétisent au moins cinq protéases différentes dans le surnageant de culture. D'autres travaux ont montré que parmi plus de 500 souches de *Streptomyces* étudiées ont une activité protéolytique et les protéases des *S. fradiae* présentent le plus haut niveau d'activité provenant (Ghorbel, 2014 ; Boulahrouf, 2016).

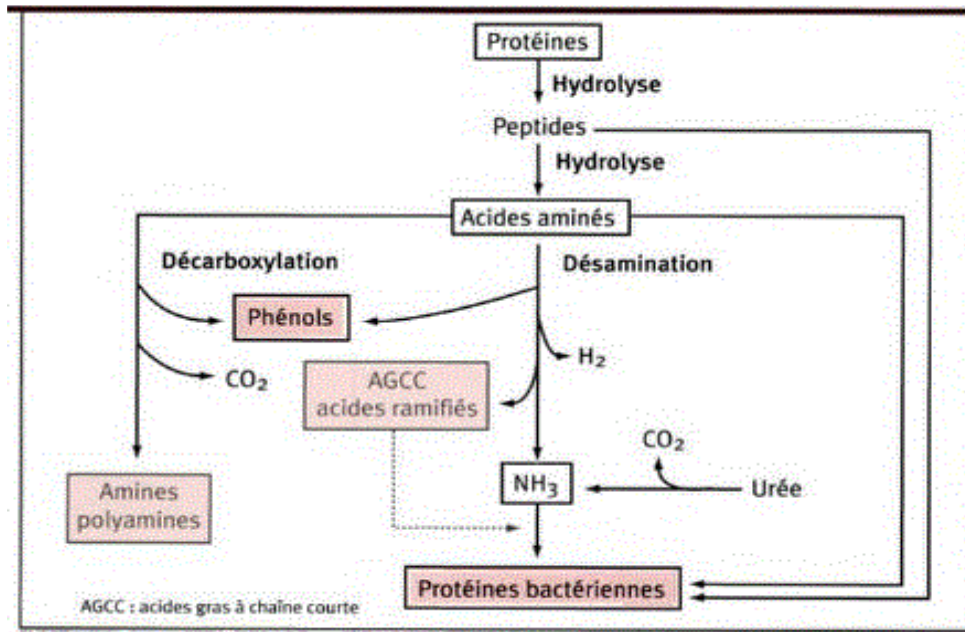


Figure 11 :Principale voies du métabolisme des protéines (Gean *et al.*, 2004).

3.3. Les Lipases

Les lipases ou les triacylglycérol-hydrolases sont des enzymes exceptionnels vu leurs mécanismes d'action et leurs spécificités de substrats. Selon la réaction à catalyser, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (fig.12) (Mukhtar *et al.*, 2017).

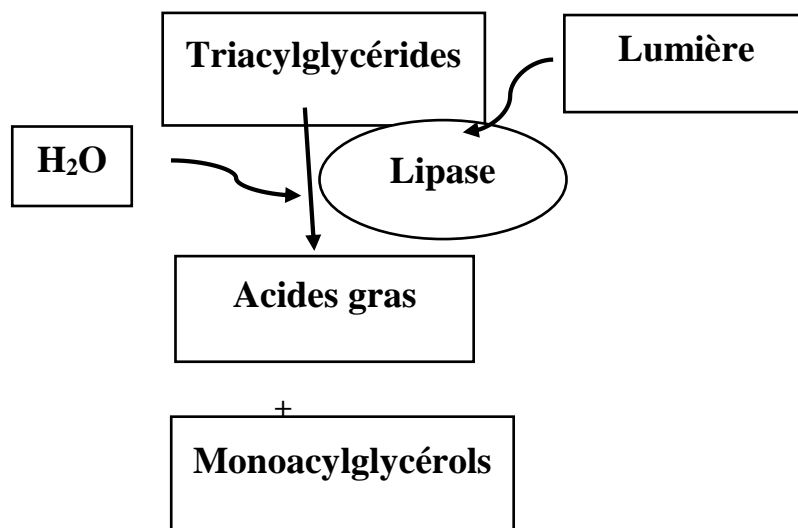


Figure 12 : Catabolisme des triglycérides (Mukhtar *et al.*, 2017).

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes et constituent une classe particulière d'estérases. Selon l'auteur Gerard *et al.*, (1988), les lipases existent largement chez les bactéries, les levures, les champignons filamenteux et chez les actinomycètes particulièrement chez *Streptomyces rimosus*, *Rhodococcus*, *Nocardia erythropolis*, *Streptomyces exfoliates* et

Nocardiosis alba. Ils produisent des lipases qui hydrolysent les liaisons ester des triglycérides en glycérol et en acides gras respectivement.

3.4. Cellulases

D'après **Rajeeva et Soni , (2015);Tanveer et al, (2014) et Hitesh et al, (2016)**, les cellulases sont des enzymes qui convertissent la cellulose en glucose et d'autres produits chimiques de base. Il existe trois grands types d'enzymes de cellulase qui agissent en synergie (fig.13) :

- ✓ **Les Endoglucanases** : L'endoglucanase, ou CMCase, coupe de manière aléatoire les liaisons β -1,4 de chaînes de cellulose, générant de nouvelles extrémités. Certaines endoglucanases peuvent agir de manière «processuelle», en fonction de leur capacité à lyser la cellulose cristalline et générer le principal produit sous forme de cellobiose ou de cellodextrines plus longues (fig.13)(**Zhang et Zhang, 2013**).
- ✓ **Les Exoglucanases** : L'exoglucanase, ou CBH, agissent de manière processive sur la réduction extrémités non réductrices ou en polysaccharide de cellulose chaînes, libérant du cellobiose ou du glucose en tant que principal des produits. Les exoglucanases peuvent travailler efficacement sur les micro-cellulose cristalline, probablement peler les chaînes de cellulose de la structure microcristalline (fig.13) (**Zhang et Zhang, 2013**).
- ✓ **β -glucosidase** : β -glucosidases (BG) qui ne contiennent pas de CBM hydrolysé les cellodextrines solubles et le cellobiose en glucose. Les BG ont un site actif en forme de poche, qui leur permet de se lier à l'unité glucose non réductrice et couper le glucose de cellobiose ou de cellodextrine (fig.13). (**Zhang et Zhang, 2013**).

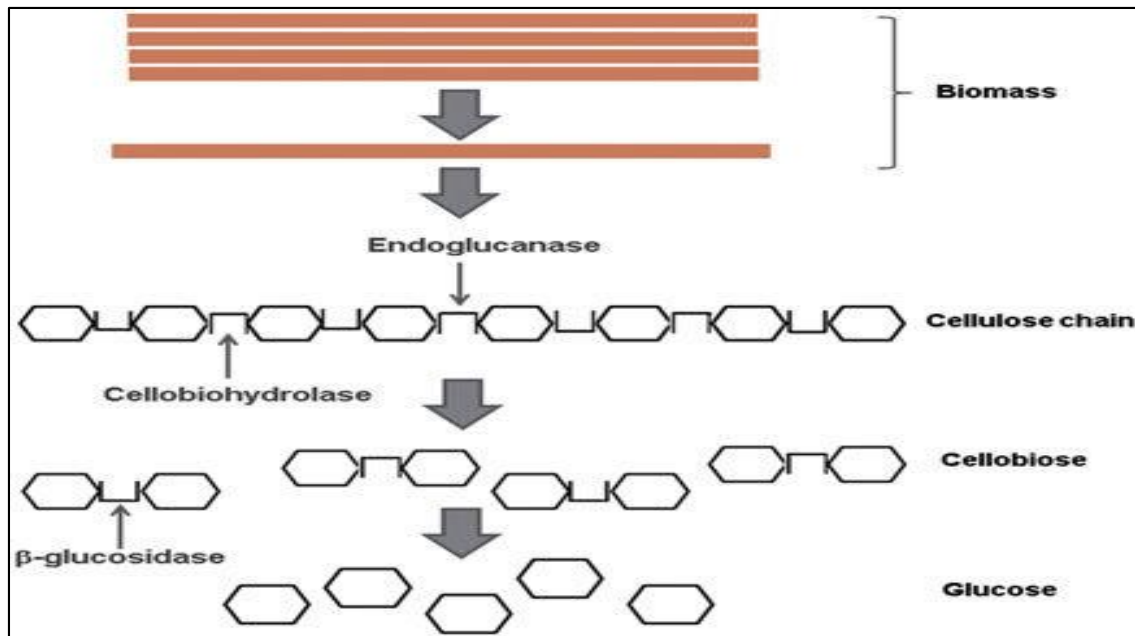


Figure 13 : Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases (Hitesh *et al*, 2016),

3.5. Xylanase

Les xylanases constituent un complexe multi-enzymatique, ce sont des glycosidases qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes afin de donner la xylose (fig.14) (Larreta-Garde, 1997 ; Gerois, 2008).

Les Xylanases sont des enzymes synthétisées par une grande diversité de microorganismes tels que les bactéries thermophiles comme les *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium sterconarium* et les champignons *Aspergillus niger*, et les actinomycètes telles que l'espèce *Thermoactinomyces thalophilus* et *Actinomadura keratinilytica* (Mouranche et Costes, 1985 ; Ronald *et al.*, 1999 ; Kohli *et al.*, 2003 ; Taibi *et al.*, 2011).

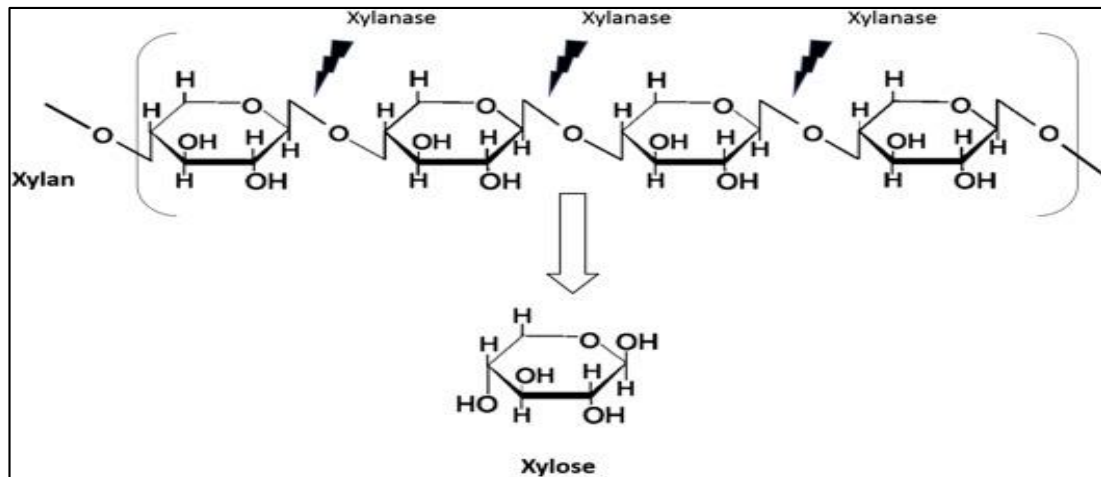


Figure 14 : Structure du xylane et mode d'action de la xylanase (Mateus et Denise, 2018)

3.6. Pectinase

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui contribuent à la dégradation de la pectine par divers mécanismes et peuvent être classées en tant qu'estérases, dépolymérase lyases et dépolymérase hydrolytiques (polygalacturonases) (fig.15) (Nicemol *et al.*, 2008).

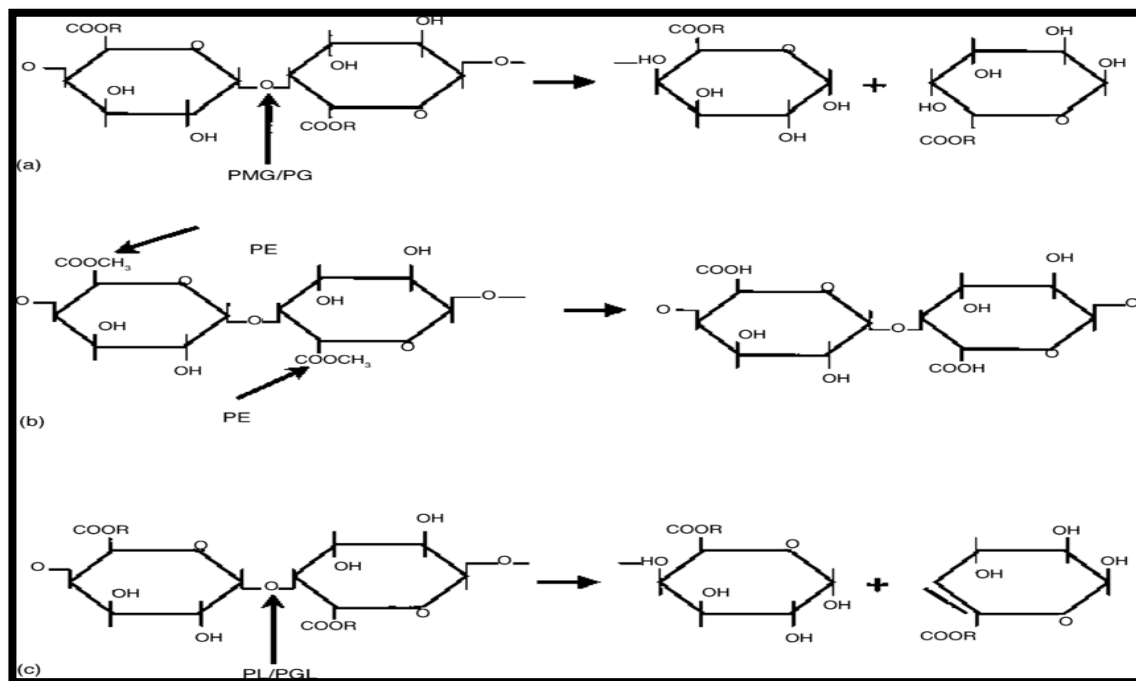


Figure 15 : mode d'action du pectinase (Jayani *et al.*, 2005)

4. Caractéristiques des enzymes synthétisées par les actinomycètes

Les principales caractéristiques physicochimiques des enzymes synthétisées par les actinomycètes sont regroupées dans le tableau ci-après.

Tableau 7: Paramètres physico-chimiques des enzymes produites par les actinomycètes (Divya et al., 2013).

Enzymes	Souches productrices	pH	T ° C	Substrats spécifiques
Cellulase	<i>Recombinant streptomyces sp.</i>	5-12	40-50°C	Cellulose
	<i>Thermobifidahalotolerans</i>	6-8	40-50°C	
	<i>Thermomonospora sp.</i>	7-10	50°C	
	<i>Streptomycesruber</i>	5,5-7	35-40°C	
Xylanase	<i>Actinomadurasp.</i>	4	70°C	Xylan
	<i>Streptomycesspp.</i>	8-11	45-60°C	
Amylase	<i>Streptomycessp.</i>	5-7	45-50°C	Amidon
	<i>Streptomyceserumpens</i>	9-10	45-50°C	
	<i>Nocardiopsis sp.</i>	8-6	70-80°C	
	<i>Thermobifidafusca</i>	5-7	60°C	
Pectinase	<i>Streptomyceslydicus</i>	4-7	45°C	Acide Polygalacturonique
Protease	<i>Thermooactinomyces sp.</i>	4	50°C	Casein
	<i>Nocardiopsis sp.</i>	10	40-50°C	Casein
	<i>Streptomycespactum</i>	7,5	40°C	Keratin
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6,5	65°C	Keratin azure
	<i>Streptomycessp.</i>	4-11	30-60°C	

5. Intérêts biotechnologiques des enzymes

Les enzymes d'origine microbienne répondent souvent à une forte demande industrielle, les différents enzymes cités ci-dessus présentent une large importance économique.

