



**UNIVERSITÉ SULTAN MOULAY SLIMANE**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
**Béni-Mellal**



*Centre d'Études Doctorales : Sciences et Techniques*  
*Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé (RNES)*

# THÈSE

Présentée par

**Chorouk ZANANE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie

---

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE, PHYSIOLOGIQUE ET  
MOLÉCULAIRE DES ACTINOMYCÈTES DES SOLS SALÉS DE BÉNI AMIR  
(BÉNI MELLAL–MAROC)**

**PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES SURFACES BACTÉRIENNES ET  
INFLUENCE DE LA SALINITÉ SUR LEUR COMPORTEMENT ADHÉSIF**

---

Soutenue publiquement le **27/04/2019** devant la Commission d'Examen :

<b>Hassan LATRACHE</b>	FST, Béni-Mellal	Président
<b>Saad IBNSOUDA KORAICHI</b>	FST, Fès	Rapporteur
<b>Fatima HAMADI</b>	FS, Agadir	Rapporteur
<b>Abderrahmene EL GHMARI</b>	FST, Béni-Mellal	Rapporteur
<b>Soumya El ABED</b>	FST, Fès	Examineur
<b>Hafida ZAHIR</b>	FST, Béni-Mellal	Co-Directeur de thèse
<b>Mostafa ELLOUALI</b>	FST, Béni-Mellal	Directeur de thèse

## *Dédicace*

### **A mes très chers parents**

Qui ont œuvré pour ma réussite, par leur amour, leur soutien, tous les sacrifices consentis et leurs précieux conseils, pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie, reçoivent à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

### **A Mon marie et ma chère fille**

Le temps que j'ai pris pour la réalisation de ce travail est un précieux cadeau dont vous m'avez fait. Pardonnez-moi de ses moments où je n'ai pas pu être à votre disponibilité.

### **A mes sœurs**

Qui n'ont cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de générosité. Je me permets aujourd'hui de vous présenter ma grande reconnaissance.

### **A la grande famille ZANANE et ATFAOUI**

### **A Mes Encadrants**

### **A Tous ceux ou celles qui me sont chers**

### **A Tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail**

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur **Nabil HMINA**, Président de l'Université Sultan Moulay Slimane, Monsieur **Ahmed ZEGHAL**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Monsieur **Khalid HABBARI**, Vice doyen de la recherche scientifique et Monsieur **Said EL MALIANI**, Directeur de centre d'études doctorales, pour l'importance qu'ils ont donné à la recherche scientifique. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et mon grand respect.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur **Mostafa ELLOUALI** et madame **Hafida ZAHIR**, Professeurs à la faculté des sciences et technique de Béni-Mellal. Je tiens vivement à leur exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour leur disponibilité, leur patience, leur compréhension, leurs qualités humaines et leurs intérêts portés pour mon sujet de recherche. Je les remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir été présents aussi souvent que possible malgré leurs tâches pédagogiques. Leur soutien permanent et dynamisme m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Nulle expression ne va pouvoir traduire les sentiments de considération que j'éprouve envers eux.*

*Je souhaite remercier particulièrement, Monsieur **Hassan LATRACHE**, Directeur du laboratoire de bioprocédés et biointerfaces, pour sa grande contribution à ces travaux de recherche, pour son aide précieuse, pour ses compétences scientifiques, pour sa confiance et ses conseils scientifiques précieux, pour son soutien et sa gentillesse, pour nos nombreuses discussions scientifiques, pour ses encouragements et sa bonne humeur. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et mes remerciements.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Mr **Hassan LATRACHE**, professeur à la FST de Béni Mellal, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je remercie Mrs les professeurs **Saad Ibsouda Koraichi** de la FST de Fes, **Fatima hamadi** de la Faculté des Sciences de Agadir et **Abderrahmene EL GHMARI** de la FST de Béni Mellal d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également à Mme. **Soumya EL ABED**, professeur à la FST de Fès pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse. Leurs remarques et suggestions m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de mon rapport.*

*Egalement, j'adresse mes vifs remerciements à Monsieur, **Robbin DUPONNOIS** directeur du Laboratoire des Symbioses Tropicales & Méditerranéennes UMR 113 IRD/CIRAD/INRA/SupAgro Montpellier/UM2 qui m'a accueilli dans son laboratoire. Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur **HICHAM FERHOUT** Responsable Recherche Microbiologie chez Agro nutrition Région de Toulouse, France. Pour son aide précieuse, pour ses encouragements et sa bonne humeur.*

*Je tiens aussi à remercier tous les doctorants du laboratoire de bioprocédés et biointerfaces de la faculté des sciences et technique de Béni-Mellal : **kaoutar, Safaa, hajar, hakim, abdelwaahid, soukaina, soukaina, rabha, ibtissame, oubid, mourad zakaria, doha, ayoub** ...C'est également un réel et grand plaisir de travailler auprès de vous, de bénéficier de vos expériences et de vos soutiens et de partager nos discussions, aussi bien scientifiques que personnelles (encore une fois merci).*

*Je tiens à remercier mes amis pour leur soutien, leur aide et leur bonne humeur : **Abdelkarim khiraoui, Hajar rizki, hassan bouaik, Ibtissame guirrou, Kaoutar el fezzazi, mehdi boutaunte, Nora salim, Siham Ourouadi, Souad lekchiri, Souad alibat, Soufiane akhramaze.***

*Un grand merci également à **Najat RIHANI**, merci pour ton amitié ta disponibilité, ton écoute, tes réponses, tes questions et tes conseils avisés.*

*Je remercie mes parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en biologie et de devenir la personne que je suis. Mes pensées vont à mes sœurs, pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leur encouragement qu'ils m'ont apporté.*

*Un grand merci à mon époux pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles et à ma fille pour la joie qu'elle nous procure.*

## AVANT-PROPOS

- **Nom et prénom de l'auteur :** ZANANE Chorouk
- **Intitulé de la thèse :** Etude des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des actinomycètes halophiles isolés des sols de Béni Amir (Béni Mellal, Maroc) et l'influence de la salinité sur leur pouvoir adhésif.
- **Directeur de la thèse :** Pr. Mostafa ELLOUALI , (Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Béni-Mellal).
- **Co-Encadrant :** Pr. Hafida ZAHIR (Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Béni-Mellal).
- **Formation doctorale :** Ressources Naturelles, Santé et Environnement.
- **Directeur du CED :** Pr. MELLIANI Said
- **Responsable de Formation :** Pr. ZYAD Abdelmajid
- **Institution :** Université Sultan Moulay Slimane - Faculté des Sciences et Technique Béni Mellal.
- **Equipes :** Bioprocédés et Bionterfaces de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal Université Sultan Moulay Slimane
- **Période de réalisation des travaux :** 2012-2018

### Principales publications et communications

#### ➤ Articles

1- **Chorouk Zanane**, Hafida Zahir, Hassan Latrache, Robin Duponnois, Hicham Ferhout, Kaoutar Elfazazi, Mostafa Ellouali. Screening of actinomycetes isolated from the soils of the Beni Amir region of Morocco by the 16S sequencing of the rDNA gene. International Journal of Scientific & Engineering Research 2363-2368 Volume 9, Issue 5 (2018). ISSN 2229-5518.

2- **Chorouk ZANANE**, Hassan LATRACHE, Kaoutar ELFAZAZI, Hafida ZAHIR, Mostafa EL LOUALI. Isolation of actinomycetes from different soils of Beni Amir Morocco. Journal of Materials and Environmental Science 2018, Volume 9, Issue 10, Page 2994-3000.

3- Kaoutar Elfazazi, Hafida Zahir, **Chorouk Zanane**, Mustapha Mabrouki, Mustapha Ellouali, Fatima Hamadi, Hassan Latrache. Physicochemical properties modification of stain-less steels 304l by using sodium hypochlorite in disinfection procedures and consequences on Escherichia coli adhesion potential. International Journal of Scientific & Engineering Research 956- 962. Volume 9, Issue 3, (2018). ISSN 2229-5518.

4- Kaoutar Elfazazi, Hafida Zahir, Safae. Tankiouine, **Chorouk Zanane**, Mostafa. Ellouali and Hassan. Latrache. Microbial Adhesion of Salmonella Muenster, *Salmonella Kentucky*, *Salmonella*

*Newport and Salmonella Kiel: Effect of Ionic Strength on Physicochemical Surface Properties.* Annual Research & Review in Biology, ISSN: 2347-565X, Vol 27, Issue:3,(2018)., DOI 10.9734/ARRB/2018/42502.

### ➤ **Articles soumis**

1- **Chorouk Zanane**, Hafida Zahir, Hassan Latrache, Kaoutar Elfazazi, Bouchra Mallouki, Fatima Hamadi, Mostafa EL Louali. Physicochemical properties of the cell surface of actinomycetes from different saline soils. Journal of Adhesion Science and Technology (Soumis pour publication).

### **Communications : Conférences Nationales et Internationales**

1. **Chorouk ZANANE**, Hafida ZAHIR, Hassan LATRACHE, Kaouter EL FAZAZI, Rabha EL OTHMANY ,Ibtissam MAYOUSSI,Oubid AIT LAHBIB, Mostafa EL OUALI.Physicochemical characterization of the surface of actinomycetes isolated from soil of Beni Amir (Beni Mellal, Morocco) by two methods.Symposium sur les biofilms microbiens Fès 23 février 2019.

2. Rabha ELOTHMANY, Hafida ZAHIR, **Chorouk ZANANE**, Mustapha EL LOUALI, Hassan LATRACHE. Caractérisation physicochimique des isolats d'actinomycètes pourvus d'activité antimicrobienne. Troisième Edition du congrès International des Sciences Pharmaceutiques CISPharm16-17 Février 2018.

3. Rabha ELOTHMANY, Hafida ZAHIR, **Chorouk ZANANE**, Mustapha EL LOUALI, Hassan LATRACHE. Prevention of adhesion and biofilm formation by actinomycetes isolated from Moroccan saline soil des isolats d'actinomycètes pourvus d'activité antimicrobienne. Deuxième Edition du congrès International des Sciences Pharmaceutiques CISPharm17-18 Février 2017

4. **Chorouk ZANANE**, Mostafa EL OUALI, Hafida ZAHIR, Kaouter EL FAZAZI, Bouchra MALLOUKI, Hassan LATRACHE. Study of physicochemical properties of the surface of actinomycetes isolated from soil of Béni amir (Beni Mellal, Morocco).”MICROBIOD3”Mohammedia 24-26 OTOBER 2016

5. **Chorouk ZANANE**, Activités antimicrobiennes des souches d'actinomycètes isolées du sol de la région de Béni-Amir (Maroc).Première Edition du congrès International des Sciences Pharmaceutiques (CISPharm 2016).

6. **Chorouk ZANANE**, Hafida ZAHIR, Hassan LATRACHE, Hanane HAMDALI, Bouchra MALLOUKI, Mostafa EL OUALI .Etude des propriétés physico-chimiques des Surfaces cellulaires des actinomycètes du sol de béni-Amir (béni mellal, Maroc) par la techniques de MATS (Microbial Adhesion To Solvents). 5éme Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces FST Beni Mellal,Maroc, 5-7 Mai 2015.

7. **Chorouk ZANANE** Hafida ZAHIR, Hassan LATRACHE, Hanane HAMDALI, Bouchra MALLOUKI, Ibtissame GUIROU, Hajar RIZKI, Mostafa EL OUALI. Adhésion à l'argile des Actinomycètes du sol de Béni-Amir (Béni Mellal, Maroc). 5éme Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces FST Beni Mellal, Maroc, 5-7 Mai 2015.

8. **Chorouk ZANANE**, Hafida ZAHIR, Hanane HAMDALI, Hassan LATRACHE, Ibtissame Guirrou, Hajar RIZKI , Mostafa EL OUALI. Effet de la salinité sur la croissance des souches actinomycétales. Deuxième édition des Journées Doctoriales (JDoc'15). Béni Mellal, Maroc, 26-28 Mars 2015.
9. **Chorouk ZANANE**, Hanane HAMDALI, Hafida ZAHIR, Hassan LATRACHE, Mostafa EL LOUALI. Isolation of salt-tolerant actinomycetes from different saline-alkali soil of Beni Amir (Morocco). ISBA '17: International Symposium on the Biology of Actinomycetes § Applications and biotechnology of Actinomycetes. Turkey, 08-12 October 2014.
10. Hamdali H, Damrani I, Essbaïy N, Ouahib C , Khoumsi A, Zahir H , Latrache H , Hafidi M, **Zanane C**, Jiddi B, ouhdouch Y. Isolation and antimicrobial activity of actinomycetes from tea (*Camellia sinensis*) and verbena (*Aloysia triphylla*). ISBA '17: XVII. International Symposium on the Biology of Actinomycetes § Applications and biotechnology of Actinomycetes. Turkey, 08-12 October 2014.
11. **Chorouk Zanane**, Hanane Hamdali, Hassan Latrache, Hajar Rizki, Ibtissame Guirrou, Hafida Zahir, Mustapha El ouali. Isolement et caractérisation des Actinomycètes du sol de Béni-Amir (Béni Mellal, Maroc). Première Edition des journées doctoriales (JDoc'14). Béni Mellal, Maroc, 10-11 JUIN 2014
12. **Chorouk ZANANE**, Hafida ZAHIR, Hassan LATRACHE, Hajar Rizki , Ibtissame Guirrou, H. HAMDALI, Mostafa EL OUALI. effet de la salinité sur le sol du périmètre de Tadla region Beni- Amir. Première édition des journées de l'environnement. Béni Mellal, Maroc 5 Juin 2014.
13. **Chorouk ZANANE**, participation au symposium Franco-marocain BIOADHESION-BIOFILM. FES, Maroc, 28 Mai 2013.

## RESUME

Les actinomycètes sont d'importants groupes de microorganismes ayant colonisé divers milieux écologiques même ceux hostiles. Jusqu'à nos jours, ils demeurent encore sources de la majeure partie des biomolécules actives (métabolites secondaires) utilisées en médecine, en agriculture et en biotechnologie.

Dans la nature des microorganismes ont tendance à vivre en biofilm. Ce processus de formation de biofilm commence par l'étape d'adhésion. Les propriétés physicochimiques des surfaces et les caractéristiques du milieu environnemental jouent un rôle déterminant dans cette première étape d'adhésion.

Rare sont les travaux qui ont étudié la caractérisation physicochimique des actinomycètes, l'objectif principal de cette étude est porté sur la détermination des propriétés physicochimiques (hydrophobicité, caractère accepteur/donneur d'électrons et composante dispersive) de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes halophiles ainsi que leur identification moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons isolé pour la "première fois" au laboratoire de Bioprocédés et Biointerface des souches d'actinomycètes à partir de 11 sites de sol dispersés dans la région de Béni Amir (Béni Mellal, Maroc) connue par des taux de salinité variables. Une caractérisation physicochimique des différents sols étudiés montre que chaque site représente un écosystème particulier. L'utilisation des milieux de culture spécifiques des actinomycètes nous a permis d'isoler 80 souches différentes sur la base d'étude morphologique des colonies. Nous avons fait une identification moléculaire basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S des souches, qui a permis de les rattacher au genre *Streptomyces*, souches réputées d'être productrices d'antibiotiques. Nous avons effectué un criblage des isolats sur la base de l'activité antimicrobienne et la tolérance en salinité qui nous a permis de sélectionner 14 souches qui vont faire l'objet de la suite des études.

Dans le second volet de ce travail nous avons déterminé en premier lieu les propriétés physicochimiques de la surface des souches d'actinomycètes par deux méthodes MATS et Angle de contact en présence de deux forces ioniques de  $\text{KNO}_3$ . Nous avons montré que les deux méthodes utilisées ne reflètent pas les mêmes caractères d'hydrophobicité, caractère donneur d'électrons, caractère accepteur d'électrons. En second lieu, l'influence du sel  $\text{NaCl}$  a été étudiée en présence de deux concentrations (0,1M et 1,2M). En utilisant la méthode de MATS (adhésion microbienne aux solvants), qui n'a jamais été appliquée aux actinomycètes, nous avons montré que la surface des souches d'actinomycètes a un caractère hydrophobe. Lorsque la force ionique passe de 0,1 à 1,2 M, le caractère donneur d'électrons augmente pour deux souches alors qu'il se rapproche de zéro pour les autres souches. Pour trois souches, le caractère accepteur d'électrons est exprimé à des forces ioniques élevées. Par des mesures d'angle de contact les résultats montrent que douze souches ont un caractère hydrophile et deux ont un caractère hydrophobe. De plus, toutes ces souches sont principalement donneurs d'électrons et présentent un caractère accepteur d'électrons faible. Une caractérisation par l'angle de contact des surfaces des sols montre qu'ils sont hydrophiles avec un caractère donneur d'électrons bien exprimé et un caractère accepteur d'électrons faible à négligeable.

Le dernier volet de ce travail est consacré à l'étude de l'influence de la salinité sur l'adhésion des Actinomycetes sur deux supports. Sur le sol, les résultats ont montré que la majorité des souches ont une bonne adhésion. Sur le verre l'adhésion de ces souches est faible. La variation de la concentration de  $\text{NaCl}$  n'a pas les mêmes influences sur ses propriétés physicochimiques de la surface des actinomycètes étudiées. Sur le pouvoir adhésif la concentration n'a pas montré d'influence notable en  $\text{NaCl}$ .

### Mots-clés

Isolement et distribution des actinomycètes, sol, région Béni Amir, identification, propriétés physicochimiques, force ionique, MATS, Angle de contact, adhésion bactérienne.



## ABSTRACT

Actinomycetes are important groups of microorganisms that have colonized various ecological environments, even hostile ones. To this day, they still remain the source of most of the active biomolecules (secondary metabolites) used in medicine, agriculture and biotechnology.

In the nature of microorganisms tend to live in biofilm. This process of biofilm formation begins with the step of adhesion. The physicochemical properties of the surfaces and the characteristics of the environmental medium play a decisive role in this first adhesion step.

Rare are the works that studied the physicochemical characterization of actinomycetes, the main objective of this study is focused on the determination of the physicochemical properties (hydrophobicity, acceptor / electron donor character and dispersive component) of the cell surface of the strains of halophilic actinomycetes as well as their molecular identification.

Firstly, we isolated for the first time in the laboratory of bioprocesses and biointerface strains of actinomycetes from 11 sites of soil dispersed in the region of Beni Amir (Beni Mellal, Morocco) known by variable salinity levels. A physicochemical characterization of the different soils studied shows that each site represents a particular ecosystem. The use of culture media specific to actinomycetes allowed us to isolate 80 different strains on the basis of morphological study of colonies. We screened the isolates for antimicrobial activity and the salinity tolerance that allowed us to select 14 strains that will be the subject of further studies. The molecular identification based on the sequencing of the 16S rRNA gene of the strains allowed to link them to the genus *Streptomyces*, strains known to be producing antibiotics.

In the second part of this work we first determined the physicochemical properties of the surface of actinomycete strains by two methods MATS and Contact Angle in the presence of two ionic strengths of  $\text{KNO}_3$ . We have shown that the two methods used do not reflect the same hydrophobicity characteristics, electron donor character, acceptor character of electrons. Secondly, the influence of the NaCl salt was studied in the presence of two concentrations (0.1M and 1.2M).. Using the method of MATS (microbial solvent adhesion), which has never been applied to actinomycetes we have shown that the surface of actinomycete strains has a hydrophobic character. When the ionic strength goes from 0.1 to 1.2 M, the electron donor character increases for two strains while it approaches zero for the other strains. For three strains, the acceptor character of electrons is expressed at high ionic strengths. By measurements of contact angle the results show that twelve strains have a hydrophilic character and two have a hydrophobic character. In addition, all these strains are mainly electron donors and have a low electron acceptor character. Characterization by the contact angle of the soil surfaces shows that they are hydrophilic with a well-expressed electron donor character and a low to negligible electron acceptor character.

The last part of this work is devoted to the study of the influence of salinity on the adhesion of Actinomycetes on two supports. On the soil, the results showed that the majority of strains have good adhesion. On glass the adhesion of these strains is weak. The variation of the NaCl concentration does not have the same influences on its physicochemical properties of the surface of the actinomycetes studied. On the adhesive power the concentration did not show significant influence in NaCl.

### Keywords

Isolation and distribution of actinomycetes, soil, Beni Amir region, identification, physicochemical properties, ionic strength, MATS, contact angle, bacterial adhesion.

## ملخص

تعد الأكتينومييسات مجموعات مهمة من الكائنات الحية الدقيقة التي استعمرت بيئات بيئية مختلفة، حتى المعادية منها، و لا تزال حتى يومنا هذا مصدر معظم الجزيئات الحيوية النشطة (الأيضات الثانوية) المستخدمة في الطب والزراعة والتكنولوجيا الحيوية.

في الطبيعة، تميل الكائنات الحية إلى العيش في الأغشية الحيوية. تبدأ عملية تكوين الغشاء الحيوي بمرحلة الالتصاق. تلعب الخصائص الفيزيوكيميائية للأسطح وخصائص الوسط البيئي دورًا حاسمًا في مرحلة الالتصاق الأولى هذه.

تعد الأعمال التي درست التوصيف الفيزيوكيميائي الأكتينومييسات نادرة، والهدف الرئيسي من هذه الدراسة يركز على تحديد الخواص الفيزيوكيميائية (الكارهة للماء، الطابع المانح/المستقبل للإلكترون والمكون المشتت) لسطح الخلية لسلاسل الأكتينومييسات أليفة الملح وتعريفها الجزيئي.

في البداية، قمنا، وللأول مرة في المختبر، بعزل سلاسل الأكتينومييسات مأخوذة من أحد عشر موقع للتربة في منطقة بني عمير المعروفة بمستويات ملوحة متفاوتة ويوضح التوصيف الفيزيوكيميائي لمختلف التربة التي تمت دراستها أن كل موقع يمثل نظامًا بيئيًا معينًا. لقد مكنتنا استعمال أوساط خاصة لتكاثر الأكتينومييسات بعزل ثمانين سلالة مختلفة معتمدين على الدراسة المورفولوجية للمستعمرات. وقد قمنا بتحديد جزيئي استنادا على تسلسل جين الترميز ARNr 16S للسلاسل والذي مكنتنا بإرفاقهم بنوع *Streptomyces* وهي سلاسل معروفة بإنتاجها للمضادات الحيوية. قمنا بفرز السلاسل المعزولة معتمدين على النشاط المضاد للمكروبات والميل للملوحة والذي مكنتنا من تحديد أربعة عشر سلالة ستم دراستها لاحقًا.

في الجزء الثاني من هذا العمل، حددنا أولاً الخواص الفيزيوكيميائية لسطح سلاسل الأكتينومييسات بطريقتين MATS وزاوية التلامس بوجود قوتين أيونيتين لنترات البوتاسيوم. لقد أظهرنا أن الطريقتين المستخدمتين لا تعكسان نفس خصائص الكارهة للماء، طابع المانح للإلكترون وطابع المستقبل للإلكترون. ثانيًا، تمت دراسة تأثير ملح كلوريد الصوديوم في وجود تركيزين (0,1 و 1,2 M) باستخدام طريقة MATS (الالتصاق الميكروبي للمذبيات)، والتي لم يتم تطبيقها مسبقًا على الأكتينومييسات، أظهرنا أن سطح سلاسل الأكتينومييسات له طابع كاره للماء. عندما تنتقل القوة الأيونية من 0,1 إلى 1,2 M، يزداد الطابع المانح للإلكترون لسلاسلتين بينما يقترب من الصفر بالنسبة للسلاسل الأخرى. بالنسبة لثلاث سلاسل، تمت ترجمة الطابع المستقبل للإلكترون بوجود نقاط قوة أيونية عالية. من خلال قياسات لزاوية التلامس، أظهرت النتائج أن اثنتي عشر سلالة لها طابع محب للماء، واثنتين لهما طابع كاره للماء. بالإضافة إلى ذلك، كل هذه السلاسل هي بشكل رئيسي مانحة للإلكترون ولها طابع مستقبل للإلكترون منخفض. يُظهر التوصيف بزاوية التلامس لأسطح التربة أنها محبة للماء وذات طابع مانح للإلكترون معبر عنه بشكل جيد أما الطابع المستقبل للإلكترون فهو منخفض ويكاد يكون منعدماً. الجزء الأخير من هذا العمل كرس لدراسة تأثير الملوحة على التصاق الأكتينومييسات على داعمين. أظهرت النتائج أن غالبية السلاسل لديها التصاق جيد على التربة أما على الزجاج فهو ضعيف. تغيير تركيز كلوريد الصوديوم ليس له نفس التأثيرات على الخواص الفيزيوكيميائية لسطح الأكتينومييسات الخاضعة للدراسة. على مستوى القوة اللاصقة، لم يظهر التركيز تأثيرًا كبيرًا في كلوريد الصوديوم.

**الكلمات المفتاحية:** عزل وتوزيع الكريات الحركية، تربة، منطقة بني عمير، الخصائص الفيزيوكيميائية، القوة الأيونية، MATS، زاوية التلامس، الالتصاق البكتيري.

## LISTE DES ABREVIATIONS

AB : Acide-base.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Aw : Activité de l'eau.

CE : Conductivité électrique

COT : Carbone organique total.

D.A.B : Acide 2,4-diaminobutyrique.

D.A.P : Acide 2,6-diaminopimélique.

DEE : Diéthyl éther.

DLVO : Derjaguin et Landau et Verwey et Over Beek

DM : Diiodométhane

DO<sub>f</sub> : Densité optique finale.

DO<sub>i</sub> : Densité optique initiale.

dS : deciSiemens,

EPS : Substances polymériques extracellulaires

FA : Formamide

KNO<sub>3</sub> : Nitrate de potassium

LW: Lifshitz-van der Waals.

Ma : Mycélium aérien

MATH : Adhésion Microbienne aux Hydrocarbures

MATS : Adhésion microbienne aux solvants

MIB : Méthyl isobornéol

Mp : Mycélium primaire

Mv : Mycélium végétatif

NaCl : Chlorure de sodium

% C+G : Pourcentage en "guanine + cytosine"

$\Delta G_{adh}$  : Variation d'énergie libre accompagnant l'adhésion

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Classification des actinomycètes selon "Taxonomic Outline of The Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".	15
<b>Tableau 2</b>	Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes.	17
<b>Tableau 3</b>	Classification des peptidoglycanes des actinomycètes.	18
<b>Tableau 4</b>	Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes.	19
<b>Tableau 5</b>	Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat.	21
<b>Tableau 6</b>	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes.	24
<b>Tableau 7</b>	Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les actinomycètes.	26
<b>Tableau 8</b>	Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes.	27
<b>Tableau 9</b>	Revue des différents travaux concernant l'étude des biofilms des actinomycètes.	29
<b>Tableau 10</b>	Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique.	57
<b>Tableau 11</b>	Paramètres physicochimiques des onze échantillons de sol de Béni Amir.	66
<b>Tableau 12</b>	Distribution quantitative des bactéries, actinomycètes et champignons dans les sols de Béni Amir.	69
<b>Tableau 13</b>	Nombre des souches d'actinomycètes isolées et purifiées à partir des échantillons du sol.	70
<b>Tableau 14</b>	Corrélation entre les caractéristiques physicochimiques du sol et la distribution des actinomycètes.	73
<b>Tableau 15</b>	Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.	77
<b>Tableau 16</b>	Mélange réactionnel et quantité de réactifs utilisés pour une réaction PCR	80
<b>Tableau 17</b>	Etude macromorphologique et caractères culturels de 30 isolats d'actinomycètes.	83
<b>Tableau 18</b>	Les différents caractères physiologiques et biochimiques de 30 isolats.	86
<b>Tableau 19</b>	Espèces proches des isolats d'actinomycètes.	90
<b>Tableau 20</b>	Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans la méthode MATS.	105
<b>Tableau 21</b>	Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans les mesures d'angle de contact.	108
<b>Tableau 22</b>	Propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes par deux méthodes MATS et Angle de contact (CAM) (0,1M KNO <sub>3</sub> ).	120
<b>Tableau 23</b>	Propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes par deux méthodes MATS et Angle de contact (CAM) (1,2M KNO <sub>3</sub> ).	121
<b>Tableau 24</b>	Propriétés physico-chimiques en fonction de la concentration du NaCl	138
<b>Tableau 25</b>	Corrélation des propriétés physico-chimiques selon les deux méthodes : MATS et Angle de contact en fonction du NaCl et du KNO <sub>3</sub> .	139
<b>Tableau 26</b>	Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma_{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) du verre.	145
<b>Tableau 27</b>	Hydrophobicité qualitative ( $\theta_w$ ) mesurée par l'angle de contact et quantitative ( $\Delta G_{iwi}$ ) des 11 sols étudiés.	146
<b>Tableau 28</b>	Caractères donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) des 11 sols mesurés par l'Angle de contact.	147
<b>Tableau 29</b>	Adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre (NaCl 0,1M).	149
<b>Tableau 30</b>	Adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre (NaCl 1,2M).	149

<b>Tableau 31</b>	Energie totale ( $\Delta G_{TOT}$ ) de l'adhésion des micro-organismes aux différents sols de la région de Béni Amir à 0,1 M de NaCl.	151
<b>Tableau 32</b>	Energie totale ( $\Delta G_{TOT}$ ) de l'adhésion des micro-organismes aux différents sols de la région de Béni Amir à 1,2 M de NaCl.	153
<b>Tableau 33</b>	Pourcentage de la surface occupée par les cellules adhérees pour les différentes souches d'actinomycètes à deux forces ioniques (0,1M et 1,2M de NaCl) sur le verre.	158

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec le mycélium végétatif et le mycélium aérien.	8
<b>Figure 2</b>	Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes.	9
<b>Figure 3</b>	Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre <i>Streptomyces</i> .	10
<b>Figure 4</b>	Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes.	10
<b>Figure 5</b>	Exemple de colonies d'actinomycètes.	11
<b>Figure 6</b>	Hyphes d'actinomycètes, rencontrées dans une culture liquide.	11
<b>Figure 7</b>	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i> .	15
<b>Figure 8</b>	Répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses.	25
<b>Figure 9</b>	Répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les <i>Streptomyces</i> et genres apparentés, et d'autres genres actinomycétales.	25
<b>Figure 10</b>	Évolution du nombre de publications par an dans lesquelles le mot « actinomycètes biofilm » apparaît dans le titre, le résumé ou en mot clef (PubMed).	30
<b>Figure 11</b>	Energie d'interaction totale d'après DLVO selon la concentration du milieu en électrolytes.	35
<b>Figure 12</b>	Comparaison entre l'énergie d'interaction déduite de DLVO classique et DLVO développée.	37
<b>Figure 13</b>	Structure de la double couche ionique.	40
<b>Figure 14</b>	Mesure par angle de contact.	48
<b>Figure 15</b>	Principe général de l'AFM.	52
<b>Figure 16</b>	A: Localisation du périmètre irrigué du Béni Amir en fonction des ressources en eau de surface, B: Vue d'ensemble de la zone d'étude à l'échelle nationale.	55
<b>Figure 17</b>	Répartition annuelle de 2000 à 2013 des précipitations et de la température dans la zone d'étude.	56
<b>Figure 18</b>	Carte montrant les zones d'échantillonnage dans la région Béni Amir Tadla-Azilal.	62
<b>Figure 19</b>	Souches d'Actinomycètes isolées sur milieu BENNET.	70
<b>Figure 20</b>	Aspect microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de Gram (Gx100).	71
<b>Figure 21</b>	Pourcentage d'actinomycètes isolés dans chaque échantillon de sol.	71
<b>Figure 22</b>	Protocole d'éclatement des bactéries.	79
<b>Figure 23</b>	Programme d'amplification par PCR de l'ADNr 16S.	80
<b>Figure 24</b>	Photo montrant la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques.	88
<b>Figure 25</b>	Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir des séquences nucléotides du gène codant l'ARNr 16S, avec la méthode de neighbour-joining.	92
<b>Figure 26</b>	Pourcentages d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir.	98
<b>Figure 27</b>	Potentiel antifongique des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir	100
<b>Figure 28</b>	Culture des actinomycètes sur milieu Bennet liquide.	104
<b>Figure 29</b>	Etapes de préparation de la suspension bactérienne.	104

<b>Figure 30</b>	Déroulement du test MATS	106
<b>Figure 31</b>	Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de ses affinités.	107
<b>Figure 32</b>	Filtration et filtres des couches minces des cellules bactériennes	108
<b>Figure 33</b>	Goniomètre (dispositif) de la mesure de l'angle de contact.	109
<b>Figure 34</b>	Adhésion des actinomycètes à l'hexadécane à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du KNO <sub>3</sub> .	110
<b>Figure 35</b>	Caractère donneur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du KNO <sub>3</sub> .	112
<b>Figure 36</b>	Caractère accepteur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du KNO <sub>3</sub> .	113
<b>Figure 37</b>	Hydrophobicité qualitative des actinomycètes en présence de KNO <sub>3</sub> 0,1M et 1,2M	115
<b>Figure 38</b>	Energie libre d'interaction de surfaces des souches pour KNO <sub>3</sub> 0,1M et 1,2M.	116
<b>Figure 39</b>	Caractères accepteur/donneur d'électrons (KNO <sub>3</sub> 0,1M).	117
<b>Figure 40</b>	Caractères accepteur/donneur d'électrons (KNO <sub>3</sub> 1,2M).	118
<b>Figure 41</b>	Comparaison du caractère accepteur d'électrons en fonction de [KNO <sub>3</sub> ].	119
<b>Figure 42</b>	Comparaison du caractère donneur d'électrons en fonction de [KNO <sub>3</sub> ].	119
<b>Figure 43</b>	Corrélation entre les propriétés hydrophobicité et caractères donneur/accepteur d'électrons évaluées par les méthodes Angle de contact et MATS.	123
<b>Figure 44</b>	Adhésion des 14 souches d'actinomycètes à l'hexadécane à deux concentrations de NaCl de 0,1M et 1,2M.	128
<b>Figure 45</b>	Caractère donneur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1M et 1,2M du NaCl.	130
<b>Figure 46</b>	Caractère accepteur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2M du NaCl.	132
<b>Figure 47</b>	Corrélation entre l'hydrophobicité et le caractère accepteur d'électrons des souches d'actinomycètes. (a) force ionique 0,1 M ; r = 0,496 et (b) force ionique 1,2M ; r = 0,878.	133
<b>Figure 48</b>	Corrélation entre l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons des souches d'actinomycètes. (c) force ionique 0,1 M ; r = 0,604 et (d) force ionique 1,2M ; r = -0,051.	133
<b>Figure 49</b>	Hydrophobicité qualitative des actinomycètes en présence de NaCl 0,1 et 1,2M.	135
<b>Figure 50</b>	Energie libre d'interaction de surfaces des souches dans NaCl 0,1M et 1,2M.	135
<b>Figure 51</b>	Caractère accepteur/donneur d'électrons (NaCl 0,1M)	137
<b>Figure 52</b>	Caractère accepteur/donneur d'électrons (NaCl 1,2M)	137
<b>Figure 53</b>	Filtration de la suspension du sol	142
<b>Figure 54</b>	Photo de mesure du sol par angle de contact	142
<b>Figure 55</b>	Adhésion des actinomycètes au verre. Observation par microscope optique à 3h et à 0,1M et 1,2M de NaCl (Gr : x400).	157
<b>Figure 56</b>	Pourcentages de bactéries adhérentes sur le verre en fonction du temps en présence de deux concentrations de NaCl (0,1M et 1,2M).	161
<b>Figure 57</b>	Corrélation entre l'adhésion prédictive ( $\Delta G_{TOT}$ ) et l'adhésion sur le verre	163
<b>Figure 58</b>	Corrélation entre l'adhésion prédictive ( $\Delta G_{TOT}$ ) et l'adhésion sur le verre pour les valeurs supérieures à 30%	163
<b>Figure 59</b>	Pourcentages d'adhésion des actinomycètes isolés aux sols étudiés.	165