- ✓ **Les amylases :** Les produits enzymes amylolytiques sont la dextrine, des oligosaccharides et des sucres simples. Ils jouent un rôle majeur dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et le textile. Dans l'industrie papetière environ 25% des amylases sont demandées sur le marché mondial des enzymes (Janaki, 2017).
- ✓ **Les protéases :** Les protéases sont parmi les classes les plus importantes industriellement telles que dans la fabrication des détergents, des lessives, la préparation de cuir, la laiterie, la panification et les applications médicales et pharmaceutiques. Elles constituent plus de 65% des demandes totales des industries (Boulahrouf, 2017).

- ✓ **Les lipases** : Les lipases microbiennes présentent plus d'avantages dans les procédés de fabrication très simples des détergents, vu leurs grande stabilité vis-à-vis la température. Les lipases peuvent être utilisées dans le traitement des huiles et des graisses, les cosmétiques, les diagnostics et la fabrication des détergents. Leurs caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications, qui ont donner de nombreux produits commerciaux, dont elles présentent une importante classe d'enzymes industrielles d'intérêt dans la recherche fondamentale et appliquée (**Patrick et al.,2008; Geraldine et al.,2009**).
- ✓ **Les cellulases** : Les cellulases sont des enzymes s synthétisés par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons, les bactéries et les actinobactéries au cours de leur croissance sur la matière cellulosique (**Ramesh et al.2015**). Actuellement, les cellulases sont utilisées dans l'industrie alimentaire, la brasserie, l'alimentation animale, le textile et la blanchisserie, les pâtes papiers, ainsi que dans l'agriculture (**Bhat, 2000**).
- ✓ **Les xylanases** : Les xylanases sont couramment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration) (**Collins et al., 2005**).
- ✓ **Les pectinases** : Les pectinases sont produites par plusieurs espèces de *Streptomyces* telles que *S. lydicus*. Ces enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'extraction et la clarification des vins, des jus, des huiles, des aromatisants et de l'industrie textile pour la préparation des tissus de lin. La polygalacturonase est l'une des pectinases les plus importantes qui est largement utilisée dans les différentes industries (**Mukhtar,2017**).

Partie expérimentale

Matériel
et
Méthodes

IV. Matériel et méthodes

1. L'objectif global

L'objectif principal de ce travail est basé sur la sélection des isolats des bactéries d'actinomycètes d'un sol foresterie de la région de Mostaganem, et leur caractérisation pour une utilisation dans un milieu réactionnel de production des amylases.

2. Protocole expérimental général

Le protocole expérimental est constitué de plusieurs étapes (fig.16). Ces différentes étapes représentent :

- a) Les sites de l'échantillonnage des sols ;
- b) L'isolement et la purification des bactéries actinomycètes.
- c) Identification de la souche bactérienne par des tests physiologiques et biochimiques
- d) La fermentation submergée des isolats d'actinomycètes dans un milieu nutritif liquide spécifique à base d'amidon et extraction liquide –liquide des enzymes amylases.
- e) Étude cinétique des extraits enzymatiques par le réactif de biuret.

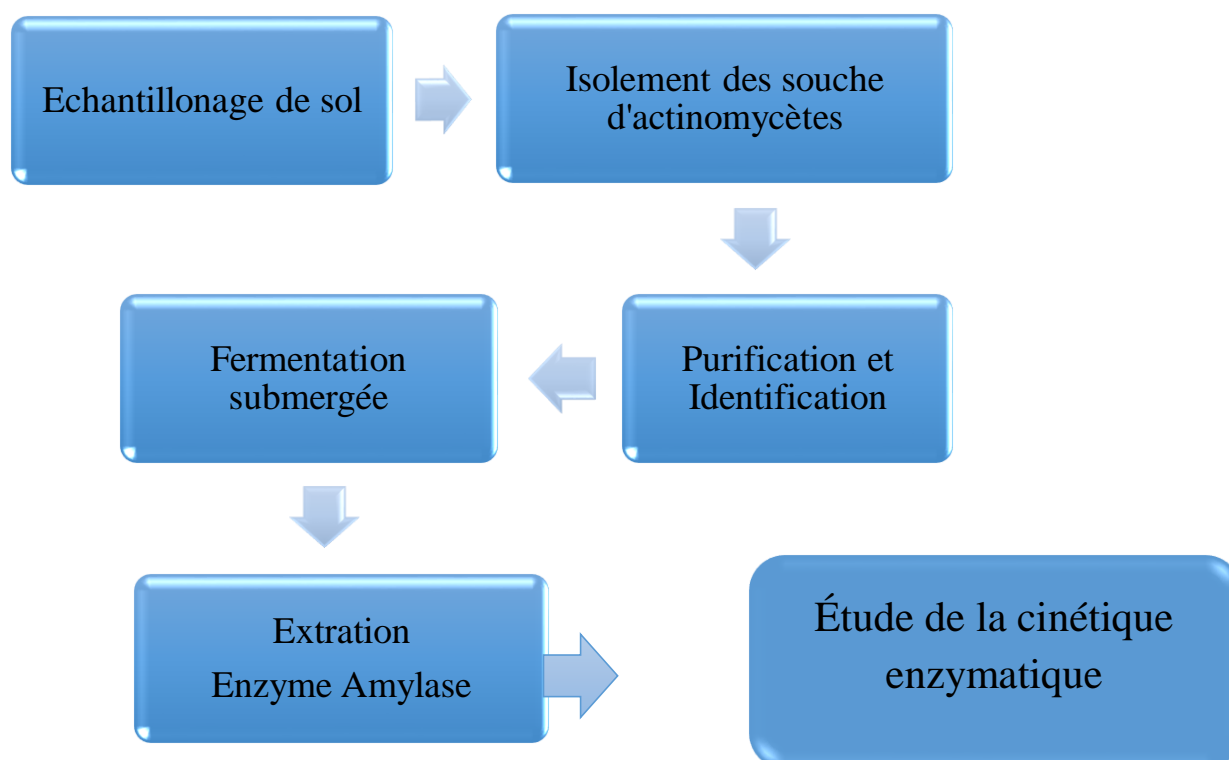


Figure 16: Protocole expérimental général.

3. Sites de prélèvement de l'échantillon

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols forestiers de la région Ouillis (Abdelmalek Ramdane) de la wilaya de Mostaganem. Les coordonnées géographiques de ce site sont à 36° 06' 12" Nord et 0° 16' 34" Est, il présente une superficie de 75 km², la température journalière est de 21°C, avec une humidité de 56 % (fig.17). Les prélèvements ont été effectués le 10 mai 2019.



Figure 17: Site des prélèvements des échantillons région de Abdelmalek Ramdane (Ouillis) Mostaganem.

A : Carte géographique du site (photo satellite)

B : La zone de prélèvement dans la forêt de Abdelmalek Ramdane (Ouillis)

A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, après nous avons prélevé les échantillons de sol de 20 à 200g entre 5 et 25cm de profondeur (fig.18). Les différents échantillons sont déposés sur des papiers d'aluminium stériles soigneusement enveloppés dans des sacs en papiers stériles puis transférés au laboratoire pour une analyse immédiate.



Figure 18: Les points des prélèvements des échantillons.

4. Isolement des actinomycètes

4.1. Les milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinomycètes sont des milieux sélectifs qui favorisent la croissance des microorganismes particuliers en excluant celle des autres, par addition d'un agent sélectif (Delarras, 2014).

L'isolement des actinomycètes est réalisé sur milieu amidon-caséine dont la composition est mentionné dans l'annexe I, le pH du milieu est ajusté à 7,2 et stérilisé à 120°C pendant 30 minutes (Jean et Guy, 2014).

4.2. Préparations des dilutions décimales

Pour chaque échantillon, 1g de sol est introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologie stérile, les tubes sont ensuite agités au vortex 4 à 5 minutes, à vitesse maximale. Cette suspension est considérée comme étant la solution mère. Une série de dilutions décimales est ensuite effectuée pour l'échantillon de sol de 10^{-1} jusqu'à 10^{-5} (fig.19).

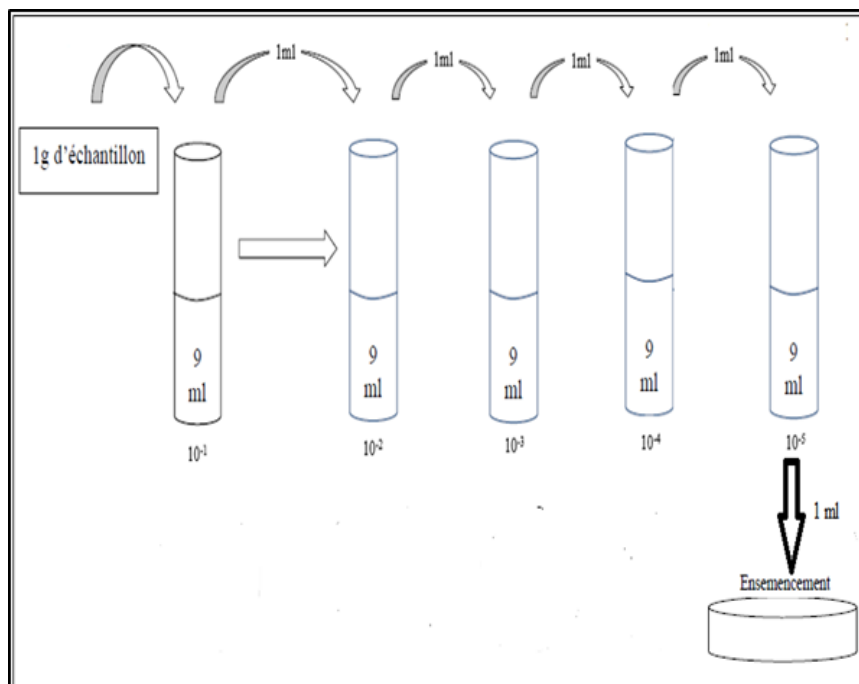


Figure 19 : Préparation des dilutions de sol (Delarras, 2014).

4.3. Ensemencement et incubation

À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau, 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-5}) a été étalée sur la surface d'un milieu gélosé (d'amidon caséine). Les boîtes de pétri portant les indications nécessaires (dilution, type du milieu de culture, origine de souches, la date) sont ensuite incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours (Lemriss *et al.*, 2003).

5. Repiquage et purification des isolats

La purification des isolats est une étape essentielle dans notre travail, elle permet d'obtenir des colonies bien isolées et pures. Pour obtenir ces colonies, nous avons ensemencé successivement des boîtes de Pétri coulées dans un milieu caséine amidon. L'ensemencement, a été réalisé par la méthode de strie d'épuisement pour chaque isolat. Ensuite, ces boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 7 jours.

5.1. Conservation des souches

La méthode de conservation des souches consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée (Botton *et al.*, 1990), puis incubé 7 jours pour les actinomycètes. La souche pure doit être conservée à 4°C pour une réalisation ultérieure des tests biochimiques, physiologiques et la technique de fermentation.

6. Caractérisation et identification des actinomycètes

Les souches microbiennes isolées sont identifiées par les méthodes classiques, par la détermination de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

6.1. Caractérisations morphologiques des actinomycètes

6.1.1. Caractérisations macroscopiques

L'étude macromorphologique permet de déterminer les différents caractères de mycélium de substrat (MS) et le mycélium aérien (MA).Après l'incubation, les colonies d'actinomycètes qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement ont été examinées à l'œil nu et à l'aide d'une loupe optique binoculaire (ZEISS 475022 G x10).

Ce test permet d'évaluer l'importance de la croissance (très importante, importante, moyenne, faible ou absente), ces caractères sont notés par des significations (+/-).La couleur de mycélium de substrat et du mycélium aérien : qui varie d'une souche à une autre ainsi que la production des pigments solubles, caractère qui se détermine par le virage de la couleur du milieu par rapport à sa couleur initiale. Dans le cas des Actinomycètes, plusieurs couleurs des pigments solubles ont été décrites selon **Shirling et Gottlieb, (1966) et Kitouni, (2007)**.

6.1.2. Caractérisations microscopiques

D'après **William et al, (2010)**, les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration deGram, qui a été mise au point en 1884 par le bactériologiste Danois Hans Christian Gram. Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolatobtenu sur le milieu caséine amidon, ces frottis sont colorés, après observation à l'aide d'unmicroscope optique à grossissements (x100), ce dernier permet de remarquer les formesmorphologiques des différentes bactéries et indiqué le Gram + et Gram- .

- ✓ Les bactéries « Gram positif» gardent leur coloration violette après décoloration par l'alcool.
- ✓ Les bactéries « Gram négatif» décolorées par alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses.

Les principales étapes de cette coloration sont les suivantes :

- ✓ Des frottis sont réalisés à partir des colonies des actinomycètes bien isolés à l'aide d'une anse de platine dans des conditions aseptiques.
- ✓ Les bactéries sont émulsionnées dans une gouttelette d'eau distillée.
- ✓ Les frottis sont fixés par une flamme à l'aide d'un bec bunzen.

- ✓ Recouvrir la lame de violet de gentianes 1 minute, puis laver à l'eau distillée.
- ✓ Ensuite, recouvrir du lugol 1 minute.
- ✓ Décolorer bien à l'alcool pendant une période, puis rincer à l'eau.
- ✓ Recouvrir la lame de fuchsine diluée, laisser 30 secondes, laver à l'eau.
- ✓ sécher entre deux feuilles de papier buvard.

Observation sous un objectif à immersion (X100) d'un microscope optique (**Prescott et al., 2010**). L'examen, nous permet de déterminer quelques caractères morphologiques des Actinomycètes, concernant le type de Gram+ et des indications sur leurs formes des filaments et présence ou absence de spores isolées (**William et al., 2010**).

6.2. Caractérisation physiologique

Une série de tests physiologiques utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre certains groupes d'actinobactéries, est retenue pour l'identification des souches isolées. Ces tests sont : l'hydrolyse de l'amidon, test de l'hydrolyse de la caséine, la dégradation de l'urée (**Holt et al., 1994 ; Toumatia, 2015**).

6.2.1. Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase

Ce test est réalisé sur la gélose nutritive contenant 1% d'amidon soluble, le milieu est réparti dans des boîtes de Pétri stériles, puisensemencés par stries, les boîtes sont incubés à 30 C° pendant 7 jours. Après l'incubation, le milieu est recouvert d'une solution de lugol, l'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies, à l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Gordon et Smith, 1953**).