## TABLE DES MATIERES

Dédicace .....	i
Remerciements .....	ii
AVANT-PROPOS .....	iv
RESUME.....	vii
ABSTRACT .....	viii
ملخص .....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS .....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTES DES FIGURES.....	xiii
TABLE DES MATIERES .....	xv
INTRODUCTION GENERALE.....	1

### PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les actinomycètes du sol : écologie, et interaction environnement .....	5
1- Introduction.....	6
2- Historique.....	7
3- Morphologie.....	7
4- Physiologie de développement.....	12
5- Cycle de vie .....	14
6- Taxonomie des Actinomycètes .....	15
6.1- Caractère Chimiotaxonomique .....	15
6.2- Caractères génétiques .....	19
7- Distribution et rôle écologique des actinomycètes.....	21
7.1- Milieu et mode de vie .....	21
7.2-Rôle écologique des Actinomycètes.....	22
8- Rôle des actinomycètes en biotechnologie .....	23
8.1- Sécrétion des antibiotiques .....	23
8.2- Sécrétion des extrêmozymes .....	25
8.3-L'utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides .....	26
8.4- Biotechnologie des microorganismes halophiles.....	27
9-Biofilm des actinomycètes : état de l'art.....	28
Chapitre II : Mécanismes physico-chimiques impliqués dans l'adhésion des microorganismes aux surfaces .	31
1- Les théories prédictives de l'adhésion .....	32
1.1- Approche thermodynamique .....	32
1.2- Approche DLVO .....	33
1.3- Théorie de DLVO développée par Van Oss (Extended DLVO) .....	36
2- Les interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion bactérienne .....	37
2.1- Les interactions de Van der Waals .....	37
2.2- Les interactions électrostatiques .....	40
2.3- Les interactions polaires .....	40
3- Facteurs influençant l'adhésion bactérienne .....	42
3.1- Facteurs liés au support. ....	42
3.2- Les facteurs liés au micro-organisme. ....	44
3.3- Facteurs liés à l'environnement.....	46
4- Méthodes de caractérisation des propriétés de surfaces bactériennes .....	48
5- Méthodes de quantification de l'adhésion.....	50



Chapitre III : Problème de la salinité en agriculture cas de : Béni Amir de la plaine de Tadla.....	54
1- Description de la zone de Béni Amir .....	55
2- Problème de la salinité et de la sodicité en agriculture .....	56
2.1- Définition de la Salinité.....	57
2.2- Salinité des sols .....	57
2.3- Origine de la salinité.....	58
2.4- Origine géologique .....	58
2.5- Origine marine.....	58
2.6- Salinisation par les eaux d'irrigation .....	58
2.7- Régime d'irrigation.....	59
2.8- Effets du sel sur les microorganismes .....	59

## PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES ACTINOMYCETES DU SOL DE LA REGION DE BENI AMIR.....	61
--	----

I-INTRODUCTION .....	61
II-MATERIELS ET METHODES .....	61
1- Echantillonnage.....	61
2- Prélèvement.....	62
3- Caractéristiques physicochimiques des échantillons du sol .....	62
3.1- Mesure du pH des échantillons.....	62
3.2- Pourcentage d'humidité .....	62
3.3- Carbone Organique Total.....	63
3.4- Détermination de la matière organique.....	63
3.5- Mesure de la conductivité électrique .....	63
3.6- Phosphore assimilable.....	63
3.7- Potassium .....	64
4- Dénombrement des micro-organismes.....	64
5- Isolement des souches d'actinomycètes .....	64
6- Purification des souches.....	65
7- Observation des colonies au microscope optique.....	65
8- Conservation des souches d'actinomycètes .....	65
8.1- Conservation par congélation dans le glycérol à -20 °C.....	65
8.2- Conservation dans le sable .....	65
III-RESULTATS ET DISCUSSION.....	65
1- Caractéristiques physicochimiques des sols .....	65
2- Isolement et énumération de micro-organismes.....	68
3- Purification des actinomycètes.....	69
4- Caractères morphologiques des actinomycètes isolés.....	70
4.1- Caractères culturels des actinomycètes .....	70
4.2- Aspect microscopique des actinomycètes.....	70
5- Distribution des actinomycètes dans les sols de Béni Amir.....	71
IV-CONCLUSION.....	73

Chapitre II : IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE, PHYSIOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES.....	74
--	----

I-INTRODUCTION .....	74
II- MATERIELS ET METHODES .....	75
1- Etude des caractères phénotypiques .....	75
1.1- Préparation de l'inoculum général .....	75
1.2- Préparation de l'inoculum lavé .....	75
2- Etude morphologique .....	76

2.1- Caractérisation de la morphologie et de la pigmentation.....	76
2.1.1- Observation macroscopique.....	76
2.1.2- Observation du mycélium aérien et du mycélium du substrat par la technique de la culture sur lamelle.....	76
2.1.3- Production de pigments mélanoides .....	76
2.2-Détermination des caractères physiologiques .....	76
2.2.1-Effet de la température sur la croissance des souches.....	76
2.2.2-Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches .....	77
2.3-Sensibilité aux antibiotiques .....	77
3- Etude biochimique .....	77
3.1- Test de la croissance sur différentes sources de carbone .....	77
3.2- Utilisation du citrate comme seule source de carbone .....	78
3.3-Réduction des nitrates.....	78
3.4- Recherche de catalase .....	78
4-Etude moléculaire .....	79
4.1-Extraction de l'ADN à partir des souches d'actinomycètes.....	79
4.1.1- Amplification du fragment d'ADN ribosomique 16s.....	79
4.2- Electrophorèse sur gel d'agarose .....	80
4.2.1- Préparation du gel d'agarose .....	80
4.2.2-Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV.....	80
5-Purification.....	81
6-Séquençage .....	81
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	81
1- Etude morphologique des souches.....	81
1.1- Macromorphologie.....	81
1.2- Micromorphologie.....	85
3- Étude physiologique et biochimique .....	85
2.1- La sensibilité aux antibiotiques .....	88
2.2- Détermination de la Température optimale de croissance.....	88
2.3- Croissance à différents pH.....	88
3- Identification moléculaire .....	89
3.1- Analyse de la séquence d'ADNr 16S .....	89
3.2- Comparaison des séquences avec la banque informatique .....	89
IV-CONCLUSION.....	92
Chapitre III : CRIBLAGE DES ACTINOMYCETES A INTERET BIOTECHNOLOGIQUE.....	94
I-INTRODUCTION.....	94
II- MATERIELS ET METHODES.....	94
1- Détermination de la tolérance au sel des actinomycètes .....	94
2- Activité antimicrobienne .....	95
2.1- Souches testées .....	95
2.2-Conservation des souches.....	95
3- Préparation des suspensions bactériennes .....	95
4- Choix des milieux de culture.....	96
5-Test des cylindres d'agar .....	96
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	97
1- Tolérance au sel des actinomycètes des sols de Béni Amir .....	97
2- Activité antimicrobienne.....	98
2.1- Activité antibactérienne .....	98
2.2- Activité antifongique .....	100
IV-CONCLUSION.....	101
Chapitre IV : ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SURFACE CELLULAIRE DES ACTINOMYCETES PAR DEUX METHODES .....	103

I-INTRODUCTION .....	103
II- MATERIELS ET METHODES .....	103
1- Souches bactériennes et conditions de cultures. ....	103
1.1- Souches d'actinomycètes étudiées. ....	103
1.2- Préparation des suspensions bactériennes .....	103
2-Détermination de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode MATS.....	104
2.1-Principe.....	105
2.2-Détermination de l'hydrophobicité.....	105
2.3-Détermination du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons.....	105
2.4-Technique expérimentale.....	106
3- Détermination de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode d'angle de contact.....	107
3.1- Principe.....	107
3.2- Préparation de la suspension bactérienne.....	107
3.3- Filtration.....	108
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	109
1- Caractérisation de la surface des actinomycètes par la Méthode de MATS .....	109
1.1- Détermination du caractère hydrophobe /hydrophile des souches d'actinomycètes .....	109
1.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1 et 1,2M du KNO <sub>3</sub> .....	111
2-Caractérisation de la surface des actinomycètes par la méthode de l'Angle de contact .....	115
2.1- Hydrophobicité qualitative et quantitative de la surface des différentes souches.....	115
2.3- Détermination du caractère donneur /accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1M et 1,2M du KNO <sub>3</sub> .....	117
3- Influence de la méthode utilisée (MATS ou Angle de Contact) sur les mesures des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes .....	120
IV-CONCLUSION.....	125

Chapitre V : INFLUENCE DE CHLORURE DE SODIUM (NaCl) SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SURFACE CELLULAIRE DES ACTINOMYCETES..... 126

I-INTRODUCTION .....	126
II- MATERIELS ET METHODES .....	126
1- Souches bactériennes, conditions de culture et préparation de la suspension bactérienne.....	126
2- Détermination de l'hydrophobicité et des caractères donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode MATS .....	127
3- Détermination de l'hydrophobicité et des caractères donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode d'angle de contact.....	127
3.1- Préparation de la suspension bactérienne.....	127
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	127
1- Effet du sel sur la surface cellulaire des actinomycètes.....	127
1.1- Par la méthode de MATS .....	127
1.1.1- Détermination du caractère hydrophobe /hydrophile des souches d'actinomycètes.....	127
1.1.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1 et 1,2M du NaCl.....	130
1.2- Par la méthode de l'angle de contact .....	134
1.2.1- Détermination de l'hydrophobicité qualitative et quantitative de la surface des actinomycètes ...	134
1.2.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes.....	136
1.3- Effet du NaCl sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire. ....	138
1.4- Etude de l'impact de la nature du sel sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes .....	139

Chapitre VI : ETUDE DE L'ADHESION DES ACTINOMYCETES AU SOL ..... 141

I-INTRODUCTION .....	141
----------------------	-----

2-Mise au point d'une nouvelle technique pour la caractérisation de la surface des sols par la méthode d'angle de contact.....	141
2.1- Protocole.....	141
3- Adhésion prédictives des actinomycètes aux sols.....	142
4- Etude de l'adhésion des actinomycètes.....	142
4.1- Adhésion des actinomycètes au verre.....	142
4.1.1- Prétraitement des surfaces.....	143
4.1.2- Adhésion des actinomycètes au verre.....	143
4.1.3- Observation des cellules adhérentes au verre par microscope optique couplé à un ordinateur ...	143
4.1.4- Quantification de l'adhésion sur la surface du verre.....	143
4.2- Adhésion des actinomycètes aux sols.....	144
4.2.1- Protocole.....	144
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	145
1- Caractérisation physicochimiques des supports.....	145
1.1.1- Détermination de l'hydrophobicité et du caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface du verre.....	145
1.2- Caractérisation physicochimique de la surface du sol.....	145
1.2.1- Détermination de l'hydrophobicité de la surface des 11 sols étudiés.....	145
2- L'adhésion prédictive des actinomycètes aux supports.....	148
2.1- Adhésion prédictive des actinomycètes au verre.....	148
2.2-Adhésion prédictive des actinomycètes aux sols.....	150
3- Adhésion expérimentale des actinomycètes.....	154
3.1- Adhésion des actinomycètes au verre.....	154
3.2. Effet du temps de contact sur le taux d'adhésion des quatorze souches d'actinomycètes.....	159
3.3- Adhésion des actinomycètes aux sols.....	164
IV-CONCLUSION.....	169
CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES.....	171
Références.....	176
Annexes.....	191

## INTRODUCTION GENERALE

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive. Elles subissent des différenciations morphologiques durant leur cycle de vie. En conditions défavorables, tel qu'un déficit de nutriments, les actinomycètes sporulent. Ce n'est que lorsque les conditions redeviennent favorables que les spores peuvent germer et former de nouveau le mycélium végétatif. Cette propriété joue un rôle important dans leur distribution (Gottlieb, 1973).

Ces bactéries retiennent particulièrement notre attention et semblent être d'excellentes candidates productrices de substances à intérêt biotechnologique. Ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des composés organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases.

Les actinomycètes sont importants non seulement pour les industries pharmaceutiques mais aussi pour l'agriculture. Les actinomycètes halophiles et tolérants au sel sont des microorganismes extrémophiles qui se développent dans des environnements à très forte concentration en sel et occupent des environnements hypersalins dans le monde entier. Plusieurs genres et espèces de nouveaux actinomycètes halophiles ont été mentionnés dans la littérature (Tang *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2006). En fait, il y a 15 genres reconnus dans la famille (Gutierrez *et al.*, 2002). Des souches d'actinomycètes halophiles ont le potentiel de sécréter des enzymes extracellulaires (protéase, lipase, estérase, galactosidase, amylases, etc.). La superficie affectée par la salinité est estimée de 350 000 hectares dans plusieurs pays dont 35% de l'ensemble des terres au Maroc (Allawi, 2006). Cependant, peu de connaissances sont actuellement disponibles sur la diversité des actinomycètes dans les milieux salins.

La forme, la fonction et le métabolisme des microorganismes ainsi que leurs capacités à coloniser toutes sortes de milieu sont à la base d'une très grande variété de ces êtres vivants. De même ils sont dotés d'une capacité indéniable de s'adhérer à différentes surfaces et de former des Biofilms. Ainsi la compréhension des mécanismes d'adhésion et de formation des Biofilms nécessite d'avoir de très bonnes connaissances des caractéristiques énergétiques, de la composition de surfaces et du métabolisme des

microorganismes. Dans ce contexte, contrairement aux actinomycètes, nombreux les chercheurs qui ont étudié ce processus d'adhésion des différents microorganismes dans différents secteurs pouvant aboutir à la formation de Biofilm dans l'optique de le comprendre, et ceci pour finalement pouvoir le moduler. Pour cela, des auteurs comme Latrache *et al.* , (1994), Latrache *et al.* , (2001), Latrache *et al.* , (2002), Hamadi *et al* (2004) se sont mis à étudier les propriétés physicochimiques des surfaces cellulaires. Tandis que d'autres s'intéressaient aux propriétés des substrats (supports d'adhésion). S'ajoutent à ces deux aspects, l'étude portée sur les caractéristiques de milieu environnementale où se fera éventuellement l'adhésion.

Vu que les microorganismes sous l'état du biofilm deviennent plus résistants, plus pathogènes quand il s'agit d'un microorganisme nuisible; mais plus productif dans le cas des microorganismes utiles comme les actinomycètes ,et vue que les travaux effectués sur la surface des actinomycètes sont très rares, l'expertise acquise dans notre laboratoire de bioprocèdes et biointerfaces sera exploitée dans ce travail pour l'investigation du comportement adhésif des actinomycètes en relation avec les interactions physicochimiques interfaciales

Ce travail se décompose en trois parties :

**La première partie** de l'étude bibliographique s'articule :

- L'écologie et l'importance des actinomycètes dans les sols notamment les sols salins et les opportunités d'étudier les biofilms.
- Les Phénomènes de bioadhésion avec les méthodologies correspondantes
- Une revue de problème de salinité avec la situation réelle de la région de Béni Amir source de l'isolement des actinomycètes

- **La deuxième partie** reviendra sur les différentes méthodologies utilisées pour le travail microbiologique notamment la biologie moléculaire. Les différentes méthodes de caractérisation de surface et de mesure de l'adhésion sont aussi décrites dans cette partie.

- **La troisième partie** présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions Elle est divisée en six chapitres.

✓ **Le premier chapitre** est consacré aux méthodes d'isolement et l'étude de la diversité des actinomycètes du sol de la région de Béni Amir (Béni Mellal, Maroc).

- ✓ **Le deuxième chapitre** représente l'identification moléculaire des souches isolées, et leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques
  - ✓ **Le troisième chapitre** traite le criblage des actinomycètes à intérêt biotechnologique.
  - ✓ **Le quatrième chapitre** est dédié à la caractérisation des propriétés physicochimiques de surface des actinomycètes par les méthodes MATS et l'angle de contact.
  - ✓ **Le cinquième chapitre** dans l'objectif de rapprocher les bactéries des conditions du milieu de leur provenance, nous avons déterminé l'influence de chlorure du sodium sur les propriétés physicochimiques de surface des actinomycètes.
  - ✓ **Le sixième chapitre** traite l'étude de l'adhésion des actinomycètes au sol.
- Les conclusions** des travaux menés ainsi que les perspectives qui en découlent clôturent ce manuscrit.

## PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



**Chapitre I :**  
**Les actinomycètes du sol : écologie, et  
interaction environnement**

## 1- Introduction

Les actinomycètes appartiennent à la classe des Actinobacteria, bactéries à Gram positif de haut coefficient de Chargaff (%GC) : généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des Actinobacteria est grand et complexe (Ventura *et al.*, 2007, Zhi *et al.*, 2009, Stackebrandt *et al.*, 1997). Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens.

Le terme actinomycète a été historiquement introduit pour définir des bactéries filamenteuses et ramifiées (Waksman and Henrici, 1943, Larpent, 2000, Lange *et al.*, 1993), qui dans la classification actuelle des Actinobacteria appartiennent à l'ordre des actinomycétales. Les actinomycètes forment des colonies circulaires constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973, Lechevalier, 1981). Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs «aktino» et «mycètes» et signifie «champignons à rayons» ou « champignons rayonnant».

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec des champignons du fait de leur morphologie fongöide (présence de filaments ramifiés, sporulation) (Reponen *et al.*, 1998), ainsi que de l'allure mycosique des maladies que certains provoquent (Gazenko *et al.*, 1998). Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques les rangent sans ambiguïté parmi les procaryotes (Becker *et al.*, 1965, Lechevalier, 1981). Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des actinophages et à des antibactériens, qui confirment le bien-fondé de la classification des actinomycètes parmi les bactéries (Mariat and M., 1990). Leur analyse génomique a par la suite confirmé cette classification (Stackebrandt *et al.*, 1997). Ainsi, les similarités morphologiques des actinomycètes et des champignons apparaissent plutôt liées au fait que ces microorganismes colonisent des écosystèmes voisins (en particulier le sol), et ont donc développé au cours de l'évolution des modes de reproduction, de dissémination et de croissance voisins.

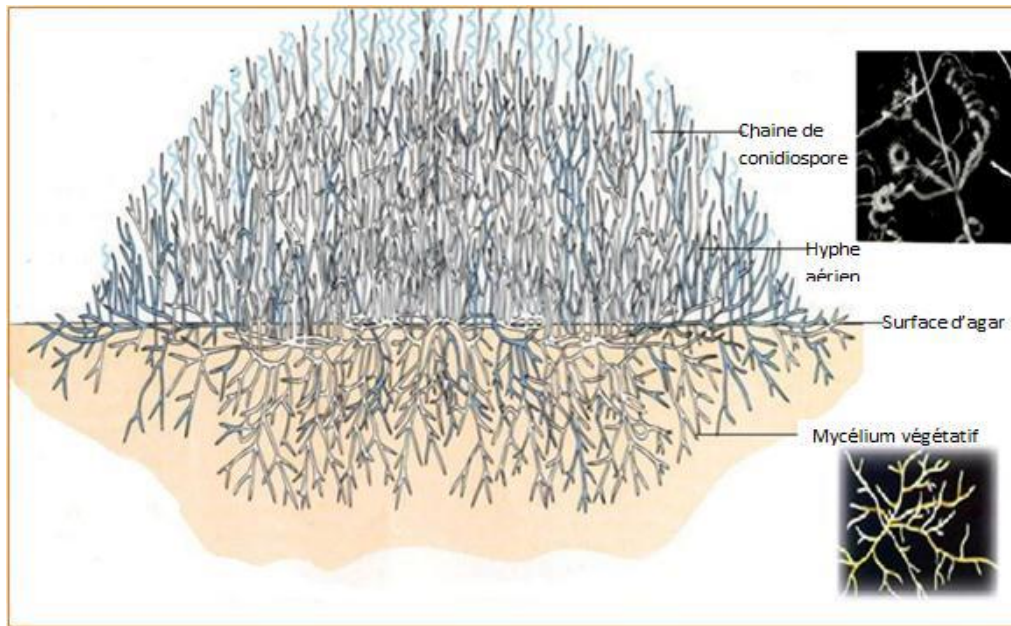
## 2- Historique

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui va de 1877 à 1890 environ, a été nommée « période médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (Baldacci, 1962). La seconde période (1900-1940) (Mariat and M., 1990) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de (Lieske, 1921, Orskov, 2012). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en **1940** et le nom de **Waksman** lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Sanglier and Trujill, 1997). Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites (Baldacci, 1962). Ainsi, la période suivante (1940- 1970) peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques. Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par **Hopwood** (Chater, 1999, Hopwood and Merrick, 1977) puis de génomique (Hopwood, 2003 ) a révolutionné la classification des espèces (Ventura *et al.*, 2007) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires (Donadio *et al.*, 2002) et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

## 3- Morphologie

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (Prescott, 2010). Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$ , est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) (Gottlieb, 1973). Le mycélium des actinomycètes présente une grande diversité de morphologies (figure 1).



**Figure 1:** Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec le mycélium végétatif et le mycélium aérien (Qin *et al.*, 2016).

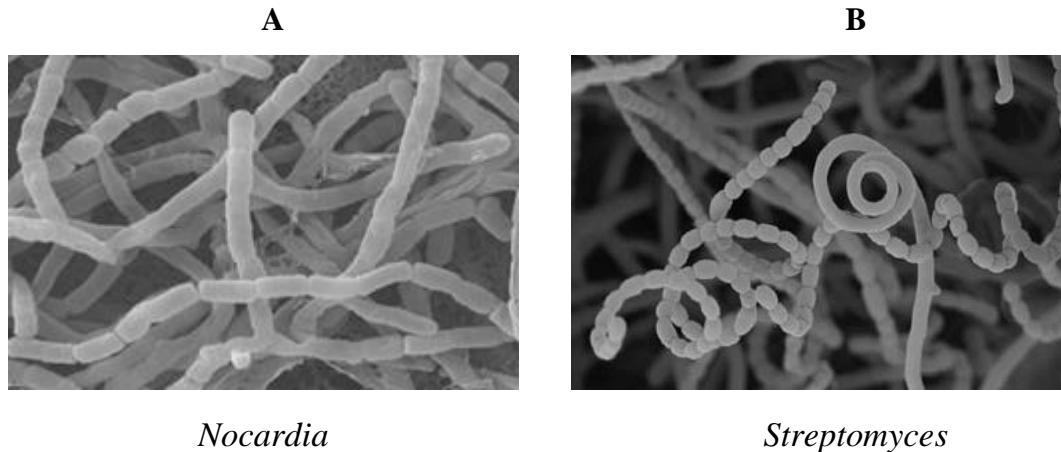
Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien (Figure 1). On distingue trois cas :

-Soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*). La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique : il renferme un cytoplasme commun multi-nucléoïde, et est donc dépourvu de septum.

-Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûri en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.

-Soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachés au substratum par des crampons

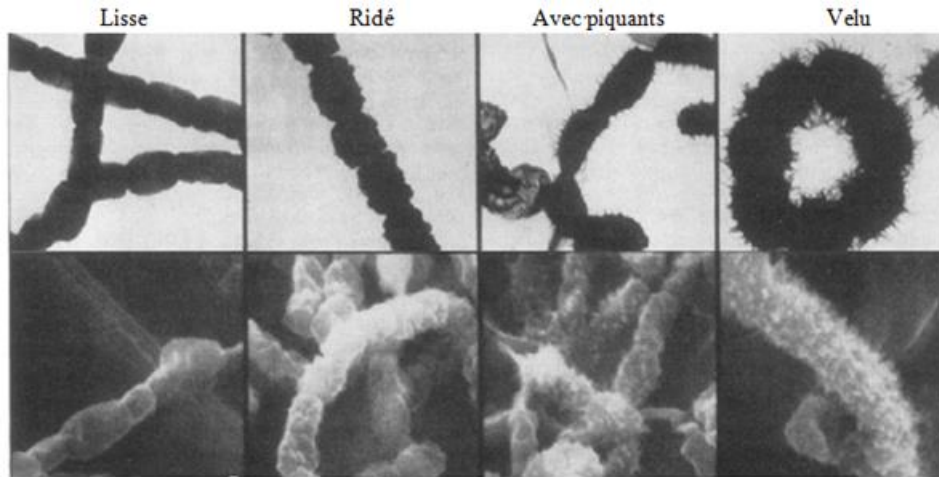
On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*), et enfin des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Les mycéliums fragmentaire et permanent sont illustrés sur la figure 2.



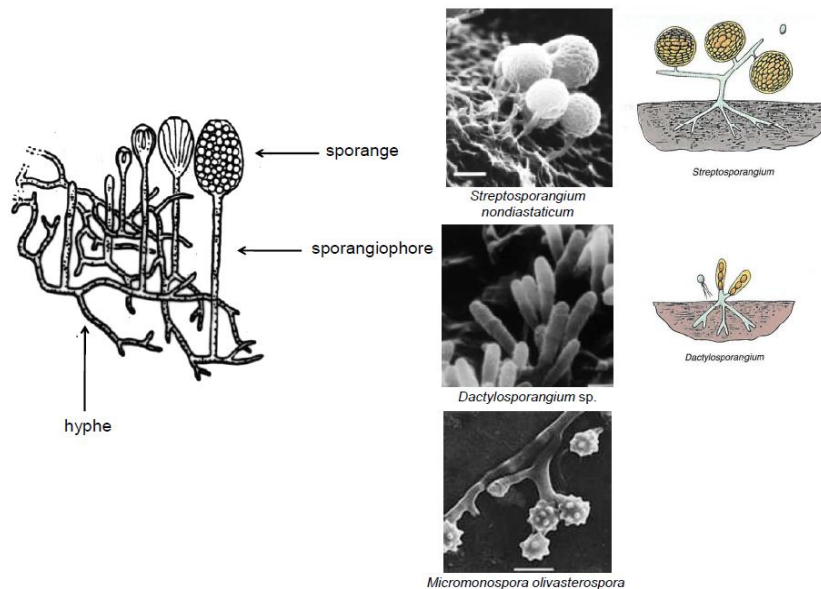
**Figure 2 :** Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes((Velho-Pereira and Kamat, 2010). (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

➤ **Production des spores**

Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Les spores peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu (Figure 3). Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporange : compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (Figure 4). Les sporanges contiennent quelques plusieurs milliers de spores, formant des chaînes enroulées ou parallèles.



**Figure 3 :** Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (Lyons and Pridham, 1971, Dietz and Mathews, 1971)



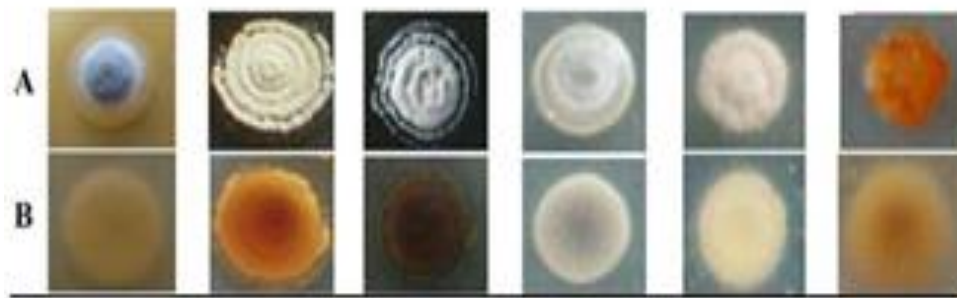
**Figure 4:** Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes (Belyagoubi, 2014)

#### ➤ Culture sur milieu solide

Les colonies formées sur milieu solide par les actinomycètes sont très particulières.

Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm.

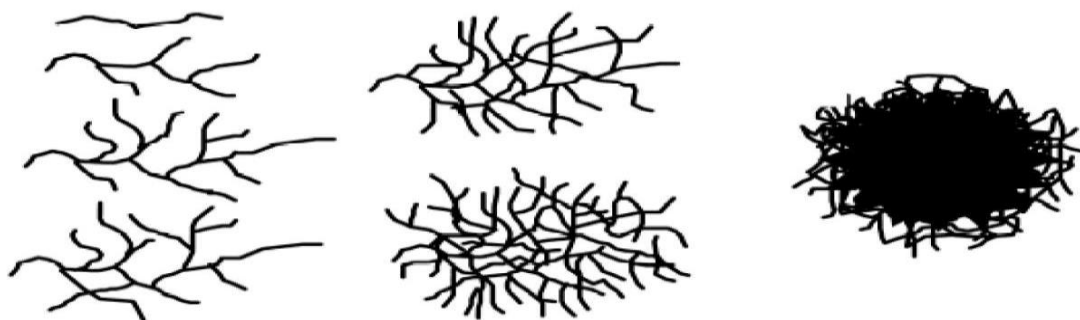
L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisses ou échancrés. Les colonies sont souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc... (Figure 5)



**Figure 5:** Exemple de colonies d'actinomycètes (Arul Jose and Jebakumar, 2013)  
 A : Vue du mycélium aérien de la colonie ; B : Vue du mycélium du substrat.

➤ **Culture sur milieu liquide**

En culture liquide sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (van Keulen *et al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'entremêlent pour former des agrégats (Figure 6). Ces derniers, généralement sphériques sont composés d'une masse dense d'hyphes enroulés. Les cellules du centre étant privées de nutriments, les agrégats grossissent seulement par la formation de cellules à la surface de la sphère (Reichl *et al.*, 1992, Tamura *et al.*, 1997).



**Mycélium libre**

**Enchevêtrements**

**Pelote**

**Figure 6 :** Hyphes d'actinomycètes, rencontrées dans une culture liquide (Almaris *et al.*, 2007).  
 (Pamboukian *et al.*, 2002).

Enfin, il existe d'autres structures morphologiques plus atypiques. Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

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

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

Des vésicules appelées **sporangés**, contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé. Ils sont présents chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (Theilleux *et al.*, 1993).

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

- Une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
- Une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- Chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- Longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;

Conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées) (Belyagoubi, 2014).

#### 4- Physiologie de développement

La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier : l'oxygène, le pH et la température.

##### ➤ Oxygène

On peut classer les actinomycètes selon leurs types respiratoires en deux groupes :

-Les formes fermentatives anaérobies strictes ou facultatives, représentées par le genre type actinomyces, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs(Le Minor *et al.*, 1989).Ils font partie de la flore de veillons (Avril, 1992).

- Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol(Avril, 1992).



➤ **pH**

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8, mais on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieurs à 4 (McKinney and Gammie, 2004), telle est le cas pour les souches acidophiles tel que : *Streptacidiphilus jiangxiensis* (Huang *et al.*, 2004) et *Streptacidiphilus oryzae* (Wang and Song, 2006).

➤ **Température**

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. La température optimale de croissance est entre 25 à 30 °C. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50 et 60°C. (Rangaswami *et al.*, 2004). Ces organismes avaient été distingués de leurs homologues thermophiles appartenant au genre *Thermomonospora* 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* (Kim *et al.*, 2000) et même psychrophiles (Holt and Lawton, 1994).

➤ **Activité de l'eau (Aw)**

La germination des spores de la pluparts des actinomycètes, peut-être observée à des valeurs d'activité d'eau supérieures ou égales à 0.67, l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égale à 0,98 (Zvyagintsev *et al.*, 2005). En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Oskay *et al.*, 2004, Prescott, 2010).

➤ **Tolérance en NaCl**

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

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

(P/V) ; et les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (Messaoudi *et al.*, 2012).

Différentes stratégies sont suivies par les microorganismes halophiles pour assurer l'osmo-régulation de leurs cytoplasmes tout en gardant une concentration faible en ions de sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Oren, 2002).

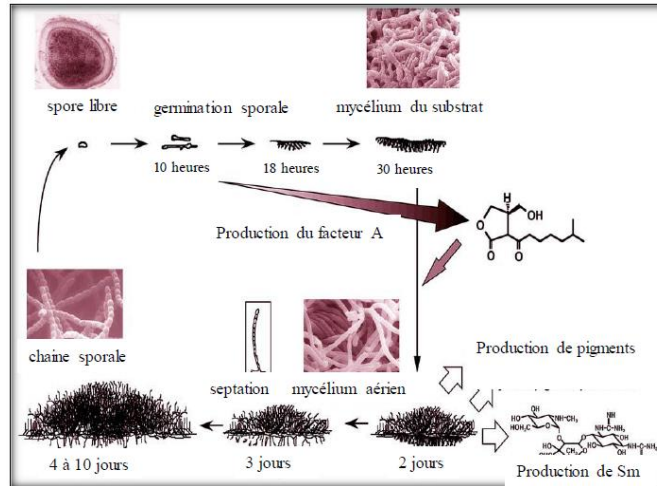
- La première consiste à l'accumulation des ions de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans leur cytoplasme sous forme de KCl, à des concentrations plus élevées que la concentration de NaCl présente tout autour du milieu. Ce mode d'adaptation est énergétiquement moins coûteux.

- La seconde agit par exclusion des différents ions présents dans le cytoplasme, par des pompes, tout en accumulant des solutés organiques pour maintenir l'équilibre osmotique. Les différents solutés organiques utilisés sont : glycérol, betaine, ectoine, les sucres comme le saccharose et le tréhalose (Galinski, 1995). Ce mode est énergétiquement coûteux à cause du coût de la synthèse des molécules organiques(Oren, 2002).

## 5- Cycle de vie

Le cycle le plus étudié est celui de genre *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la figure 7 (Flärdh and Buttner, 2009).

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent, pendant la phase de limitations nutritionnelles, une famille de protéines du type  $\gamma$ - butyrolactone((Saffroy, 2006).Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques (Demain and Dijkhuizen, 2006).



**Figure 7 :** Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002)

## 6- Taxonomie des Actinomycètes

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al.*, 2004) (Tableau 1), les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales ((Larpent, 2000) La classe des Actinobacteria se présente comme suit :

**Tableau 1 :** Classification des actinomycetes selon "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al.*, 2004)

Classe Actinobacteria		
Sous-classe	Ordre	Famille
Acidimicrobidae	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae
Rubrobacteridae	Rubro bacté rales	Rubrobacteraceae
Coriobacteridae	Coriobact é rales	Coriobacteriaceae
Sphaerobacteridae	Sphaerobact é rales	Sphaerobacteraceae
Actinobacteridae	Actinobact é riales	

La classification des actinomycètes est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, chimiotaxonomiques et génétiques.

### 6.1- Caractère Chimiotaxonomique

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes.

Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. L'examen des acides aminés de la paroi cellulaire, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (O'Donnell *et al.*, 1982, O'DONNELL, 1985). Cette approche taxonomique a permis une grande avancée dans la classification des actinomycètes.

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée soit d'une :

-Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces* (Becker *et al.*, 1965)

-Glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide diaminopimélique DAP ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tels que les *Streptomyces*.

Le peptidoglycane des actinomycètes est constitué sur le même modèle que celui des autres bactéries. En effet, il y a alternance des unités glucosamines et de l'acide muramique, liées par des liaisons (1-4) (Kandler, 1970).