6.2.2. Hydrolyse de la caséine : recherche de caséinase

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

6.2.3. La dégradation de l'urée

Le milieu urée-tryptophane (urée indole) est un milieu synthétique fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens. Ensemencer largement la suspension d'urée indole par la culture d'actinomycètes, et incubée à 7 jours à température 30°C. L'observation d'une alcalinisation traduit une hydrolyse de l'urée et donc la souche *Streptomyces* possède l'enzyme uréases. Cette alcalinisation à raison de l'indicateur de pH le rouge de phénol qui se trouve dans le milieu, vire lors d'une réaction positive, de sa couleur jaune orangé au rouge (**Jean et Guy, 2014**).

6.3. Caractérisation biochimique

Il existe plusieurs tests biochimiques pour effectuer une près identification, tels que l'utilisation de citrate, la production d'H₂S, la catalase, l'hydrolyse de la gélatine, les tests des réactions VP et RM (les acides mixtes par la réaction de rouge méthyle ; fermentation de butylène glycolique par la réaction de Voges-Prauskaouer), la réduction de nitrate, et l'hydrolyse de la lécithine.

6.3.1. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'un spatule stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à 30±1°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (Marchal *et al.*, 1991). L'utilisation du citrate s'accompagnera d'une alcalinisation mise en évidence par le bleu de bromothymol (virage de la couleur du vert en en bleu) (Jean et Guy, 2014).

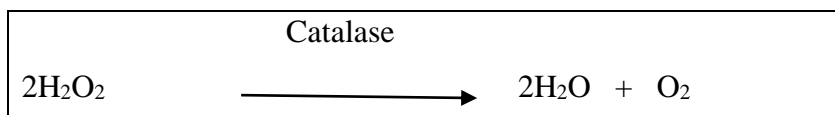
6.3.2. Utilisation des différents substrats carbonés /Production de H₂S

Ce test est réalisé en utilisant le milieu TSI (gélose au Glucose, Lactose, Saccharose et H₂S). Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés puis incubés pendant 7 à 14 jours à 30±1°C (Marchal *et al.*, 1991). Les résultats se manifestent comme suit :

- ✓ Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune.
- ✓ Glucose positif : culot jaune.
- ✓ H₂S positif : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente.

6.3.3. Recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air :



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. On dit que le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles, le test est négatif (Delarras, 2007).

6.3.4. Hydrolyse de la gélatine

Les bactéries d'actinomycètes ont été ensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% de gélatine, ensuite, incubées à 30°C. L'observation des zones claires autour des colonies correspondent à l'hydrolyse de la gélatine par enzyme gélatinase. (**Williams et Cross, 1971**).

6.3.5. Les réactions VP et RM

Une colonie de la souche à étudier est ensemencée sur un milieu liquide Clark et Lubs, puis incubé à 30°C pendant 7 jours. Après l'incubation, on divise le milieu dans deux tubes stériles et on ajoute quelques gouttes de VP I et VP II dans l'un des deux tubes et quelques gouttes de réactif rouge de méthyle sont additionnées dans l'autre tube, s'il y a le virage en rouge, le test est positif (**Jean et Guy, 2014**).

6.3.6. Production de nitrate réductase

Le test de nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté. La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide de deux réactifs NR1 et NR2. Après 7 à 10 jours d'incubation, on rajoute les deux réactifs, le test positif se manifeste par l'apparition de couleur rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés s'il ya :

- ✓ Apparition de la couleur rouge : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
- ✓ Absence de coloration : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

6.3.7. Hydrolyse de la lécithine et les lipoprotéines

La lécithine est recherchée sur une gélose riche en jaune d'œuf, coulée en boîtes de pétri, ensemencées avec les souches à tester par des stries, puis incubées pendant 1 à 5 jours à 28° C. Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes : La lécithine : l'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence d'une lécithinase. Si la lécithinase est absente, toute l'opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase. La lipoprotéinase est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (**Jean et Guy, 2014**).

7. Production d'amylase par fermentation submergée

L'activité enzymatique des isolats d'actinomycètes est mise en évidence par deux criblages. Le premier criblage, réalisé sur le milieu solide, consiste à sélectionner le meilleur isolat producteur de l'amylase. Ce dernier sera utilisé dans la fermentation submergée réalisé sur le milieu liquide. Cette fermentation va être suivie d'une extraction de la fraction soluble des extraits enzymatiques amyliques.

7.1. Sporulation des souches sélectionnées

Les souches d'actinomycètes sélectionnés sont cultivées sur le milieu bouillon nutritif à base d'amidon. La culture est incubée à 30°C pendant 5 jours. Après la sporulation, les spores sont mises en suspension par l'addition de 10 ml de l'eau distillée stérile et agitation manuel. La suspension sporulée va servir à l'inoculation des milieux de culture d'extraction. Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à $\lambda = 540$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Saci, 2012 ; Naglaa *et al.*, 2017).

La suspension de spores est diluée à l'aide d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention une densité optique DO = 1,5 qui correspond environ à une concentration de 10^7 UFC/ml.

7.2. Inoculation des milieux de fermentation

Le milieu de cultures précédemment préparés est inoculé par 3 ml de la suspension sporale (10^7 spore/ml) de l'isolat d'actinomycètes sélectionné dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu liquide à base d'amidon. Ensuite, ils sont incubées à 30°C pendant 5 jours sous agitation continue à une vitesse de 120 rpm (Khwaja, 2011 ; Ragunathan et Padmadas, 2013).

7.3. Extraction de la fraction soluble des enzymes d'amylases

L'extraction est basée sur la libération les enzymes des cellules ou des constituants cellulaires. Elle nécessite un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des méthodes physico-chimiques. Après le 5^{ème} jour, une filtration de la culture à été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Ce dernier a été traité par le bicarbonate de sodium (CaCO_3 0,05 M, V/V) et centrifugé à 4000 tours pendant 15 minutes pour éliminer le culot. Ensuite, le surnageant a été recueilli sous forme d'enzyme brute et utilisé pour l'estimation de l'enzyme amylolytique et l'étude cinétique (Khwaja, 2011).

8. Dosage colorimétrique de l'extrait enzymatique par la méthode de Biuret

En milieu alcalin et chaud le cuivre Cu^{+2} réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe du biuret, de coloration violacée caractéristique (Khwaja, 2011). Les acides aminés isolés et les dipeptides ne forment pas le composé coloré en présence de cuivre (CuSO_4), car deux liaisons peptidiques adjacentes sont nécessaires. Il apparaît une coloration violet-rose devenant de plus en plus bleue. Cette coloration est due à la formation, au niveau des groupes aminés libres, de complexes amino cuivriques. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines. Le tartrate de potassium et de sodium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium (KI) empêche l'auto-réduction du cuivre.

Mode opératoire :

- ✓ Préparer de la solution mère d'ovalbumine à 0,5g/100ml d'eau distillée ;
- ✓ Préparer des dilutions à partir de la solution mère : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ml compléter à 10 ml d'eau distillée. Ajouter 4 ml du réactif Biuret ;
- ✓ Agiter et incubé à 15 mn à température ambiante.
- ✓ Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible.
- ✓ On trace la courbe de la densité optique en fonction de la quantité d'ovalbumine.

9. Étude cinétique des extraits enzymatiques**9.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose**

Une gamme de dilution de glucose a été préparée pour mettre en évidence le sucre réducteur libéré à partir du substrat d'amidon après l'hydrolyse enzymatique. Cette réaction est basée sur l'intensité de la coloration du réactif Fehling en fonction de la quantité de sucres réducteurs libéré après hydrolyse.

Mode opératoire

La préparation des différentes dilutions (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ml) ont été effectuées à partir d'une solution mère du glucose de concentration 1g/L.

- Ajouter 1ml de tampon acétate de sodium à 0,5M ;
- Ajouter 5 ml du réactif Fehling.
- Chauffer les tubes pendant 5 minutes dans un Bain-marie à 40°C ;
- Ajouter 3 ml de H₂O dans les tubes laissé refroidir pendant 3 minutes environ.
- Mesurer l'absorbance DO à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ;
- Tracer la courbe de la densité optique en fonction de la de glucose oxydé en mol
[DO = f ([Cmol]).

9.2. La cinétique des extraits enzymatiques

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes des différents extraits enzymatiques (des isolats).

Mode opératoire :

1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté à 3ml de la solution du substrat, après agitation le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 3 ml du réactif Fehling et chauffé à 40°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 6 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à $\lambda = 540$ nm contre un essai à blanc. La concentration des sucres réducteurs correspondants est

déterminée à partir de courbe étalonnage établie avec des concentrations du glucose variant de 1 à 10 mg/100ml. Les préparations des solutions réactifs Feheling, solution du substrat et le tampon acétate sont détaillées en annexe I.

Remarque : La détection de sucre réducteurs a été estimée par la méthode de Fehling vu l'indisponibilité du réactifs dinitrosalicilyque .La détermination des paramètres cinétiques des extraits enzymatiques d'amylase dans un tampon acétate pH 4,7 est mise en évidence par la courbe de la gamme des dilutions du glucose en présence du réactif de Fehling.

La variation de la concentration en substrat (amidon) dans le milieu réactionnel et dans des conditions optimales (pH et température) permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'amylase. Nous avons utilisé la courbe d'étalonnage du glucose pour calculer la quantité du produit (glucose) libéré par l'hydrolyse enzymatique, pour évaluer par l'équation de Michaelis-Menten les constantes cinétiques K_m , V_{max} et V_i vitesse initiale de la réaction des extraits enzymatiques des différents isolats des actinomycètes.

$$V_i = V_{max} * [S] / (K_m + [S])$$

V_i : Vitesse initiale d'oxydation (mol.l⁻¹.min⁻¹)

V_{max} : Vitesse maximale d'oxydation (mol.l⁻¹.min⁻¹).

[S] : Concentration en substrat (Amidon) (mol.l⁻¹).

K_m : Constante de Michaelis (mol.l⁻¹), elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle $V_i = V_{max}/2$.

Résultats
et
discussion

V. Résultats et discussion

1. Isolement et purification des actinomycètes

L'isolement des actinomycètes sur le milieu amidon-caséine présente les meilleurs résultats par rapport aux autres milieux qui ont été utilisés (GN, Bennet). Plusieurs équipes comme **Lakshmi** (2010), **Sudhanshu** (2011), **Palaniyandi** (2013), ont confirmées que le meilleur milieu pour l'isolement est l'amidon caséine et la caractérisation des actinomycètes. Dans notre travail un nombre important des actinomycètes de différents genres est enregistré sur ce milieu et qui dépasse dix isolats (fig.21). Parmi ses isolats, trois souches sont identifiés et caractérisés par des observations à l'œil nu et au microscope optique et par des différents tests physiologiques et biochimiques.



Figure 21 : les isolats des actinomycètes obtenus sur milieu amidon caséine.

2. Étude morphologique des actinomycètes

Les différentes souches actinomycètes montrent une variation morphologique qui est présentée dans le tableau 8 et discuter ultérieurement.

Tableau 8 : Caractérisations macroscopiques des isolats actinomycètes.

	Taille			Formes	Mycélium végétatif	Mycélium aérien
	Pet	Moy	Gr		Hyphes	Hyphes
A1			+	Bombée	Rose foncée	Gris
A2		+		Aplatie	Jaune	Verdâtre
A6		+		Bombée	marron	Marron

A : actinomycètes ; Pet : petite ; Moy : moyenne ; Gr : grande.

2.1. Aspect macroscopique

Après la sélection et la purification, les colonies d'actinomycètes sont reconnues sur la base de leurs aspects morphologiques macro et microscopiques qui expriment un polymorphisme génétique des isolats (A1, A2 et A6). Des variations visibles à l'œil nu sont observées, les colonies obtenues ont des tailles différentes petite, moyenne et grande. Des formes bombées sont observées pour les souches A1 et A6 par contre la souche A2 présente une forme aplatie (tab.8, fig. 21), possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes : marron, gris, verdâtre. (tab.8 et fig.22).

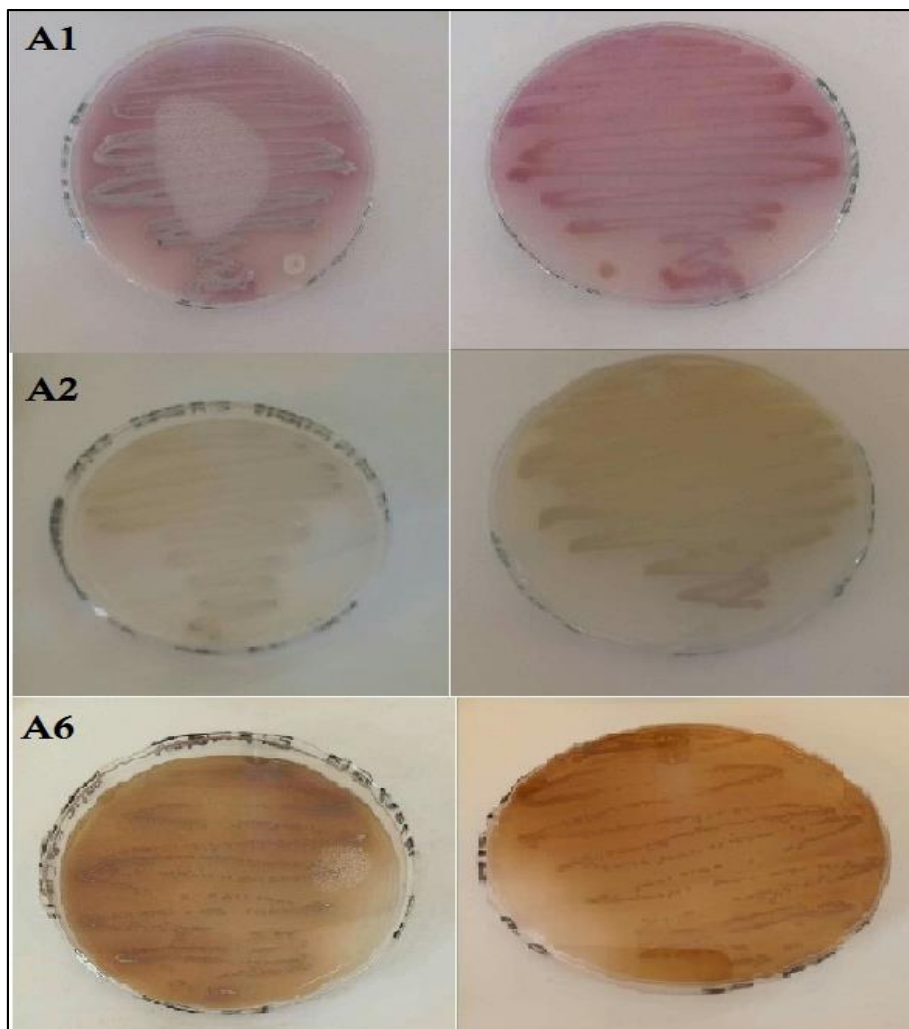


Figure 22 : Cultures pures d'actinomycète à différentes pigmentations diffusibles.

A1 : souche 1 d'actinomycète ; **A2** : souche 2 d'actinomycète ; **A6** : souche 6 d'actinomycète

D'après, **Palaniyandi (2013)**, les couleurs des mycéliums aériens des actinomycètes sont différents de celles des substrats et la plupart ont une couleur blanchâtre et d'autres ont des couleurs différentes comme gris, beige, noir, marron, vert, jaune, ce qui confirme les résultats constatés (fig.22).