Les chaînes des glycanes sont reliées entre elles par des sous-unités peptidiques dont la composition en acides aminés est variable ainsi que les liaisons entre ces acides aminés, ce qui explique l'existence de différents peptidoglycanes chez les actinomycètes.

En dépit de l'uniformité générale du glycane, des structures atypiques ont été signalées, notamment le remplacement de l'acide N-acétylmuramique par l'acide N-glycolmuramique (CH<sub>3</sub>-CO- remplacé par OHCH<sub>2</sub>CO-) voir Tableau 2 (Kandler, 1970).

**Tableau 2 :** Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes

<b>Type d'acétyle</b>	<b>Taxon</b>
Acide N-Glycolylmuramique	<i>Mycobacterium, Nocardia Rhodococcus, Actinoplanes, Amorphosporangium, Ampullariella, Dactylosporangium, Micromonospora, Corynebacterium</i>
Acide N-Acetylmuramique	<i>Actinomadura, Oerskovia, Streptomyces, Corynebacterium</i>

#### **- Composition en aminoacides**

L'alternance des acides aminés de la forme L et D dans la séquence tétrapeptidique du peptidoglycane renforce la dureté de la paroi (les hétéropolymères sont plus solides que les homopolymères). Cette structure permet aux acides aminés de s'aligner de telle sorte que les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se former. De plus, la présence des acides aminés de la forme D et l'absence d'acides aminés aromatiques rendent le peptidoglycane inattaquable par les L-protéases. Le tableau 3 résume les critères de classification des différents peptidoglycans des actinomycètes.

**Tableau 3** : Classification des peptidoglycanes des actinomycètes d'après (Rogers et Becker 1980).

Position de la Liaison interpeptidique	Pont peptidique	Aminoacide en position 3
<b>Peptidoglycane A</b> Liaison interpeptidique en position 3 et 4.	1- Liaison simple 2- Polymère peptidique 3- L-acide aminé Monocarboxylique glycine ou oligopeptides 4- Contient un acide aminé dicarboxylique	$\alpha$ L-Lysine $\beta$ L- ornithine Acide mesodiaminopimélique $\alpha$ L-lysine $\alpha$ L-lysine $\beta$ L-ornithine Acide LL-diaminopimélique $\alpha$ L-lysine $\beta$ L-ornithine Acide mésodiaminopimélique Acide L-diaminobutyrique
<b>Peptidoglycane B</b> Liaison interpeptidique en position 2 et 4.	1- Contient un L-amino acide 2- Contient un D-amino acide	$\alpha$ L-lysine $\beta$ L-homoserine Acide L-glutamique L-alanine $\alpha$ L-ornithine L-homoserine Acide L-diaminobutyrique

#### - Composition en sucres

Les glucides de la paroi ou de l'hydrolysate cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs ( (Lechevalier, 1968). Le **spectre de sucre A** (arabinose, galactose) est caractéristique de la grande majorité des nocardioformes (*Nocardia*, *Saccharopolyspora*). Le **spectre glucidique B** (madurose, 3-O-méthyl-D-galactose) est présent chez les maduromycetes (*Actinomadura*, *Streptosporangium*). Les streptomycetes et apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (**spectre C**). Il en est de même chez les *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (**spectre D**) est caractéristique du type principal des actinoplanetes (*Actinoplane*, *Micromonospora*). La combinaison du type d'acide aminé du peptidoglycane et du spectre de glucides permet un classement en groupes principaux (Tableau 4) (Lechevalier and Lechevalier, 1970).

**Tableau 4** : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes ( (Lechevalier and Lechevalier, 1970).

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

a) Ac. 2,6-diaminopimélique ; b) Ac. 2,4-diaminobutirique.

#### - Composition en lipides

Les lipides importants en taxonomie peuvent être divisés en trois groupes :

- Les acides gras : Les acides gras qui constituent la paroi des actinomycètes sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, des molécules saturées ou insaturées avec la présence éventuelle de groupes cyclopropane. Les plus communs chez les actinomycètes appartiennent soit à un groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (*Nocardia* : 46 à 60).

- Les ménaquinones : Elles sont classées en fonction du nombre d'unités isoprènes et du nombre de doubles liaisons. Dans le groupe des genres dont les parois contiennent du LL-DAP, le genre *Nocardioides* se caractérise par du MK-8(H4) alors que le genre *Streptomyces* synthétise principalement du MK-9(H6). Le genre *Thermoactinomyces* est caractérisé par la présence de MK-7.

- Les lipides polaires : Les lipides polaires les plus communs chez les actinomycètes sont les Phospholipides.

#### 6.2- Caractères génétiques

Dès 1936, Kluyver et Van Niel proposaient l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique, mais les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie

n'étaient pas disponibles et il fallut attendre la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle pour qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

### **6.2.1 - Détermination du (G+C %)**

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, ont montré que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN.

### **6.2.2 - Séquençage de l'ADN ribosomique 16S**

C'est une technique très fiable pour l'identification des actinomycètes (Weisburg *et al.*, 1991, Cook and Meyers, 2003); Stackebrandt et ces collaborateurs (1981, 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinomycètes. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes.

L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Cette analyse de l'ADNr 16S a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe) (Rainey *et al.*, 1996, Labeda and Kroppenstedt, 2000).

### **6.2.3- Les hybridations ADN-ADN**

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries



ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses (Smaoui, 2010).

## 7- Distribution et rôle écologique des actinomycètes

### 7.1- Milieu et mode de vie

Les actinomycètes constituent un groupe adapté à divers milieux écologiques (Tableau 5), y compris les plus extrêmes : sols (sols cultivés, sols polaires gelés, sols désertiques chauds et secs, sols des régions polluées par du pétrole et les sols hautement contaminés avec des métaux lourds), eaux (rivières, lacs extrêmement alcalins et les lacs salés, mers et océans...), air, chotts salés, fumiers et composts, débris végétaux et litières... (Sabaou *et al.*, 1998).

Deux genres sont bien représentés au niveau du sol : le genre *Streptomyces* et le genre *Nocardia*. Les *Streptomyces* à eux seuls peuvent représenter presque 70 à 90% de l'ensemble de la micropopulation d'actinomycètes du sol ( Dommergues and Mangenot, 1970, Williams and Vickers, 1988). Au niveau aquatique, les genres *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* et *Thermoactinomyces* sont les plus fréquemment rencontrés (Breton *et al.*, 1989). Ils présentent une petite partie de la flore bactérienne totale de l'environnement marin et leur nombre dans les régions côtières est plus élevé que celui du large et des fonds marins (Okami and Okazaki, 1978).

**Tableau 5 :** Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat d'après (Goodfellow and Williams, 1983).

<b>Genre</b>	<b>Habitat</b>
<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

Les actinomycètes sont en grande majorité des saprophytes, connus pour leur aptitude à dégrader la matière organique sous forme polymérique notamment la kératine, la cellulose (Kluepfel *et al.*, 1986) et les lignines (McCarthy and Broda, 1984) Ils participent aussi au cycle de l'azote atmosphérique. Certaines formes sont parasites et d'autres sont symbiotiques (Bignell *et al.*, 1981, Goodfellow and Williams, 1983, Williams and Vickers, 1988).

La plupart des actinomycètes sont des organismes du sol et se trouvent aussi bien au niveau de la surface du sol qu'à plus de 2 mètres de profondeur (Breton *et al.*, 1989). Leur densité dans le sol est de  $10^6$ - $10^9$  cellules par gramme selon les biotopes et les conditions climatiques (Goodfellow and Williams, 1983). Leur abondance est influencée par plusieurs paramètres physicochimiques du sol. En effet, la température, le pH et l'humidité des sols régissent leur croissance. Ils peuvent se conserver durant de longues périodes grâce aux spores. La germination de ces dernières dépend étroitement de la nature des éléments nutritifs exogènes.

## **7.2-Rôle écologique des Actinomycètes**

Pendant longtemps, la fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes a été considérée comme négligeable à cause de la lenteur de leur croissance et de leur faible pouvoir compétitif. Il semble, au contraire que leur action soit très importante au niveau écologique :

### **7.2.1-Dégradation des substances organiques**

La fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (Prescott, 2010). Les actinomycètes, fort nombreux dans les sols, se joignent aux autres bactéries et aux champignons comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus (Dommergues and Mangenot, 1970). Ils prolifèrent surtout quand l'action des autres bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action.

Comme ils produisent plusieurs enzymes extracellulaires dans le sol, les actinomycètes sont capables de dégrader les substances les plus récalcitrantes à savoir la cellulose et la lignine ( (McCarthy and Broda, 1984, Kluepfel *et al.*, 1986, Kitouni *et al.*, 2005).

### **7.2.2- Production des substances probiotiques, antibiotiques ou toxiques**

Parmi les substances probiotiques produites par les actinomycètes, (Krasil'nikov, 1958) cite les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique. La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes (50 à 75% des souches isolées sont productrices d'antibiotiques) ce qui a un effet sur les interrelations entre les microorganismes. Certaines synthétisent des substances toxiques pour les plantes ou au contraire, stimulent leur croissance (Dommergues and Mangenot, 1970).

De nombreuses espèces répandent des odeurs caractéristiques (odeur de terre fraîchement labourée, de moisi, de camphre, de fruits) dont la nature chimique est mal connue.

### **7.2.3- Fixation de l'azote atmosphérique**

Les actinomycètes du genre *Frankia* vivent en association avec de nombreux arbres et arbrisseaux tels que les aulnes. Ils pénètrent dans les cellules des racines qu'ils déforment et y produisent des nodules où l'azote gazeux est fixé grâce à une nitrogénase (Baker and Okami, 1988).

## **8- Rôle des actinomycètes en biotechnologie**

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires.

### **8.1- Sécrétion des antibiotiques**

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part dominante dans l'industrie pharmaceutique, représentant près de 25% de son chiffre d'affaire.

Les tableaux 6 et 7 illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes.

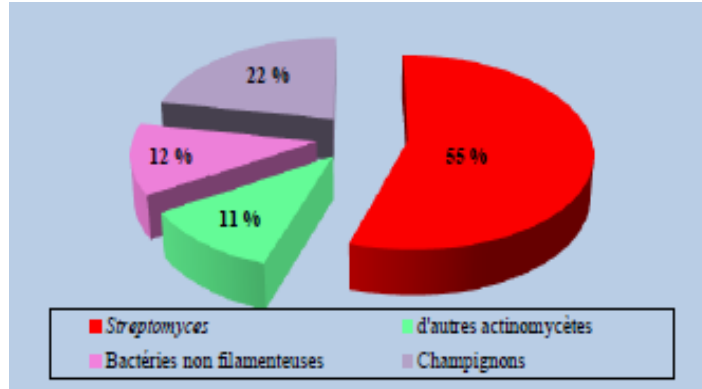
En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (Sanasam and Ningihoujam, 2010), et la souche *Streptomyces*

*rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis de dermatophyte *Trichophyton rubrum* (Lakshmipathy and Krishnan, 2009).

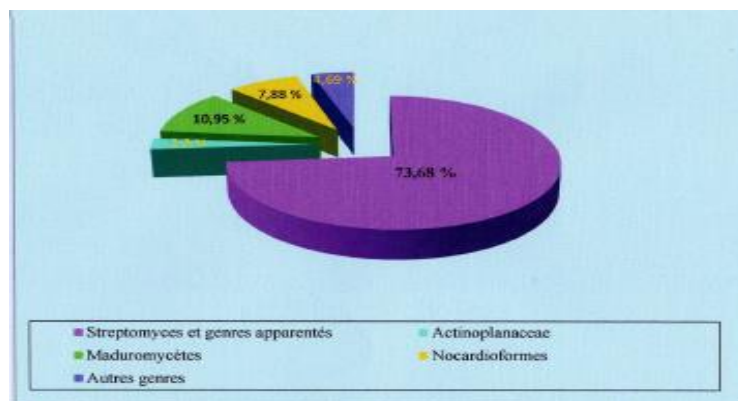
**Tableau 6** : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes

Molécules bioactives	Actinomycète producteur	Références
<b>1/ Les agents antiparasitaires</b>		
Trioxacarcine	<i>Streptomyces sp</i>	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Prodiginine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Williamson <i>et al.</i> , 2006
<b>2/ Les agents anti viraux</b>		
9-β-Darabinofuranosyladénine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Madigan <i>et al.</i> , 1997
Panosialine	<i>Streptomyces sp</i>	Aoyagi <i>et al.</i> , 2006
<b>3/ L'agent hypocholestérolémique</b>		
Rapamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1999
<b>4/ Les agents anti tumoraux</b>		
Asterobactine	<i>Nocardia asteroides</i>	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Fenical <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmycine	<i>Thermoactinomyces sp</i>	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
Marinomycine	<i>Marinospora sp</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Borrelidine	<i>Streptomyces sp</i>	Vino et Lokesh, 2008
IB-00208	<i>Actinomadura sp</i>	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2009
<b>5/ Les agents immunostimulateurs</b>		
Rubratin	<i>Nocardia rubra</i>	De boer <i>et al.</i> , 2000
Bestatine	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Ichinose <i>et al.</i> , 2003
FR-900494	<i>Kitasatosporia kifunense</i>	Iwami <i>et al.</i> , 2006
<b>6/ Les agents immunosuppresseurs</b>		
Pentalenolactone	<i>Streptomyces filipinensis</i>	Uyeda <i>et al.</i> , 2001
Brasilicardine A	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Komatsu <i>et al.</i> , 2005
<b>7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale)</b>		
L- asparaginase	<i>Streptomyces spp</i>	Saleem Basha <i>et al.</i> , 2009
L- glutaminase	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Balagurunatha <i>et al.</i> , 2010

Les figures 8 et 9 représentent respectivement la répartition de production d'antibiotiques entre les bactéries et les champignons, et celles des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres d'actinomycètes dont la dominance de production est affectée aux bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.



**Figure 8** : Répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005).



**Figure 9** : Répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et genres apparentés, et d'autres genres actinomycétales (Sanglier and Trujill, 1997)

## 8.2- Sécrétion des extrêmozymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes. Ces enzymes peuvent avoir des applications médicales, en biologie moléculaire, en industrie alimentaire ou celle des détergents, ...etc.

Les enzymes isolées à partir des actinomycètes des environnements extrêmes, dites actinomycètes extrémophiles, sont commercialement très importantes.

Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les actinomycètes extrémophiles sont résumés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les actinomycètes**

Actinomycètes extrêmophiles	Extrêmozymes	T opt	pH opt	Références
<b>1/ Actinomycètes Alkalithermophiles</b>				
<i>Streptomyces sp</i>	Cellulase	60 °C	8	Aboul-Enein <i>et al.</i> 2010
<i>Streptomyces sp</i>	Kératinase	50 °C	8,5	Korkmaz <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces sp</i>	Endocellulase	50 °C	8	Van Soulinger <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces anulatus</i>	Dextranase	50 °C	8	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermomonospora sp</i>	Endocellulase	50 °C Stabilité à pH = [7-10] t½ vie : 3 heures à 70		George <i>et al.</i> , 2001
<b>2/ Actinomycète thermophile</b>				
<i>Streptomyces spp</i>	Glucose isomérase	70 °C	6,9	Dhungel <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces sp</i>	Xylanase	60 °C	6,5	Rawashdehet <i>al.</i> , 2005
<b>3/ Actinomycète alkaliphile</b>				
<i>Streptomyces fradiae</i>	Aminopéptidase		10	Vitale, 1999
<b>4/ Actinomycète halo-alkaliphile</b>		<b>NaCl</b>	<b>pH opt</b>	
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Protéase	5 %	9	Thumar et Singh, 2007
<b>5/ Actinomycète psychrotrophe</b>		<b>T opt</b>	<b>Stabilité thermique de l'enzyme</b>	
<i>Streptomyces sp</i>	Alpha-amylase	15 °C	T=[5-20] °C	Cotarlet et al, 2010

### 8.3-L'utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides

Les actinomycètes sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (Voir Tableau 8)

**Tableau 8** : Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes

<b>Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
Spinosad. Insecticide neurotoxique	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Williamson <i>et al.</i> , 2006
Herbicides. <b>Exemple 1.</b> 2,4-Dihydro-4-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one	<i>Actinomadura sp</i>	Schmitzer <i>et al.</i> , 2000
<b>Exemple 2.</b> Herbimycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Omura <i>et al.</i> , 2006

#### 8.4- Biotechnologie des microorganismes halophiles

Les microorganismes halophiles avaient trouvé plusieurs applications en biotechnologie. Certaines de ces applications existent depuis des siècles, avant même la compréhension des processus microbiens.

Dans les années récentes, le nombre des microorganismes halophiles utilisés en biotechnologie avait augmenté et des applications nouvelles sont en voie de développement.

L'utilisation des halophiles en biotechnologie peut être divisée en trois catégories (Oren, 2002).

**Catégorie I :** L'halo-tolérance de plusieurs enzymes, extraits de microorganismes enzymatiques, requière une faible activité d'eau : c'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel.

**Catégorie II :** Certains stabilisateurs osmotiques présentent des applications intéressantes (éctoine et hydroxéctoine).

**Catégorie III :** Certains microorganismes halophiles peuvent produire des composés de valeur, le plus souvent sans aucune connexion directe avec leurs propriétés halophiles. Ces composés sont également produits par des microorganismes non halophiles, mais les halophiles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement de processus biotechnologiques de production.

## **9-Biofilm des actinomycètes : état de l'art**

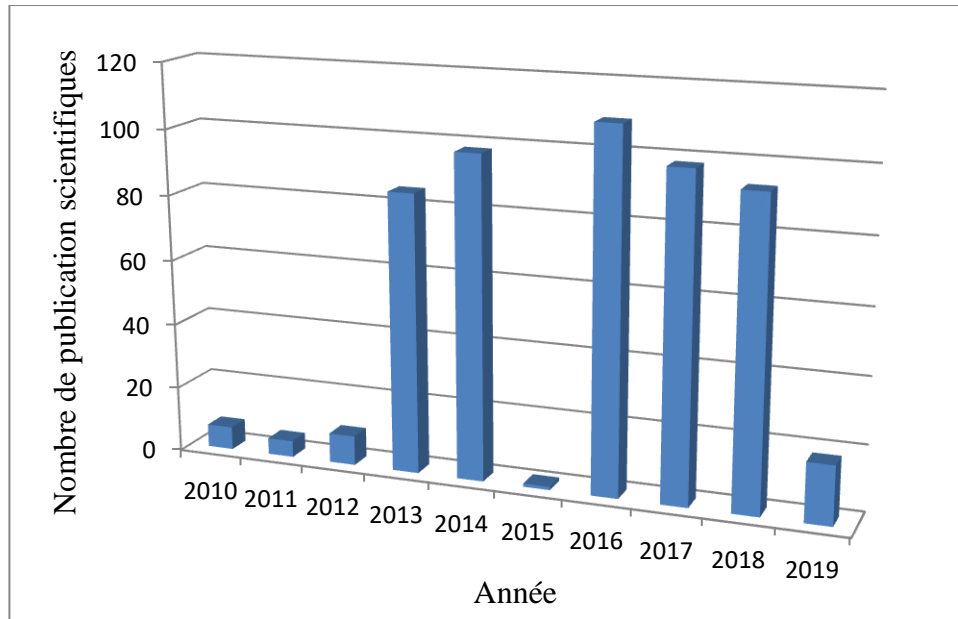
Les études sur les biofilms (Figure 10) des actinomycètes sont peu nombreuses et concernent en général les espèces pathogènes telles que *Nocardia* et quelques *streptomyces* pathogènes.

Les différents travaux concernant l'étude des biofilms des actinomycètes sont résumés dans le Tableau 9 :



**Tableau 9** : Revue des différents travaux concernant l'étude des biofilms des actinomycètes

Microorganismes étudiés	Objectif	Domaine	Références
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Décrire la morphologie des colonies de biofilm <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> qui ont été développées et attachées sur les surfaces en verre et en plastique ; et aussi étudier la dynamique du détachement des cellules de biofilm.	Médicale	Jeffrey B. Kaplan <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> CU1000	Description d'un quatrième mutant d'insertion de transposon d' <i>A. Actinomycetemcomitans</i> qui présente une carence en détachement de cellules de biofilm et en dispersion de biofilm.	Microbiologie	Jeffrey B. Kaplan <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> CU1000	Description d'un quatrième mutant d'insertion de transposon d' <i>A. Actinomycetemcomitans</i> qui présente une carence en détachement de cellules de biofilm et en dispersion de biofilm.	Microbiologie	Jeffrey B. Kaplan <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinomycete Rhodococcus ruber</i>	Surveiller la cinétique de la formation de biofilm par la souche C208 sur du polystyrène, déterminer l'activité physiologique du biofilm et analyser sa capacité à dégrader le polystyrène.	Microbiologie	Mor, R., & Sivan, A. (2008)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Décrire les modèles de colonisation et d'analyser la dynamique de la population de <i>A. naeslundii</i> par rapport à celle des streptocoques et d'autres bactéries, au cours des 6, 12, 24 et 48 h initiales de la formation de biofilm.	Médicale	Dige and al., 2009
<i>Actinomycetes</i>	Identifier de puissants inhibiteurs du biofilm à partir du criblage à haut débit d'une bibliothèque d'actinomycètes contre <i>S. aureus</i> .	Médicale	Joo-Hyeon Park <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptomyces A4, Nocardia s C15 et Nocardia C17</i>	Évaluer l'activité antibactérienne de la nystatine et son effet sur les biofilms générés par des actinomycètes isolés à partir de prélèvements endocervicaux d'utilisateurs de DIU.	Médicale	Santhanam Shanmughapriya <i>and al.</i> , 2012
<i>Actinomycete Rhodococcus</i>	la contribution de l'ADN extracellulaire à la formation et à la stabilité de biofilms.	Microbiologie	Gilan, I., & Sivan, A. (2013)
<i>Actinomycete Rhodococcus ruber C208</i>	l'effet de fructanes, les glucanes et un mélange des deux fructanes et des glucanes, synthétisés <i>in situ</i> par fructosyltransférase immobilisée ou glucosyltransférase, sur l'adhérence <i>Actinomyces viscosus</i> à des billes d'hydroxyapatite enrobées de salive humaine.	Microbiologie	Gilan, I., & Sivan, A. (2013)
<i>Actinomycètes associé de corail CAA-3.</i>	évaluer l'effet d'un actinomycète associé au corail (CAA) - 3 sur les biofilms de <i>S. aureus</i> , <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	Médicale	Dhamodharan Bakkiyaraj <i>et al.</i> 2014
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Présenter les avantages uniques de la microscopie à force atomique (AFM) dans l'étude des surfaces de biofilms par des analyses des images de hauteur Obtenu sur des biofilms.	Médicale	Susmita Chatterjee <i>etal.</i> , 2014



**Figure 10** : Évolution du nombre de publications par an dans lesquelles le mot « actinomycètes biofilm » apparaît dans le titre, le résumé ou en mot clef (PubMed)

**Chapitre II :**  
**Mécanismes physico-chimiques impliqués  
dans l'adhésion des microorganismes aux  
surfaces**

## 1- Les théories prédictives de l'adhésion

L'adhésion des microorganismes aux supports solides est un phénomène de nature physicochimique. Ce processus est le résultat des interactions physico-chimiques (Van der Waals, électrostatiques, et acido-basiques) entre la surface de substrat et la surface cellulaire. Il existe trois approches pour l'explication de l'adhésion microbienne aux surfaces ((Van Oss, 1996) (Bellon-Fontaine and Cerf, 1991).

- Approche thermodynamique : Elle ne prend en compte que les interactions non électrostatiques.
- Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO : Elle prend en compte les interactions électrostatiques ainsi que les interactions de Lifshitz-Van der Waals.
- Théorie de DLVO développée par Van Oss (Extended DLVO) : La théorie DLVO étendue prend en compte les trois types d'interactions fondamentales (Lifshitz-Van der Waals, acide-base de Lewis et électrostatiques).

### 1.1- Approche thermodynamique

Cette approche considère le processus d'adhésion comme la création d'une nouvelle interface entre le substrat, le microorganisme (MS) et la destruction des deux premières interfaces : Microorganismes et liquide (ML) et solide- liquide (SL).

La tendance pour qu'il y ait une association des deux surfaces est exprimée comme un équilibre de l'énergie libre interfaciale ( $\gamma$ ) :  $\Delta G_{adh} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL}$  (1) Où  $\gamma$  représente la tension superficielle (énergie libre interfaciale) et les indices S, M et L sont relatifs à la surface réceptrice, microorganisme et liquide de suspension (Van Oss, 1996).

Les énergies libres interfaciales intervenant dans l'équation (1) ne sont pas directement mesurables. Plusieurs approches théoriques ont été proposées pour déterminer ces énergies interfaciales. Toutes ces approches sont basées sur les mesures de l'angle de contact entre la surface solide ou tapis d'un microorganisme et le liquide de tension superficielle connue (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990, Busscher *et al.*, 1990, Van Oss, 1996).

L'angle de contact avec le liquide peut être simplement mesuré en posant des  $\mu$ l de gouttelettes de liquide sur la surface.

Parmi les approches théoriques, on peut citer : l'angle de contact qui peut être relié à l'énergie libre de la surface selon l'équation de Young :  $\gamma_{LV}\cos\theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$  (2)

Où  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  et  $\gamma_{LV}$  sont respectivement les tensions interfaciales entre le substrat solide S et la phase vapeur V, entre S et le liquide L et entre L et V ;  $\theta$  représente l'angle de contact sur le solide ( Absolom *et al.*, 1983, Neumann *et al.*, 1974).

$\gamma_{LV}$  et  $\gamma$  sont les seuls paramètres qui peuvent être déterminés expérimentalement. Alors une relation entre tous les paramètres apparaît nécessaire.

Une équation d'état qui permet de relier ces paramètres (Ward, 1974) :

$$\gamma_{SL} = f(\gamma_{SV}, \gamma_{LV}). \quad (3).$$

L'utilisation des données expérimentales de l'angle de contact et la tension interfaciale du liquide vapeur permet d'aboutir à l'équation suivante ( Neumann *et al.*, 1974) :

$$\gamma_{SL} = [(\gamma_{SV})^{1/2} - (\gamma_{LV})^{1/2}] / (1 - 0.015(\gamma_{SV}\gamma_{LV})^{1/2}) \quad (4).$$

(2) et (4) impliquent que  $\cos\theta = [(0.015\gamma_{SV} - 2)(\gamma_{SV}\gamma_{LV})^{1/2} + \gamma_{LV}] / (0.015\gamma_{LV})$  (5)

Alors d'après l'équation (5)  $\gamma_{SV}$  et  $\gamma_{SL}$  peuvent être déterminées. De la même manière  $\gamma_{BL}$  et  $\gamma_{BS}$  peuvent être calculées.

L'adhésion microbienne est favorable lorsque  $\Delta G_{adh}$  est négative et défavorable lorsque  $\Delta G_{adh}$  est positive. La description de l'adhésion par l'approche thermodynamique indique le rôle de l'énergie de la surface et de l'hydrophobicité et elle tient compte des forces à courte distance (Busscher *et al.*, 1984, Absolom *et al.*, 1983) mais elle ne tient pas en considération les interactions électrostatiques. En réalité, les interactions électrostatiques et l'hydrophobicité ont une influence sur l'adhésion (Absolom *et al.*, 1983, Mozes *et al.*, 1987).

L'approche thermodynamique peut être corrélée avec les résultats expérimentaux (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996, Asther *et al.*, 1990, Busscher *et al.*, 1990, Boulange-Petermann *et al.*, 1993). Mais dans certain cas, elle ne peut pas expliquer les résultats d'adhésion (McEldowney and Fletcher, 1986).

## 1.2- Approche DLVO

L'approche DLVO, doit son nom aux auteurs qui l'ont développée indépendamment : (Derjaguin and Landau, 1941, Verwey, 1962). C'est la première théorie

concernant la stabilité de l'état colloïdale. Selon ces auteurs, une particule qui s'approche à une certaine distance d'une surface donnée va interagir avec cette surface par des forces de type Van der Waals ou électrostatiques. Selon la théorie DLVO l'adhésion microbienne était décrite comme un équilibre entre les interactions attractives de Lifshitz-Van der Waals et les interactions électrostatiques répulsives ou attractives. Selon cette théorie, l'énergie libre d'interaction totale  $G_T$  entre deux corps séparés par la distance  $d$  est la somme de l'énergie d'attraction due aux forces de London-Van der Waals  $G_V$  et de l'énergie de répulsion  $G_E$  :  $G_T = G_V + G_E$

Si l'on considère une particule sphérique de rayon  $a$  située à une distance  $l$  du substrat, le potentiel de Van der Waals s'écrit alors :  $G_V = -A/6((a/l+2a)+(a/l) + \ln(l/l+2a))$ .

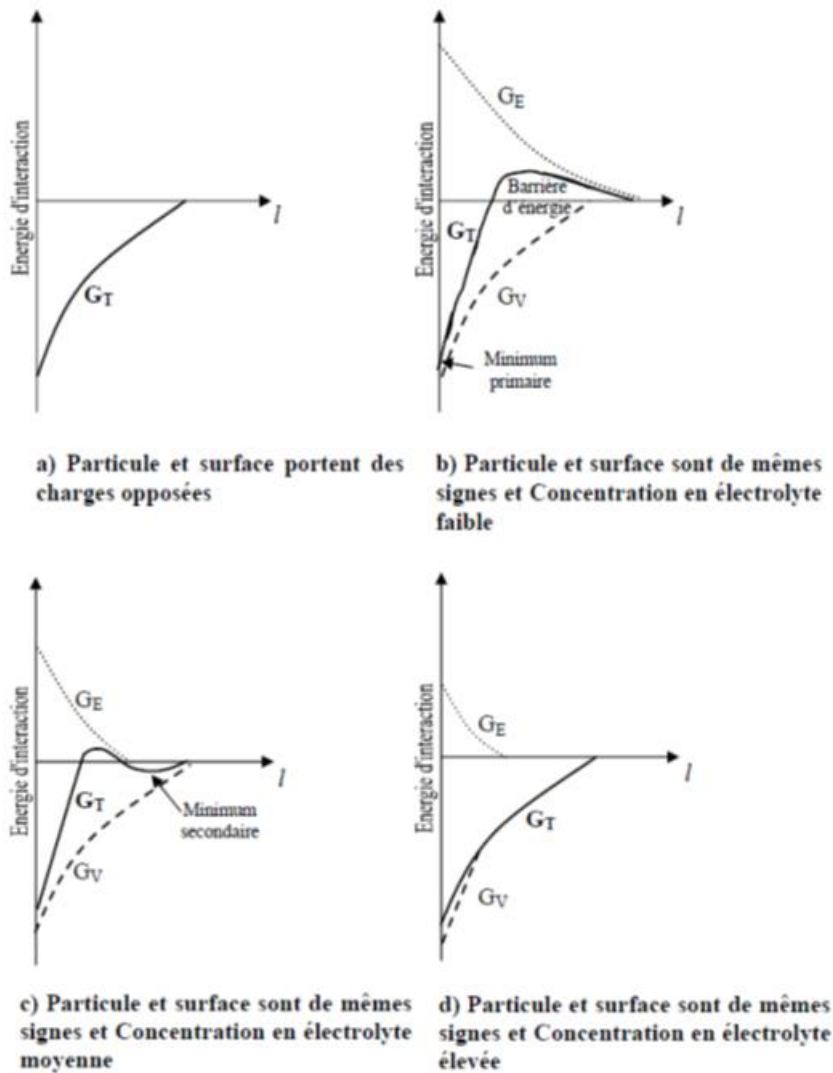
$A$  est la constante d'Hamaker, elle est fonction des constantes diélectriques et des indices de réfraction du milieu et de la particule. Cette équation peut être simplifiée pour une faible distance de séparation ( $l \ll a$ ) :  $G_V = - (Aa/6l)$ .

L'énergie d'attraction de Van der Waals n'est pas influencée par la force ionique, par contre les interactions électrostatiques diminuent avec l'augmentation de la force ionique (Bos *et al.*, 1999). Par conséquent, l'énergie d'interaction totale est influencée par la force ionique (Figure 11).

Lorsque les deux surfaces portent des charges de signes contraires, il y a toujours attraction, quelque soit la distance  $l$ ,  $G_T$  étant négatif (Figure 11-a). Alors que lorsque les deux surfaces portent des charges de même signe, plusieurs cas se présentent :

- Pour des concentrations en électrolytes faibles (inférieures à  $10^{-4}$  mol/l) l'épaisseur de la double couche ionique  $-1\kappa$  est importante et il existe une barrière d'énergie de répulsion, la particule est donc repoussée et ne peut se stabiliser aux abords de la surface réceptrice.

L'énergie exigée par la cellule pour traverser cette barrière et s'approcher de la surface est forte.



**Figure 11** : Energie d'interaction totale d'après DLVO selon la concentration du milieu en électrolytes.

- Pour des concentrations intermédiaires en électrolytes ( $10^{-4}$  à  $10^{-1}$  mol/l),  $G_T$  est inférieure à 0 pour des distances importantes ( $\geq 6$ nm), l'énergie d'interaction électrostatique  $G_E$  étant nulle, les forces d'interactions sont essentiellement de type Van der Waals, ce qui permet à la bactérie de s'immobiliser temporairement aux abords de la surface dans une zone appelée minimum secondaire. La barrière d'interaction subsiste mais, étant condensée (Figure 11-c), une certaine fraction des collisions particule – surface permet aux particules de franchir la barrière et donc de s'immobiliser dans cette zone. L'adhésion demeure réversible, et  $G_T$  devient positive pour des distances plus faibles, la bactérie ne pouvant pas entrer en contact intime avec la surface. Une adhésion irréversible peut néanmoins se produire grâce aux pilis ou par la sécrétion de molécules de petite taille pouvant franchir cette barrière de répulsion.

- Pour une concentration ionique élevée, l'épaisseur de la double couche est faible,  $G_E$  est nulle au-delà de 2 nm et il n'y a plus de barrière énergétique d'interaction (Figure 11-d). Toutes les collisions particule/surface conduisent à l'établissement d'un contact permanent irréversible. Ceci permet aux particules de s'immobiliser dans la zone nommée minimum primaire.

La théorie DLVO prend en considération les interactions à longue distance et met en évidence le rôle des interactions électrostatiques, mais néglige les interactions à courte distance (forces de Keesom et Debye et les interactions acide base) qui sont généralement prédominantes dans les milieux aqueux et jouent un rôle très important dans l'adhésion microbienne. Cette théorie permet de décrire qualitativement l'adhésion des microorganismes mais ne peut pas donner des renseignements quantitatifs sur ce phénomène.

### 1.3- Théorie de DLVO développée par Van Oss (Extended DLVO)

En 1986 Van Oss et ses collaborateurs suggèrent un développement de la théorie afin d'expliquer le phénomène d'adhésion microbienne. Dans cette nouvelle approche, trois types d'interactions sont prises en considération : les interactions électrostatiques  $G_E$ , les interactions de Van der Waals  $G_{LW}$ , et les interactions acido-basiques  $G_{AB}$ . Les interactions acido-basiques dépendent du caractère donneur/accepteur d'électrons entre les entités polaires dans le milieu aqueux. L'énergie libre totale d'interaction est exprimée comme suit :  $G_T = G_E + G_{LW} + G_{AB}$ .