2.2. Aspect microscopique

Les observations microscopiques montrent les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif (fig.23).

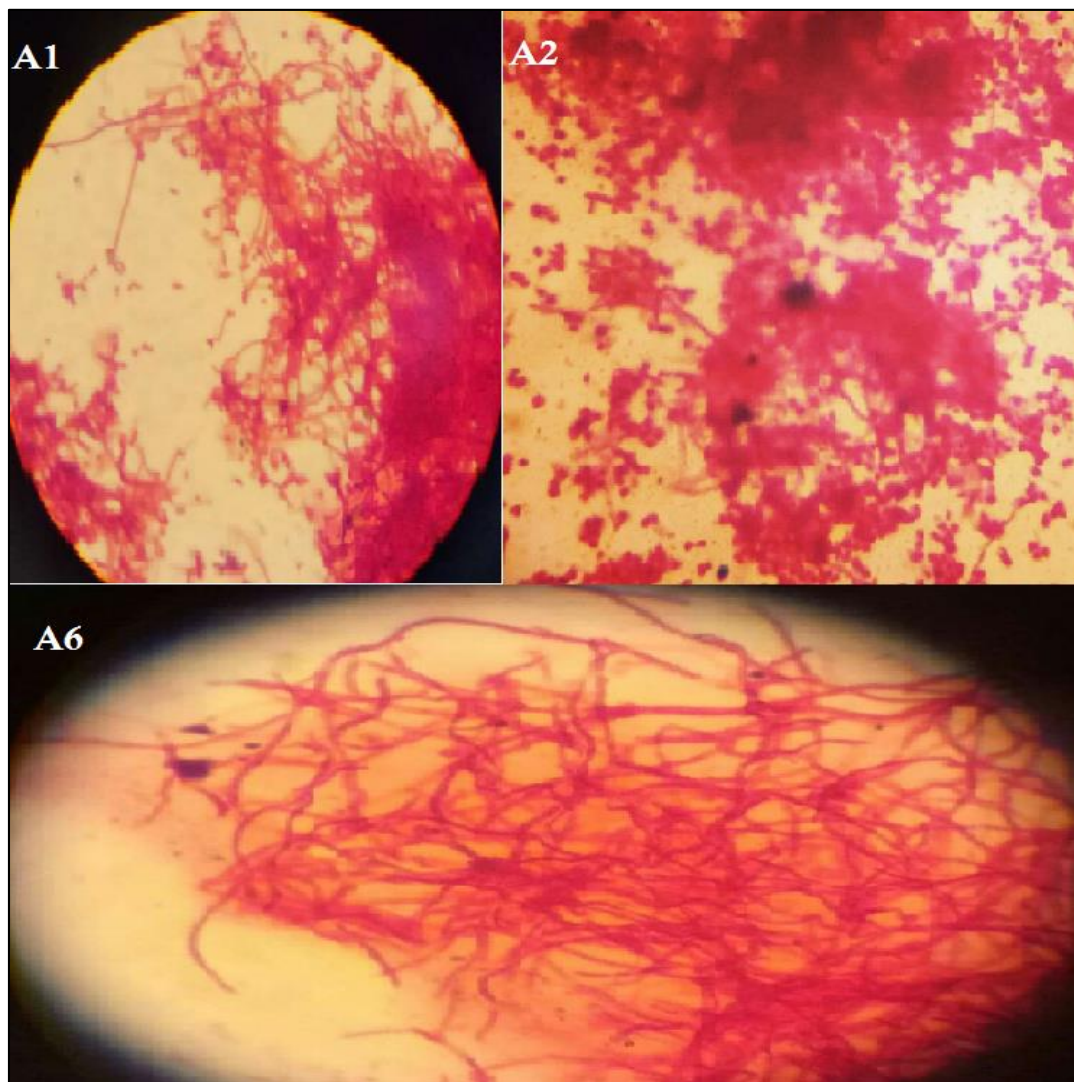


Figure 23 : Observations à la coloration de Gram des mycéliums d'actinomycète (G100x).

Le mycélium végétatif des souches présentent une structure cloisonnée avec un nombre limités de spores, qui sont des sacs contenant des endospores. Selon **Holt et al. (1994)**, **Cheriet et al. (2015)**, le mycélium aérien des actinomycètes *est* bien développé, ramifié, non fragmenté, portant des spores ou

des vésicules globuleuses et sphériques contenant des spores et que les actinomycètes sont à Gram positif. Ces observations confirment que les différentes souches sont du genre *Streptomyces*.

3. Tests physiologiques et biochimiques

Une série de tests physiologiques utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre les espèces des actinomycètes est retenue pour l'identification des souches isolées. Les résultats de ses différents tests sont cités et discutés ci-dessous.

Tableau 9: Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes

Caractéristiques		TM	A1	A2	A6
Souches					
Hydrolyses de la caséine		-	+	+	+
Hydrolyses de l'amidon		-	+	+	+
Hydrolyses de la gélatine		-	+	+	+
Réduction de nitrate		-	+	+	+
Lécithine et lipoprotéinase	Lécithine	-	+	+	+
	Lipoprotéinase	-	+	+	+
Production d'H ₂ S		-	-	-	-
Recherche de Catalase		-	+	+	+
Dégradation de l'urée indole		-	+	+	-
L'utilisation de citrate		-	+	-	+
La fermentation intermédiaire	RM	-	-	-	-
	Vp	-	+	+	+
TM : Témoin ; S : Souche ; (+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; VP : Vogues Prauskouer ; RM : Rouge méthyle.					

3.1. Hydrolyse de la caséine

Autour de chaque souches des actinomycètes, on voit la présence d'un halo d'éclaircissement autour de la culture signifie que les résultats sont positifs pour toutes souches isolées des actinomycètes (tab.9 et fig. 24). Cette dégradation de caséine est due à des synthèses extracellulaires des caséinases des différents isolats (A1, A2 et A6) dans le milieu caséine-amidon.

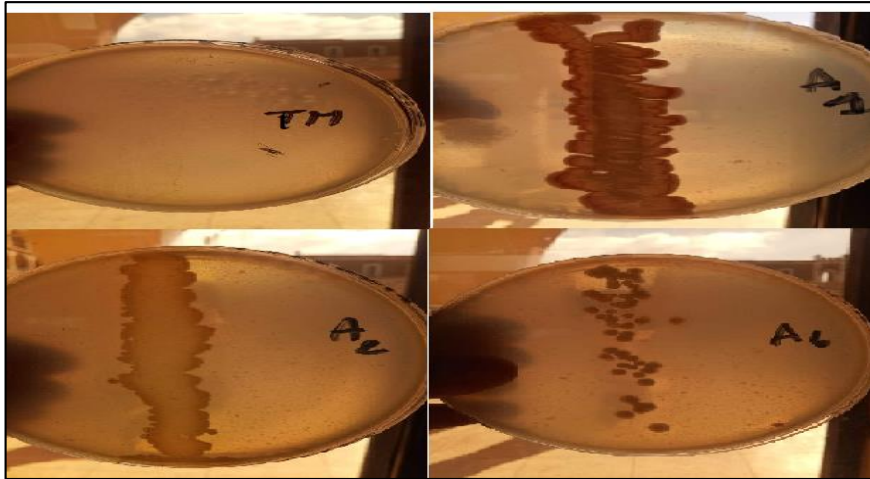


Figure 24 : Test d'Hydrolyse de la caséine est positif pour les isolats des actinomycètes

La présence de ces zones claires signifie que la caséine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée les enzymes des souches *Streptomyces*. Plusieurs travaux réalisés sur les actinomycètes prouvent que la plupart de ses souches peuvent hydrolyser les caséines du lait (Mihaela *et al.*, 2011 ; Palaniyandi *et al.*, 2013).

3.2. Hydrolyse de l'amidon

Le test d'hydrolyse d'amidon est positif pour les isolats d'actinomycètes. L'absence de coloration bleue autour des colonies bactériennes, signifie que l'amidon est hydrolysé dans cette zone. Cette hydrolyse est due à la présence des amylases dans le milieu qui sont sécrétés par les bactéries (tab.9 et fig.25).

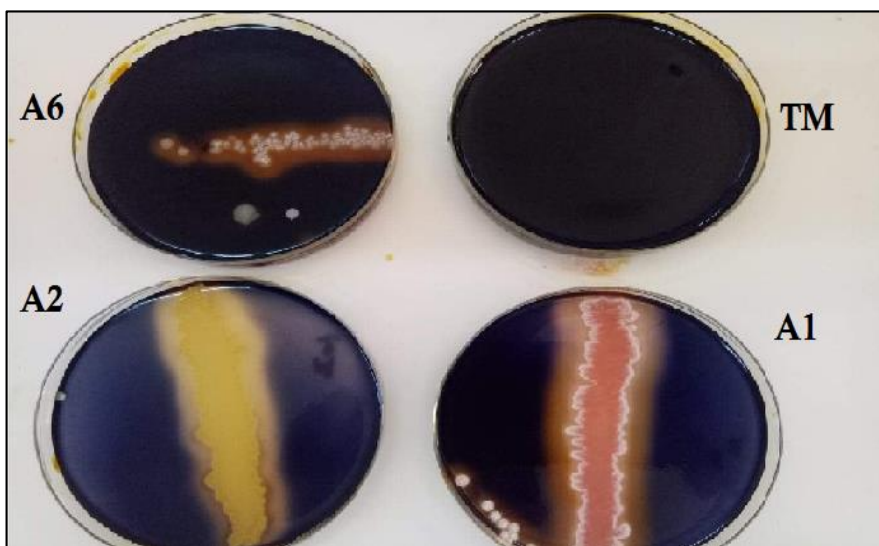


Figure 25 : Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats des actinomycètes. Plusieurs

travaux entrepris sur l'hydrolyse de l'amidon par les actinomycètes confirent les résultats obtenus (Stamford *et al.*, 2001).

3.3. Hydrolyse de la gélatine

Les résultats obtenues de ses tests sont positif, la gélatine du milieu a été dégradé par la gélatinase sécrétés par les trois souches des actinomycètes. Des zones claires autour des cultures reflètent une bonne dégradation de la gélatine. Les diamètres de ses zones varient selon l'espèce des actinomycètes (tab.9 et fig. 26).

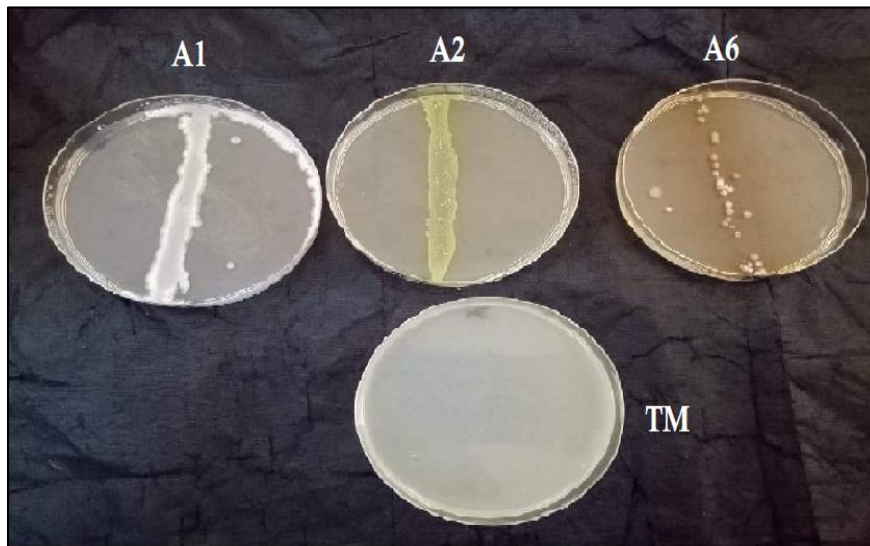


Figure 26 : Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des actinomycètes.

Ces résultats ressemblent aux résultats des travaux des chercheurs qui ont travaillé sur les actinomycètes des sols tels que les travaux de **Boulahrouf (2016)** sur le sol de Sebkhia et **Messaoudi (2013)** sur le sol foresterie de Bechar.

3.4. Recherche de lécithinases et lipases

La figure ci-dessous (fig. 27) et le tableau 9 présente les résultats des tests de lécithinases et lipases, les souches A1, A2 et A6 possèdent l'enzyme lécithinase.

La lécithinase permis de dégrader la lécithine. Les souches possèdent les lipoprotéinase, qui sont des enzymes lipases qui hydrolysent les triglycérides et les protéinases qui hydrolysent les lipoprotéines. Le résultat présent une zone de protéolyse transparente traduit l'hydrolyse de la lécithine et une zone d'opacification hydrolyse les lipoprotéines.

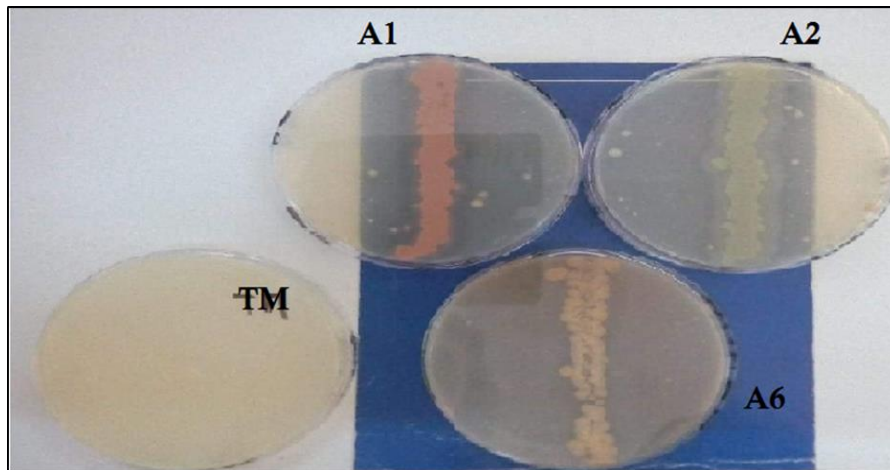


Figure 27 : Test positif d'hydrolyse de la Lécithine en présence des actinomycètes

Ces résultats sont similaires aux travaux de **Das *et al.* (2012)**, **Minotto *et al.* (2014)** in **Cheriet *et al.* (2015)**.

3.5. Réduction des nitrates

Toutes les souches des actinomycètes (A1, A2 et A6) (fig. 28) présentent un changement de couleur (rouge) après l'ajoute des réactifs NR1 et NR2. Cela indique que le test est positif et que les nitrates du milieu sont transformés en nitrites (tab. 9 et fig. 28).



Figure 28: Tests positif de réduction des nitrates pour les souches des actinomycètes.

Ces souches possèdent la capacité de synthétiser une enzyme très active qui est le nitrate réductase. Ces résultats ont été déjà obtenus dans les travaux de **Boulahrouf (2012)** sur le sol de Sebkha confirment les notre.

3.6. Productions d'H₂S

Après l'incubation des souches pendant 10 jours sur le milieu TSI, les isolats (A1, A2 et A6) des actinomycètes présentent un test négatif dont on n'a pas noté un noircissement du culot au fond des tubes de TSI. Cela explique que les souches bactériennes ne sont pas productrices de H₂S (Fig. 29).

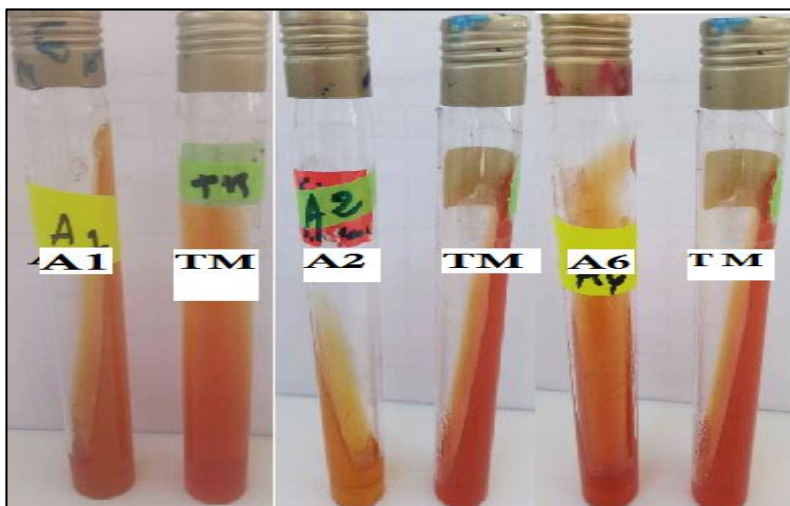


Figure 29 : test négatif pour la production d'H₂S des isolats des actinomycètes

Nous avons obtenues des résultats qui ne sont pas similaires à la plupart des chercheurs, alors les travaux de **Tresner et Danga (1958)**, **Küster et Williams (1964)**, qui ont travaillé sur la production d'H₂S par des espèces des actinomycètes confirment que les actinomycètes sont productrice d'H₂S.

3.7. Recherche de Catalase

L'examen de la recherche de catalase, montre un résultat positif. Tous les isolats des actinomycètes sont de test positif, l'apparition de bulles d'air signifie la présence de catalase (tab 9 et fig.30). Ce dernier présente une oxydoréductase qui catalyse la réaction du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau et dioxygène O₂. Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheurs **Boulahrouf (2016)** et **Maameri (2007)**.

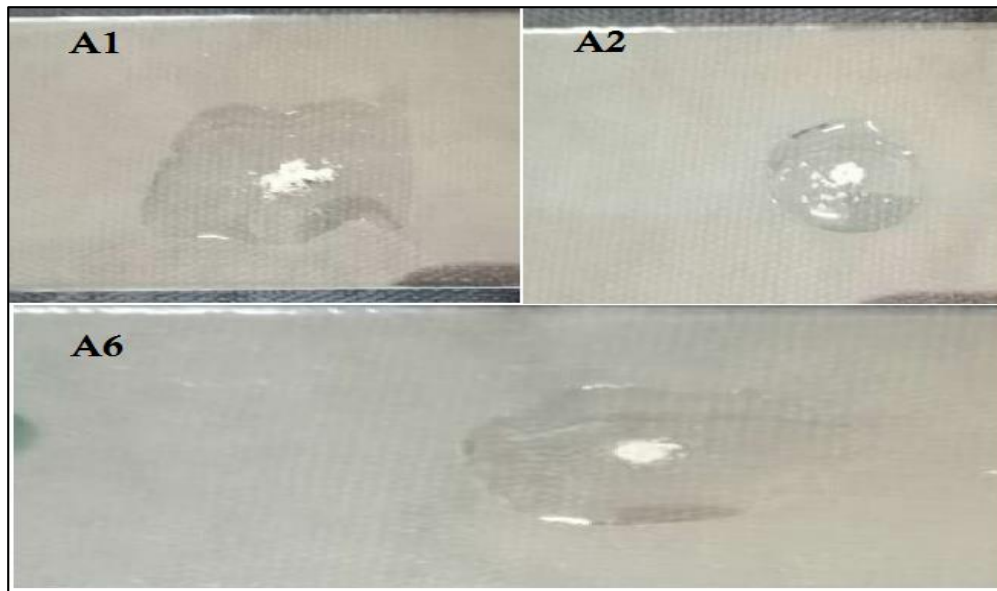


Figure 30 : Test de catalase positif pour les trois isolats des actinomycètes.

3.8. Dégradation de l'urée

Les tests de dégradation de l'urée obtenus sont positifs pour les souches des actinomycètes A1, A2 possèdent des uréases. Ces enzymes sont responsables de la dégradation de l'urée, avec production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Ce dernier provoque une alcalinisation du milieu, qui se traduit par le virage de la couleur du rouge orangé vers le rouge (fig.31).

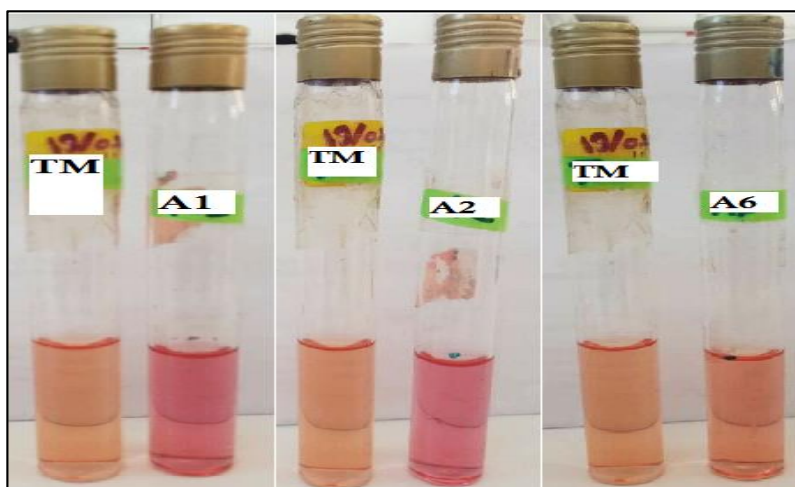


Figure 31 : les résultats du test de la dégradation d'urée obtenus par les isolats des actinomycètes.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec les actinomycètes et qui confirme la dégradation d'urée (Bastida, 2008). A l'exception de la souche A6 le test était négatif.

3.9. L'utilisation de citrate

Les résultats obtenus sont différents, la souche A2 le test est négatif, ce qui indique que cette souche n'utilise pas le citrate de Simmons comme une source de carbone. On n'a pas observée le virage de la couleur du milieu citrate vers le bleu (fig. 32). Les mêmes résultats obtenus avec les actinomycètes ont été publiés par **Harir et al. (2017)**.

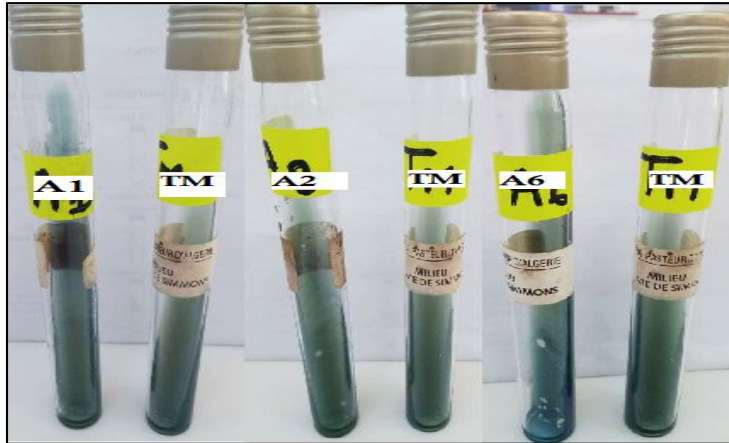


Figure 32 : Résultats de test de citrate obtenus par les trois isolats des actinomycètes.

Contrairement, à la souche A2, les souches A1 et A6 les résultats sont positif.

3.10. Les réactions de VP et RM

Les tests de VP sont positif, du changement de couleur des milieux enregistrées et la couleur varie vers le gris-rouge, contrairement pour les RM, les résultats sont négatif, la couleur des milieux à virer vers le jaune (fig. 33).

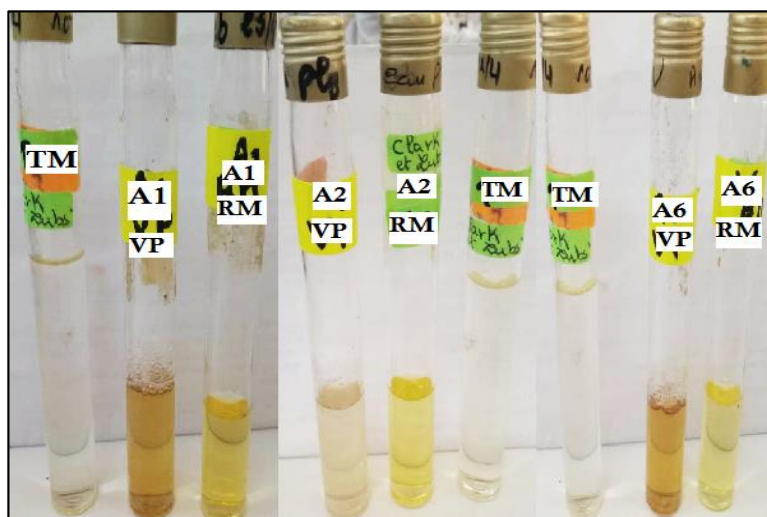


Figure 33 : Test de VP et RM des isolats des actinomycètes.

Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs avec des actinomycètes **Gouse (2017)**, **Sheik et al. (2017)**.

4. Production des extraits enzymatique des isolats des actinomycètes

4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret

Les quantifications des extraits enzymatiques des isolats des actinomycètes par la technique de Biuret sont réalisées par le dosage de la protéine ovalbumine. Cette quantification est réalisée grâce à la courbe d'étalonnage des dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5,2 et T= 40°C) (Fig. 34).

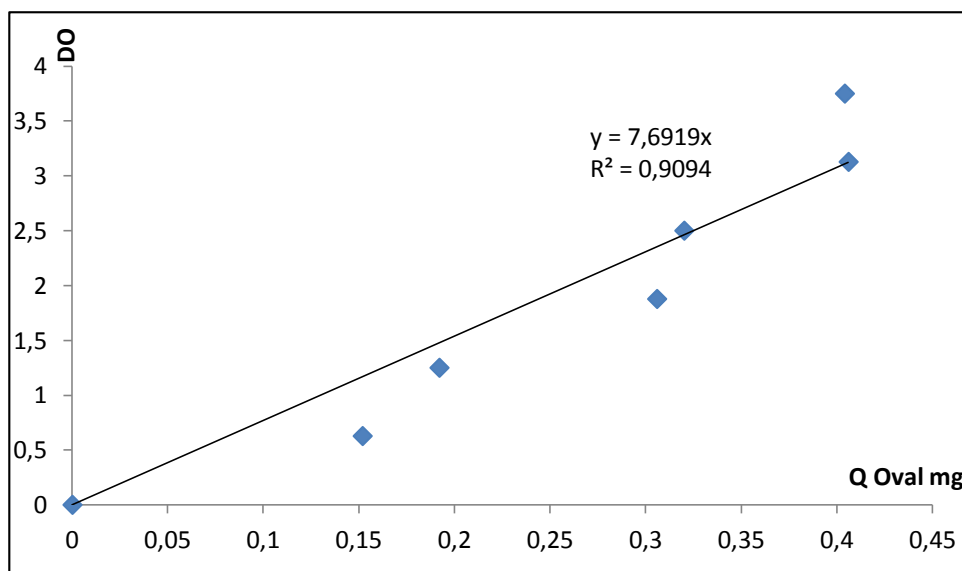


Figure 34 : Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

Les figures 35 représentent les concentrations des extraits enzymatiques des trois isolats des actinomycètes. Cette quantification a été établie par une extrapolation des valeurs des densités optiques des extraits enzymatiques sur la courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

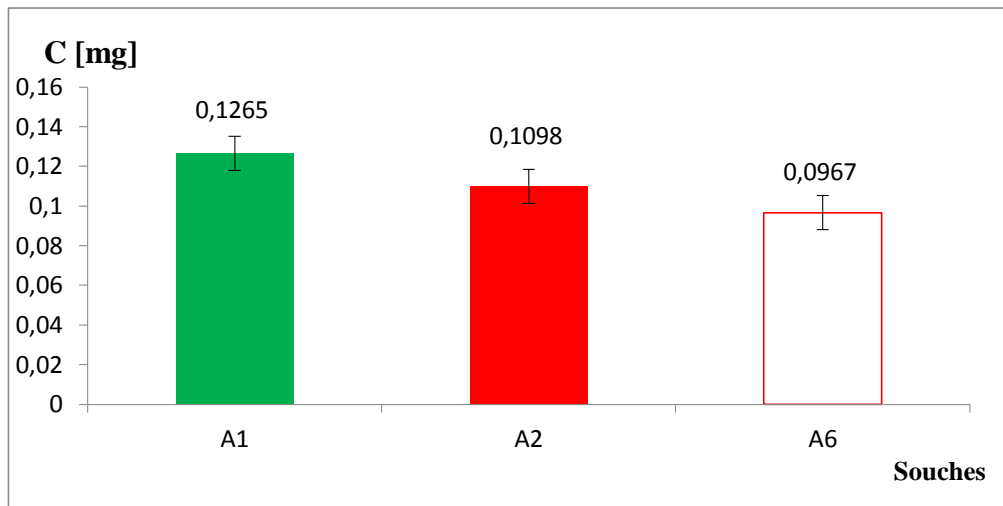


Figure 35 : Quantités des extraits protéiques brutes des différentes souches d'actinomycètes.

On constate clairement que la souche A1 représente la valeur la plus élevée en protéines brutes suivie d'A2 d'actinomycète (fig. 35). La souche A6 sa concentration est un peu faible à celle d'A1 et A2. Cette variation dans les teneurs en extraits enzymatique confirme les résultats des tests d'hydrolyses de caséines, amidon et les autres substrats (tab. 9).

4.2. Cinétique des extraits amylasiques des isolats des actinomycètes

Les extraits enzymatiques des amylases obtenus à partir des isolats des actinomycètes sont utilisés bruts, et dilués pour l'étude de leurs cinétiques d'hydrolyse d'amidon. Cette cinétique est estimée par la technique colorimétrique de la réduction du réactif liqueur de Fehling. Ceci nécessite le dosant d'un sucre réducteur pur préparé à différentes concentrations comme le glucose, avec le sucre réducteur libéré (glucose) par les extraits enzymatiques après hydrolyse du substrat l'amidon (fig. 36).