Pour un système sphérique (microorganisme) – plan (substrat), la variation de l'énergie d'interaction acido-basique en fonction de la distance est donnée par la relation suivante (van Oss, 1994):

$$\Delta G_{AB}(d) = 2\pi a \lambda \Delta G_{adh}^{AB}(d_0) \exp[(d_0 - d)/\lambda]$$

Où :

$a$  = rayon de la sphère,

$\lambda$  : longueur de corrélation qui concerne la molécule d'eau,

$d_0$  : distance à l'équilibre,

$\Delta G_{adh}^{AB}$  : l'énergie libre d'interaction à la distance d'équilibre.

$\Delta G_{adh}^{AB}(d_0)$  peut être calculée par l'utilisation des valeurs donneuses d'électrons  $\gamma^-$

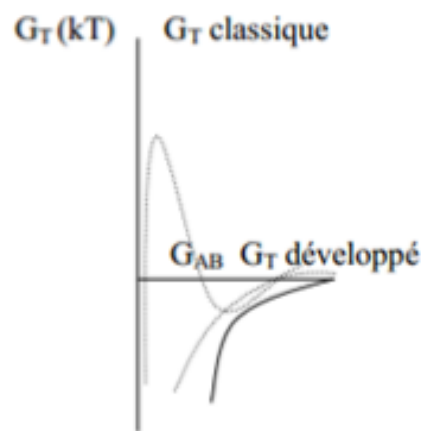
et accepteur d'électrons  $\gamma^+$  des entités qui réagissent entre elles (van Oss, 1994). L'énergie



libre d'interaction acido-basique entre les deux entités 1 et 2 immergées dans un milieu liquide 3 est exprimée par l'équation de Van Oss (van Oss, 1994).

$$\Delta G_{132}^{AB} = 2[(\gamma_3^+)^{1/2}[(\gamma_1^-)^{1/2} + (\gamma_2^-)^{1/2} - (\gamma_3^-)^{1/2}] + (\gamma_3^-)^{1/2}[(\gamma_1^+)^{1/2} + (\gamma_2^+)^{1/2} - (\gamma_3^+)^{1/2}] - (\gamma_1^+ \gamma_2^-)^{1/2} - (\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2}]$$

L'introduction du terme d'énergie d'interaction acido-basique dans l'énergie totale d'interaction (DLVO Extended) montre une grande influence sur la variation de l'énergie d'interaction (Figure 12). Ainsi, il faut noter que les interactions acido-basiques sont à courte distance et elles ont un effet significatif pour de petites distances de séparation (5 à 10 nm) (Bos *et al.*, 1999).



**Figure 12** : Comparaison entre l'énergie d'interaction déduite de DLVO classique et DLVO développée.

## 2- Les interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion bactérienne

### 2.1- Les interactions de Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont des forces d'attraction ou de répulsion entre deux ou plusieurs molécules. Elles sont universelles et interviennent quels que soient les corps considérés. Celles-ci se distinguent des liaisons chimiques par le fait qu'elles ne sont pas assez fortes pour donner lieu à des structures géométriques définies ; elles ne donnent lieu qu'à des édifices de dimensions variables, qui se font et se défont en permanence.

Elles résultent de trois effets physiques différents :

- Les forces de Keesom : entre molécules polaires.
- Les forces de Debye : entre molécules polaires et molécules apolaires.
- Les forces de dispersion de London : entre 2 molécules apolaires.

### a. Forces de Keesom

Il s'agit d'interactions entre molécules polaires = interaction dipôle-dipôle (Keesom, 1921) :

- Deux molécules polaires possédant des moments de dipôles non-nuls  $p_1$  et  $p_2$  peuvent trouver des orientations favorables pour maximiser l'attraction entre elles.
- Les dipôles ont tendance à se réorienter et à s'aligner pour minimiser l'énergie.
- L'énergie d'interaction n'est efficace qu'à courte distance.

Energie moyenne d'interaction  $E$  en keesom

$$\bar{E} (J) = \frac{2p_1^2 p_2^2}{3kTr^6}$$

$p$ : Moment dipolaire

$K$ : Constante de Boltzmann ( $1,381 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}$ )

$T$  : Température absolue

### b. Forces de Debye

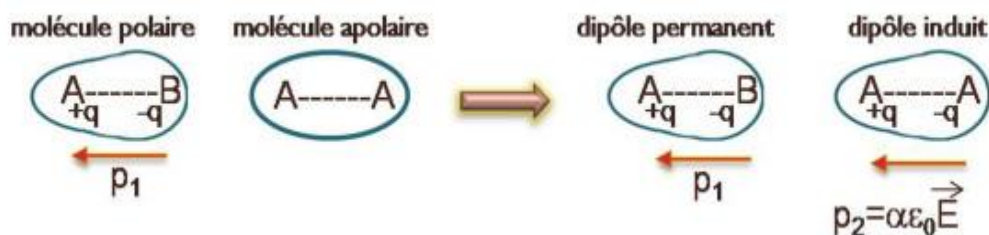
Ces interactions se produisent entre des molécules possédant un moment dipolaire permanent et des molécules non polaires. Tout atome ou molécule est polarisable c'est-à-dire que son nuage électronique se déforme suite à la présence d'un champ électrique. Ce champ électrique est créé par le dipôle permanent de la molécule polaire qui induit un dipôle au niveau de l'autre molécule. Il est important de rappeler que la polarisabilité d'un atome ou d'une molécule augmente avec la taille.

- Le champ électrique créé par la molécule polaire déforme le nuage électronique de la molécule apolaire.

Création d'un dipôle induit

$$\vec{P}_i = \alpha \epsilon_0 \vec{E}$$

Dipôle induit 2



Energie moyenne (Energie debye) :

$$\bar{E} \text{ prop } \frac{\alpha p^2}{r^6}$$

$\alpha$  : Polarisabilité  
 $p$  : Moment dipolaire

### c. Forces de dispersion de London

La force de London traduit l'interaction entre deux dipôles induits. Une légère répartition inhomogène du nuage électronique dans une molécule va créer un dipôle induit qui va lui-même entraîner la création d'un dipôle induit sur la molécule voisine. Cette interaction peut avoir lieu a priori entre une molécule apolaire/apolaire mais elle est prépondérante lorsqu'elle a lieu entre molécules apolaires (Popham, 1931).

Dans de telles molécules, les électrons qui constituent le nuage électronique sont perpétuellement en mouvement sur leur orbite.

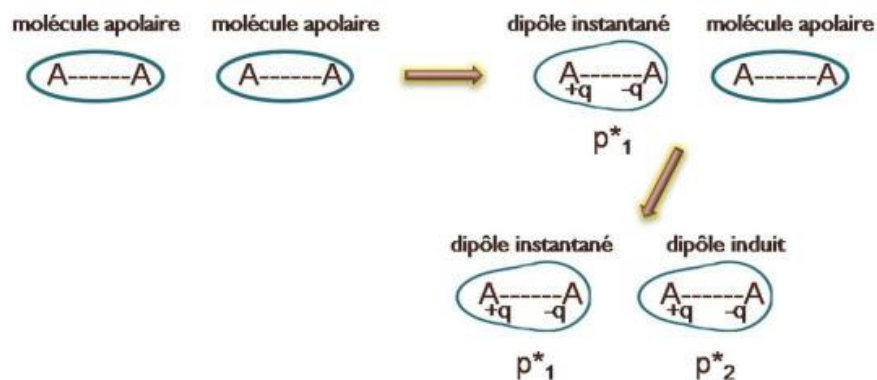
Ces fluctuations spatiales font que la molécule à chaque instant peut présenter un dipôle électrique instantané (bien que, en moyenne, le moment dipolaire soit nul).

Il existera donc des interactions électrostatiques instantanées qui vont donner une cohésion aux liquides ou aux solides.

Le dipôle instantané crée  $E$  qui crée un dipôle induit dans une molécule voisine d'où interaction et attraction

$$\bar{E} \text{ prop } \frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6}$$

$\alpha$ : Polarisabilité



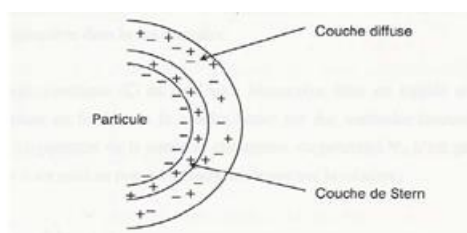
Les forces de Keesom et Debye sont négligeables en milieu aqueux et seules les forces de London subsistent. Ces dernières sont communément nommées forces de Lifshitz-Van der Waals.

## 2.2- Les interactions électrostatiques

Elles se caractérisent par la formation des ponts entre une charge négative de la bactérie et une charge négative du substrat, grâce à des cations divalents.

Dès que les corps sont plongés dans un milieu aqueux, des forces électrostatiques apparaissent, sous l'effet de charges électriques surfaciques, liées à deux phénomènes principaux :

- L'ionisation ou la dissociation des groupements fonctionnels de surface
- L'adsorption d'ions (cations ou anions) contenus dans la solution aqueuse.



**Figure 13** : Structure de la double couche ionique d'après (Hiemenz and Rajagopalan, 1997)

Quel que soit le mécanisme conduisant à l'apparition des charges de surface, ces dernières confèrent à la surface un potentiel de surface  $\Psi_0$ . La présence de ces charges de surface influence la distribution spatiale des ions contenus dans la solution.

Les ions de charge opposée (contre-ions) sont attirés par la surface, et ceux de charge identique (co-ions) sont repoussés loin de l'interface. Cet excès de contre-ions est maximal à la surface puis diminue progressivement lorsque l'on s'éloigne de cette surface et ce, jusqu'à ce que l'équilibre ionique de la phase aqueuse soit retrouvé.

## 2.3- Les interactions polaires

Ce sont les interactions que l'on trouve en milieu aqueux, et qui décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Elles concernent principalement l'interaction entre donneur et accepteur d'électrons.

### 2.3.1- Liaisons hydrogène

La liaison hydrogène est une liaison chimique non covalente de type dipôle-dipôle entre 2 molécules ou entre 2 groupements d'une molécule.

Nature de la liaison : Elle consiste essentiellement dans l'interaction entre deux molécules :

- Une molécule possédant un atome donneur d'électrons (O, N, F)
- Une molécule possédant un atome H accepteur d'électrons (OH, NH<sub>2</sub>)
- La liaison résulte d'un transfert partiel d'un e<sup>-</sup> célibataire sur le groupement H.
- Les liaisons hydrogène peuvent être intramoléculaires ou intermoléculaires.
- Le rôle des liaisons hydrogène est très important en chimie et en biochimie.

### 2.3.2- Répulsion hydrophile et interactions hydrophobes

- **Répulsion hydrophile**

Dans le cas de surfaces polaires ou chargées, les groupements fonctionnels de la surface deviennent hydratés : ils s'associent avec les molécules d'eau par des liaisons hydrogène. L'interaction entre deux surfaces hydratées est une interaction répulsive. En effet, l'affinité de chacune de ces surfaces pour l'eau se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau. Or, pour parvenir à un contact rapproché des deux surfaces, il est nécessaire que celles-ci libèrent les molécules d'eau associées en fournissant de l'énergie.

Il en résulte une énergie de répulsion hydrophile,  $\Delta G_{AB}$ , positive. Cette répulsion hydrophile est fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation  $d$ . Elle varie avec  $d$  selon une loi exponentielle et est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm. Selon la théorie développée par (Van Oss, 1996), dans le cas de particules hydrophiles, il est possible de distinguer celles qui ont des propriétés de surfaces acides (c'est-à-dire accepteurs d'électrons) ou basiques (donneurs d'électrons) au sens de Lewis. Une répulsion hydrophile aura lieu entre deux corps de « nature » identique au sens de Lewis.

- **Attraction hydrophobe**

Dans le cas où une surface solide ne porte pas de groupements fonctionnels ioniques ou polaires, ni de sites adéquats pour la formation de liaisons hydrogène, cette surface est inerte vis-à-vis de l'eau et est donc hydrophobe. Les molécules d'eau se trouvant à proximité de cette surface ont tendance à s'en éloigner pour s'entourer d'autres molécules d'eau. Dans le cas où ces molécules sont confinées entre deux surfaces hydrophobes, leur mouvement moyen en direction de la solution aqueuse favorise le

rapprochement des surfaces. L'énergie d'attraction hydrophobe qui en résulte,  $\Delta G_{AB}$ , est négative. Cette attraction hydrophobe est également fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation  $d$ . Elle varie avec  $d$  selon une loi exponentielle et est effective à partir de distances de l'ordre de 10 nm (Vergnault, 2004).

### **3- Facteurs influençant l'adhésion bactérienne**

L'étude des facteurs impliqués dans l'adhésion initiale des microorganismes aux supports fait l'objet d'une partie importante de la littérature dans le domaine. Il est aujourd'hui reconnu que de multiples paramètres, liés à la fois au microorganisme, à la surface solide ou au milieu environnant, influencent cet attachement initial ((Palmer *et al.*, 2007). Le poids relatif de ces caractéristiques biologiques, métaboliques, physiques et chimiques dépend de la souche microbienne étudiée.

Cependant, ces facteurs doivent être considérés avec attention, afin de développer des stratégies efficaces pour prévenir la colonisation microbienne.

#### **3.1- Facteurs liés au support.**

Pour étudier l'adhésion microbienne sur les matériaux, il est important de prendre en compte le type de métal ou de matériau, l'hydrophobicité, la rugosité de surface, les procédures de nettoyage (Boulané-Petermann, 1996, El Abed *et al.*, 2010, Ibensouda *et al.*, 2012) et la présence ou non d'un film organique.

##### **a. La charge de la surface et le caractère hydrophobe des matériaux**

La charge à la surface d'un solide peut engendrer des forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion lors de l'approche de la bactérie. Les cellules bactériennes possèdent une charge négative sur leur membrane cellulaire (Corpe, 1970) mais cette charge est plus ou moins importante d'une souche à l'autre. La charge de surface du matériau peut être modifiée par le pH et la composition ionique de la solution environnante.

Cependant, la charge de la surface peut aussi être modifiée par l'adsorption de protéines, qui a lieu au cours des premières étapes de l'adhésion. Cette adsorption augmente avec l'hydrophobicité du support.

## **b. Le nettoyage des surfaces**

Les traitements de nettoyage des surfaces influencent la charge et l'énergie de surface du matériau (Boulangé-Petermann *et al.*, 1997, Boulané-Petermann, 1996).

Selon les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces (produits acides, basiques,), celles-ci peuvent être plus ou moins chargées et posséder des énergies de surface différentes, engendrant ainsi une adhésion différente du micro-organisme.

## **c. La rugosité des matériaux**

La rugosité semble jouer un rôle important dans l'adhésion bactérienne. L'influence de la rugosité du support reste tout de même un paramètre très discuté.

Selon les auteurs, des surfaces rugueuses :

- Possèdent une surface active plus importante
- Protègent les cellules des forces de cisaillement dues à l'écoulement.

En revanche, pour d'autres auteurs, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le micro-organisme et le support, favorisant ainsi son détachement (Boulangé-Petermann *et al.*, 1997). Ainsi, la rugosité des supports ne parait pas influencer directement l'adhésion.

Certains auteurs ont rapporté que la rugosité des matériaux influence l'adhésion au-dessus d'une valeur moyenne de 0,9 $\mu\text{m}$  (Hilbert *et al.*, 2003). D'autres auteurs affirment qu'au-dessus de 10  $\mu\text{m}$  (Scheuerman *et al.*, 1998), la rugosité n'a plus d'influence sur l'adhésion.

Il apparaît alors que pour que la rugosité influence l'adhésion des micro-organismes, sa valeur moyenne sur le support doit être de l'ordre de grandeur du diamètre de l'élément biologique étudié.

Du fait de la variabilité des diamètres des espèces et des gammes de rugosité étudiées, des supports utilisés, et des méthodes d'évaluation de l'adhésion, il est difficile de conclure rapidement quant à l'effet de la rugosité sur l'adhésion.

### **3.2- Les facteurs liés au micro-organisme.**

#### **a. Caractères physico-chimiques de la surface des cellules**

En regard des propriétés physico-chimiques du matériau, l'hydrophobie et la charge de la surface cellulaire jouent un rôle prépondérant lors de l'étape d'adhésion. Ces deux propriétés sont liées à la composition de la paroi cellulaire (Palmer *et al.*, 2007), ainsi qu'aux conditions et à l'âge de la culture.

L'hydrophobie de surface des microorganismes est fréquemment déterminée par la méthode MATH (Microbial Adhésion To Hydrocarbons), la mesure de l'angle de contact avec des solvants non polaires ou par chromatographie d'interaction hydrophobe. Une hydrophobie importante est souvent corrélée à une forte adhésion, notamment aux surfaces hydrophobes comme les plastiques (McEldowney and Fletcher, 1986), par l'intermédiaire de forces d'attraction hydrophobes (Donlan and Costerton, 2002) ont corrélé l'hydrophobie de la surface d'*E. coli* à leur attachement à des floes dans un procédé de traitement des eaux usées.

Concernant les levures, (Brugnoni *et al.*, 2011) ont également démontré l'existence d'une corrélation entre le caractère hydrophobe de la surface de cellules isolées de jus de pomme et leur adhésion à l'acier inoxydable, dans un milieu de force ionique suffisamment élevée (23 mM) pour inhiber les interactions électrostatiques.

Le rôle de la charge dans le phénomène de l'adhésion a été étudié par plusieurs auteurs (Mozes *et al.*, 1988, Van der Mei *et al.*, 1993a, Van der Mei *et al.*, 1998). La corrélation entre la charge de la surface et l'adhésion n'est pas linéaire ; ainsi l'effet de la charge paraît plus important pour l'adhésion des cellules hydrophiles que les cellules hydrophobes (van Loosdrecht *et al.*, 1989).

(Van Oss, 1996) a rapporté que l'énergie des interactions acido-basiques peut être deux fois plus importante que celle due aux interactions de Van der Waals ou interactions électrostatiques, mais leur rôle dans le phénomène de l'adhésion est rarement étudié. Pour cette raison, l'un des objectifs principaux de ce travail est d'étudier les propriétés acido-basiques de la surface cellulaire d'une part et d'autre part de montrer leur rôle dans le phénomène de l'adhésion.



## **b. Mode de préparation et milieu de culture**

Il apparaît que le mode de préparation de la culture bactérienne peut avoir de grandes conséquences sur les propriétés physico-chimiques de surfaces des bactéries (Bruinsma *et al.*, 2001).

Par exemple, la centrifugation des cultures permettant un "lavage" des micro-organismes peut rompre flagelles et pilis, modifiant la composition de surface des micro-organismes (Neu, 1996) et, par conséquent, les caractéristiques énergétiques de surface de la bactérie (Rubio, 2002). La disparition des flagelles et des pili peut perturber l'adhésion (Stanley, 1983).

La résistance des biofilms, en termes de force d'adhérence, peut être due à la présence d'appendices. Plusieurs auteurs ont indiqué que la présence de flagelles et la mobilité des bactéries favorisent les premières étapes de formation du biofilm (Gavín *et al.*, 2003, Moreira *et al.*, 2003).

Les flagelles peuvent, en effet, faciliter le contact avec le support en permettant de franchir la zone de répulsion électrostatique. Ceci favorise l'adhésion des cellules directement en contact avec la surface. Les pilis jouent également un rôle primordial dans l'adhésion et/ou l'autoaggrégation des micro-organismes, les bactéries n'ayant pas de pilis adhèrent moins facilement que les autres (Fletcher *et al.*, 1993)

Le pH du milieu influence le nombre de groupements chimiques dissociés (carboxyles, phosphates, amines, etc.) présents en surface et intervient dans l'intensité des forces d'interaction électrostatiques. Par conséquent, l'adhésion des cellules est favorisée lorsque leur charge de surface est nulle, c'est-à-dire lorsque le pH du milieu est proche du point isoélectrique (pI) du microorganisme, comme démontré par (Husmark and Rönner, 1993).

Comme dans le cas des surfaces inertes, la concentration en sels dans le milieu influence également la charge surfacique des cellules (Poortinga *et al.*, 2002). Les phénomènes de répulsion électrostatique sont favorisés dans les solutions de faible force ionique (Husmark and Rönner, 1990) et sont moins importants dans les milieux de force ionique élevée. Ainsi, ont démontré l'absence d'interactions électrostatiques entre des

levures *S. cerevisiae* et une surface de verre dans une solution de  $\text{KNO}_3$  à 0,06 M (pH non précisé).

### **3.3- Facteurs liés à l'environnement**

#### **a. Caractéristiques du milieu**

De nombreuses caractéristiques du milieu influencent les interactions entre les cellules et la surface solide, par exemple sa nature, sa viscosité ou sa température, mais également la force ionique, la nature des sels et le pH, ou encore la présence de détergents ou d'éléments nutritifs.

##### **– Température du fluide**

La température du milieu environnant influence la colonisation microbienne, car la croissance cellulaire est maximale pour une température dite optimale, spécifique à chaque microorganisme. (Pompermayer and Gaylarde, 2000) ont ainsi montré que l'adhésion d'*E. coli* au polypropylène est plus importante à 30°C qu'à 12°C. De plus, (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002) ont souligné l'importance de réaliser les expériences d'adhésion à une température proche de la température optimale de croissance, car ce paramètre peut influencer les caractéristiques physico-chimiques (charge, hydrophobie) de la surface des cellules.

##### **– Force ionique et nature des sels**

De nombreuses études ont prouvé l'influence de la force ionique du milieu sur l'adhésion microbienne, par l'intermédiaire des interactions électrostatiques établies entre le microorganisme et le support ( (Bos and Busscher, 1999, Poortinga *et al.*, 2002). En effet, la charge de la surface du matériau et des cellules est influencée par la concentration en sels dans le milieu de suspension. Ainsi, (Piette and Idziak, 1992) ont observé un accroissement de l'adhésion de *P. fluorescens* avec l'augmentation de la force ionique de 10 à 100 mM. De même, (Guillemot *et al.*, 2006) ont montré que l'adhésion de la levure *S. cerevisiae* sur un support de verre est plus importante pour une force ionique de 150 mM qu'à 1,5 mM. Ceci s'explique par la diminution des forces de répulsion électrostatiques entre le microorganisme et la surface, due à la réduction de l'épaisseur de la double couche ionique. La nature des sels présents dans le milieu (mono- ou polycationiques) influence également les interactions microorganismes/surface, du fait de la capacité différente de neutralisation des charges négatives de la surface cellulaire (Fletcher, 1988).

### **– Influence du pH**

Le pH du milieu environnant a une influence sur la croissance des cellules. La valeur du pH a également un impact sur la charge de surface du support, notamment dans le cas des métaux comme l'acier inoxydable, pour lequel l'état d'oxydation dépend du pH (Palmer *et al.*, 2007).

### **– Présence de macromolécules, de surfactants et d'éléments nutritifs**

Une surface solide exposée à un milieu non stérile est systématiquement recouverte d'une couche de macromolécules, qui modifie ses propriétés physico-chimiques et influence l'adhésion des microorganismes (Rouxhet and Mozes, 1990, Compere *et al.*, 2001).

La présence de surfactants (détergents comme le Tween, le SDS ou le RBS) modifie les interfaces solide/liquide et microorganisme/liquide, ce qui influence l'adhésion et le détachement des cellules, comme mentionné par (McEldowney and Fletcher, 1986). En outre, de nombreux microorganismes relèguent des composés appelés (biosurfactants), dont l'adsorption aux surfaces inertes et aux surfaces des autres cellules modifie leurs propriétés physico-chimiques (Bos *et al.*, 1999).

Enfin, la présence d'éléments nutritifs, comme le carbone et l'azote desquels dépend le métabolisme microbien (notamment la synthèse des composés pariétaux), a une influence sur les propriétés de la surface cellulaire, donc sur l'adhésion initiale.

### **b. Le temps de contact entre le micro-organisme et son support**

Le temps de contact entre le micro-organisme et son support est également très important et joue sur l'adhésion.

Après un temps d'incubation plus long (15 à 180 minutes), le nombre de bactéries adhérentes s'est aussi révélé plus important (Fletcher *et al.*, 1993).

L'adhésion des micro-organismes dépend donc des propriétés des deux entités, à savoir le support et la bactérie, sans oublier le milieu environnant. Il faut noter cependant que le support peut être modifié assez rapidement. En effet, lorsqu'il est placé dans un environnement aqueux contenant des molécules organiques, ces dernières viennent contaminer la surface du support et ainsi modifier les propriétés physicochimiques.

De même, les propriétés de surface des bactéries peuvent évoluer avec l'âge de la culture.

#### 4- Méthodes de la caractérisation des propriétés de surfaces bactériennes

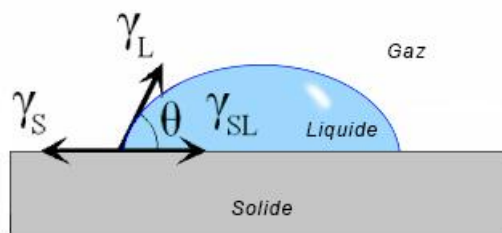
##### a. Angle de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide.

La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

##### -Principe

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact ( $\theta$ ). (Figure 14)



**Figure 14 :** Mesure par angle de contact

La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui de Owens Wendt.

Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

### **b. Technique du MATS**

La MATS "Microbial Adhesion To Solvents", méthode mise au point par (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996), permet de déterminer les caractères donneur/ accepteur d'électrons (acide/ base au sens de Lewis) et hydrophobe/ hydrophile des microorganismes. Cette méthode de partage repose sur l'affinité des micro-organismes pour différents solvants de propriétés physicochimiques connues. Elle est basée sur la comparaison entre l'affinité des cellules microbiennes à un solvant monopolaire et un solvant apolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique, au sens de Lewis, mais les deux solvants, polaire-apolaire, doivent avoir les composantes de la tension de surface de Lifshitz- Van Der Waals similaires.

Sur cette base, pour déterminer les propriétés acides ou basiques des cellules microbiennes en utilisant la méthode de MATS, nous avons sélectionné deux paires de solvants: la paire Chloroforme (solvant acide qui montre un caractère basique négligeable quand il est pur) et Hexadécane et la paire Diéthyléther (DEE) (solvant basique fort) et Hexane. L'Hexadécane et l'Hexane sont des n- alcanes apolaires (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

L'hydrophobicité correspond au pourcentage des cellules adhérees aux solvants apolaires, l'hexadécane et l'hexane. La souche est considérée hydrophobe lorsque ce pourcentage dépasse 50%. Dans le cas contraire, elle est considérée comme hydrophile. De nombreuses études ont rapporté que l'hydrophobicité des surfaces microbiennes mesurée par l'hexadécane est précise et reproductible (Dickson and Koohmaraie, 1989, Pelletier *et al.*, 1997b).

Le caractère donneur/accepteur d'électrons correspond à la différence d'affinité des cellules bactériennes entre les solvants polaires et apolaires qui constituent chaque couple de solvants. C'est alors la différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme (acide, accepteur d'électrons) et celui de l'hexadécane qui permet d'évaluer le caractère donneur d'électrons des cellules microbiennes. Le caractère des souches étudiées est basique quand cette différence est positive. Alors que la différence entre le pourcentage d'adhésion au diéthyléther (basique, donneur d'électrons) et celui d'hexane permet

d'évaluer le caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes. Le caractère des souches étudiées est acide lorsque cette différence est positive (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996)

### **c- La chromatographie d'interaction hydrophobe**

La chromatographie d'interaction hydrophobe (Mozes *et al.*, 1989) (hydrophobic interaction chromatography, méthode qui sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. Son principe repose sur le fait qu'en présence d'une force ionique élevée (fortes concentrations en sels), les molécules d'eau constituant l'enveloppe d'hydratation des protéines sont déplacées pour hydrater les anions et les cations provenant de la dissociation du sel (relargage, salting out). Ceci entraîne une réorganisation des molécules d'eau autour des protéines et l'exposition de leurs zones hydrophobes favorisant l'établissement d'interactions hydrophobes entre ces zones (normalement enfouies) et les groupements hydrophobes portés par la phase stationnaire. Les protéines qui se lient à la phase stationnaire réadoptent leur conformation native lorsqu'un tampon avec une force ionique faible est ajouté. Il en résulte une élution des protéines.

### **d- Le partage entre deux phases (PEG/DEX)**

Le partage entre deux phases DEX/PEG (Gerson, 1980) dépend des caractéristiques extérieures autres que la charge. Ces caractéristiques sont considérées liées à l'hydrophobicité de surface des cellules puisque la phase supérieure (riche en PEG) a une énergie plus faible que la phase inférieure (riche en DEX).

L'hydrophobicité est exprimée comme le rapport en pourcentage entre des cellules dans la phase supérieure et la quantité totale des cellules mises en essai.

## **5- Méthodes de quantification de l'adhésion**

Avant d'évaluer la force d'adhésion proprement dite, avec les difficultés opératoires liées à la complexité des surfaces microbiennes, il est nécessaire de mettre au point des méthodes expérimentales permettant la quantification du niveau d'adhésion pour un microorganisme en contact avec une surface donnée et sa variation en fonction des conditions environnementales.

### **a. Méthode par immersion**

Cette appellation regroupe l'ensemble des essais pour lesquels la suspension cellulaire est mise en contact avec la surface inerte dans des conditions statiques ou des conditions d'agitation peu maîtrisées. A l'issue d'un temps de contact variable (de quelques minutes à plusieurs jours), le support est la plupart du temps rincé et les microorganismes restant adhérents sont comptés sous microscope optique, avec ou sans marquage préalable. Les microorganismes peuvent également être dénombrés après avoir été détachés du support par sonication. B-Limites Les procédures de rinçage sont le plus souvent non standardisées (par exemple, un rinçage « doux », préconisé sans autre précision, est effectué) et vont dépendre de l'opérateur, rendant ainsi impossible toute comparaison entre des résultats provenant de différents laboratoires. Par ailleurs, pendant le rinçage, les microorganismes adhérents sont soumis à des forces de détachement relativement importantes. Ainsi, un rinçage « doux » soumet le microorganisme à une force de l'ordre de  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  N. Mais le simple fait de sortir la lame de la suspension cellulaire se révèle de loin le plus drastique. En effet, cette dernière étape correspond à l'établissement d'une interface eau-air, ce qui se traduit par des forces de détachement de l'ordre de  $10^{-7}$  N (Leenaars, 1988). Ces forces, le plus souvent appliquées de manière non intentionnelle, conduisent en fait à évaluer la rétention du microorganisme sur le support plutôt que sa réelle adhésion.

### **b. Les microplaques**

Cette technique n'est qu'une variante de la précédente. En effet, elle consiste à faire adhérer la suspension cellulaire au fond et sur les parois d'une plaque « 96 puits ». Les procédures de rinçage et de marquage sont du même type que dans la technique d'immersion. Cette technique est qualifiée de technique « haut-débit » car elle permet une lecture rapide et automatisée des résultats. Elle est notamment utilisée pour réaliser des criblages, par exemple pour évaluer la sensibilité de biofilms à une palette d'antibactériens ou d'antifongiques selon le biofilm considéré (Ramage *et al.*, 2001).

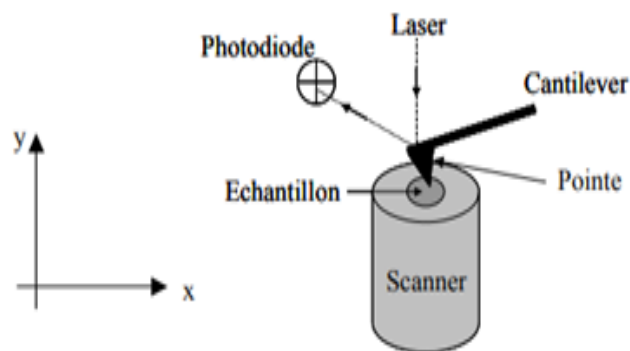
### **c. La microscopie électronique à balayage**

C'est à la microscopie électronique à balayage que l'on doit les premières données sur la structuration des biofilms. Bien que largement controversée aujourd'hui, notamment car elle présente un risque de dénaturation de l'échantillon biologique, dû à la fixation

artificielle des structures, au recouvrement par un film métallique et au travail sous vide, elle offre encore de nombreuses informations. (Nett and Andes, 2006) présentent une belle illustration de la structure bi-dimensionnelle d'un biofilm formé par *C. albicans*.

#### f. La microscopie à force atomique

Actuellement, la microscopie à force atomique (AFM) est peut-être la technique la plus précise utilisée pour étudier les premières étapes de la formation du biofilm.



**Figure 15** : Principe général de l'AFM d'après (Dufrêne, 2002)

L'un des avantages de l'AFM est la possibilité de travailler sur des échantillons en milieu liquide. Les images obtenues par AFM ne sont pas générées par un rayonnement lumineux incident comme en microscopie optique classique, mais par la mesure de la force existant entre une pointe et la surface d'un échantillon (Dufrêne 2002) (figure 15) expose le principe simplifié de cette technique. Une image est obtenue suite à l'enregistrement de l'évolution de cette force quand la pointe balaye l'échantillon dans les dimensions x et y de l'espace. De plus, l'échantillon étant monté sur un support piézoélectrique, un positionnement dans les trois dimensions de l'espace est possible. La pointe est fixée sur un cantilever déformable qui agit comme un ressort. Sa déformation - ou déflexion- est mesurée à l'aide d'un laser focalisé sur la partie libre du cantilever, le rayon réfléchi étant détecté par une photodiode. Une forte déflexion du cantilever révèle une force d'attraction globale importante entre la pointe et l'échantillon. De nombreuses approches expérimentales ont été développées afin de mesurer la force d'interaction entre un microorganisme et un support.

L'une d'elles consiste à « attacher » directement le microorganisme sur la pointe puis à déterminer l'évolution des courbes force-retrait entre ce microorganisme et le



support d'intérêt (Ong and Mackie, 1999). Cependant, la pointe étant plus large que le microorganisme, il est difficile de conclure quant à l'influence « parasite » de la pointe sur la déflexion engendrée (Klein *et al.*, 2003) .Il faut, de plus, noter que la phase critique de cette manipulation est l'« attachement » de la cellule sur la pointe. En effet, l'architecture macromoléculaire de la membrane du microorganisme peut être dénaturée. Un moyen de préserver cette architecture serait de le faire adhérer par interactions spécifiques .Une autre approche, proposée par Lower et ses collaborateurs consiste à fixer sur la pointe des billes portant des fonctions amines, sur lesquelles ont adhéré les bactéries. Il est également possible de préparer un tapis bactérien, et d'étudier les interactions de la pointe avec ce tapis .

L'AFM se révèle donc être l'outil nanométrique d'avenir pour la mesure des forces d'interaction car elle présente une sensibilité de mesure suffisante.