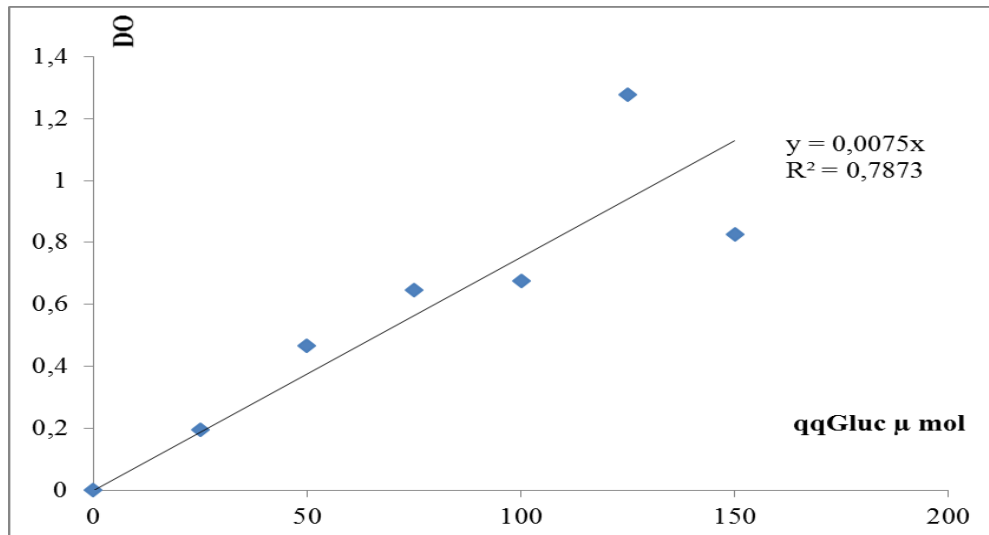


Figure 36 : Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose.

La gamme d'étalonnage du sucre réducteur glucose pur présente un coefficient de régression positif $R^2 = 0,7873$ très proche de la valeur 1. Cela signifie que les différentes dilutions de la solution de glucose sont en linéarité. Cette courbe va servir à estimer les quantités du produit libéré, après l'hydrolyse du substrat l'amidon.

4.3. Mesure des paramètres cinétiques

Les cinétiques enzymatiques des extraits d'amylases des trois souches en fonction du temps permettent de caractériser les constantes cinétiques (tab.10, fig.37, fig.38 et fig.39).

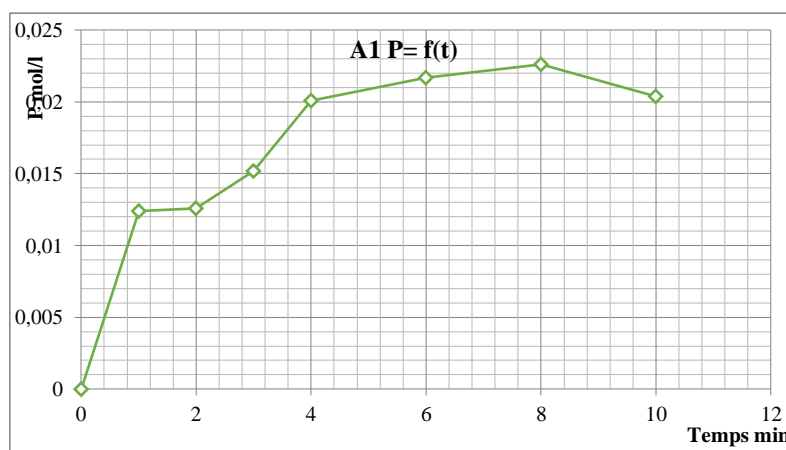


Figure 37 : L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A1 au cours du temps.

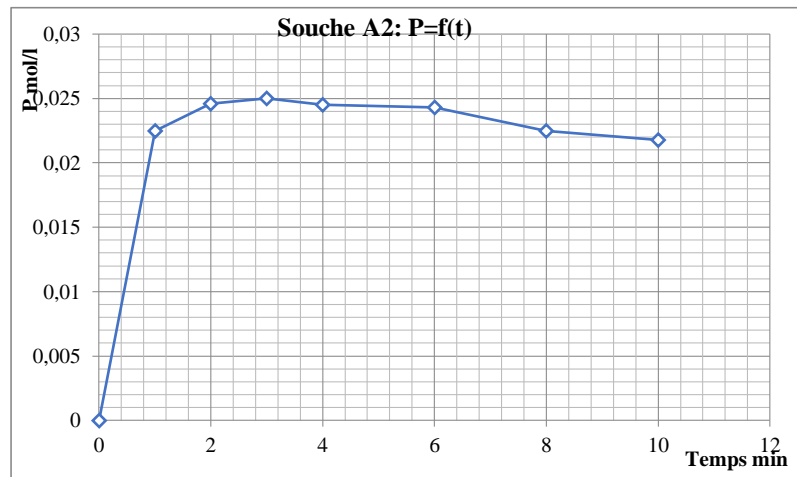


Figure 38 : L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A2 au cours du temps.

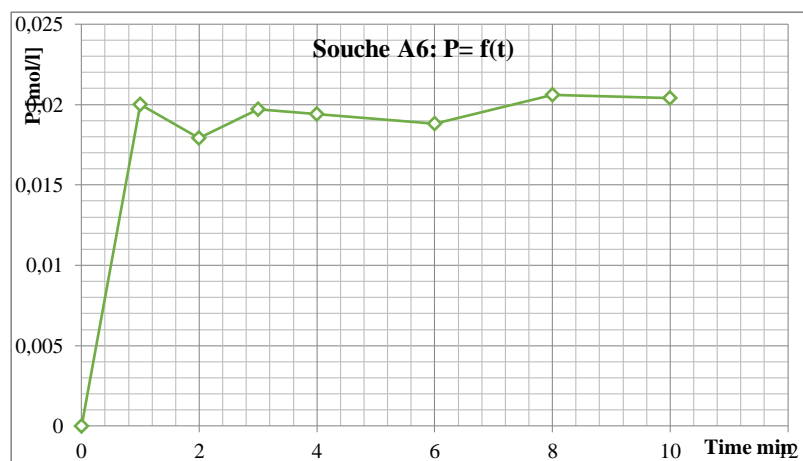


Figure 39 : L'évolution du produit (glucose) après hydrolyse d'extrait amylase de la souche A6 au cours du temps.

La variation de la concentration en produits libérés après hydrolyse de l'amidon dans les milieux réactionnels permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'amylase. On constate à travers les figures 37, 38 et 39 que les concentrations du glucose en fonction du temps augmentent progressivement jusqu'à un seuil maximal ou le temps est calculé, afin de déterminer la vitesse de la réaction. Une légère différence est marquée entre les extraits enzymatiques vis-à-vis le temps maximum de la transformation du substrat et l'obtention de quantité maximale de produit qui est le sucre réducteur libéré (glucose).

Les deux extraits de la souche A1 et A6 présentent presque le même temps de transformation de l'amidon (8 minutes) et qui est très rapide de 3 minutes à celui de l'extrait A2 (fig. 37, 38 et 39). Ainsi que, les quantités des produits libérés sont légèrement différentes elles varient de 0,0226 ; 0,0246 et 0,0206 Mol/l respectivement pour les souches A1, A2 et A6.

Ces courbes obtenus ont permis de calculer les vitesses des extraits et de tracer les courbes cinétiques suivantes (fig.40, fig.41 et fig.42)

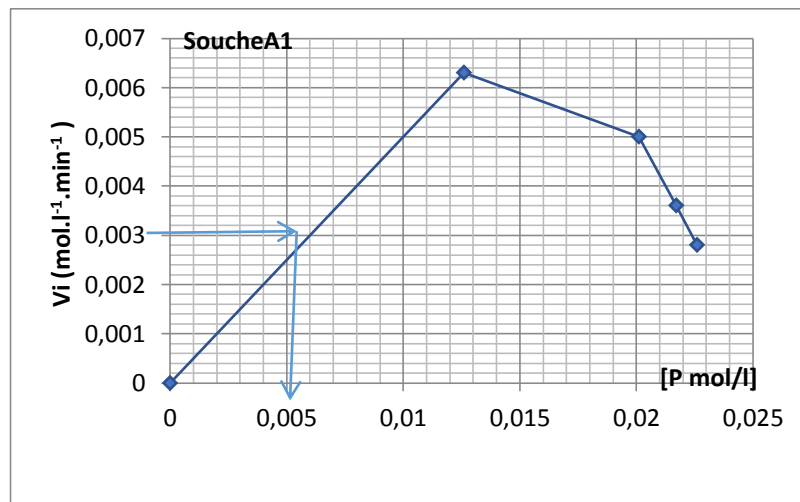


Figure 40: Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A1.

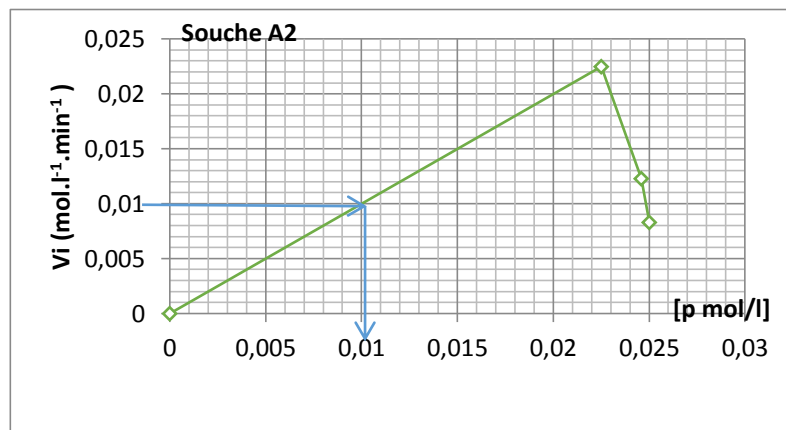


Figure 41 : Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A2.

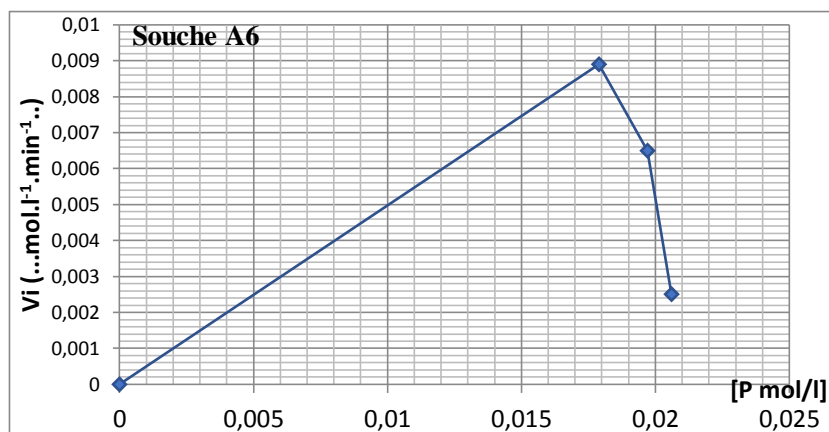


Figure 42 : Courbe cinétique de l'extrait enzymatique de la souche A6.

Les différentes courbes cinétiques (fig. 40, 41 et 42) ont été utilisées pour calculer les constantes K_m et V_{max} . Elles permettent aussi une comparaison approximative entre les vitesses de réactions et le type d'enzymes. On utilisant, les valeurs extrapolées à partir des graphes et l'équation de Michaelis-Menten, les vitesses initiales pour évaluer des extraits enzymatiques des différentes souches sont calculées et regroupés dans le tableau ci-dessous (tab. 10)

Tableau 10 : Les paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats des actinomycètes

Souches	V_{max} [Mol.l ⁻¹ .mn ⁻¹]	$V_{max}/2$ [Mol.l ⁻¹ .mn ⁻¹]	K_m [Mol.l ⁻¹]	V_i [Mol.l ⁻¹ .mn ⁻¹]
A1	$6,3 \times 10^{-3}$	$3,15 \times 10^{-3}$	6×10^{-3}	$5,62 \times 10^{-3}$
A2	$22,5 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$21,9 \times 10^{-3}$
A6	$8,9 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-3}$

Les valeurs du K_m les plus faibles sont notés pour les souches des actinomycètes A1 et A2 avec des vitesses supérieures par rapport à la souche A6 (tab.10). Le K_m traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat (amidon), plus le K_m est faible plus cette affinité augmente. Les souches des actinomycètes A1 et A2 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon comparant avec la souche A6. Plusieurs travaux ont été réalisés sur les activités des amylases des actinomycètes isolées du sol confirment ses résultats (Khwaja, 2011 ; Ragunathan et Padhumadas, 2013).

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

Les résultats de l'isolement et de l'identification des actinomycètes du sol de la région d'Abd El-Malek Ramdan (wilaya de Mostaganem) sur un milieu sélectif (caséine amidon) révèlent un nombre important des actinomycètes qui dépasse dix isolats. Trois isolats (A1, A2, A6) sont retenus et caractérisés sur la base des observations macroscopiques et microscopique, suivie de quelques tests physiologiques et biochimiques. Les trois isolats d'actinomycètes présentent les caractéristiques des *Streptomyces* sp. Cependant, après la sélection, la purification, ainsi que, les observations macro et microscopiques, les colonies obtenues ont des tailles différentes varie de 1 à 3 mm. Leurs forme sont variables bombé, aplatie, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes jaune, marron, rose foncée. Ils présentent des structures ramifiée avec un nombre limités de sporanges, qui sont des sacs contenant des endospores et une coloration de Gram positif.

Les tests physiologiques d'hydrolyses de caséine, de l'amidon et de l'urée pour les souches A1 et A2 sont positifs, par contre pour la souche A6 ce test urée est négatif. Ainsi que, les tests biochimiques (hydrolyse de la gélatine, catalase, réduction des nitrates, lécithinase, citrate) sont positif pour toutes les souches à l'exception du test citrate pour la souche A2. Des résultats négatifs ont été aussi enregistrés avec les tests de la production d'H₂S et VP et RM pour toutes les souches.

Le test d'hydrolyse de l'amidon a permis de sélectionné les isolats de *Streptomyces* sp au tant que des souches productrices des amylases pour l'opération de l'extraction de cette protéine.

La quantification des extraits enzymatiques des isolats de *Streptomyces* sp. Par la technique de Biuret, dans les mêmes conditions opératoires (pH = 5,2 et T = 40°C), présente une concentration en protéique de 0,1265 ; 0,1098 et 0,0967 mg/ml respectivement pour les trois isolats (A1, A2, A6).

Les résultats de la cinétique enzymatique des extraits amyliques montrent une variation dans les activités amyliques. Les quantités des produits libérés sont légèrement différentes elles varient de 0,0226 ; 0,0246 et 0,0206 Mol de glucose /l. En effet, Les souches des actinomycètes de A1 et A2 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon, les valeurs du Km sont très faibles de 6×10^{-3} et $1,2 \times 10^{-3}$ respectivement.

Les vitesses initiales des réactions varient selon les extraits enzymatiques (A1(Vi) = $5,62 \times 10^{-3}$ mol .l⁻¹ min⁻¹, A2(Vi) = $21,9 \times 10^{-3}$ mol .l⁻¹ min⁻¹, A6(Vi) = $7,5 \times 10^{-3}$ mol .l⁻¹ min⁻¹).