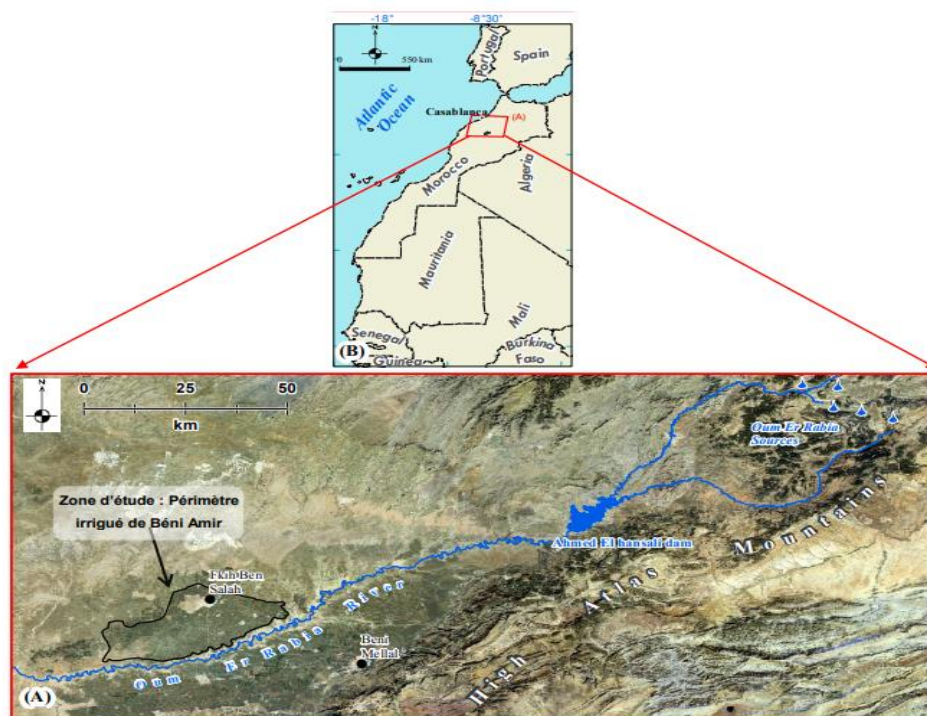
#### **i- La microscopie confocale**

Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier la structuration dans l'espace du biofilm mature. C'est en utilisant cette technique que Chandra et al. (2001) ont pu mettre en évidence l'effet de la nature du support sur l'architecture du biofilm. Ce dernier est formé dans une petite cellule directement placée sous le microscope, évitant ainsi la création d'interface dommageable avec l'air. L'observation de la structure 3D est rendue possible par reconstruction d'images.

**Chapitre III :**  
**Problème de la salinité en agriculture cas**  
**de : Béni Amir de la plaine de Tadla**

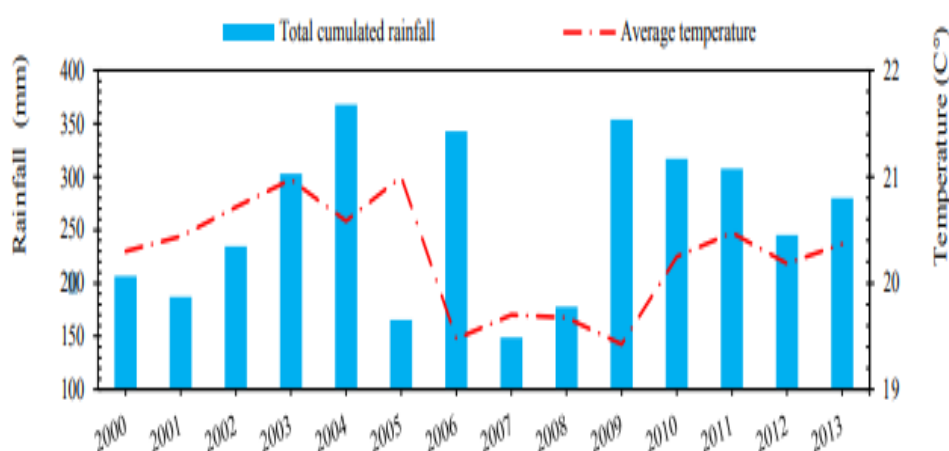
## 1- Description de la zone de Béni Amir

Cette étude est effectuée dans le périmètre irrigué de Béni Amir de la plaine de Tadla au centre du Maroc (Figure 16). Ce périmètre a été choisi en raison de son importance agricole. De plus, dans ce périmètre, l'utilisation accrue des eaux souterraines et de surface salines, couplée à l'intensification agricole conduit à la détérioration de la qualité des sols en particulier par la salinisation et par conséquent, l'affaiblissement de la production agricole de la région. Dans le périmètre irrigué de Béni Amir, la salinisation des sols est causée par l'irrigation, les mauvaises pratiques agricoles et les effets climatiques (Lhissou *et al.*, 2014, Barbouchi *et al.*, 2015). Géologiquement, les sols de la zone d'étude sont formés par limons et des marnocalcaires du Quaternaire (El Antaki and El Boustani, 1991). Les sols du périmètre irrigué de Béni Amir sont principalement de type isohumique, qui sont propices à l'agriculture en raison de leur profondeur et de leur texture équilibrée (Missante, 1963). L'irrigation des terres agricoles dans la zone d'étude est assurée par les eaux d'Oued Oum Er Rabia. Ce dernier est alimenté par des sources salines qui traversent les formations triasiques salines du Haut Atlas. En plus des eaux de surface, les eaux souterraines salines sont également utilisées pour l'irrigation.



**Figure 16** : A : Localisation du périmètre irrigué du Béni Amir en fonction des ressources en eau de surface, B : Vue d'ensemble de la zone d'étude à l'échelle nationale

Le climat de la région est de type méditerranéen, aride à semi-aride à caractère continental avec une saison sèche d'avril à octobre et une saison pluvieuse de novembre à mars. Le cumul pluviométrique annuel est de l'ordre de 149 à 397 mm. Les températures connaissent des variations saisonnières avec un maximum en août de 46°C, un minimum en janvier de -6°C et une moyenne annuelle de 20°C (El Harti *et al.*, 2016). L'évaporation moyenne annuelle est de l'ordre de 1800 mm soit près de 6 fois la moyenne annuelle des précipitations. Durant la période 2000-2013, une diminution des précipitations s'est observée durant les années 2000, 2001, 2002, 2005, 2007 et 2008 alors que les années 2004, 2009 et 2013 sont relativement pluvieuses (Figure 17).



**Figure 17 :** Répartition annuelle de 2000 à 2013 des précipitations et de la température dans la zone d'étude.

#### ➤ Sols

Le périmètre du Tadla présente les types de sols suivants :

- Sols isohumiques qui comprennent : sols bruns subtropicaux modaux ; sols bruns subtropicaux salins et salsodiques ; sols châtaîns modaux. Cette classe de sols représente la majorité des sols du périmètre (83 %) ;
- Sols calcimagnésiques comprenant les sols bruns calcaires (11 %) et les sols rendziniformes ;
- Sols ferralitiques à sesquioxydes de fer ;
- Sols hydromorphes et sols peu évolués.

## 2- Problème de la salinité et de la sodicité en agriculture

La salinisation et la sodisation des terres cultivables est un problème chronique pour les périmètres irrigués dont la pérennité (qui dépend notamment de divers facteurs

hydrologiques) ne peut être assurée sans gestion contrôlée de l'accumulation et du drainage des sels (Tanji, 1990).

## 2.1- Définition de la Salinité

Selon la (FAO, 2002), la salinisation est définie comme un enrichissement en sels solubles de la surface et de la tranche supérieure du sol lorsque la salinité dépasse 1 à 2%.

Les sels les plus fréquents sont les chlorures, les sulfates, et les carbonates de sodium. D'autres sels moins courants et plus toxiques à faibles concentrations sont également à considérer, ces éléments traces sont le bore, le sélénium, l'arsenic et le molybdène.

La salinisation est de deux types, primaire et secondaire :

- La salinisation primaire contemporaine de la pédogenèse est dite naturelle lorsque les sels sont autochtones (présents dans le milieu).
- La salinisation secondaire, résultat d'activités agricoles sur un sol déjà formé, est corollaire de l'irrigation, à la fois conséquence de la quantité d'eau apportée, de sa qualité (nature et concentration des sels) de la texture des sols et du climat (Rose *et al.*, 2003).

Les pratiques d'irrigation agissent donc comme révélateur ou accélérateur d'un phénomène naturel de concentration lorsque les quantités de sels apportées par l'eau d'irrigation dans un sol ou un périmètre sont supérieures à celles qui sont exportées, souvent indirectement, en provoquant la remontée de la nappe et l'accélération des ascensions de sel par capillarité. L'effet des sels sur les sols se manifeste différemment et l'en peut avoir des sols salins ou/et des sols sodiques.

## 2.2- Salinité des sols

Par le processus de salinisation, les sels s'accumulent dans le sol. Quand la quantité de sels dans la solution du sol est élevée, ces derniers peuvent se concentrer à la surface du sol et y causer un état appelé salinité du sol.

**Tableau 10 :** Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique (Richards, 1969)

	Type de sol				
	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extremementsalé
CE. ex 1/5 (mS/cm)	< 0.6	0.6 - 1.2	1.2 - 2.4	2.4 - 6	>6
Salure (méq/100 g de sol)	<3	3 - 6	6 - 12	12 - 30	> 30

### **2.3- Origine de la salinité**

La présence des sels hydrosolubles dans le sol est le résultat d'un ensemble de facteurs soit à l'origine de ces sels (roche mère, nappe phréatique et eaux d'irrigation salées) soit à l'absence de l'évacuation de ces sels

### **2.4- Origine géologique**

La source principale des sels dans le sol est l'altération des minéraux de la croûte terrestre (Bryssine, 1961). Les réactions chimiques y compris l'hydrolyse, l'hydratation et les réactions d'oxydoréduction affectant les minéraux primaires du sol font passer peu à peu les sels constitutifs dans l'eau environnante, la dynamique de cette eau sous climat aride entraîne à son tour la salinisation des sols. Cependant certains auteurs estiment que l'accumulation de quantités élevées de ces sels pour former des sols salins ne peut se faire que rarement (Gaucher and Burdin, 1974).

La source principale des sels dans le sol est l'altération des minéraux de la croûte terrestre (Bryssine, 1961). Les réactions chimiques y compris l'hydrolyse, l'hydratation et les réactions d'oxydoréduction affectant les minéraux primaires du sol font passer peu à peu les sels constitutifs dans l'eau environnante, la dynamique de cette eau sous climat aride entraîne à son tour la salinisation des sols. Cependant certains auteurs estiment que l'accumulation de quantités élevées de ces sels pour former des sols salins ne peut se faire que rarement (Gaucher and Burdin, 1974).

### **2.5- Origine marine**

La salinisation des sols résulte de l'infiltration des eaux marines dans la nappe phréatique littorale constituée originellement par des eaux douces. La contamination des terres survient alors soit naturellement à la suite de la remontée du niveau de la nappe, soit par pompage et irrigation avec l'eau salée.

### **2.6- Salinisation par les eaux d'irrigation**

Cette salinisation est qualifiée de secondaire, elle est due à l'irrigation avec une eau de mauvaise qualité. Les sols irrigués avec une telle eau contiendront un mélange de sels de même composition que celle de l'eau, mais en concentration plus élevée. L'importance de l'accumulation des sels dans le sol dépendra de la qualité de l'eau d'irrigation, de la conduite de cette irrigation et de l'efficacité du drainage.

## **2.7- Régime d'irrigation**

L'irrigation insuffisante est une cause de la salinisation. Si la quantité d'eau apportée est inférieure à la consommation des plantes, une accumulation des sels dans le sol est inévitable car la plante évapore l'eau et dépose les sels que cette dernière contenait initialement. Une irrigation excessive sans drainage peut aussi occasionner une salinisation. En effet, la remontée des eaux de nappe par capillarité par évaporation superficielle en climat aride a pour conséquence la remontée et l'accumulation des sels en croûte à la surface du sol.

## **2.8- Effets du sel sur les microorganismes**

Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol sont complexes et imprévisibles du fait que plusieurs interactions peuvent avoir lieu entre les ions, les bactéries et les particules du sol (Polonenko *et al.*, 1986). Puisque la membrane cytoplasmique bactérienne est perméable à l'eau mais non à la plupart des métabolites, un choc hyper ou hypoosmotique pour diminution ou une augmentation concomitante du volume cytoplasmique. Vu la rigidité de la paroi bactérienne, le choc hypoosmotique n'entraîne généralement qu'une légère augmentation du volume cytoplasmique. Par contre, le choc hyperosmotique a pour conséquence de considérable contraction du volume cytoplasmique. L'importance de cette plasmolyse dépend de l'osmolarité du milieu mais non de la nature du soluté.

L'exposition des bactéries à des conditions d'hyperosmolarités a comme résultat une diminution de l'activité de l'eau cytoplasmique. Les protéines et d'autres macromolécules biologiques ont une activité optimale entre certaines limites de valeurs de l'activité de l'eau, en dehors desquelles celle-ci est perturbée. La plasmolyse entraîne la dénaturation des enzymes (Yancey *et al.*, 1982) et donc l'inhibition de processus physiologiques tels l'accumulation de nutriments (Roth *et al.*, 1985) ou la réplication de l'ADN (Meury, 1988).

## PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE



## **Chapitre I :**

# **ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES ACTINOMYCETES DU SOL DE LA REGION DE BENI AMIR**

## **I-INTRODUCTION**

Les actinomycètes sont les microorganismes les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites primaires et secondaires essentiels pour la santé comme les Antibiotiques(Barakate *et al.*, 2002)

L'isolement sélectif des actinomycètes, à partir de leur habitat, pose problème. En effet, trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (Williams and Vickers, 1988)

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement sélectif des bactéries actinomycétales. Elles reposent essentiellement sur le traitement des échantillons, le développement de milieux appropriés et l'addition aux milieux d'isolement de substances inhibitrices stoppant la croissance des germes envahisseurs (Larpent, 2000, Ouhdouch *et al.*, 2001, Hilali *et al.*, 2002).

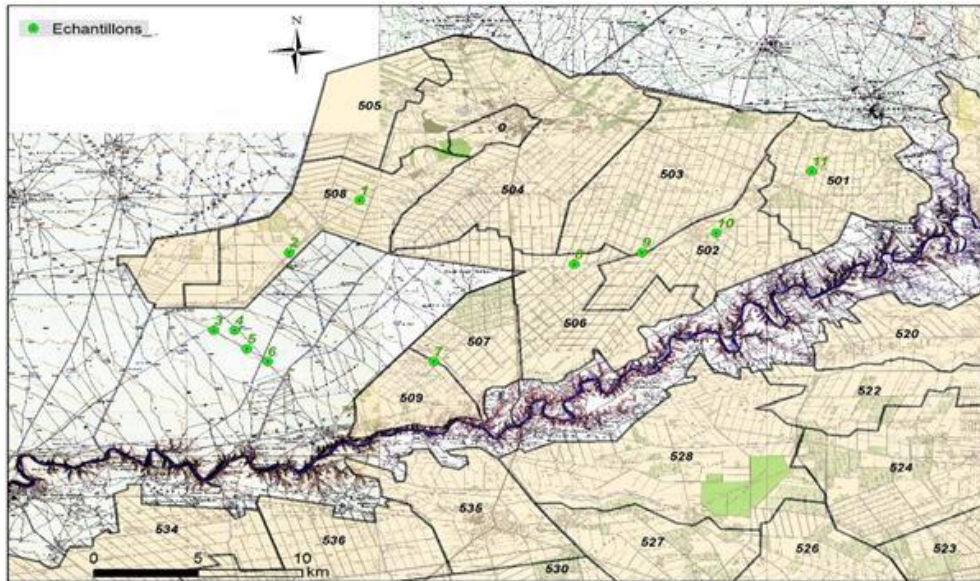
L'échantillonnage a été effectué sur 11 sols distribués dans la région de Béni Amir, caractérisés par des taux de salinité relativement élevés.

L'étude écologique des habitats environnementaux des actinomycètes est importante. C'est pour cela que nous pensons qu'il est très utile de déterminer les caractères physico-chimiques des sols prélevés et d'étudier la relation entre les microorganismes isolés et les caractéristiques physico-chimiques de leur prévenance.

## **II-MATERIELS ET METHODES**

### **1- Echantillonnage**

11 Échantillons ont été prélevés à partir du périmètre de Tadla, région de Béni –Amir caractérisée par des sols présentant différents degrés de salinités(Figure 18).



**Figure 18 :** Carte montrant les zones d'échantillonnage dans la région Béni Amir Tadla-Azilal

## 2- Prélèvement

A l'aide d'une spatule stérile : les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés. Cent à cent –cinquante (100 à 150) grammes de terre de la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) sont prélevés avec une petite spatule stérile, puis déposés sur une feuille d'aluminium. Les gros débris (pierres, racines etc.) sont écartés, et environ 50g sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse (Pochon and Tardieux, 1962).

## 3- Caractéristiques physicochimiques des échantillons du sol

### 3.1- Mesure du pH des échantillons

Une fois au laboratoire, des suspensions de sols sont préparées (5g de sol pour 12,5ml d'eau distillée). Les pH sont alors mesurés à l'aide d'un pH mètre selon la technique de (Pochon et Tardieux, 1962).

### 3.2-Pourcentage d'humidité

Dix grammes de sol sont séchés pendant 2 jours dans un four à 105 °C, jusqu'à obtention d'un poids constant (Lee et Hwang, 2002). Le pourcentage d'humidité est calculé d'après la relation :

$$H = \frac{PH-PS}{PH} \times 100$$

H : Humidité en pourcent (%).

PH : Poids humide de l'échantillon.

PS : Poids sec de l'échantillon.

### 3.3- Carbone Organique Total

Mettre le sol à sécher dans l'étuve à 105°C pendant une nuit, peser 1 g de sol tamisé (si le sol est riche en matière organique, réduire la prise d'essai au 1/2 ou au 1/10<sup>ème</sup> de 1 g), l'introduire dans un erlen de 250 ml, ajouter 10 ml de bichromate de potassium K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1N) et 20 ml d'acide sulfurique concentré, agiter une minute et laisser reposer 30 min sur une plaque de bois (à une coloration verte, diminuer la quantité de la prise d'essai).

La réaction est stoppée par ajout de 100 ml d'eau distillée. Après 2 heures de décantation, à 25 ml de la solution sont ajoutés 5 ml de l'acide orthophosphorique et 3 gouttes de diphénylamine. Après agitation, l'excès de bichromate est titré par une solution de sulfate de fer et d'ammonium N/2 jusqu'au virage vert. Un blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

Le carbone organique total exprimé en pourcentage de matière sèche est donné par la formule suivante :

$$\%COT = \frac{(V_t - V_e)}{P \times V_t} \times F$$

COT : Carbone organique total en pourcentage de matière sèche.

V<sub>t</sub> : Volume de titre de témoin en ml.

V<sub>e</sub> : Volume de titre de l'échantillon en ml.

F : Facteur de correction: 3,9.

P : Poids de la prise d'essai en g.

### 3.4- Détermination de la matière organique

A partir des pourcentages de COT, nous pouvons déterminer les pourcentages de la matière organique (MO) en appliquant la relation Suivante :

$$\text{Pour le sol Agricole :} \quad \% MO = \% COT \times 1,724$$

### 3.5- Mesure de la conductivité électrique

Vingt grammes (20g) de terre tamisée dans un tamis de 2 mm sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur rotatif suivie d'une demi-heure de repos, la suspension est ensuite décantée dans un bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre.

### 3.6- Phosphore assimilable

L'analyse du phosphore assimilable est faite par méthode d'OLSEN (Olsen, 1954). L'extraction est faite par une solution alcaline (hydrogénocarbonate de sodium) pendant une heure, qui dissout une partie importante de la matière humique, on ajoute le charbon pour la séparer. Après filtration, un complexe phosphomolybdique se forme par l'ajout de la solution

sulphomolybdique et ensuite ce complexe subit une réduction par l'acide ascorbique 1%. Ce complexe de couleur bleu dont l'intensité est proportionnel à la quantité du phosphore réduit et par conséquent à la quantité du phosphore. La lecture se fait par un colorimètre à 825 nm.

### **3.7- Potassium**

La détermination du potassium échangeable est réalisée par l'extraction à l'aide d'une solution neutre d'acétate d'ammonium, la lecture est réalisée à l'aide d'un photomètre à flamme à 766 nm.

## **4- Dénombrement des micro-organismes**

Pour chaque échantillon, 1g de sol est pesé puis des dilutions en cascade sont réalisées. L'échantillon est mis en suspension dans 9ml d'eau physiologique stérile. Après agitation au vortex, 1ml de la solution est prélevé stérilement puis transféré dans un deuxième tube contenant comme le premier, 9ml d'eau physiologique stérile. La dilution ainsi commencée est continuée jusqu'à  $10^{-8}$ . 0,1 ml de chacune des dilutions  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$  sont ensuite étalées à l'aide d'un étaloir stérile sur le milieu MMS pour les actinomycètes et milieu gélosé nutritive pour la flore bactérienne et le milieu sabouraud pour les champignons. Tous ces milieux ont été stérilisés pendant 20 mn à 120 °C avant d'être coulés dans des boîtes de Pétri de 9 mm de diamètre.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 28 °C pour les actinomycètes et la flore bactérienne et à 25 °C pour les champignons pendant 7 jours.

## **5- Isolement des souches d'actinomycètes**

Deux grammes de chaque échantillon de sol ont été remis en suspension dans 18 ml de sérum physiologique stérile (9 g/l de NaCl) et agités pendant cinq minutes au Vortex. 0,1 ml de chaque dilution a été inoculé à la surface des boîtes de Pétri contenant les deux milieux de culture Bennett (D-glucose anhydre : 10g de casaminoacide : 2g, extrait de levure : 2g, extrait de viande 1g, agar : 20g, eau distillée 1000 ml), milieu minimum synthétique (SMM) contenant 10 g/l de glucose, 2 g/l  $\text{NaNO}_3$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/l de KCl, 0,01 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et de RPK (0,5 g/l, contenant environ 2,2 mM de phosphore). Le pH a été ajusté à 7 et le milieu a été stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes. Ce milieu a été complété avec 40 µg/ml d'actidione et 10 µg/ml d'acide nalidixique, des inhibiteurs de croissance de champignons et des bactéries Gram négatives, respectivement. Après le placage, les plaques d'agar ont été incubées pendant 21 jours à 28 °C afin de permettre la croissance des

actinomycètes à croissance lente. Les actinomycètes ont été reconnus sur la base des caractéristiques morphologiques à la suite du projet international *Streptomyces* (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966b) .

## **6- Purification des souches**

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 2 à 3 semaines à 28 °C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquage possible, pour conserver la stabilité génétique des souches.

## **7- Observation des colonies au microscope optique**

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques à ces derniers, colonies dures et incrustées dans la gélose, sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple par le bleu de méthylène, ainsi que la coloration de Gram. L'observation au microscope optique est effectuée avec des grossissements gradués ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ) (Kalyani and Dhoble, 2012).

## **8- Conservation des souches d'actinomycètes**

### **8.1- Conservation par congélation dans le glycérol à -20 °C**

Après centrifugation les spores des bactéries filamenteuses sont mises en suspension dans des Eppendorf contenant du glycérol 20% stérilisé, puis congelés à -20 °C (Rivière, 1975).

### **8.2- Conservation dans le sable**

Après stérilisation des tubes à vices contenant du sable et du carbonate de calcium (2%) pendant trois fois 30 min à 120 °C, les spores d'actinomycètes sont ajoutées. La conservation des tubes se fait à la température ambiante (Rivière, 1975).

## **III-RESULTATS ET DISCUSSION**

### **1- Caractéristiques physicochimiques des sols**

Pour chaque échantillon, nous avons déterminé le pH, la conductivité électrique, l'humidité, la matière organique, le carbone organique total et les sels minéraux.

Cette étude nous a permis d'avoir les résultats présentés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Paramètres physicochimiques des onze échantillons de sol de Béni Amir

Echantillons	Paramètres physico-chimiques						
	pH	Taux d'humidité	%M.O	Conductivité (dS/m)	% COT	Phosphore ppm	Potassium ppm
Sol 1	8,1	4	10,1	2,511	5,85	1,005	10,3
Sol 2	8,09	4	10,7	1,964	6,2	0,216	10,3
Sol 3	7,4	3,5	64,7	1,29	37,52	0,188	10,3
Sol 4	7,91	8	2,1	9,05	1,21	0,394	10,3
Sol 5	7,73	3	13,2	1,625	7,65	0,977	10,3
Sol 6	7,83	3,5	50,3	4,38	29,17	0,195	10,3
Sol 7	8,1	3	4,8	2,529	2,78	0,817	10,3
Sol 8	7,7	4	7,9	1,52	4,58	0,189	10,3
Sol 9	7,61	5,5	9,4	2,23	5,45	0,132	87,2
Sol 10	7,93	2,5	4,2	2,575	2,43	1,31	39,4
Sol 11	7,75	1,5	7,4	2,731	4,29	0,215	10,3

%M.O : pourcentage de la matière organique, dS : deciSiemens, % COT : pourcentage de carbone organique total.

Il est intéressant de noter que les sols présentent différents caractères physico-chimiques.

#### ✓ *pH*

Les sols étudiés se caractérisent par des valeurs de pH allant de 7,4 à 8,1. Les sols S3 (7.4), S4 (7.91), S5 (7.73), S6 (7.83), S8 (7.7), S9 (7.61) et S10 (7.93) sont des sols faiblement basiques. Les sols S1 ; S2 et S7 dont les pH sont respectivement de 8.1 ; 8.09 et 8.1 sont des sols moyennement basiques à tendance alcaline.

#### ✓ *Humidité*

Selon Lee et Hwang (2002), le taux d'humidité d'un sol est considéré comme faible si le pourcentage d'humidité est compris entre (2,0 et 9,0) ; modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9,1 à 13,0 et élevé si les valeurs sont comprises entre 13,1 et 20,0%. Les résultats présentés dans le tableau 11 montrent que tous les sols ont une faible humidité allant de 1,5 à 8%.

#### ✓ *Matière organique*

Le taux de la matière organique dans le sol est considéré comme faible de (4- 7%), modéré de (7,1-9%) et élevé de (9 .1-11%) (Lee et Hwang, 2002).

Les sols S3 (64,7%); S5 (13,2%) et S6 (50,3%) ont des taux en matière organique très élevés alors que les sols S1 (10,1%) ; S2 (10,7%) et S9 (9,4%) ont des taux élevés tandis que les sols S8 et S11 ont des taux modérés avec des pourcentages de 7,9 et 7,4 % respectivement. Par contre, les sols S7 et S10 ont des taux faibles en matière organique avec des pourcentages de 4,8 et 4,2 respectivement. Le pourcentage très bas de la matière

organique du sol 4(2.1%) nous permet de conclure que la matière organique dans cet échantillon n'existe que sous forme de traces.

✓ ***Salinité***

Les résultats présentés dans le tableau 15 nous permettent de classer les sols S1 ; S6 ; S7 ; S10 ; S11 dont la conductivité électrique est comprise entre 2,51 et 4.38 dS/m en tant que sols très salés, le sol S4 est extrêmement salé (9,05dS/m) alors que pour les autres sols S2 ; S3 ; S5 ; S8 ; S9 sont considérés comme des sols salés (Richards, 1969).

✓ ***Carbone organique total***

Le pourcentage du carbone organique total est minimal dans le sol 4(1,21%) et maximal dans le sol 3 (37,52%) (Tableau 11).

➤ **Sels minéraux**

✓ ***Phosphore***

Le phosphore est un des éléments majeurs indispensables à la croissance et au développement des végétaux. Il joue en particulier un rôle essentiel dans la mise en place du système racinaire, la photosynthèse et la reproduction du végétal. Sa variation dépend des propriétés physico-chimiques du sol (El Alaoui, 2007). Les résultats montrent que le Phosphore disponible présente des valeurs très faibles comprises entre 0.132 dans le sol S9 et 1,005 dans le sol S1 (Tableau 11).

✓ ***Potassium échangeable***

Le potassium est absorbé par la plante sous sa forme ionique  $K^+$ . Il est essentiel pour la translocation des sucres et pour la formation de l'amidon. Il intervient dans la régulation osmotique et ionique, ainsi que dans le processus d'ouverture et de fermeture des stomates. Le potassium est nécessaire pour plusieurs fonctions enzymatiques et pour le métabolisme des protéines et des carbohydrates. Sa variation dépend des propriétés physico-chimiques du sol (El Alaoui, 2007).

Les valeurs de potassium varient de 10.3 ppm dans les sols S1 ; S2 ; S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S11 à 87,2 ppm dans le sol S9.

Le pH est un paramètre important de la dynamique du sol, c'est une clé en agronomie car le degré d'acidité ou de basicité joue un rôle très important dans l'assimilation des nutritifs par les microorganismes, il a une influence sur trois composantes importantes de la fertilité d'un sol : la biodisponibilité des nutriments, l'activité biologique et la stabilité structurale. La variation de pH dépend des variations saisonniers et du pouvoir tampon de sol (le nombre

d'ions en réserve sur le complexe argilo-humique), l'état hydrique du sol, sa température et la présence ou non d'une culture en période de croissance active ((Dinon and Gerstmans, 2008, Baize *et al.*, 2006).

D'après les résultats obtenus (Tableau 15), on constate que tous les sols de la région étudiée représentent un pH basique. La moitié des sols sont riches en matière organique alors que les autres possèdent un taux modéré. Cette différenciation peut être influencée par la souffrance des sols des degrés différents de la salinité qui est due aux mauvaises pratiques d'irrigations avec une intensification de l'agriculture accompagnée d'une surexploitation des ressources en eaux souterraines induisant ainsi une forte salinisation et par conséquent, l'affaiblissement de la production agricole de la région.

## **2- Isolement et énumération de micro-organismes**

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc... De fait des aptitudes, les actinomycètes peuvent représenter un moyen de lutte efficace, persistant et sans effets négatifs vis à vis de l'environnement en comparaison avec les traitements chimiques et remplacer ainsi l'utilisation des antibiotiques systémiques (Loqman *et al.*, 2009).

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

Les résultats montrent clairement, que le milieu Bennet est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir des sols étudiés. 80 colonies différentes d'actinomycètes ont été isolées à partir du sol S6 et 24 souches ont été obtenues, c'est le plus grand nombre d'actinomycètes obtenu dans cette étude. Une souche d'actinomycète a été également récoltée des sols S3 et S7.



Le dénombrement des micro-organismes concerne 3 types : les actinomycètes, les autres bactéries cultivables dans les conditions décrites précédemment et les champignons (Tableau 12).

Les résultats montrent que le nombre d'actinomycètes varie de  $0,36 \times 10^5$  UFC / g dans le sol S10 à  $209 \times 10^5$  UFC / g dans le sol S3 et de  $0,03 \times 10^8$  UFC / g dans le sol S4 à  $146 \times 10^8$  UFC / g dans le sol S3 pour les bactéries et de  $0,51 \times 10^5$  UFC / g dans le sol S6 à  $2310,33 \times 10^5$  UFC / g dans le sol S3 pour les champignons.

De ce fait, le pourcentage d'actinomycètes, par rapport à la microflore totale, va de 0,001% dans le sol S11 à 20,31% dans le sol S4 (Tableau 12).

**Tableau 12:** Distribution quantitative des bactéries, actinomycètes et champignons dans les sols de Béni Amir

Echantillons	Microorganismes			
	Bactéries UFC/g $10^8$	Actinomycètes UFC /g $10^5$	Champignons UFC/g $10^5$	%Actinomycètes
S1	36.20±0.721	117.67±2.516	0.53±0.030	0.32
S2	32.73±2.000	9.97±3.605	600.00±10.000	0.03
S3	146.00±1.250	209.00±0.251	2310.33± 32.145	0.14
S4	0.03±0.003	10.30±0.608	10.40±0.529	20.31
S5	1.44±0.116	60.67±2.081	10.10±0.360	4.01
S6	4.73±0.416	4.00±0.025	0.51±0.020	0.08
S7	1.22±0.0251	1.01±0.010	300.00±20.000	0.06
S8	1.34±0.055	34.67±1.527	100.00±3.000	2.35
S9	1.70±0.030	20.07±0.057	1.07±0.061	1.16
S10	4.27±0.0642	0.36±0.020	91.33±1.527	0.008
S11	36.00±2.645	0.41±0.040	130.67±4.041	0.001

### 3- Purification des actinomycètes

Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu Bennett et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Les résultats de la purification des colonies d'actinomycètes dans les sols de la région de Beni Amir sont présentés dans le tableau 13 Ces résultats montrent une variation significative du nombre de souches actinomycétales isolées de chaque échantillon.

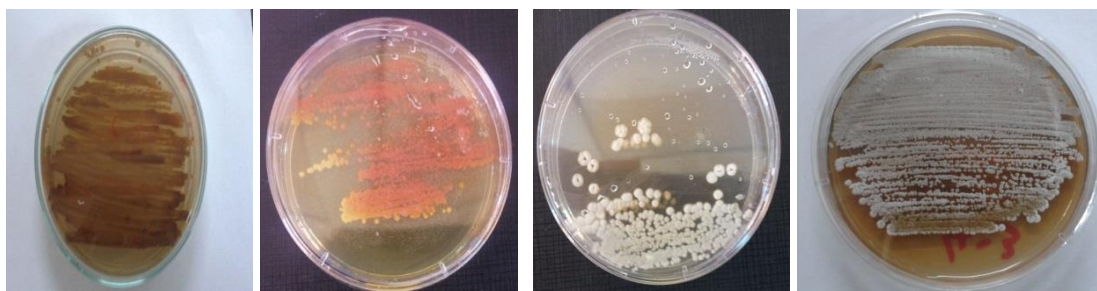
**Tableau 13:** Nombre des souches d'actinomycètes isolées et purifiées à partir des échantillons du sol

Echantillons	Nombres des souches d'actinomycètes isolées à partir des sols
Sol 1	11
Sol 2	2
Sol 3	1
Sol 4	18
Sol 5	6
Sol 6	24
Sol 7	1
Sol 8	3
Sol 9	3
Sol 10	5
Sol 11	6

#### 4- Caractères morphologiques des actinomycètes isolés

##### 4.1- Caractères cultureux des actinomycètes

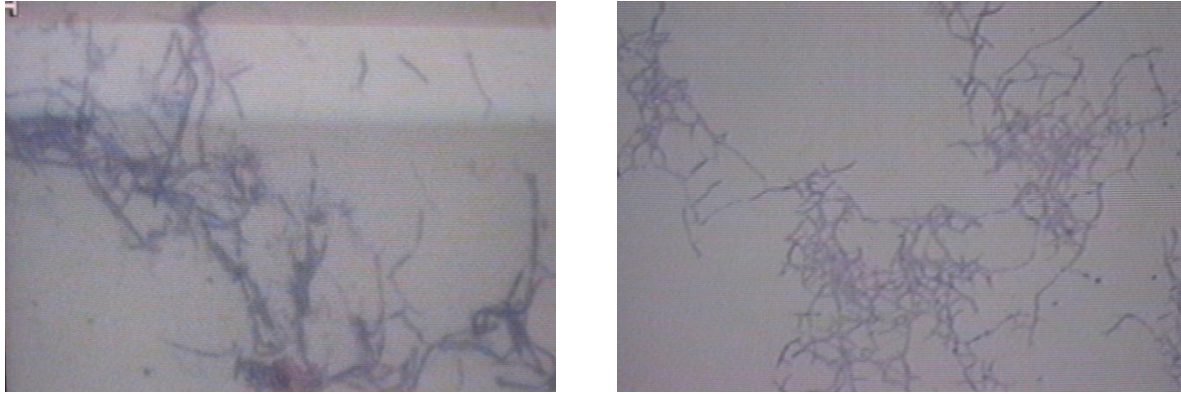
Après ensemencement sur le milieu Bennet, les colonies obtenues (Annexe1) sont de taille différente (petite à moyenne) et de forme variable (bombée, aplatie...etc.). Elles sont toutes incrustées dans la gélose, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (transparente, jaune, blanche, marron rouge) (Figure 19)



**Figure 19 :** Souches d'Actinomycètes isolées sur milieu BENNET

##### 4.2- Aspect microscopique des actinomycètes

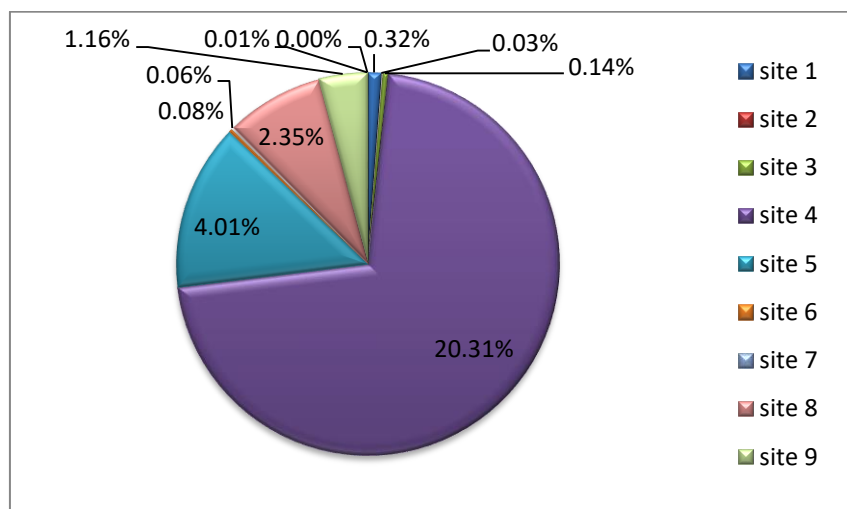
D'après la coloration de Gram, l'observation microscopique montre que les souches d'actinomycètes isolées et purifiées sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive comme le montre la Figure 20. Les actinomycètes se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certains ou pas pour d'autres en éléments bacillaires ou ovoïdes.