En fin, les résultats obtenus méritent une étude plus approfondie pour les amylases qui réveillent une grande importance biotechnologique dans de nombreuses industries tels : que l'agroalimentaire, pharmaceutique, grâce à leur utilisation potentielle et leurs diverses exploitations comme biocatalyseurs, dont il est préférable de :

- ❖ Purifier l'enzyme amylase et de la caractériser par les techniques telles que l'électrophorèses et HPLC, etc.
- ❖ Approfondir cette étude par l'identification chimio-taxonomique et la biologie moléculaires et génie génétique les espèces des différentes souches de *Streptomyces* sp isolées.

Références
bibliographiques

Liste des références bibliographiques

1. **Alexander M., (1977).** Introduction to Soil microbiology. 2^{ème} édition. John Wiley and sons. New York. 467p
2. **Anderson A.S. and Wellington E.M.H., (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related Antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against candida Appl& environ microb. 74: 3877-3886.
3. **Anonyme., (2010)** .Encyclopédie libre Wikipédia 2010: <http://fr.wikipedia.org>.
4. **Antoni A., (2012).** Guide pratique pour la description des sols de France. CEN Bourgogne. 7p
5. **Aouar L., (2006).** Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de, Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Mémoire de Magister. En Biochimie et Microbiologie appliquées. Université Mentouri Constantine. P : 4-8
6. **Baize D., Jabiol B., (1995).** Guide pour la description des sols. Ed INRA. 375p.
7. **Basile A., D'urso G., (1997).** Experimental corrections of simplified methods for predicting water retention curves in clay-loamy soils from particle size determination. Soil Technology ,10 (3): 261-272.
8. **Bastida F., Kandeler E., Moreno J.L., Ros M., Garcia C., Hernandez T., (2008).** Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40 : 318-329.
9. **Basilio A., González I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Gabello A., González A., Ben Ameer M., Sioud R., Fourati S., Ben Fguira L., Bejar S., Mellouli L., (2001).** *Streptomyces mexicanus*, a xylanolytic microorganism isolated from soil. Int sys bu devo *Streptomyces* sp. Strain amt-3 isolated from brazilincerrado soil. Enzyme microb technol. 31: 549-555.
10. **Bhat M.K., (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. Journal of biotechnology Advances. 18 : 355-383.
11. **Brady N.C., Weil R.R., (2002).** The nature and properties of soils. 13th edition. Pearson Education, Inc., New Jersey, USA. 960p.
12. **Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent. & Veau P., (1990).** Moisissures utiles et nuisibles (importance industrielle). Masson, France. pp48-98.
13. **Boucheffa K., (2011).** Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des

- antifongiques produits. Mémoire de Magister. En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira Bejaia. P : 3-15
14. **Boudemagh A.,(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. 132 p.
 15. **Boulahrouf A., Rachedi K., Duran R., Lauga B., Karama S., B Lynda., Boulezaz S., Boukrouma M., Boutaleb H., and Boughachiche F.,(2016)**. Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment. african journal of biotechnology.15(26) :1401-1412.
 16. **Bruand A., Duval O., Gaillard H., Darthout R., Jamagne M., (1996)**. Variabilité de rétention en eau des sols : Importance de la densité apparente. Etude et gestion des sols, 3(1) : 27-40
 17. **Calvet R., (2003)**. Le sol Propriétés et fonctions. Tome 1 : constitution et structure, Phénomènes aux interfaces, Éditions France Agricole. pp9-12
 18. **Chakraborty S., Raut G., Khopade A., Mahadik K., Kokare C., (2012)**. Study on calcium ion independent α -amylase from halo-alkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. Indian J Biotechnol .11: 427-437.
 19. **Cheraiti N et GacemiKirane D., (2012)**. Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.6(1) : 18-34.
 20. **Cheriet M., Amari S., Benmammar Y.,(2015)**. Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes.
 21. **Choulet F., (2006)**. Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy.1 : 210
 22. **Collins T., Gerday C., Feller G., (2005)**. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 29 : 3-23.
 23. **Conn V.M., (2005)**. Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.
 24. **Dairi T., (2005)**. Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *J. Antibio*, 58 (4), 227-243.
 25. **De Gannes Vidya., Gaius Eudoxie., Isaac Bekele and William J.Hickey.,(2015)**. Relations of microbiome characteristics to edaphi cproperties of tropical soils from Trinidad.1p

26. **Das A., Hamedani K., Soudbakhsh M., Prashanthi K., Bhattacharya S., and Suryan S., (2012).** Enzymatic screening, antibacterial potential and molecular characterization of *Streptomyces* isolated from Wayanad District in Kerala, India. *IJPBS*. 2(1) :201-210.
27. **Delarras C., (2014).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle Sanitaire. Tec & doc Lavoisier.492p.
28. **Divya P., Neelu N., Mansi P., Manish B., Abul M., Madhukar K., and Balasaheb K., (2013).** Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential revenue resource.*Journal of BioMed Research International*, 264020 : 8.
29. **Dommergues Y.,Mangenot F., (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie Editeurs, paris.Pp 23,27, 29
30. **Duchaufour F., (1968).** L'évolution des sols : essai sur la dynamique des profils .Masson et Cie éditeurs, 93p.
31. **Duchaufour P., (1984).** Abrège de pédologie. Edit : Masson,paris, France. 220p.
32. **Ensign J. C., Normand p., Burden J. P.,Yallop C. A., (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144 : 657-660.
33. **Feller C., (1994).** La matière organique dans les sols tropicaux à argile : recherche de compartiments organiques fonctionnels. Une approche granulométrique. Thèse de Doctorat. Univ. Strasbourg (ULP).190p.
34. **Floyd M. H., pieper R. L., Mert F. P., (1987).** Sporulation of *Streptomyces roseoporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* 2 : 235-241.
35. **Genilloud O., (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appi Microbiol*, 95 : 814–823.
36. **Geraldine S., Mala J., Satoru T., (2009).** Perspectives on Lipase Enzyme.Technology .Pp 147
37. **Gerard M., Williams S.T., Mordarksi., (1988).** Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press Limited, Pp 232.
38. **Gerard T.,(2001).** Microbiologie. 2eme édition. Canada. P : 152-154
39. **Gerois J., Gianotta F., De Buyl E., Garnier B., Frère J.M.,(2008).** Purification and properties of three endo b-1-4 xylanases produces by *Streptomyces* sp. Strain S38. *Enzyme Microb. Technol.* 26 : 178-186.
40. **Getha K., S .Vikineswary S., (2005).** Evaluation of *Streptomyces* sp. strain 10g for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. P : 24-32.

41. **Ghorbel S., Maher K., Hala S., Moncef N., and Noomen H.,(2014).***Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and Characterization of Extracellular Proteases and Their Compatibility with Laundry Detergents. journal of BioMed, 8 Pp.
42. **Girard M.C., Walter C., Remy J.C, Businelli D.B et Morel J.L., (2005).**Sols et environnements. Collection : Sciences sup.80p
43. **Gobat J.M., Aragno M. et Matthey W., (2003).** Le sol vivant. Bases de pédologie. Biologie des sols. Edit. Presses polytechniques et universitaires romandes. 571P.
44. **Gordon R.E., R.E Smith.,(1953).**Rapidly growing,acid fast bacteria I.Species descriptions of *Mycobacterium phlei*.J.Bacteriol. 66:41-48.
45. **Gottlieb D., (1973).** General considerations and implications of the actinomycetes. In: Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Sakes G., Skinner FA. Ed. Academic Press, New York. pp.1–10.
46. **Gouse B., Sheik M., Sheriff M., Gokul S., Ranjith MS., (2017).** Isolation and characterization of actinomycetes from soil of ad-dawadmi, saudiarabia and screening their antibacterial activities.International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.pp9.
47. **Gras R., (1988).**Physique du sol pour l'Aménagement. Masson, paris.12p
48. **Harir M.,Bellahcene M.,Fortas Z.,José M.G., Antonio V.,Susana R.C.,(2017).** Isolation and characterization of actinobacteria from algerian sahara soils with antimicrobial activities. International Journal Molecular and cellular Medecin Spring.6(2) :212.
49. **Hasegawa S., A. Meguro M., Shimizu T., Nishimura., Kunoh H., (2006).** Endophyticactinomycetes and their interactions with host plants. Actinomycetol, 20 (2) : 72-81.
50. **Henin S., (1976).**Cours de physique du sol. Ed ORSTOM : 159P
51. **Henri J., Jurion F., (1969).**Can primitive farming be modernized ?publication INEAC, Hors-série, Bruxelles, 457p.
52. **Hillel D., (1984).** L'eau et le sol principes et processus physique. Cobaye,
53. **Hitesh J., Nimita U., Darshan D., Manthan K., Shilpa S., and Jagdish P., (2016).** Isolation, Optimization and Production of Cellulase by *Aspergillus niger* from Agricultural Waste. Journal of pure and applied microbiology. 10(2) : 1159-1166.
54. **Holt J.G .,Sneath P., JT Staley., S.Williams.,(1994).**Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.pp 2340–2343.
55. **Hoorman J. J., R. Islam.,(2010).** Understing soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, pp.1-5.

56. **Huang H., Z Fang., k Zhang., S Bao., (2004).***Micromonospora rifamycinica* sp.a novel actinomycete from mangrove sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.58 :17- 20.
57. **Janaki T., (2017).** Enzymes From Actinomycetes. International Journal of ChemTechResarc.10(2) : 176-182
58. **Jayani, R.S., Saxena S. and Gupta R., (2005).** Microbial pectinolytic enzymes : A review.process biochemistry.40(9) :2931-2944
59. **Jean C., CJ.C., Gérard C., Bernard F., (2004).** Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestives, John Libbey. Euro. text, Paris. Pp 71.
60. **Jean N., Guy Leyral., (2014).** Microbiologie Technique : Dictionnaire des techniques. Edition 2014. Pp.239, 270 , 283, 404.
61. **Kar S., and Ray RC., (2008).** Statistical optimization of α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. Pol. J. Microbiol. 57: 49-57.
62. **Kelly KL., Judd DB., (1976).** Color Universal language and dictionary of names. National Bureau of Standards Special Publication 440.U.S. Department of Commerce, Washington D.C.
63. **Khwaja S., Ram Santosh K., Manish D., and Visavadia ., (2011).** Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of α -amylase. African Journal of Biotechnology.10(77) :17831-17836
64. **Kim SB., Goodfellow M., (2000).** Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier et al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov. comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 2(5) :07–12.
65. **Kitouni M., (2007).** Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extremes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 170p.
66. **Kohli U., Nigam P., Singh D., Chaudharu K., (2003).** Thermostable alkalophilic and cellulose free xylanase production by Thermo actinomyces thalophilus sub group C. Enzyme Microbiol. Technol. 28 : 606-610.
67. **Küster E., et Williams S.T., (1964).** Production of Hydrogen Sulfide by *Streptomyces* and Methods for its detection. Journal. American Society for Microbiology. 12(1) :46-52.
68. **Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. Ann. Agr. Env. Med. 4 : 113-121.
69. **Lakshmipathy D., Krishnan K., (2010).** Isolation and Characterization of Antagonistic Actinomycetes from Marine Soil. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 2(1) :001-006.

70. **Lansing M., P John., A Donald., (2003).**Microbiologie. 2^{ème} édition .Française.
P : 599-541.
71. **Larpent J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux Groupes bactériens. Lavoisier. France. 4 : 183-212.
72. **Larreta., Garde V.,(1997).** Enzymes en Agroalimentaire. Edition Lavoisier. Pp.179-361.
73. **Lechevalier M.P., Lechevalier H.A.,(1980).** The Chemotaxonomy of actinomycetes. *In* : Microbiology Thayer Actinomycete taxonomy Eds : A. Dietz,
D. W. Society for industrial SIM, Special publication Number, 6. Arlington,
Virginia, USA, pp. 225- 291.
74. **Lechevalier MP., Prauser H., Labeda DP., Ruan JS., (1986).** Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 36:29–37.
75. **Lee J. Y. et Hwang B. K., (2002).** Diversity of antifungal actinomycètes in various vegetative. Soils Korea. *Can. J. microbiol.* 48 : 407-417.
76. **Lemriss, S., F. Laurent., A. Couble., E. Casoli., J. M. Lancelin et D. Saintpierr-Bonacci.,(2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49: 669-674.
77. **Leveau .J .Y., M Bouix ., (1993).** Microbiologie Industrielle. Paris. P : 424-439
78. **Locci. R., (1976).** “Developmental micromorphology of actinomycetes”. *In* : Actinomycetes the boundry microorganisms : Arai. TED, . Tokyo. Pp.170-180.
79. **Loucif K., (2010).** Recherche de substances antibactériennes à partir d’une collection des souches d’actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives.139 :05-10.
80. **Maameri M., 2007.** Caractérisation microbiologique des sols sous conditions semi-arides. (Ksar Chellala) Mémoire.Ing.Agro.Univ. Ibn-Khaldoun, Tiaret.
81. **Madigan M. T., JM Martinko., (2007).** *Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11^{ème} édition.*pp. 331-423, 686-718.
82. **Maier, R. M., I. L. Pepper., C. P. Gerba., (2000).** Microorganisms in surface soils. *In*: Environmental microbiology. Academic press. A Harcourt Science and technology company. Canada, , pp. 79-82
83. **Marchal. N, Bourdon. J.L, Richard. C.I.,(1991).**Les milieux de culture pour l’isolement et l’identification biochimique des bactéries. *Doin editor*, Paris.pp: 67-122.
84. **Messaoudi O., 2013.** Contribution à la caractérisation des souche d’actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebka de kenadsa (Bechar). Mémoire Magister en microbiologie appliquée .pp 32,34, 35,36.

85. **Mateus G.G., Denise M.G., (2018).** Agricultural Residues as Animal Feed: Protein Enrichment and Detoxification Using Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Pp 235-256.
86. **McNeil M.M, Brown J.M., (1994).** The medically important aerobic actinomycètes : epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiology. Rev.* pp 357-417.
87. **Meziani.A., Mahcene.H., (2017).** Activités hydrolases des souches fongiques : Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium. sp* sur substrat solide. Thèse de Master Biotechnologie des Mycètes. Université de Mentouri Constantine.
88. **Michael M& M John (2007)** Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. France. 7p
89. **Mihaela C., Teodor Gh., Negoita., Gabriela E., Bahrim., Peter Stougaard., (2011).** Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. From antarctica. *Brazilian journal of microbiology.* 42: 868-877
90. **Minotto E., Pasqualini M.L., Trindade O.M. and Van Der Sand S.T., (2014).** Enzyme characterization of endophyto-actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research.* 5 (2) : 16-23.
91. **Mouranche A., Costes C., (1985).** Les Hémicellulases. Dans: Hydrolases et dépolymérases, enzymes d'intérêt industriel. Eds. Gauthier-Villars, Paris, pp.165-197.
92. **Mukhtar S., Ahmad Z., Dalaq A., Kauser A. M., and Samina M., (2017).** Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics.* 10 : 316-319.
93. **Mustin M., (1987).** Le composte, gestion de la matière organique. Edit. François. 12p.
94. **Musy A., Soutter M., (1991).** Physique du sol. Edit. Presses polytechniques et universitaires romandes. 331p.
95. **Naglaa H., Satoko N., Mohsen M.E., Hush N., Naznin HA., Masaharu K., Hammad, and Masafumi S., (2017).** Biocontrol Potential of an Endophytic *Streptomyces* sp. Strain MBCN152-1 against *Alternaria brassicicola* on Cabbage Plug Seedlings. *Microbes Environ.* 32(2) : 133-141.
96. **Navarre., Françoise I., (2010).** L'œnologie. 7^{ème} Edition. pp39 et 42.
97. **Nicemol C., Asha P., Prem., (2008).** Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Journal Bioresource Technology.* 99:6697-6701.
98. **Oskay M ; AU Tamer., C.Azeri ., (2004).** antibacterial activity of some actinomycètes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology.* 3(9) : 441-446.

99. **Pandey B., Ghimire P., Agrawal VP., (2000).** Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. Acad. Sci Technol, 4(3) :1-4.
100. **Palaniyandi S.A., Yang S.H., and Suh J.-W., (2013).** Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro13 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. Applied Microbiology. pp1364-5072.
101. **Patrick F., Jacqueline D. & Philippe T., (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. 2 :81- 85
102. **Perry J. J., Staley J. T., Lory S., (2004).** Microbiologie. Dunod, Paris. P : 497–498.
103. **Petit J., Jobin P., (2005).** La fertilisation organique des cultures, fédération d'agriculture biologique du Québec. 48p.
104. **Pierre F., (2000).** Livre le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. 123p.
105. **Pizzul L., (2006).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39.
106. **Prescott L., J Harley (2003).** Microbiologie. 2^{ème} édition. 1164P.
107. **Prescott L.M., JP Harly ., DA Klein ., (2007).** Microbiologie. Edition de la Boeck. P : 06-08
108. **Prescott., (2010).** Microbiologie. 3^{ème} édition. Paris. P : 589-603.
109. **Ragunathan R., Padmadas R., (2013).** Production, purification and characterization of amylase using *Streptomyces* spp. PDS1 and *Rhodococcus* spp. Isolated from Western Ghats. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2(8) : 206-214.
110. **Rajeeva G., Soni.T., (2015).** Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. Journal of BMC Biotechnology. 15 :19.
111. **Ramesh C., Rishi G., and Ajay S., (2015).** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Journal of SAGE-Hindawi. 10 :4061.
112. **Ronald P., De Vries., Visser J., Leo H., de Graaff., (1999).** CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res. Microbiol. 150 :281-285.
113. **Saci A., (2012).** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Université Mentouri, Constantine .thèse de magister.
114. **Sai Shiva K., Prasad V., Davide G., and Emilio S., (2018).** Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, via Amendola. 2 :42122.
115. **Sanglier. J.J., Trujillo. M., (1997)** Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection des souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol. p : 12-13

116. **Sharma D., Kaur T., Chadha B.S., & Manhas R.K., (2011).** Antimicrobial Activity of *Actinomycetes* Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* December.10(6) : 801-808.
117. **Shirling. E.B., Gottlieb. D., (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16 (3) : 313-340
118. **Shrivastava S., S. F. D'Souza., P. D. Desai.,(2008).** Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Current Sci.* 94(25) :1595-1604.
119. **Soltner D., (2003).** Les bases de la production végétale. Tome I. Le sol et son amélioration. Collection Sciences et Techniques Agricoles.23ème. Ed, Paris. 472p.
120. **Sommer P., Bormann C., and Cötz F., (1997).** Genetic and biochemical characterization *Streptomyces humidus*. *Infect dis.* 5 (3) : 207-213.
121. **Song L., Li WJ., Wang QL., Chen GZ., Zhang YS., Xu LH. (2001).** *Jiangella gansuensis* gen. nov.,sp. nov., a novel actinomycete from a desert soil in north-west China. *Int J Syst Evol Microbiol.*,55:881–884.
122. **Sposito G., (1989).** The chemistry of soils. Oxford University Press, New York.17p
123. **Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B., and Araujo J.M.,(2001).** Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology.*76(2) : 137–141.
124. **Stanier W., (1965).** Methods for characterization of streptomyces species. *International journal of systematic bacteriology.* 16(3) : 313-340.
125. **Sudhanshu D., Ravindra., Vijay U., Sanjay K., (2011).** Isolation and Characterization of *Actinomycetes* Producing Antimicrobial Substance against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmacy Research.* 4(11) : 4066-4068.
126. **Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gergouri A., Ladjama A., (2011).** Purification and biochemical characterization of highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl. Biochem. Biotechnol.*pp 011.9457
127. **Tanveer P., Shashank G., Joginder S., Ashish V., Manish K., Naseem G., MadhuBala., Reiaz R., Ajit V., Vivek K., and Manoj K., (2014).** Characterization of *Actinomycetes* and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *Journal of Spirnger*, 3:622.
128. **Tokala, R.K., Strap J. L., Jung C.M., Crawford D. L., (2002).** Vitro to in silico (review article). *Microbiology.* 145: 2183-2202.

129. **Toumatia O., (2015).** Étude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Ecole Normale de Kouba-Alger.
130. **Tresner H.D., and Danga D.F., (1958).** Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species differentiation. Pubmed Bactériol.76(3) :239-244.
131. **Univa Edition (2005).** « Le sol et ses constituants » Vitro to in silico (review article). Microbiology. 145: 2183-2202.
132. **Valli S., Suvathi Sugasini S., Aysha OS., Nirmala P., VinothKumar P., Reena A., (2012).** Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian. Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(6) : 469-473.
133. **Vitousek, P. M., R. W. Howarth.,(1991).** Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. Biogeochem, 13: 87-115.
134. **Wang L., Huang. Y., Liu Z., Goodfellow., Rodri M., guez C., (2006).** *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. J. Sys. Ev.Microbiol. 56: 1257-1261.
135. **Weyland H. (1981).** Distribution of actinomycetes on the sea floor. In : Actinomycetes.Eds : K. Schaal, G. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. *Zbl. Bakt. Suppl.* 11 : 185-193.
136. **White R.E., (2006).** Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource. *Fourth edn: Blackwell Publishing.*
137. **Wild A., (1993).** Soils and environment. In Campridge price editions. Campridge University press, Campridge. pp. 281
138. **William B. R.,Whitman., T Krieg ., T James ., R Daniel .,P Brian Hedlund., J. Paster., (2010).** Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Springer New York Dordrecht Heidelberg, London.pp 25-49
139. **William B., Whitman., Michael Good fellow., Peter Kämpfer., (2012).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.The Actinobacteria,5: 1928.
140. **William S M., G Goodfellow., EMH Alderson., PHA Wellington., (1983).** Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology* .129 :1743-1813
141. **Williams., Cross., (1971).** Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiol.* 4 : 295-334.
142. **Wopereis, (2008).** Curriculum APRA-GIR : Manuel technique.9p

143. Zhang X .Z., Zhang Y.H. P.,(2013). Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications.Biotechnol. Bioeng. 94 : 888 – 898.

Annexe

I. Composition des milieux de cultures et des solutions**1. les milieux de culture :****Caséine amidon agar**

- Amidon.....10g
- Caséine.....0,03g
- KNO₃.....2g
- K₂HPO₄.....0,02g
- NaCl.....2g
- MgSO₄ .7H₂O.....2g
- CaCO₃.....0,05g
- FeSO₄.7H₂.....0,01g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH= 7.3

Gélose nutritive

- Amidon.....10g
- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- NaCl.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7.5

Citrate de Simmons

- Citrate de sodium..... 1g
- Bleu de bromothymol.....0,08g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium.....0,2
- Hydrogénophosphate de potassium.....1g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,1

Gélose TSI

- Peptone.....15g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levure.....3g
- Peptone pepsique de viande.....5g
- Glucose.....1g
- Lactose.....10g
- Saccharose.....10g
- Rouge de phénol.....0,05g
- Chlorure de sodium.....5g
- Thiosulfate de sodium.....0,3g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Urée indole

- Urée.....2g
- L-tryptophane.....0.3g
- Ethanol à 0,95.....1cm³
- Rouge de phénol.....2,5mg
- Chlorure de sodium.....0,5g
- Dihydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Hydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

Bouillon Clark et Lubs

- Peptone.....5g
- Glucose.....5g
- Hydrogénophosphate de potassium.....5g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Milieu d'extraction

- Amidon.....10g
- Na₂HPO₄.....10g
- Extrait de levure.....5g
- KCl.....0,5g
- MgSO₄.....0,015g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

2. Les solutions

2.1. Tampon acétate de Sodium à 0,05M

- 4,1g d'acétate de Na.
- 100 ml d'eau distillé.
- Ajuster le pH à 4,7 ou 4,6 avec l'acide acétique dilué.

2.2. Préparation de la liqueur de Fehling

- **Solution cuprique A** : Sulfate de cuivre pur : 40 g ; Acide sulfurique : 2 ml ;
Eau : 1L
- **Solution Tartarat-Alcaline B** : Tartrate double de sodium et de potassium : 200 ; Soude
: 150 g ; Eau : 1L

2.3. Préparation de biuret

- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g
- Tartaratedoule de potassium et de sodium.....6g
- NaOH30g
- Iode de potassium1g
- H_2O :1L

Résumé :

Les enzymes d'origines bactériennes représentent une source principale dans les applications industrielles. Parmi ces enzymes, les amylases qui sont les plus impliquées dans la biodégradation de l'amidon. Dans cette étude, trois souches d'actinomycètes ont été isolées à partir du sol de la région de Ouilis (Mostaganem). Ces isolats sont identifiés et caractérisés par des observations macro et microscopiques, suivi des tests physiologiques et biochimiques. Une fermentation submergée des isolats dans un milieu liquide riche en amylase a été effectué pour produire les amylases. Après l'extraction des fractions enzymatiques solubles, la quantification et la cinétique des extraits enzymatiques ont été effectués à des longueurs d'ondes $\lambda = 540$ nm par les méthodes de dosages colorimétriques de Biuret et de liqueur Fehling.

Les résultats des caractérisations macro, microscopiques et les tests physiologique et biochimique confirment que les trois isolats d'actinomycètes appartiennent au genre *Streptomyces* sp. Les extraits enzymatiques bruts des souches présentent des concentrations 0,1265 ; 0,1098 et 0,0967 mg/ml respectivement pour les trois isolats (A1, A2 et A6). Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions d'hydrolyses des substrats présentent respectivement des valeurs supérieur de 0,0226 et 0,0246 mol de glucose /l pour les isolats A1 et A2. Cependant, les valeurs du Km, les plus faibles sont notées respectivement pour les souches de *Streptomyces* sp. A1 et A2 (6×10^{-3} et $1,2 \times 10^{-3}$) par rapport à l'isolat A6 ($8,9 \times 10^{-3}$). Les vitesses initiale (V_i) des réactions sont de 5,62 ; 21,9 et 7,5 mol.l⁻¹.min⁻¹ respectivement pour les trois isolats A1 ; A2 et A6.

Les résultats obtenus méritent une étude plus approfondie, dont il est souhaitable de purifier l'enzyme amylase et ouvrent des perspectives positives pour des bonnes exploitations industrielles des souches et leurs enzymes.

Mots-clés : Actinomycètes, Amylase, constante Km ; Vitesse initiale.

Sammary : Enzymes of bacterial origin represent an important source in industrial applications, such as amylases which are the main enzymes involved in the biodegradation of starch. In this study, three strains of actinomycetes were isolated from the soil of the region of Ouilis (Mostaganem). These isolates are identified and characterized by macro and microscopic observations, followed by physiological and biochemical tests. Submerged fermentation of the isolates in amylase-rich liquid medium was performed to produce the amylases. After the extraction of the soluble enzyme fractions, quantification and kinetics of the enzymatic extracts were carried out at wavelengths $\lambda = 540$ nm by Biuret and Fehling colorimetric methods assays.

The results of the macro, microscopic characterizations and the physiological and biochemical tests confirm that the three isolates of actinomycetes belong to the genus *Streptomyces* sp. The crude enzymatic extracts of the strains have concentrations of 0.1265; 0.1098 and 0.0967 mg / ml respectively for the three isolates (A1, A2 and A6). The dosage of the products released during the different hydrolysis reactions of the substrates respectively have higher values of 0.0226 and 0.0246 mol glucose / l for the isolates A1 and A2. However, the Km values are the lowest for *Streptomyces* sp. A1 and A2 (6×10^{-3} and $1,2 \times 10^{-3}$) compared to isolate A6 ($8,9 \times 10^{-3}$). The initial velocities (V_i) of the reactions are 5.62 ; 21.9 and 7.5 mol.l⁻¹.min⁻¹ respectively for the three isolates A1 ; A2 and A6.

The results obtained deserve further study, from which it is desirable to purify the amylase enzyme and open up positive prospects for good industrial exploitation of the strains and their enzymes.

Keywords : Actinomycetes, Amylase, Km constant ; Initial speed.

ملخص

تمثل الإنزيمات ذات الأصل البكتيري مصدرًا مهمًا في التطبيقات الصناعية، إلخ ، مثل الأميلازات التي تعتبر الإنزيمات الرئيسية التي تشارك في التحلل الحيوي للنشاء. في هذه الدراسة، تم عزل ثلاث سلالات من الشعيات من تربة منطقة عبد المالك رمضان (مستغانم). حيث من الناحية الشكلية، يتم التعرف على هذه العزلات من خلال الملاحظات الكلية والمجهرية، تليها الاختبارات الفسيولوجية والكيميو حيوية. تم إجراء تخمير مغمور للعوازل في وسط سائل غني بالنشاء لإنتاج الأميلاز. بعد استخراج الكسور الإنزيمية القابلة للذوبان، تم إجراء القياس الكمي وحركية المستخلصات الإنزيمية في الأطوال الموجية=540 نانومتر بواسطة فحوصات اللونية للبيوريت و الفهلينك.

تؤكد نتائج الخواص العامة والتوصيف المجهرية والاختبارات الفسيولوجية والكيميوحيوية أن العزلات الثلاث للاكتينومييسيتات تنتمي إلى جنس *Streptomyces* sp.، حيث ان المستخلصات الأنزيمية الخام للسلالات لها تركيز 0,1265 ؛ 0,1098 و 0,0967 ملغ / مل على التوالي للعزلات الثلاث A1 ، A2 و A6. تحتوي جرعة المنتجات المنبعثة خلال تفاعلات التحلل التفككي المختلفة للركائز على قيم أعلى من 0,0226 و 0,0246 مول جلوكوز / لتر لعزلاتي A1 و A2. أما قيم ثابت ميكاليس Km هي الأقل بالنسبة إلى A1 و A2 (6×10^{-3} و $1,2 \times 10^{-3}$) مقارنة بالعزل A6 ($8,9 \times 10^{-3}$). السرعات الأولية (V_i) من ردود الفعل هي 5,62 ؛ 21,9 و 7,5 مول. لتر⁻¹. دقيقة⁻¹ على التوالي للعزلات الثلاث A1 ؛ A2 و A6.

إن النتائج التي تم الحصول عليها تستحق مزيدًا من الدراسة، حيث من المرغوب فيه تنقية إنزيم الأميلاز وفتح آفاق إيجابية للاستغلال الصناعي وأنزيماتها الجيد للسلالات

الكلمات المفتاحية: الأكتينومييسات، الأميلاز ، km ثابت ؛ السرعة الأولية vi.