**Figure 20 :** Aspect microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de Gram (Gx100).

### 5- Distribution des actinomycètes dans les sols de Béni Amir

Les résultats montrent une variation significative du nombre de souches actinomycètes isolées de chaque échantillon. Il apparaît également que le nombre d'actinomycètes isolées du site S4 est supérieur à celui obtenu à partir des autres échantillons. Le pourcentage maximum a été enregistré dans le site S4 (20,31%) suivi des sites S5 (4,01%), S8 (2,35%), S9 (1,16%), tandis que les autres sites tels que S1 (0,32), S3 (0,14), S6 (0,08%), S7 (0,06%), S2 (0,03%), S10 (0,008%) et S11 (0,001%) ont enregistré un faible pourcentage (Figure 21).



**Figure 21 :** Pourcentage d'actinomycètes isolés dans chaque échantillon de sol

Pour comprendre l'influence des conditions écologiques sur la distribution des actinomycètes dans différents milieux, nous avons effectué une analyse statistique qui permet de déterminer la corrélation de chaque paramètre physico-chimique des sols étudiés avec le pourcentage d'actinomycètes isolés de chaque sol. Les résultats sont donnés dans le tableau 14.

Ces résultats ont montré que la charge en actinomycètes et l'humidité du sol étaient négativement corrélées, confirmant que les actinomycètes préfèrent plutôt les sols secs que les sols humides (Varghese *et al.*, 2012, Zenova *et al.*, 2007). Le pH des différents sols est basique. La corrélation entre le pH et la charge des actinomycètes est négative. (Basilio *et al.*, 2003) ont montré que le nombre d'actinomycètes obtenus dans la gamme pH 7 et 11, la matière organique et le carbone organique ont une corrélation positive (Wolf and Wagner, 2005) Le potassium et le phosphore ont une corrélation négative avec le nombre des actinomycètes. Dans cette étude, la matière organique a eu une influence significative sur les propriétés biologiques et physiques du sol.

La distribution hétérogène des micro-organismes dans les sols de surface peut s'expliquer par la différence de distribution de la matière organique. La teneur en matière organique est un indicateur important de la dégradation de la qualité du sol par sa contribution à la stabilité du sol, la capacité de rétention d'eau du sol, la fixation des éléments minéraux et le substrat des microorganismes du sol (K. El Oumlouki et al., 2014). Henis (1986) a montré que les actinomycètes augmentaient généralement en nombre la teneur en matière organique du sol Henis (1986). Hayakawa *et al.* (1988) ont également démontré que les actinomycètes étaient plus abondants dans le sol ayant une teneur en matière organique (M. Hayakawa *et al.*, 1988). Dans nos études aussi, des actinomycètes ont été trouvés dans des sols contenant des quantités de matière. Le pH peut aussi être un élément influençant la distribution des actinomycètes du sol.

Selon nos résultats, les actinomycètes sont distribués dans les sols dont le pH varie de 7,4 à 8,1. Ces résultats sont similaires à ceux de (Hayakawa *et al.*, 1988) qui ont montré que *Streptomyces* et *Micromonospora* étaient abondants dans les sols avec des valeurs de pH allant de 6,5 à 8,0. Dans cette étude, tous les actinomycètes ont été trouvés dans des sols à faible taux d'humidité allant de 1,5 à 8%. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par (Hayakawa *et al.*, 1988) qui ont démontré que les actinomycètes étaient distribués dans les sols végétatifs avec une teneur en eau de 6,2 et 7,6%, ce qui indique qu'une humidité modérée est favorable à la colonisation par les actinomycètes. Par conséquent, le pH du sol, la teneur en humidité et la teneur en matière organique peuvent être des facteurs importants influençant l'écologie et la diversité des actinomycètes.

**Tableau 14** : Corrélation entre les caractéristiques physicochimiques du sol et la distribution des actinomycètes

	pH	Humidité	MO	CE	COT	Phosphore	Potassium	Actinomycètes
pH	1							
Humidité	0,023	1						
MO	-0,561	-0,150	1					
CE	0,240	0,705*	-0,172	1				
COT	-0,561	-0,150	1**	-0,172	1			
Phosphore	0,473	-0,267	-0,372	-0,086	-0,372	1		
Potassium	-0,266	0,211	-0,189	-0,126	-0,189	-0,059	1	
Actinomycètes	-0,480	-0,031	0,624	-0,336	0,624*	-0,020	-0,188	1

\*. La corrélation est significative au niveau 0,05 (bilatéral).

\*\*.. La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

CE : Conductivité électrique, MO : Matière organique, COT : Carbone organique total

#### IV-CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'avoir des données intéressantes sur la répartition des actinomycètes dans les sols de la Région Béni Amir. Il a été démontré que la distribution de ces bactéries varie d'un sol à l'autre, la diversité et la richesse en actinomycètes étant associées aux facteurs environnementaux du sol, à savoir la matière organique, l'humidité, le pH et la salinité. D'après les résultats, le pourcentage maximal d'actinomycètes de 20,31% a été également enregistré dans le site S4, tandis que le pourcentage minimum de 0,001% a été enregistré sur le site S11. Ceci s'explique par le fait que, d'une part, l'échantillon S4 est plus riche en matière organique que l'échantillon S11, bien que la conductivité électrique de S4 soit supérieure à celle du précédent échantillon. Les résultats ont également montré que les 11 échantillons de sol avaient des pH basiques différents. La teneur en humidité de tous les sols est considérée comme faible. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour connaître la caractérisation physico-chimique de la surface de ces actinomycètes et de faire une identification phénotypique et moléculaire de toutes les souches isolées

Une meilleure connaissance des actinomycètes isolés passera par une identification phénotypique et moléculaire. Le chapitre suivant exposera l'identification moléculaire par 16S.

## Chapitre II :

# IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE, PHYSIOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES

## I-INTRODUCTION

L'identification des genres d'actinomycètes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien, la présence de spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes et la présence de sporanges de sclérotés, ou de synnémata. Ces méthodes classiques d'identification bactérienne basées sur la détermination des caractères culturels, physiologiques et métaboliques ont montré leurs limites, en particulier, pour la détection des micro-organismes non cultivables. Elles n'ont conduit qu'à la description d'une très faible partie de la diversité microbienne. Ces méthodes d'identification ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité (Provost *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999, Labeda and Kroppenstedt, 2000, Cook and Meyers, 2003).

La taxonomie moléculaire a été mise en place à partir des années 80 et consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment la détermination du pourcentage en GC (Chargaff *et al.*, 1949), l'hybridation ADN-ADN (Labeda, 1992) et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S (Afifi *et al.*, 2012, Jeffrey, 2008). Ces techniques ont permis de tracer toute la phylogénie des bactéries notamment, celle des actinomycètes.

(Gupta *et al.*, 1983) ont commencé à étudier et à séquencer des gènes de l'ADNr 16S de différentes bactéries en utilisant le séquençage de l'ADN, une bonne technologie à l'heure actuelle, et en employant ces séquences pour les études phylogénétiques.

Dans différents cas, le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été principalement utilisé pour distinguer les *Actinomyces* des *Actinomyces* bacilles anaérobies Gram positif, qui est souvent difficile dans les laboratoires de microbiologie clinique (Woo *et al.*, 2002, Colmegna *et al.*, 2003).

Les premiers travaux ont montré une large diffusion en utilisant la PCR et le séquençage de l'ADN. Le séquençage de l'ADNr 16S joue un rôle essentiel dans la bonne identification d'isolats bactériens et fongiques et également dans la découverte de nouvelles souches dans les domaines de la microbiologie clinique. L'utilisation du séquençage de l'ADNr 16S, a permis de montrer qu'il existe de nombreux organismes identifiés par de nouvelles espèces bactériennes et appartenant à des genres découverts jusqu'à présent (Woo *et al.*, 2008)

Le gène de l'ARNr 16S est l'outil principalement utilisé pour l'identification moléculaire et la classification phylogénétique des bactéries. C'est un gène chromosomique présent chez toutes les espèces bactériennes (gène universel) dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' sont conservées dans toutes les espèces bactériennes.

Dans ce travail, nous nous sommes fixés comme objectif principal l'identification, par l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S, des bactéries actinomycétales isolées des sols de la région de Béni Amir.

Seules 30 isolats d'actinomycètes sur 80 ont été identifiés moléculairement, vue l'accès aux technologies disponibles en France.

## **II- MATERIELS ET METHODES**

### **1- Etude des caractères phénotypiques**

#### **1.1- Préparation de l'inoculum général**

Chaque souche d'actinomycète a étéensemencée en stries serrées sur milieu ISP3 et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Après croissance, 20 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de Pétri, les colonies sont raclées à l'aide d'un râteau puis récupérées par pipette Pasteur dans un tube stérile. Cette suspension contenant des fragments de mycélium et de spores est utilisée comme inoculum pour tous les tests effectués à l'exception de la fermentation des substrats carbonés (Shirling and Gottlieb, 1966a).

#### **1.2- Préparation de l'inoculum lavé**

Dans un Erlenmeyer de 250 ml de volume, Cinq millilitres de l'inoculum général sontensemencés dans 50 ml du milieu liquide ISP1, Après incubation à 28 °C pendant 48 heures sous forte agitation, la culture a été centrifugée à 5000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot repris dans de l'eau distillée stérile. Une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions a été réalisée et le culot est mis en suspension dans

de l'eau distillée stérile. Cette préparation est conservée à 4 °C, pour servir à la détermination des sucres utilisés par les actinomycètes étudiés.

## **2- Etude morphologique**

### **2.1- Caractérisation de la morphologie et de la pigmentation**

#### **2.1.1- Observation macroscopique**

Sur quatre milieux de croissance préconisés par (Shirling and Gottlieb, 1966a) ISP2, ISP3, ISP4 (Annexe 5), 0,05 ml de l'inoculum général de chaque souche actinomycétale sont ensemencés en surface. La présence ou l'absence des chaînes de spores, la disposition des hyphes, la couleur des spores de surface et du pigment soluble autre que mélanoïde sont recherchés sur tous les milieux utilisés, par observation macroscopique après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28 °C.

#### **2.1.2- Observation du mycélium aérien et du mycélium du substrat par la technique de la culture sur lamelle**

Des lamelles stériles sont insérées dans le milieu ISP2 en faisant un angle de 45 °C environ avec la surface du milieu. Dix microlitres de l'inoculum général de chaque souche sont déposés au point d'intersection de la lamelle et de la gélose. Après 15 jours d'incubation à 28°C, les lamelles sont soigneusement retirées, puis déposées sur des lames propres et observées au microscope optique.

#### **2.1.3- Production de pigments mélanoïdes**

La production de pigments mélanoïdes est considérée positive quand une couleur brune apparaît après culture de quatre jours de chaque souche d'actinomycète sur milieu ISP7.

### **2.2-Détermination des caractères physiologiques**

#### **2.2.1-Effet de la température sur la croissance des souches**

0,05 ml de l'inoculum général de chaque souches ont été ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de Bennett. L'incubation a été réalisée aux températures suivantes: 30 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °C. La croissance a été évaluée bonne, moyenne ou médiocre après 14 jours d'incubation à différentes températures.



### 2.2.2-Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches

0,05 ml de l'inoculum général de chaque souche sont ensemencés sur plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu de Bennett additionné de différentes concentrations de NaCl. Les concentrations testées sont 2%, 7%, 10% (p/v). La croissance des souches sur ces milieux est comparée avec celle d'un milieu sans NaCl pris comme témoin.

### 2.3-Sensibilité aux antibiotiques

Sur le milieu Mueller Hinton, la souche d'actinomycétale est ensemencée en surface. Les disques d'antibiotiques (Tableau 15) sont déposés sur la surface de la gélose puis placés dans un réfrigérateur à 4±1 °C pendant 2 h. La lecture est effectuée après 72 h d'incubation à 30±1°C. La résistance est considérée comme positive lorsque aucune zone d'inhibition n'est observée (Chun *et al.*, 2000).

**Tableau 15 :** Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

Antibiotiques	Charge (µg/disque)
Amoxicilline	2 µg
Amoxicilline	30 µg
chloramphénicol	30 µg
Tétracycline	30 µg
Erythromycine	15 µg
gentamicine	10 µg

## 3- Etude biochimique

### 3.1- Test de la croissance sur différentes sources de carbone

Le milieu ISP 9 a été utilisé dans cette étude. Ce milieu est exempt de toutes formes de carbone, sa composition est citée en annexe 5. Les différentes sources de carbone testées sont celles recommandées par (Shirling and Gottlieb, 1966a), elles sont les suivantes: saccharose, D-fructose, L-arabinose, Dglucose, arabinose, lactose, D-mannitol, maltose, et galactose

Des solutions de ces sources de carbone, à 10 % (p/v) de concentration, sont préparées et stérilisées par filtration. La cellulose et L'inositol sont stérilisés dans une solution d'acétone et d'éthyl-éther, après évaporation des solvants ces composés sont repris dans de l'eau distillée. L'ensemble des sources de carbones sont additionnées aseptiquement au milieu de base de manière à obtenir une concentration finale de 1 % (p/v). Ces différents milieux ont été répartis dans des boîtes de Pétri, ensemencés par 0,01 ml de l'inoculum lavé préparé précédemment et incubés pendant sept jours à 28 °C.

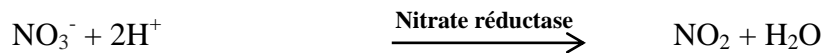
La croissance sur ces milieux est comparée avec un témoin négatif (milieu sans source de carbone) et un témoin positif (milieu avec glucose). Si la croissance obtenue est supérieure à celle du témoin négatif, le résultat est considéré positif.

### 3.2- Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons estensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette Pasteur 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.*, 1982).

### 3.3-Réduction des nitrates

Des tubes contenant 10 ml du milieu bouillon nutritif supplémentés par 0,1 % (P/V) de nitrates de potassium sontensemencés, puis incubés à 30±1°C. Au 5ème, 10ème et 14ème jour, 3 gouttes des réactifs I et II sont ajoutées à 1 ml de la culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.



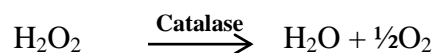
En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés:

✓ L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche).

✓ En l'absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites) (Marchal *et al.*, 1982).

### 3.4- Recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes : une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

## 4-Etude moléculaire

### 4.1-Extraction de l'ADN à partir des souches d'actinomycètes

Le protocole d'extraction de l'ADN génomique des isolats d'actinomycètes a été réalisé par choc thermique. A partir d'une culture fraîche, on met un petit fragment de mycélium des actinomycètes dans de l'eau appelée milli-q stérile à raison de 50 µl. Les tubes sont ensuite mis à -20 °C pendant une heure, puis ont subi un protocole d'éclatement selon le cycle représenté dans la figure 22, 2 µl du surnageant (contenant de l'ADN) est utilisé pour la réaction d'amplification (PCR) réaction de polymérisation en chaîne (Figure23).

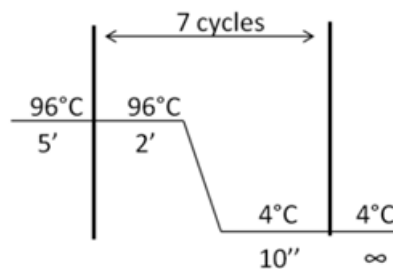


Figure 22 : Protocole d'éclatement des bactéries

#### 4.1.1- Amplification du fragment d'ADN ribosomique 16s

L'amplification a été effectuée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les gènes codant l'ARN ribosomal 16S des souches sont amplifiées par l'utilisation des amorces (Normand *et al.*, 1992) suivantes :

-FGPS6 (GGAGAGTTAAGATCTTGGCTCA)

-FGPS1509 (AAGGAGGGGATCCAGCCGGA)

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type « Verity » d'Applied Biosystems. Le tableau 16 donne la composition du milieu de réaction PCR. 7. L'opération (figure 23) débute par une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, ensuite 30 cycles comportant 1min de dénaturation à 95 °C, 1min d'hybridation à 55 °C, 1 min 30 d'élongation à 72 °C et enfin terminée par une élongation finale à 72 °C pendant 10 min.

**Tableau 16 :** Mélange réactionnel et quantité de réactifs utilisés pour une réaction PCR

Stock	Volume pour 1 réaction à partir volume stock	Concentration d'utilisation
Tampon 5X	5	MgCl <sub>2</sub> – 1.5 mM
Mix dNTPs 2.5mM	2	200 µM de chaque
Amorce 1 (10 µM)	1.25	0.5 µM
Amorce 2 (10 µM)	1.25	0.5 µM
Taq	0.2	1 U total
H <sub>2</sub> O	13.3	

95 °C	5min	}	× 1
95 °C	1min	}	× 30
55 °C	1min		
72 °C	1min30		
72 °C	10min	}	× 30
20 °C	Infini		

**Figure 23 :** Programme d'amplification par PCR de l'ADNr 16S.

## 4.2- Electrophorèse sur gel d'agarose

### 4.2.1- Préparation du gel d'agarose

2g d'agarose ont été mélangés à 100 ml de tampon TAE 1X. Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition, puis refroidi à 50 °C environ sous l'eau, ensuite additionné une goutte de bromure d'ethydidium. La préparation a été versée dans un support muni d'un applicateur. Après solidification de gel, l'applicateur a été enlevé pour que les puits apparaissent.

Après amplification, 1 µl de chaque amplifiât + 3 µl d'eau qualité biologie moléculaire+ 1 µl de bleu de Bromophénol ont été préparés séparément, puis déposés sur le puit du gel pour une analyse par électrophorèse horizontale pendant 2 heures à 100 V, dans un tampon TAE 1X. Dans un autre puit, 1 µl d'un marqueur de poids moléculaire 100 smart Ladder (MW-1700-10) a été déposé comme ADN contrôle. Après migration, le gel a été retiré de l'appareil pour observation sous UV.

### 4.2.2-Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de (100 paires de base) utilisé comme témoin.

## **5-Purification**

Le gel kit SK GEPU-100 a été utilisé pour purifier les ADN qui présentent des bandes parasites le protocole de purification d'ADN à partir de gel d'agarose.

## **6-Séquençage**

Le séquençage est effectué selon la technique de Sanger automatisée au laboratoire GENOSCREEN Montpellier France.

# **III- RESULTATS ET DISCUSSION**

## **1- Etude morphologique des souches**

### **1.1- Macromorphologie**

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables.

Après ensemencement sur les milieux de culture, les colonies des isolats d'actinomycètes apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 28 °C et se développent. Toutes les souches se développent sur tous les milieux utilisés avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible à une croissance abondante.

Cinq milieux de cultures ont été utilisés : ISP2, ISP3, ISP4, ISP7 et ISP 9, (Annexe 5). Ces différents milieux sont généralement utilisés pour les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* (Shirling and Gottlieb, 1966a).

D'après les résultats présentés sur le tableau 17, nous pouvons déduire que :

Les 30 isolats A30, A44, A46, A49, A50, A53, A57, A58, A60, A63, A64, A65, A76, A79, A3, A7, A10, A14, A15, A23, A43, A61, A27, A33, A41, A26, A36, A80, A22 et A34 présentent une croissance et une sporulation abondantes sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP7. La croissance est aussi abondante pour les isolats A44, A46, A57, A58, A60, A64, A65, A3, A7, A14, A61, A27 et A26 sur ISP3 et elle est moyenne pour les isolats A50, A53, A79, A23, A43, A80, A22 et A34 et faible pour A30, A49, A63, A76, A10, A15, A33, A41 et A36.

Les colonies sont poudreuses ou granuleuses, et adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension.

Sur le milieu ISP2, les souches présentent des colonies circulaires de taille moyenne pour A30, A49, A50, A3, A7, A14, A61, A27 et A26 et pour les souches A44, A46, A53,

A57, A58, A60, A63, A64, A65, A76, A79, A23, A43, A80, A22, A34, A10, A15, A33, A41 et A36, la forme de colonies est irrégulière en forme de cratère à bords filamenteux.

Sur le milieu ISP3, la forme des colonies est irrégulière à bords ondulés pour la souche A79 alors que pour les souches A30, A44, A46, A49, A50, A3, A7, A14, A61, A27 et A26, les colonies présentent une forme circulaire à bords réguliers. Pour les souches A53, A57, A58, A60, A63, A64, A65 A23, A43, A80, A22, A34, A10, A15, A33, A41 et A36, les colonies sont convexes à bords réguliers sauf pour la souche A76 qui présente des bords ondulés.

Sur le milieu ISP4, les 30 souches présentent des colonies circulaires à bords réguliers de taille moyenne. Pour le milieu ISP7, la forme des colonies est irrégulière à bords ondulés pour les souches A58, A63, A64, A76 et A79 qui élaborent des pigments de couleur beige foncé, marron foncé et marron chocolat respectivement, alors que pour le reste des souches, la forme est circulaire et aucun pigment mélanoïde n'est produit.

**Tableau 17 :** Etude macromorphologique et caractères cultureux de 30 isolats d'actinomycètes.

Isolats	Milieux de culture												
	ISP2			ISP3			ISP4			ISP7			
	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Pigments solubles
A30	+++	Jaune	Jaune	+	Jaune	Jaune	+++	Jaune	Jaune orangé	+++	Jaune	Jaune orangé	-
A44	+++	blanc	Jaune	+++	Blanc à beige	Jaune	+++	Jaune clair	Jaune clair	+++	Jaune foncé	Jaune foncé	-
A46	+++	Blanc	Jaune foncé	+++	beige	Brun	+++	Beige	Brun	+++	Blanc à beige	Brun orangée	-
A49	+++	Jaune pale	Jaune pale	+	Blanc	beige	+++	Blanc	beige	+++	Beige	Crème	-
A50	+++	Jaune pale	Jaune pale	++	Jaune foncé	Crème	+++	Jaune fonce	jaune	+++	Jaune foncé	crème	-
A53	+++	Blanc	Jaune	++	Blanc	beige	+++	blanc	beige	+++	Blanc	beige	-
A57	+++	Blanc	blanc	+++	Blanc	Beige clair	+++	Blanc	Beige foncé	+++	blanc	Brun	-
A58	+++	Gris	blanc	+++	Gris blanc	Blanc	+++	Gris	Orange	+++	Gris	Marron	Beige foncé
A60	+++	Gris	Gris	+++	Gris	Gris	+++	Gris foncé	Beige	+++	Gris foncé	noir	-
A63	+++	Gris	Jaune	+	Gris	Jaune foncé	+++	Gris	Jaune orange	+++	Gris	Marron	Marron foncé
A64	+++	Gris foncé	Marron fonce	+++	Gris	marron	+++	Gris foncé	brun	+++	Gris foncé	marron	Marron foncé
A65	+++	Beige foncé	Jaune pale	+++	Blanc	Jaune	+++	Blanc	jaune	+++	Blanc	Jaune	
A76	+++	Gris	Jaune foncé	+	Gris	Orange	+++	Gris foncé	Marron	+++	Gris foncé	Jaune	Marron foncé -
A79	+++	Gris verdâtre	Beige	++	Gris	Beige	+++	Gris foncé	Marron	+++	Gris foncé	Marron	Marron chocolat

**Tableau 17 (suite) : Etude macromorphologique et caractères cultureux de 30 isolats d'actinomycètes.**

Isolats	Milieux de culture												
	ISP2			ISP3			ISP4			ISP7			
	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Croissance	Couleur du MA	Couleur du MV	Pigments solubles
A3	+++	Gris foncé	Marron fonce	+++	Gris	marron	+++	Gris foncé	brun	+++	Gris foncé	marron	Marron foncé
A7	+++	Beige foncé	Jaune pale	+++	Blanc	Jaune	+++	Blanc	jaune	+++	blanc	Jaune	-
A10	+++	Gris	Jaune foncé	+	Gris	Orange	+++	Gris	Marron	+++	Gris	Marron	Marron foncé
A14	+++	Blanc	Jaune foncé	+++	beige	Brun	+++	Beige	Brun	+++	Blanc à beige	Brun orangée	-
A15	+++	Jaune pale	Jaune pale	+	Blanc	beige	+++	Blanc	beige	+++	Beige	Crème	-
A23	+++	Jaune pale	Jaune pale	++	Jaune foncé	Crème	+++	Jaune fonce	jaune	+++	Jaune foncé	crème	-
A43	+++	Blanc	Jaune	++	Blanc	beige	+++	blanc	beige	+++	Blanc	beige	-
A61	+++	Blanc	blanc	+++	Blanc	Beige clair	+++	Blanc	Beige foncé	+++	blanc	Brun	-
A27	+++	Gris	blanc	+++	Gris blanc	Blanc	+++	Gris	Orange	+++	Gris	Marron	Beige foncé
A33	+++	Gris	Gris	+++	Gris	Gris	+++	Gris foncé	Beige	+++	Gris foncé	noir	-
A41	+++	Gris	Jaune	+	Gris	Jaune foncé	+++	<b>Gris</b>	Jaune orange	+++	Gris	Marron	Marron foncé
A26	+++	Blanc	Jaune foncé	+++	beige	Brun	+++	Beige	Brun	+++	Blanc à beige	Brun orangée	-
A36	+++	Jaune pale	Jaune pale	+	Blanc	beige	+++	Blanc	beige	+++	Beige	Crème	-
A80	+++	+++	Beige foncé	++	+++	Blanc	Jaune	+++	Blanc	jaune	+++	Blanc	Jaune
A22	+++	+++	Gris	++	+	Gris	Orange	+++	Gris foncé	Marron	+++	Gris foncé	Jaune
A34	+++	Gris verdâtre	Beige	++	Gris	Beige	+++	Gris	Marron	+++	Gris	Marron	Marron chocolat



## **1.2- Micromorphologie**

Les colonies des isolats cultivés sur les milieux utilisés pour l'étude de la macromorphologie (ISP2, ISP3, ISP4 et ISP7) sont observées sur boîtes de Pétri sous microscope optique à l'objectif x 40 après 14 jours d'incubation à 28 °C.

Les observations microscopiques des mycéliums aériens des souches mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés et non septés. Les chaînes de spores portées à l'extrémité des hyphes sont droites de type rectiflexibles. Les spores sont cylindriques et ne présentent aucune mobilité. Le mycélium végétatif quant à lui est long, très arborescent, non fragmenté et ne portant pas de spores.

## **3- Étude physiologique et biochimique**

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques de 30 isolats d'actinomycètes testés sont présentés dans le tableau 18.

**Tableau 18** : Les différents caractères physiologiques et biochimiques de 30 isolats

<b>Isolats</b>	A30	A44	A46	A49	A50	A53	A57	A58	A60	A63	A64	A65	A76	A79	A3
<b>Utilisation de la source du carbone</b>															
Glucose	+	+++	++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+++	++	+	+	+
Maltose	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
Mannitol	-	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-	-
Arabinose	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	-	+	-	-
Lactose	-	+++	+	+	+	-	+++	+++	+++	-	+++	+	+	+	-
Fructose	-	+++	-	++	+	-	+++	+++	+++	-	+++	-	++	+	-
saccharose	-	++	-	++	-	-	+++	+++	+++	-	+++	-	++	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-
<b>Sensibilité aux antibiotiques</b>															
Amoxicilline 2µg	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Amoxicilline 30µg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Chloramphenicol30µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline30µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine 15µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicine 10µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrate réduction	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Température de croissance</b>															
45°C	+++	++	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-
28°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>pH</b>															
4	++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+	-
9	+++	+	++	+++	+	+	+	+	+	+++	+	++	+	+++	-
12	+++	+	++	++	+++	+	+		+	+++	+	+++	+	+++	-

**Tableau 18 (Suite) :** Les différents caractères physiologiques et biochimiques de 30 isolats

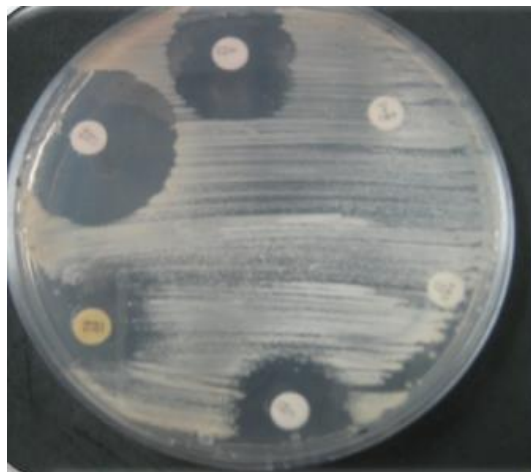
<b>Isolats</b>	A7	A10	A14	A15	A23	A43	A61	A27	A33	A41	A26	A36	A80	A22	A34
<b>Utilisation de la source du carbone</b>															
Glucose	+	+++	++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+++	++	+	+	+
Maltose	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
Mannitol	-	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-	-
Arabinose	-	+	-	+	-	-	+++	+++	+++	-	+	-	+	-	-
Lactose	-	+++	+	+	+	-	+++	+++	+++	-	+++	+	+	+	-
Fructose	-	+++	-	++	+	-	+++	+++	+++	-	+++	-	++	+	-
saccharose	-	++	-	++	-	-	+++	+++	+++	-	+++	-	++	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-
<b>Sensibilité aux antibiotiques</b>															
Amoxicilline 2µg	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Amoxicilline 30µg	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Chloramphenicol30µg	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline30µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine 15µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicine 10µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrate réduction	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Température de croissance</b>															
45°C	+++	++	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-
28°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>pH</b>															
4	++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+	-
9	+++	+	++	+++	+	+	+	+	+	+++	+	++	+	+++	-
12	+++	+	++	++	+++	+	+		+	+++	+	+++	+	+++	-

Les 30 souches cultivées sur le milieu ISP9 se développent sur le milieu contenant le glucose et le maltose alors que le galactose n'est pas utilisé par toutes les souches. Pour les souches A44, A57, A58, A60, A64, A10, A61, A27, A33 et A26, elles utilisent le mannitol, l'arabinose, le lactose, le fructose et le saccharose. Le citrate est dégradé par A44, A46, A49, A58, A64, A65, A76, A10, A14, A15, A27, A26, A36 et A80.

Toutes les souches sont catalase positives. Les deux isolats A58 et A27 réduisent les nitrates en nitrites.

### 2.1- La sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches sont sensibles à chloramphénicol 30 µg, Tétracycline 30µg, érythromycine 15 µg et gentamicine 10 µg. Les souches A30 ; A49 ; A50 ; A57 ; A58 ; A 60 ; A63 ; A76 ; A79, A7, A15, A23, A61, A27, A33, A41, A22, A80, A3 et A34 sont résistantes à l'amoxicilline 2 et 30 µg. Alors que A44, A64, A10 et A26 sont sensibles à ces concentrations de cet antibiotique. A46 ; A53 ; A65, A46, A43 et A36 sont sensibles à l'amoxicilline 2 µg.(Figure24)



**Figure 24 :** Photo montrant la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques.

### 2.2- Détermination de la Température optimale de croissance

Toutes les souches présentent une bonne croissance qui se traduit par un développement plus important du MA à 28 °C et les souches A30, A44, A49, A57, A58, A60, A63, A64, A76, A7, A10, A15, A61, A27, A33, A41, A26 et A80 poussent à 45°C.

### 2.3- Croissance à différents pH

Les souches A44, A49, A57, A58, A60, A64, A76, A10, A15, A61, A27, A33, A26 et A80 croissent à des pH allant de 4 à 12, avec un optimum de croissance à pH =4.

Les membres d'actinomycètes appartenant aux neutrotolérants sont moins capables d'utiliser les sources de carbones que leurs homologues acidophiles (*Kim et al., 2004*).

### **3- Identification moléculaire**

#### **3.1- Analyse de la séquence d'ADNr 16S**

Les résultats du séquençage des souches d'actinomycètes ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts sous logiciel ChromasR. Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par le logiciel Clustal W pour définir la séquence consensus.

#### **3.2- Comparaison des séquences avec la banque informatique**

Pour évaluer la diversité des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir, une méthode PCR a été effectuée sur les 30 isolats en utilisant des amorces FGPS 6 et FGPS 1509 (Normand *et al.*, 1992) qui permettent l'amplification d'un fragment de 1400 pb qui correspond aux régions V3 à V5 du gène de l'ADNr 16S (Brosius *et al.*, 1981). Les séquences obtenues sont comparées avec celles disponibles dans les bases de données Gen Bank, en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) au Centre National de l'Information pour la Biotechnologie (NCBI).

L'alignement des séquences nucléotidiques avec celles de la banque de données montrent que les 30 souches d'actinomycètes isolées sont classées dans le phylum des Actinobacteria, la classe V des Actinobacteridae et l'ordre I des Actinomycetales et toutes font partie du genre *Streptomyces* avec des pourcentages de similitude variable entre 99 et 100% (tableau 19). Des résultats similaires ont été obtenus dans la littérature par d'autres auteurs (Isik *et al.*, 2014)

Chaque isolat présente une similitude avec plusieurs espèces de la banque de donnée « Genbank ». Pour affilier chacun des isolats à l'une des espèces les plus proches, une analyse phylogénétique est donc nécessaire.

**Tableau 19** : Espèces proches des isolats d'actinomycètes

Isolats d'actinomycètes	Souches proches	Numéro d'accession	Pourcentage de similitude
A30	<i>Streptomyces lilaceus</i>	AB 184457	99%
A44	<i>Streptomyces bellus</i>	Nr_041222	99%
A46	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A49	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A50	<i>Streptomyces azureus</i>	LM644081	100%
A52	<i>Streptomyces lilaceus</i>	AB 184457	99%
A57	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	GQ925802	99%
A58	<i>Streptomyces rochei</i>	KC1720301	100%
A60	<i>Streptomyces labedae</i>	KU5003691	100%
A63	<i>Streptomyces griseorubens</i>	EU841556	99%
A64	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A65	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	GQ925802	99%
A76	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	GQ925802	99%
A79	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A3	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A7	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A10	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A14	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A15	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A23	<i>Streptomyces griseorubens</i>	EU841556	99%
A43	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A61	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A27	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	GQ925802	99%
A33	<i>Streptomyces griseorubens</i>	EU841556	99%
A41	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%
A26	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	GQ925802	99%
A36	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	KU324449	99%
A80	<i>Streptomyces griseorubens</i>	KY120282	99%
A22	<i>Streptomyces griseorubens</i>	EU841556	99%
A34	<i>Streptomyces bellus</i>	NR_041222	99%

L'analyse des séquences nous a permis de réaliser un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), par la méthode de neighbour-joining . La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps (Felsenstein, 1985) en réalisant 1000 réplicats.

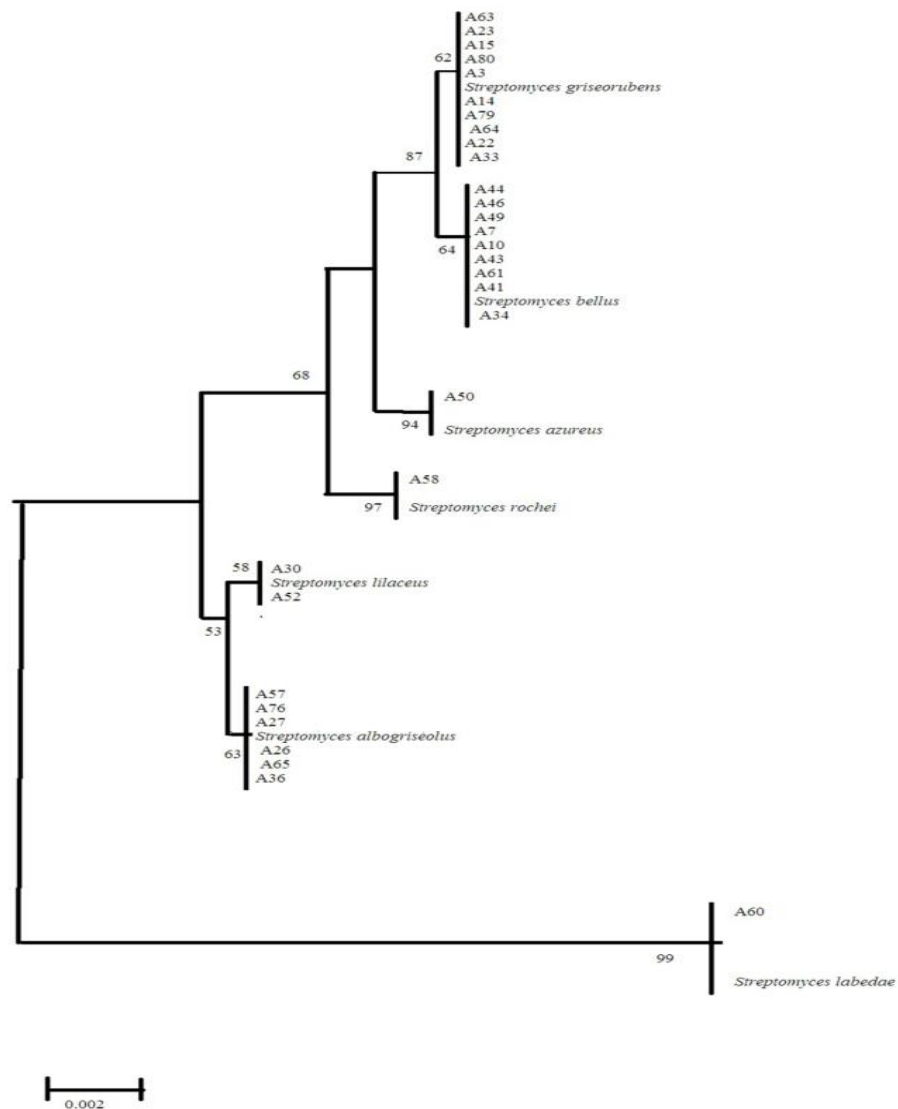
L'analyse de cet arbre montre un assemblage des séquences du gène codant l'ARNr 16S aux espèces du gène *Streptomyces*.

Les isolats forment sept groupes phylogénétiques sur l'arbre phylogénétique (figure 25). Le plus grand groupe comprend 10 isolats (A63, A23, A15, A80, A3, A14, A79, A64, A22 et A33) qui sont placés sur la même branche phylogénétique que *Streptomyces griseorubens*. Le deuxième groupe phylogénétique est composé des 9 isolats (A44, A46, A49, A7, A10, A43, A61, A41 et A34) qui occupe la même branche phylogénétique avec *Streptomyces bellus*. Les isolats A57, A76, A27, A26, A65 et A36 sont groupés avec *Streptomyces albogriseolus* formant le troisième groupe phylogénétique. Deux isolats (A30 et A52) sont affiliés à *Streptomyces lilaceus*. Les isolats A58, A60 et A50 présentent une similarité respectivement aux souches *Streptomyces rochei*, *Streptomyces labedae* et *Streptomyces azureus*.

Les résultats confirment l'abondance du genre *Streptomyces* au sein des souches d'actinomycètes isolées. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Felsenstein J et al 1985, Sabaou N et al 1998). Il a été rapporté que seulement 0,001 à 15 % de la population microbienne présente dans les échantillons environnementaux est cultivable (Lechevalier and Lechevalier, 1986). Les espèces du genre *Streptomyces* ont la capacité de produire une grande variété d'enzymes extracellulaires et d'antibiotiques (Amann *et al.*, 1995), ce qui peut expliquer leur grande capacité à coloniser différents environnements.

Les séquences du gène de l'ADNr 16S ont joué un rôle vital en microbiologie et peuvent être utilisées de diverses manières dans diverses disciplines, notamment la taxonomie et l'écologie. Cela a conduit à une abondance d'informations sur la diversité des procaryotes (Trejo-Estrada *et al.*, 1998, Zhi *et al.*, 2009).

Les résultats ont montré une distribution hétérogène des souches dans les 11 sols étudiés. Nous avons trouvé les souches *Streptomyces griseorubens* dans les sols 1; 11; 7; 6; 5; 8 et 4, *Streptomyces bellus* dans les sols 6; 4; 10; 5; 9; 8 et 11, *Streptomyces albogriseolus* dans les sols 1; 2; 6; 8 et 3, *Streptomyces lilaceus* dans les sols 6 et 1, *Streptomyces rochei* dans le sol 2 et *Streptomyces labedae*, *Streptomyces azureus* dans le sol 6. Cette distribution peut être expliquée par la différence des caractères physicochimiques des sols de la région de Béni Amir, qui présente un taux de salinité élevé. Ces résultats sont similaires à ceux de (ZANANE *et al.*, 2018) qui ont montré que la diversité des actinomycètes est associée aux caractères physicochimiques du sol à savoir la salinité, la matière organique, l'humidité et le pH.



**Figure 25** : Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir des séquences nucléotides du gène codant l'ARNr 16S, avec la méthode de neighbour-joining.

#### IV-CONCLUSION

La comparaison des séquences après amplifications de l'ADNr 16S avec les actinomycètes disponibles dans la base de données (Genbank) à l'aide du programme Blast a montré que les 30 souches étudiées ici étaient assimilées au genre *Streptomyces* avec des pourcentages allant de 99 à 100%. Ces résultats confirment l'abondance de *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques par rapport aux autres genres.

Les résultats ont montré que la distribution des actinomycètes dans les sols varie d'un sol à l'autre. Cette diversité peut être influencée par la forte salinité de la région de Beni Amir.



Les techniques moléculaires basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S peuvent mettre en évidence une grande diversité phylogénétique dans les écosystèmes.

# **Chapitre III :**

## **CRIBLAGE DES ACTINOMYCETES A INTERET BIOTECHNOLOGIQUE**

### **I-INTRODUCTION**

Les actinomycètes sont les bactéries les plus répandues pour leurs capacités à produire des métabolites à activité antimicrobienne (Finance *et al.*, 1985, Hilali *et al.*, 2002). Les microorganismes trouvés dans des environnements extrêmes sont utilisés par plusieurs programmes de recherche dans le monde entier en raison de la production par ces microorganismes de nouveaux composés à intérêt biotechnologique. Plusieurs travaux de recherche ont été menés sur des actinomycètes trouvés dans des environnements extrêmes (Jiang *et al.*, 1999).

Les actinomycètes halophiles et tolérants au sel sont des microorganismes extrémophiles, ayant attiré beaucoup d'attention et sont naturels et possédant des mécanismes spécialisés d'adaptation aux sols salins (Solingen *et al.*, 2001)

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes, il est pratiqué par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes (Ouhdouch *et al.*, 2001, Lemriss *et al.*, 2003) et en mettant au point des méthodes de sélection favorisant des espèces rares (Hacene *et al.*, 1994, Hilali *et al.*, 2002).

L'objectif principal de ce chapitre est d'étudier la biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants et de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées des sols de la région de Béni Amir connue par sa salinité élevée.

### **II- MATERIELS ET METHODES**

#### **1- Détermination de la tolérance au sel des actinomycètes**

Les actinomycètes purifiés sontensemencés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MMS, dans lequel les concentrations de NaCl étaient respectivement de 0, 50, 70 et

100 g/l. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C et le développement des souches dans les différentes boîtes est observé après 21 jours d'incubation. La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (Geraldine *et al.*, 1981).

## **2- Activité antimicrobienne**

### **2.1- Souches testées**

Les souches utilisées sont des souches de référence obtenues du Laboratoire de Bioprocédés et Biointerfaces de la FST de béli Mellal. Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont :

#### **❖ Bactéries à Gram-négatif**

- Salmonella sp* CCMMB17,
- E. Coli* CCMMB4,
- E. Coli* ATCC 25922,
- Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

#### **❖ Bactéries à Gram-positif**

- Micrococcus luteus* ATCC 381

#### **❖ Levures :**

- Candida albicans* CCMML15

#### **❖ Champignons :**

- Verticillium dahliae* V22
- Rhizoctonia*
- Fusarium oxysporum* A27

### **2.2-Conservation des souches**

Nous avons fait un repiquage à partir des souches identifiées dans leurs milieux sélectifs. Elles ont été inoculées sous forme de strie sur une gélose nutritive inclinée dans des tubes à essais stériles. Ensuite, nous avons laissé incuber à 37 °C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite conservés dans le réfrigérateur à  $6 \pm 1$  °C. Les repiquages sur gélose nutritive ont été réalisés tous les 15 jours.

## **3- Préparation des suspensions bactériennes**

Pour chaque bactérie-test, un inoculum a été réalisé à partir d'une culture de 24 h, mis en suspension dans le milieu LB (Luria-Bertani Medium) stérile de telle manière à obtenir une densité optique entre 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes en phase de croissance exponentielle.

#### **4- Choix des milieux de culture**

Suivant les méthodes utilisées dans l'activité antimicrobienne et selon les souches, nous avons employé les milieux de culture suivants:

- Milieu MH (Mueller Hinton) pour les bactéries.
- Le milieu PDA pour les champignons.
- Sabouraud pour la levure

#### **5-Test des cylindres d'agar**

L'activité antibactérienne et l'activité antifongique sont déterminées par la technique des cylindres d'agar (Lee et Hwang, 2002) qui consiste à prélever, à l'aide d'un emporte-pièce, des cylindres de 6mm de diamètre à partir du milieu Bennett gélosé ensemencé en stries serrées par les actinomycètes et incubé durant quatorze jours à 28 °C et, par la suite, les déposer sur milieu gélosé (Mueller-Hinton pour les bactéries, PDA pour les champignons filamenteux et Sabouraud pour la levure), préalablement, ensemencé en surface par les microorganismes cibles dont la concentration est de  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Les boîtes de Pétri sont ensuite maintenues à 4 °C pendant 4 heures pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes actives dans le milieu déculturé (Tortorano *et al.*, 1979), puis incubées à 28 °C. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant vingt-quatre heures dans le cas des bactéries-tests et à 28 °C pendant quarante-huit heures pour les champignons-tests. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètre du bord de la souche actinomycétale ou du cylindre d'agar à la limite de la zone où il y a une croissance normale du microorganisme cible (Badji *et al.*, 2005, Boughachiche *et al.*, 2005)

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1- Tolérance au sel des actinomycètes des sols de Béni Amir

A partir des résultats obtenus (Annexe 2), nous avons pu déduire que les souches d'actinomycètes ne nécessitent pas la présence de NaCl dans leur milieu pour se développer. Ce sont des actinomycètes halotolérants. Nous avons réparti les souches d'actinomycètes isolées du sol de Beni Amir en 2 groupes:

A partir des résultats obtenus (Annexe2), nous avons pu déduire que les souches d'actinomycètes ne nécessitent pas la présence de NaCl dans leur milieu pour se développer. Ce sont des actinomycètes halotolérants. Nous avons réparti les souches d'actinomycètes isolées du sol de Beni Amir en 2 groupes :

Le premier groupe est composé de 61 souches qui se sont développées sur le milieu contenant la concentration de 50 g / L de NaCl; Correspondant à 76,25% des actinomycètes étudiés. Le second groupe est composé de 14 souches capables de croître sur le milieu SMM avec une concentration en NaCl de 70 g / l; ce qui représente 17,5% de tous les actinomycètes. Ce résultat concorde avec le résultat trouvé par (Cai *et al.*, 2009) qui a montré que 10 souches pouvaient croître sur 70 g de NaCl / l de milieu. Nos résultats ont montré une tolérance à la salinité et une adaptation à des conditions défavorables, conformément aux études sur *Bacillus okuhidensis* et *Bacillus halodurans* (Li *et al.*, 2002)

Des études obtenues par (Petrovic̃ *et al.*, 2002) ; (Kis-Papo *et al.* (2003) ont rapporté que des variétés de champignons ont été isolées de la Mer Morte se développant dans un milieu à (340 g / L de NaCl). Pour s'adapter à ces conditions, les halophiles accumulent généralement de fortes concentrations de substances dissoutes ou d'osmolytes (Roberts, 2005) et de cryoprotecteurs dans leur cytoplasme. Les osmolytes qui s'accumulent dans la cellule halophile sont généralement des acides aminés et des polyols tels que ; La bétaine, la glycine, l'acétoïne, le tréhalose et le glycérol qui ne perturbent pas le processus métabolique et qui n'ont pas de charge à l'exception de leur effet sur le pH (Sarma, 2001, Kis-Papo *et al.*, 2003). Les souches bactériennes testées présentent une halotolérance, elles possèdent les capacités endogènes pour équilibrer leur pression de turgescence et de résister au stress osmotique en dehors de toute osmoprotection externe.

Elles porteraient donc l'information génétique et l'équipement enzymatique nécessaire à l'osmotolérance (Kerbab, 2018).

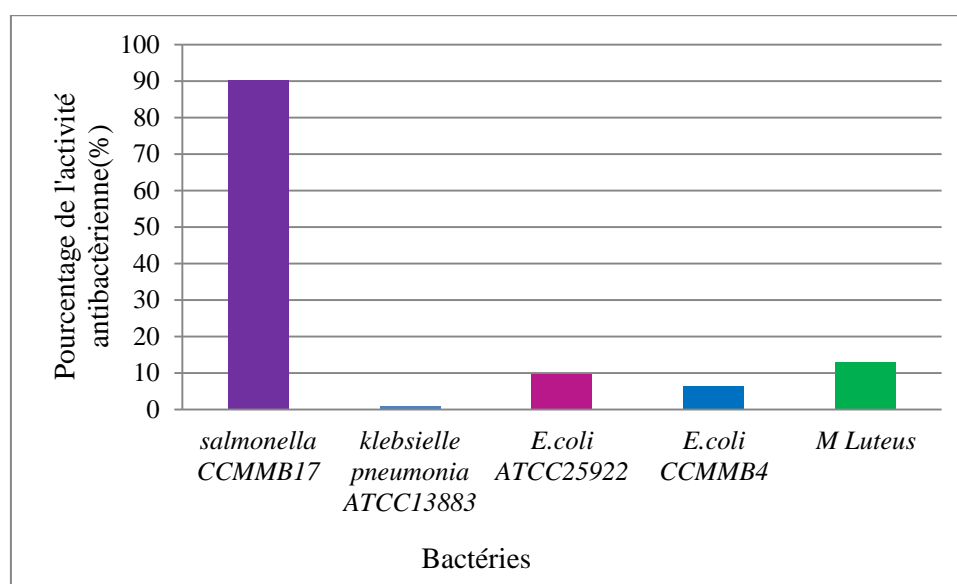
## 2- Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique de 80 souches d'actinomycètes isolées des sols de la région de Béni Amir a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar.

### 2.1- Activité antibactérienne

Dans cette étude, le taux d'isolement d'actinomycètes à activité antibactérienne était de 76,25 % alors que dans des études antérieures, il a été démontré que le taux d'isolement d'actinomycètes productrices d'antibiotiques est supérieur à 40 % (Lemriss *et al.*, 2003) et dans d'autres il est moins de 10 % (Jiang *et al.*, 1999).

61 souches parmi les 80 testées, ont montré une activité antibactérienne contre au moins un des germes cibles testés (*salmonella sp CCMMB17* (61,25%), *k. pneumonia ATCC13883* (2,5%), *E. coli ATCC25922* (10%), *E. coli CCMMB4* (3,75%), *Micrococcus luteus ATCC 381* (5%)) (Figure 26).



**Figure 26 :** Pourcentages d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir.

Les isolats Actinomycètes A22 et A60 n'ont aucune activité inhibitrice contre aucun des organismes testés, les deux isolats A26 et A29 ont montré une activité contre toutes les bactéries sauf *Klebsielle pneumoniae ATCC 13883*, les isolats A36 et A40 sont actifs contre *Salmonella sp CCMMB17* et *Micrococcus luteus ATCC381*, et A45 a seulement une activité

contre *E. coli* ATCC25922. Les résultats ont montré que quatre actinomycètes ont une activité contre *M. luteus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 10 à 16 mm.

Les résultats révèlent que la plupart des isolats étaient plus actifs contre les bactéries Gram négatives (*Salmonella sp* CCMMB17, *E. coli* ATCC25922 et *E. coli* CCMMB4) que les bactéries Gram-positives. L'effet plus marqué sur les bactéries Gram négatives pourrait être attribué aux différences morphologiques entre ces microorganismes. Les bactéries Gram-négatives ont une membrane de polysaccharide externe portant la composante lipopolysaccharidique. Cela rend la paroi cellulaire soluté imperméable aux lipophiles, le Gram positif devrait d'avantage être susceptible d'avoir uniquement une couche externe de peptidoglycane qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (Scherrer & Gerhardt, 1971) (Annexe 3).

Cependant, cette hypothèse ne concorde pas avec la conclusion de divers chercheurs qui ont observé que la réaction antagoniste contre les bactéries Gram-positives était beaucoup plus élevée que celle des Gram-négatifs ((Balagurunathan *et al.*, 1996, Oskay *et al.*, 2004, Sacramento *et al.*, 2004).

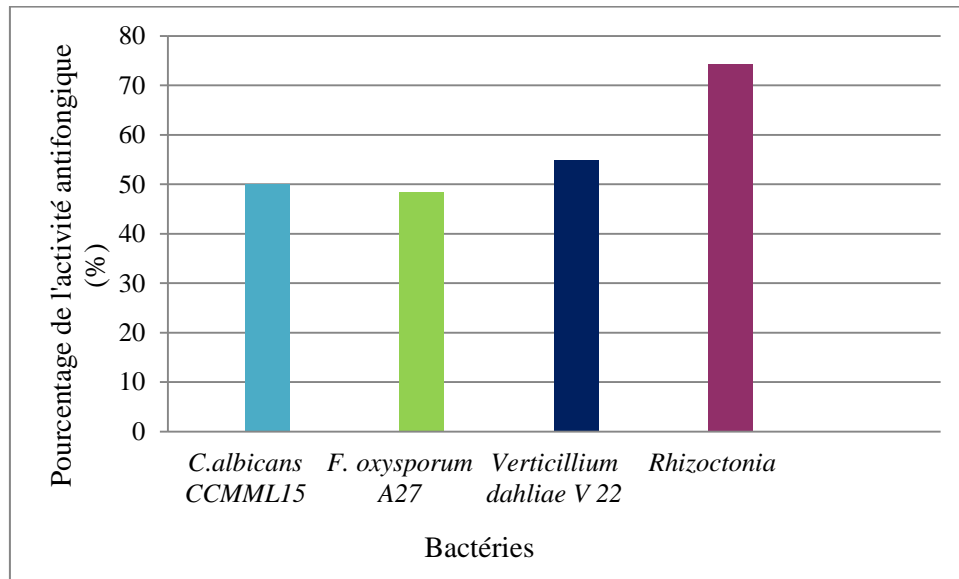
Le travail de (Fourati-Ben Fguira *et al.*, 2005) a montré que les isolats du *Streptomyces* tunisiens isolés du sol possèdent une activité inhibitrice entre 21 et 32 mm par ce germe. Par contre, une souche de *Streptosporangium* isolée du sol du Sahara algérien a montré des zones d'inhibition de 41 mm et des fractions du surnageant purifiées par HPLC ont montré des zones d'inhibition entre 26 et 34 mm (Boudjella *et al.*, 2006, Boudjella *et al.*, 2007).

La plupart des souches d'actinomycètes n'ont pas montré d'effet sur *E. coli*. Par contre les souches Actinomycétales A26, A29, A45 ont montré un effet inhibiteur pour *E. coli* ATCC25922 et les souches A26, A29, A37, A38, A39, A54, A80 pour *E. coli* CCMMB4 avec des zones d'inhibition de 13 et 18mm. Des résultats similaires ont été décrits par (ŞAHİN and UĞUR, 2003) où deux des 15 souches isolées des *Streptomyces* du sol sont actives avec des zones d'inhibition entre 10 et 20 mm de diamètre. Le même résultat est trouvé dans le travail de (Oskay *et al.*, 2004) où à partir d'un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol en Turquie, seules deux souches étaient actives contre *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition compris entre 15 et 26 mm.

## 2.2- Activité antifongique

Le spectre d'activité antifongique des souches a été testé contre *C. albicans*, *Fusarium oxysporum* A27, *Verticillium dahliae* V22 et *Rhizoctonia* (Annexe4).

Sur 80 souches actives, 40 (50%) ont montré une activité contre *Candida albicans* CCMML15, 15 (48,38%) contre *Fusarium oxysporum* 27, 17 (54,83%) contre *Verticillium dahlia* V22 et 23 (74,19%) contre *Rhizoctonia* (Figure 27).



**Figure 27** : Potentiel antifongique des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir

L'évaluation de l'activité contre *Candida* révèle des zones d'inhibition entre 12 et 25 mm pour 40 des 80 souches testées (Annexe 4). Le travail de Lemriss et al. (2003) a montré que parmi les 110 actinomycètes, 42 (38%) sont actifs contre *C. albicans* CIP 884.65 avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 03 à 52 mm. De même (Ilić et al., 2005) ont rapporté que les souches du genre *Streptomyces* présentaient des zones d'inhibition (11-31mm) vis-à-vis de *C. albicans* ATCC10231. Le pourcentage d'isolats actifs contre *V. dahliae* était plus élevé dans cette étude que 8% des isolats d'actinobactéries marocains du sol rhizosphérique rapportés par ((Barakate et al., 2002). De plus, le pourcentage d'isolats actifs contre *F. oxysporum* était également supérieur à celui obtenu par (Kitouni et al., 2005) avec des échantillons de sol non rhizosphérique provenant d'une région semi-aride du nord-est de l'Algérie. Les travaux de (Hilali et al., 2002) montrent que lors du criblage initial de 85 souches isolées de plusieurs milieux naturels (sol, eau et sédiments marins), 18 souches ont présenté une activité antifongique contre *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*. Ce



résultat était également supérieur à celui obtenu par (Kitouni *et al.*, 2005), avec des échantillons de sol non rhizosphérique provenant d'une région semi-aride du nord-est de l'Algérie.

Ces variations de résultats du test d'activité antimicrobienne s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature de ces dernières dépend de la composition, la nature et la concentration des composants du milieu de culture.

#### **IV-CONCLUSION**

Dans ce chapitre, nous avons réalisé un criblage des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir.

Les résultats du test de tolérance au chlorure de sodium réalisé sur le milieu SMM additionné de différentes concentrations de NaCl (0 ; 50 ; 70 et 100 g /l) montrent que les actinomycètes testés sont des bactéries halotolérantes. 76,25% des actinomycètes testés ont pu croître sur le milieu contenant la concentration de 50g /L de NaCl et 17,5% sont capables de pousser sur le milieu SMM à concentration de NaCl de 70 g /l.

Sur les 80 souches d'actinomycètes isolées, 76,25% sont actives sur au moins une des bactéries test étudiées. Parmi cette population isolée, seules 50% ont présenté une activité antifongique contre au moins une souche fongique testée. On peut conclure que, d'une part, l'activité antimicrobienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre, et d'autre part, pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre.

Ces variations des résultats du test d'activité antimicrobienne s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont l'action dépend de la composition, de la nature et de la concentration des composants du milieu de culture.

En se basant sur les résultats de criblage des 80 souches d'actinomycètes isolées des sols de la région de Béni Amir, nous avons pu sélectionner 14 souches qui ont une tolérance vis-à-vis de la concentration de 70 g/l de NaCl la plus élevée. Ces mêmes souches ont montré

une activité antimicrobienne contre les différentes bactéries pathogènes testées. Ces souches vont faire l'objet d'une étude de caractérisation physicochimique de leur surface.

## **Chapitre IV :**

# **ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SURFACE CELLULAIRE DES ACTINOMYCETES PAR DEUX METHODES**

## **I-INTRODUCTION**

De nombreuses études ont rapporté que les propriétés physico- chimiques de la surface bactérienne sont impliquées dans plusieurs phénomènes interfaciaux comme l'adhésion microbienne. Ces propriétés comprennent l'hydrophobicité, la charge électrostatique et le caractère donneur / accepteur d'électrons. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à déterminer l'hydrophobicité et le caractère donneur / accepteur d'électrons des surfaces cellulaires des souches d'actinomycètes isolées des sols de la région de Béni Amir.

Rares sont les travaux qui étudient les caractéristiques physico-chimiques des actinomycètes. L'objectif de ce chapitre est d'étudier les caractères physicochimiques par les méthodes les plus couramment utilisées à savoir les méthodes MATS (Microbial Adhesion To Solvents) et l'Angle de Contact et ceci en utilisant deux forces ioniques du  $\text{KNO}_3$  pour se rapprocher des conditions naturelles.

## **II- MATERIELS ET METHODES**

### **1- Souches bactériennes et conditions de cultures.**

#### **1.1- Souches d'actinomycètes étudiées.**

A partir des 80 souches d'actinomycètes isolées présentant une activité antimicrobienne et suite au test de la tolérance de NaCl à différentes concentrations, quatorze souches actinomycétales différentes ont été retenues en raison de leur capacité à tolérer la forte concentration de NaCl qui est de 70g/l. Ces souches vont subir une caractérisation physicochimique de leur surface.

#### **1.2- Préparation des suspensions bactériennes**

Pour la richesse de la culture (Figure 28), approximativement 100 ml du milieu Bennet, pour chaque souche, sont incubés sous agitation pendant 7 jours à l'étuve à 28°C.



**Figure 28** : Culture des actinomycètes sur milieu Bennet liquide.

Après incubation, les cultures sont soumises à deux centrifugations (8 400g pendant 15 min) successives, pour se débarrasser du milieu de culture et laver les cellules. Les culots sont à chaque fois resuspendus dans une solution de  $\text{KNO}_3$  à deux forces ioniques différentes 0,1 M et 1,2 M successivement égales à 5,8 g / l et 70 g / l de  $\text{KNO}_3$ .

Après, la suspension a été soumise au Stomacher pendant 20 min afin de disperser la masse des actinomycètes et empêcher leurs agrégations. La concentration de chaque suspension bactérienne est ajustée, par mesure de la densité optique (DO) à 405 nm, entre 0,7 et 0,8 qui correspond à  $10^8$  UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre ELISA (Multiskan EX, labsystems) (Figure 29).



**Figure 29**: Etapes de préparation de la suspension bactérienne.

## **2-Détermination de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode MATS**

## 2.1-Principe

La technique du MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996), inspirée de la technique du MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) (Rosenberg, 1984), est très utilisée, vue sa simplicité, pour la détermination de l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes et de leur caractère acide-base au sens de Lewis.

Cette méthode est basée sur la comparaison de l'affinité d'une souche pour un solvant apolaire et un solvant monopolaire qui peut être acide ou basique (au sens de Lewis). Mais les deux solvants doivent posséder la même énergie libre de surface liée au caractère Lifshitz-Van der Waals (Tableau20).

**Tableau 20** : Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans la méthode MATS (Van Oss *et al.*, 1989)

Solvant	Formule	$\gamma^{LW}$ (mj/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^+$ (mj/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^-$ (mj/ m <sup>2</sup> )
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	27,2	3,8	0
Hexadécane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	27,2	0	0
Diéthyle éther	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O) <sub>2</sub>	16,7	0	16,4
Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	18,4	0	0

## 2.2-Détermination de l'hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface des cellules microbiennes est considérée comme un facteur majeur dans le phénomène de l'adhésion ((Rosenberg and Kjelleberg, 1986, Rosenberg and Doyle, 1990).

Le caractère hydrophobe/hydrophile est déterminé par le pourcentage de cellules ayant adhérees à l'hexadécane (ou à l'hexane).

La surface est considérée relativement hydrophobe lorsque ce pourcentage est supérieur à 50%, et relativement hydrophile dans le cas contraire.

## 2.3-Détermination du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons

La différence d'affinité entre le chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère donneur d'électrons d'une bactérie, puisque les composantes de Van der Waals des deux solvants étant identiques.

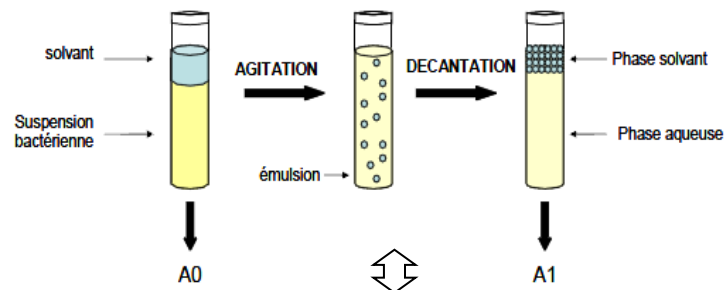
La différence d'affinité entre le diéthyle éther (solvant monopolaire basique) et l'hexane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère accepteur d'électrons de la bactérie, les composantes de Van der Waals des deux solvants étant identiques.

## 2.4- Technique expérimentale

2,4 ml de suspension bactérienne sont ajustés à une densité optique d'environ 0,8 (soit  $10^8$  UFC/ml) à 405 nm ( $A_0$ ) avec une solution de  $KNO_3$



Le mélange est vortexé avec 0,4 ml de chaque solvant pendant 90 secondes afin d'obtenir une émulsion. Il est ensuite laissé au repos pendant 15 min pour permettre la séparation complète des deux phases. La phase aqueuse est prélevée pour la mesure de la densité optique à 405 nm.



Le pourcentage d'affinité des bactéries aux solvants est déduit par la relation :

$$\text{Affinité (\%)} = (1 - A_1/A_0) * 100$$

$A_0$  : Densité Optique initiale de la suspension bactérienne

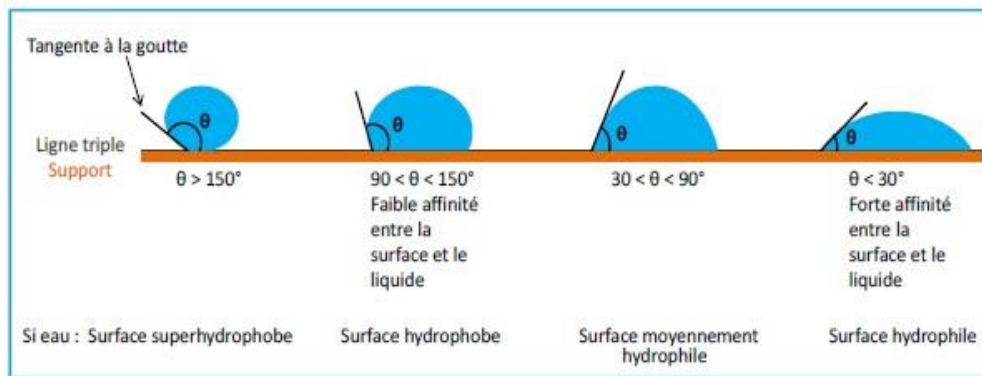
$A_1$  : Densité Optique finale de la suspension bactérienne

**Figure 30** : Déroulement du test MATS

### 3- Détermination de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode d'angle de contact

#### 3.1- Principe

La mesure d'angle de contact est une technique permettant d'évaluer la mouillabilité (hydrophobicité) d'une surface (la capacité d'une goutte à s'étaler sur la surface) (Fariss *et al.*, 2011). Elle consiste à y déposer une goutte d'un liquide de propriétés connues et à mesurer l'angle formé par la tangente du profil de celle-ci avec la surface réceptrice au point triple (Figure 31).



**Figure 31** : Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de ses affinités.

Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

Si on utilise d'autres liquides comme le formamide et le diiodométhane, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss (Van Oss *et al.*, 1988).

$$\cos\theta = -1 + 2(\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_S^+ \gamma_L^-)^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_S^- \gamma_L^+)^{1/2} / \gamma_L$$

$\gamma_S^{LW}$ : Composante de Lifshitz- Van der Waals de la surface

$\gamma_L^{LW}$ : Composante de Lifshitz- Van der Waals du liquide

$\gamma_S^+$ : Composante accepteur d'électrons de la surface.

$\gamma_L^+$ : Composante accepteur d'électrons du liquide.

$\gamma_S^-$ : Composante donneur d'électrons de la surface.

$\gamma_L^-$ : Composante donneur d'électrons du liquide.

#### 3.2- Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne est préparée de la même façon que précédemment pour l'étude de la technique du MATS.

### 3.3- Filtration

10 ml de la suspension bactérienne sont déposés sur un filtre d'acétate de cellulose de  $0,45\mu\text{m}$  (Sartorius) lavés préalablement par 10 ml d'eau distillée pour le mouillage. Cette filtration se fait au moyen de la pression négative jusqu'à l'obtention d'un tapis bactérien homogène et plat (Figure 32).



**Figure 32** : Filtration et filtres des couches minces des cellules bactériennes

Les filtres humides sont placés soigneusement sur un support de verre et laissés sécher à température ambiante pendant 30 min. Trois à six mesures d'angle de contact sont réalisées sur chaque échantillon en utilisant 3 solvants : eau distillée, formamide et diiodométhane (Tableau 21).

**Tableau 21** : Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans les mesures d'angle de contact (Van Oss, 1993)

Solvants/Matériels	$\gamma^{\text{tot}}$	$\gamma^{\text{LW}}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Eau	72,8	21,8	25,5	25,5
Di-iodométhane	50,8	50,8	0	0
Formamide	58	39	2,3	39,6

Les caractéristiques physico-chimiques de la surface des micro-organismes sont obtenues à partir de mesures d'angles de contact à l'aide d'un goniomètre (GBX, France) (Figure 33).





**Figure 33** : Goniomètre (dispositif) de la mesure de l'angle de contact

### **III- RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **1- Caractérisation de la surface des actinomycètes par la Méthode de MATS**

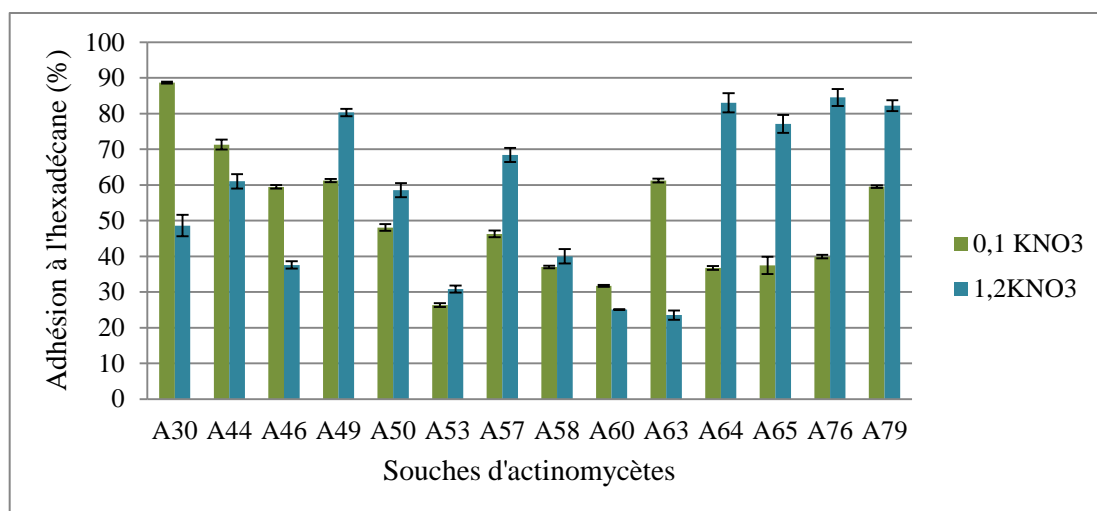
##### **1.1- Détermination du caractère hydrophobe /hydrophile des souches d'actinomycètes**

L'hydrophobicité de la surface des cellules microbiennes est un facteur majeur dans le phénomène de l'adhésion ((Rosenberg and Kjelleberg, 1986, Rosenberg and Doyle, 1990).

Le caractère hydrophobe/ Hydrophile est déterminé par le pourcentage de cellules ayant adhérees à l'hexadécane (ou à l'hexane).

La surface est considérée relativement hydrophobe lorsque ce pourcentage est supérieur à 50%, et relativement hydrophile dans le cas contraire.

Le pourcentage des cellules d'actinomycètes adhérentes à l'hexadécane est représenté dans la Figure 34.



**Figure 34** : Adhésion des actinomycètes à l'hexadécane à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du KNO<sub>3</sub>.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux forces ioniques 0,1 M et 1,2 M du KNO<sub>3</sub>. A la concentration 0,1M de KNO<sub>3</sub>, les souches A44(71,3%), A46(59,5%), A49(61,3%), A63(61,2%) et A79(59,5%) ont un pourcentage d'adhésion à l'hexadécane supérieur à 50% ce qui traduit un caractère hydrophobe. La souche A30 est fortement hydrophobe car son pourcentage d'adhésion à l'hexadécane est d'environ 90%. L'affinité à l'hexadécane des autres souches A50(48,1%), A53(26,3%), A57(46,3%), A58(37%), A60(31,7), A64(36,7%), A65(37,5) et A76(39,9) est inférieure à 50%, ce qui indique un caractère hydrophile.

Pour la force ionique 1,2M de KNO<sub>3</sub>, les souches A44(61%), A49(80,3%), A50(58,6%), A57(68,4%), A64(83%), A65(77,1%), A76(84,5%) et A79(82,2%) montrent une affinité importante supérieure à 50% pour l'hexadécane, ce qui indique que ces souches ont un caractère hydrophobe. Alors que les autres souches A46(37,6%), A53(30,8%), A58(40%), A60(25,1%) et A63(23,5) ont un caractère hydrophile remarquable puisque leur pourcentage d'adhésion à l'hexadécane ne dépasse pas 50%. La souche A30(48,6%) est relativement hydrophile.

**Les résultats montrent que 42,85% des actinomycètes étaient hydrophiles à 0,1M de KNO<sub>3</sub> et deviennent hydrophobes lorsque la concentration du KNO<sub>3</sub> a augmenté.**

La littérature rapporte une multitude d'études sur la caractérisation physicochimique de la surface des bactéries par la méthode MATS, mais les actinomycètes n'ont pas eu leur chance dans ce genre d'études. De ce fait, nous avons comparé nos résultats à ceux rapportés sur d'autres variétés de bactéries ou d'autres microorganismes.

Les résultats présentés dans cette étude montrent que les souches A30, A46, A63 et A53 sont hydrophiles à la forte force ionique. Les mêmes résultats ont été rapportés par (Hamadi *et al.* (2004), Latrache (2001)), Latrache *et al.* (2002) qui ont rapporté que les souches de *E. coli* et *Staphylococcus aureus* étaient hydrophiles. Dickson and Koochmaraie (1989), lorsqu'ils ont utilisé deux méthodes l'angle de contact et l'adhésion microbienne à l'hexadécane ont montré que. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. étaient hydrophiles. Les souches A44, A49, A50, A57, A60, A64, A65, A76 et A79 sont hydrophobes lorsque la concentration du  $\text{KNO}_3$  a augmenté. Ces résultats sont en accord avec les études effectuées sur certaines levures qui ont rapporté une hydrophobicité importante de la surface de *C. albicans* (Kuhn *et al.*, 2002). Les mêmes tendances ont été observées chez *C. parapsilosis* (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002).

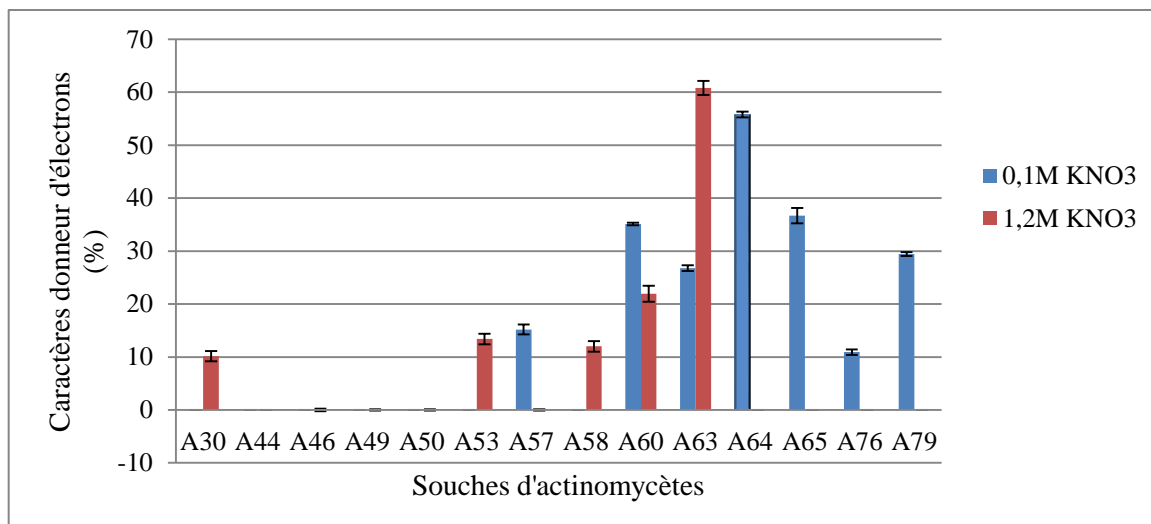
Les résultats de cette figure 34 montrent aussi que les souches d'actinomycètes du sol de Béni Amir, étudiées ici, traitées par différentes concentrations de  $\text{KNO}_3$  se comportent différemment vis-à-vis de la force ionique et peuvent se classer en 3 grandes catégories. Une première catégorie où l'adhésion à l'hexadécane ne change pas lorsque la concentration en  $\text{KNO}_3$  augmente (A44, A50, A53, A58 et A60). Une deuxième catégorie où l'adhésion à l'hexadécane augmente avec l'augmentation de la concentration en  $\text{KNO}_3$  (A49, A57, A64, A65, A76 et A79). Enfin, une troisième catégorie (A30, A46 et A63) où, à l'inverse du deuxième cas, l'adhésion à l'hexadécane diminue avec l'augmentation de la concentration en  $\text{KNO}_3$ . Ces trois catégories d'actinomycètes pourraient donc se comporter différemment vis-à-vis de l'adhésion sur des supports en général.

## **1.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1 et 1,2M du $\text{KNO}_3$ .**

### **a-Caractère donneur d'électrons.**

La différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme et le pourcentage d'adhésion à l'hexadécane permet l'estimation du caractère donneur d'électrons (basicité) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). La surface cellulaire n'est considérée "donneur" d'électrons que lorsque cette différence est positive (Hamadi *et al.*, 2004).

La figure 35 résume les résultats du caractère donneur d'électrons pour les souches d'actinomycètes étudiées.



**Figure 35** : Caractère donneur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du KNO<sub>3</sub>.

Pour la concentration 0,1M de KNO<sub>3</sub>, les souches A57 (15,1%), A60 (35,1%), A63 (26,7%), A64 (55,7%), A65 (36,6%), A76 (10,9%) et A79 (29,4%) ont une affinité plus importante au chloroforme en comparaison avec l'hexadécane, ce qui montre qu'elles ont un caractère donneur d'électrons bien exprimé. Alors que la différence entre le pourcentage des cellules adhérentes au chloroforme et à celui de l'hexadécane pour les souches A30, A44, A46, A49, A50, A53, A58 est négative, ce qui montre qu'elles ont un caractère donneur d'électrons nul.

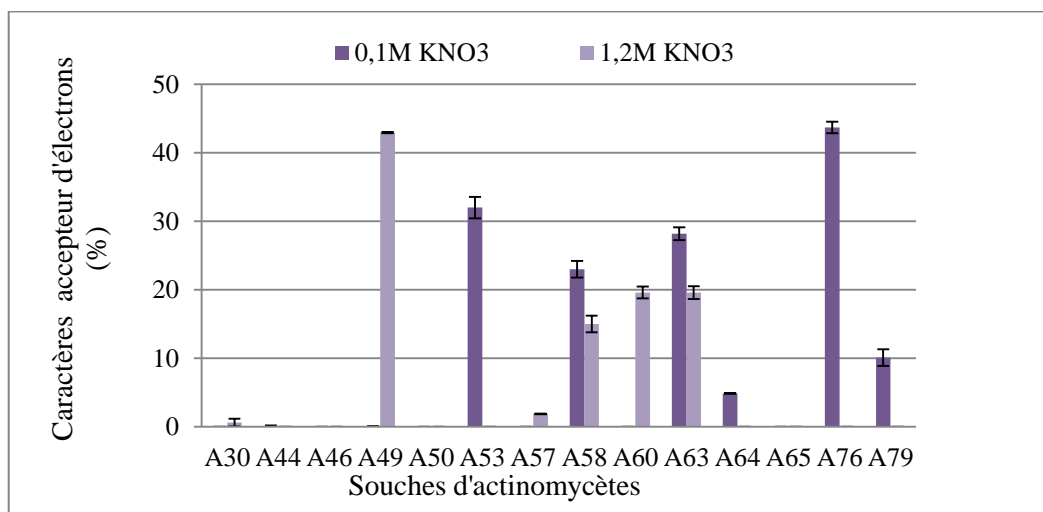
Pour 1,2M du KNO<sub>3</sub>, les souches A30(10,2%), A53(13,4%), A58(12%), A60(21,9%) et A63(60,8%) présentent un pourcentage d'adhésion au chloroforme supérieur à celui de l'hexadécane. Ces résultats montrent un caractère donneur d'électrons remarquable. Alors que toutes les autres souches montrent un caractère donneur d'électrons nul puisque la différence entre leurs pourcentages d'adhésion au chloroforme et à l'hexadécane est négative.

**Ces résultats montrent une augmentation du caractère donneur d'électrons avec l'augmentation de la force ionique pour 21,42% des souches d'actinomycètes.**

### b-Caractère accepteur d'électrons.

La différence entre le pourcentage d'adhésion au diéthyلة éther (DEE) et le pourcentage d'adhésion à l'hexane permet l'estimation du caractère accepteur d'électrons (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). La surface cellulaire n'est considérée "accepteur" d'électrons que lorsque cette différence est positive (Hamadi *et al.*, 2004).

Les figures 36 présente les résultats du caractère accepteur d'électrons pour les actinomycètes étudiées.



**Figure 36** : Caractère accepteur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1 M et 1,2 M du  $\text{KNO}_3$ .

Pour les souches A53, A58, A63, A64, A76 et A79, nous remarquons que la différence entre les pourcentages d'adhésion du DEE (diéthyle éther) et de l'hexane est positive, donc elles ont un caractère accepteur d'électrons, mais cette différence est négative pour les souches A30, A44, A46, A49, A50, A57 et A65, ce qui montre qu'elles ont un caractère accepteur d'électrons nul (Figure 36).

Ce graphe montre que les souches A49, A57, A58, A60 et A63 présentent un caractère acide car leurs pourcentages d'adhésion au DEE (diéthyle éther) sont supérieurs à ceux de l'hexane. Comme la différence entre le % d'adhésion au diéthyle éther et celui de l'hexane est négative, donc toutes les autres souches ont un caractère accepteur d'électrons nul.

**Les résultats montrent que le caractère accepteur d'électrons de la surface microbienne de 21,42% a augmenté en augmentant la concentration du  $\text{KNO}_3$ .**

Plusieurs travaux se sont consacrés à l'étude des éléments chimiques qui sont à l'origine du caractère donneur-accepteur d'électrons. En effet, de nombreux travaux ((Magnusson and Endler, 1977, Amory *et al.*, 1988, Mozes *et al.*, 1989, Cowan *et al.*, 1992, Cuperus *et al.*, 1993, Van der Mei *et al.*, 1993b, Latrache *et al.*, 1994, Rouxhet *et al.*, 1994) et Elghmari *et al.*, 2002) ont rapporté que la charge de la surface cellulaire peut être expliquée par la composition chimique de la surface déterminée par spectrophotométrie aux rayons X (XPS).

Les travaux de Pelletier *et al.* (1997a) qui ont utilisé la méthode MATS ont rapporté que les microorganismes hydrophiles possèdent un caractère donneur d'électrons important. De

même, (van Oss, 1994) a rapporté qu'une surface hydrophobe a un caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons faibles et qu'une surface hydrophile a un caractère donneur d'électrons important. Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que le caractère donneur-accepteur d'électrons des actinomycètes étudiés vont dans le même sens.

En effet, l'importance du caractère donneur d'électrons a été attribuée à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxyles (COO<sup>-</sup>), phosphates (PO<sub>4</sub>) des phospholipides, lipoprotéines et lipopolysaccharides, amines (NH<sub>2</sub>) (Briandet *et al.*, 1999a) ou les groupements sulfates (SO<sub>3</sub>) ((Pelletier *et al.*, 1997a). Ainsi que l'importance du caractère accepteur d'électrons a été attribuée à la présence des groupements acides exposés à la surface cellulaire, comme R-NH ou R-OH. Les travaux de (Hamadi *et al.* (2012)) ont corrélée le caractère donneur d'électrons de la surface d'*E. coli* à une combinaison du groupe carboxyle et du groupe amine et aussi à une combinaison des protéines et des polysaccharides. Une bonne corrélation ( $r = 0.84$ ) est observée entre le caractère donneur d'électrons et le rapport de RCOOH/RNH<sub>2</sub>

Il est important de noter que certaines souches d'actinomycètes étudiées présentent des caractères donneurs d'électrons très importants comme la souche A65 pour laquelle  $\gamma = 86,64\%$  (MATS) et  $\gamma = 68,25 \text{ mjm}^{-2}$  (CAM).

Les valeurs de ce caractère sont comparables à ceux rapportés par (Hamadi et al., 2008) sur *staphylococcus aureus ATCC 25923* qui ont montré que les valeurs de  $\gamma$  de ces bactéries par les deux méthodes MATS et Angle de contact sont respectivement 62% et  $59,06 \text{ mjm}^{-2}$ .

Aussi, Feng et al. (2013) ont rapporté que la souche *Pseudomonas putida 852* a une valeur élevée  $\gamma = 57.0 \text{ mjm}^{-2}$ . De même, Elfazazi et al. (2018) ont rapporté que *Salmonlla. Muenster* possède un caractère donneur d'électrons très élevé de l'ordre de  $72 \text{ mjm}^{-2}$ .

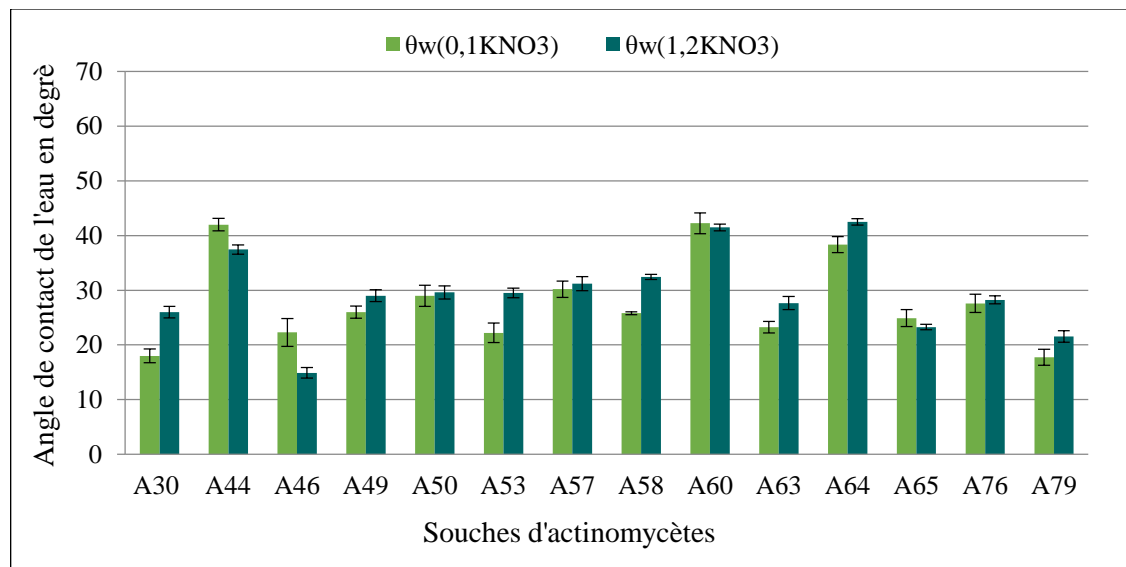
Ceci montre que nos souches d'actinomycètes ont des valeurs du caractère donneur-accepteur d'électrons importantes par rapport à la littérature.

## 2- Caractérisation de la surface des actinomycètes par la méthode de l'Angle de contact

### 2.1- Hydrophobicité qualitative et quantitative de la surface des différentes souches

#### a- Hydrophobicité qualitative

En utilisant l'eau, l'angle de contact nous permet d'avoir une idée sur l'hydrophobicité qualitative ( $\theta_w$ ) des surfaces des différentes souches utilisées. Lorsque sa valeur est supérieure à  $65^\circ$ , cela indique que la surface est hydrophobe, tandis qu'une valeur inférieure implique une surface hydrophile (Vogler, 1998). La figure 37 montre les valeurs des  $\theta_w$  obtenues pour les différentes souches en présence de deux forces ioniques ( $\text{KNO}_3$  0,1M et 1,2M).



**Figure 37 :** Hydrophobicité qualitative des actinomycètes en présence de  $\text{KNO}_3$  0,1M et 1,2M

On constate que toutes les souches en présence de  $\text{KNO}_3$  à 0,1M et 1,2M ont une valeur de  $\theta_w$  inférieure à  $65^\circ$ , ce qui signifie qu'elles sont toutes hydrophiles. Des résultats similaires ont été obtenus par (Maataoui *et al.*, 2014) avec trois souches de *Streptomyces*. Ainsi pour les surfaces des souches A30( $26^\circ$ ), A53( $29,5^\circ$ ), A58( $32,45^\circ$ ) et A79( $21,55^\circ$ ), l'hydrophobicité qualitative  $\theta_w$  a augmenté quand la force ionique augmente de 0,1M à 1,2M de  $\text{KNO}_3$ , alors qu'elle a peu augmenté pour certaines souches (A49, A63 et A64).

Puisque  $\theta_w$  a augmenté pour certaines souches, ceci indique une diminution de leur hydrophilie. Pour les souches A50( $29,6^\circ$ ), A57 ( $31,2^\circ$ ) et A76 ( $28,25^\circ$ ), une très faible variation d'hydrophilicité est observée. Une augmentation peu significative d'hydrophilicité est observée pour A46 ( $14,9^\circ$ ), alors que pour A44( $37,45^\circ$ ), A60( $42,25^\circ$ ) et A65( $23,25^\circ$ ) elle a diminué quand on passe de 0,1M à 1,2M de  $\text{KNO}_3$  (Figure 37).

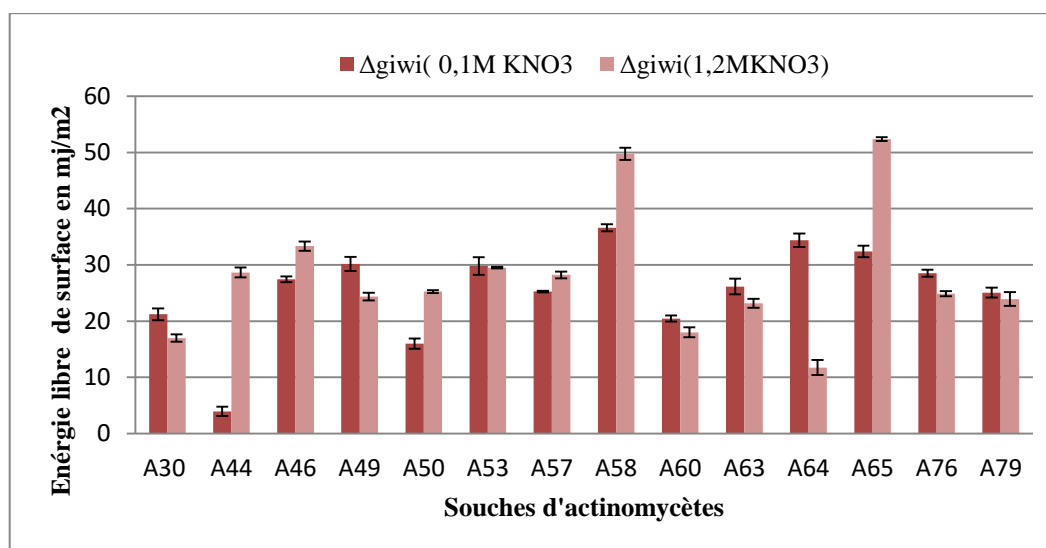
Une variation de l'hydrophilicité qualitative  $\theta_w$  peu significative a été obtenue pour les différentes souches en passant de la concentration 0,1M à 1,2M de  $KNO_3$ .

### **b- Hydrophobicité quantitative**

L'hydrophobicité à travers l'énergie libre de surface ( $\Delta Gi_w$ ) est définie selon le signe de la valeur de cette dernière. Une valeur positive indique l'hydrophilie et à l'inverse une valeur négative désigne l'hydrophobie. Ce paramètre est quantitatif et s'exprime en milli Joule par mètre carré ( $mJ.m^{-2}$ ). La figure 38 montre les valeurs de l'énergie libre de surface des différentes souches en présence de  $KNO_3$  0,1M et 1,2M respectivement. Nous remarquons que toutes les souches sont hydrophiles car  $\Delta Gi_w$  de chacune des souches est positive. Le classement dans l'ordre du plus hydrophile au moins hydrophile est le suivant :

**A44>A50>A60>A30>A79>A57>A63>A46>A76>A53>A49>A65>A64>A58 ( $KNO_3$  0,1M)**

**A64>A30>A60>A63>A79>A49>A76>A50>A57>A44>A53>A46>A58>A65 ( $KNO_3$  1,2M)**



**Figure 38** : Energie libre d'interaction de surfaces des souches pour  $KNO_3$  0,1M et 1,2M.

Les propriétés de surface des microorganismes dépendent de la composition de la surface de ces derniers et surtout leur composition chimique.

Plusieurs auteurs ont montré que l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est directement corrélée avec le rapport élevé des concentrations de N/C et inversement corrélée avec celui des concentrations de O/C (Mozes et al 1989, 1988; Cowan et al 1992 ; Cuperus et al 1993 ; Latrache et al 1994 ; Van der Mei et Busscher 1997 ; Dengis et Rouxhet 1997 ; Dufrene et al 1997; Boonaert et Rouxhet 2000; Latrache et al 2002). Ces résultats indiquent



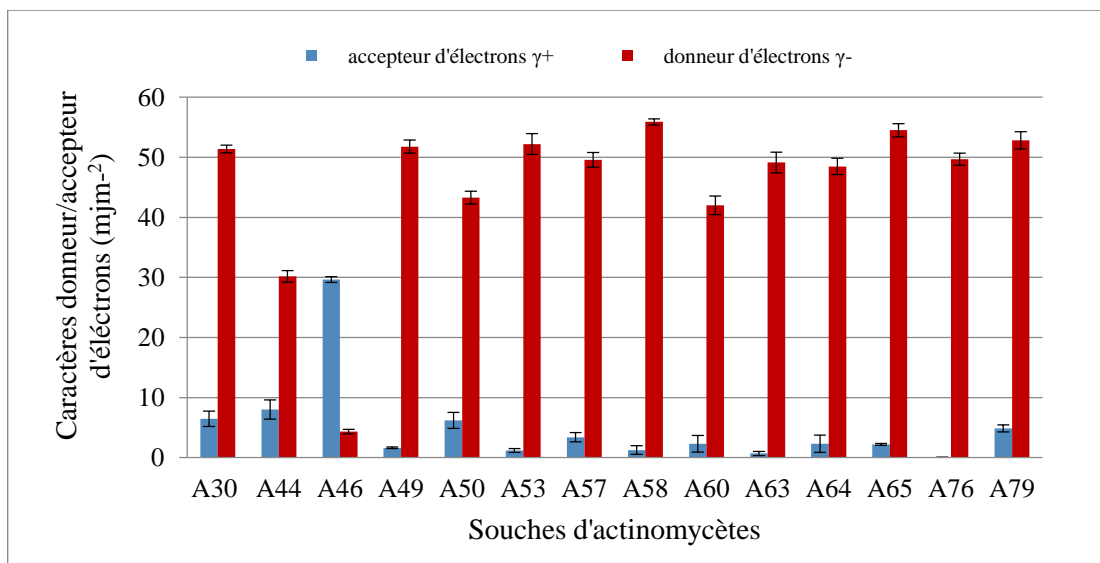
que l'origine de l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est les groupements contenant l'azote et l'origine de l'hydrophilicité est les groupements contenant l'oxygène.

De nombreuses études ont mis en évidence cette relation entre la composition de la surface cellulaire et le caractère hydrophobe/hydrophile des microorganismes. Ainsi, selon Latrache *et al.* (2002) l'hydrophilie d'*E.coli* est due à la présence de polysaccharides, par contre l'hydrophobie de leur surface est due à la présence de protéines. D'autres études ont montré que la présence de protéines est à l'origine de l'hydrophobicité des levures (Dengis and Rouxhet, 1997).

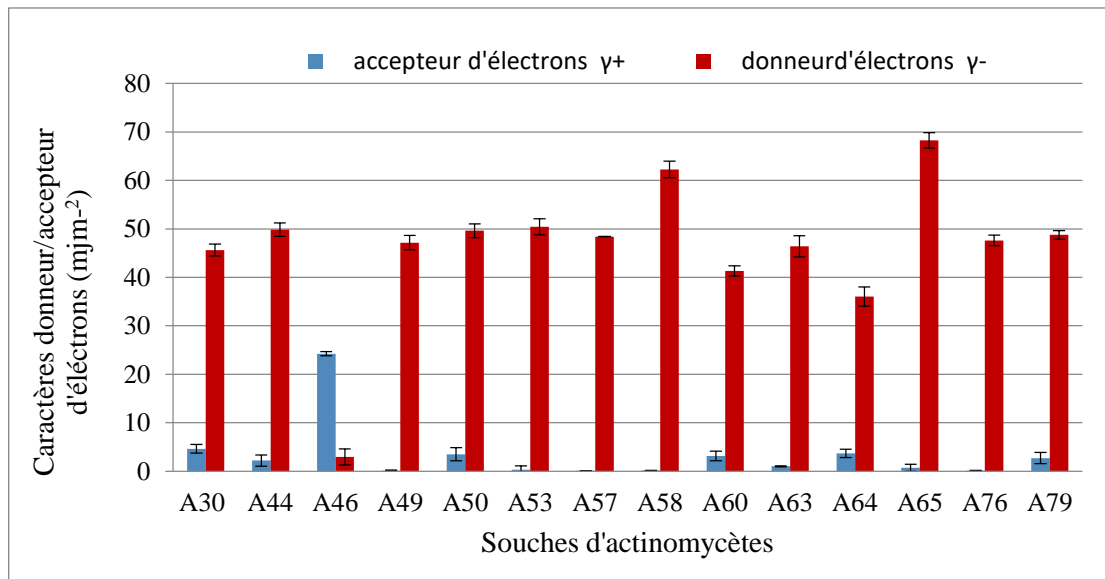
### 2.3- Détermination du caractère donneur /accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1M et 1,2M du KNO<sub>3</sub>

L'angle de contact nous permet d'accéder aux composantes acido-basiques de la surface d'un matériel donnée (Support ou microorganisme).

Les résultats obtenus pour les composantes polaires avec les différentes souches sont représentés sur les figures 39 et 40.



**Figure 39** : Caractères accepteur/donneur d'électrons (KNO<sub>3</sub> 0,1M)

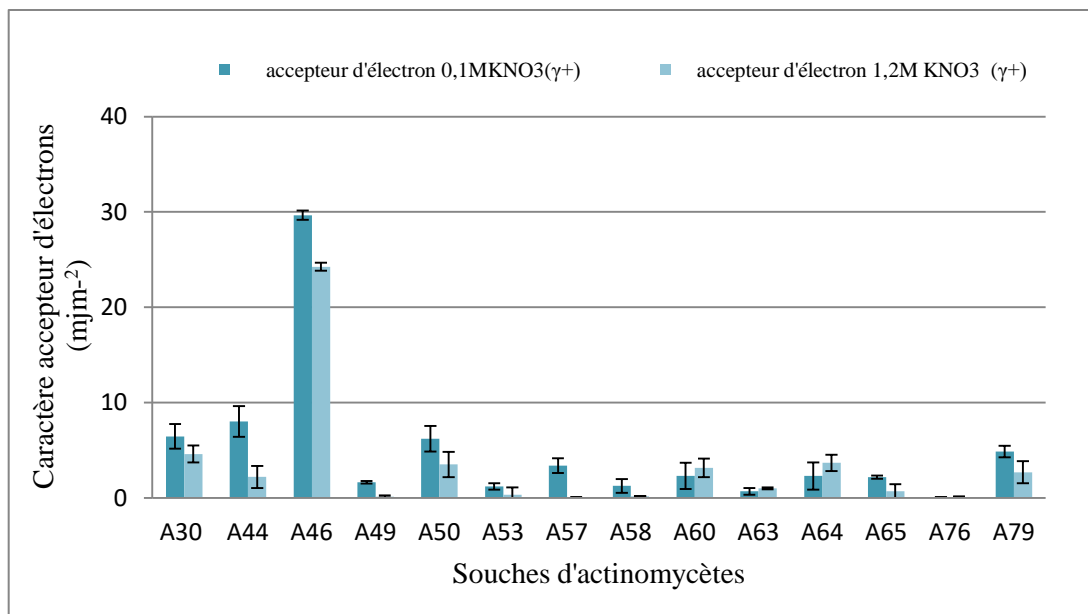


**Figure 40 :** Caractères accepteur/donneur d'électrons ( $\text{KNO}_3$  1,2M)

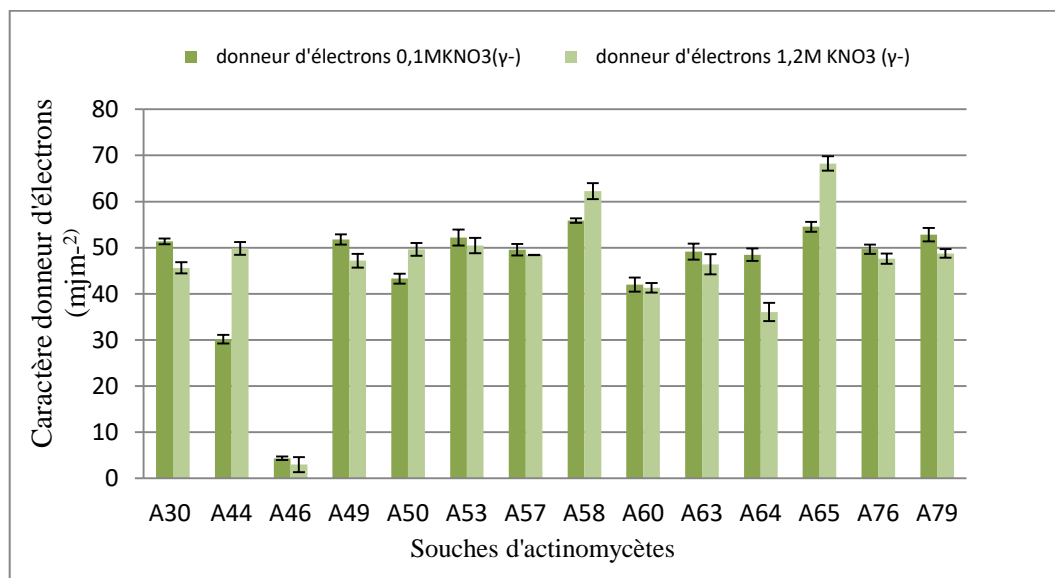
En présence de  $\text{KNO}_3$  à 0,1M et à 1,2M, nous constatons que toutes les souches ont un caractère donneur d'électrons fort et largement supérieur à celui d'accepteur d'électrons excepté la souche A46 ayant à l'inverse un caractère accepteur d'électrons fort et beaucoup plus élevé que le caractère donneur d'électrons.

**Pour les deux forces ioniques, la majorité des souches présentent un caractère donneur d'électrons bien exprimé et un caractère accepteur d'électrons faible à l'exception de la souche A46 qui présente un fort caractère accepteur d'électrons**

Il apparait une très légère diminution du caractère accepteur d'électrons à la concentration de  $\text{KNO}_3$  de 1,2M par rapport à 0,1M pour la plupart des souches d'actinomycètes et une légère augmentation de ce caractère pour les souches A60, A63 et A64 (Figure 41). Concernant la figure 42, pour les souches A44, A58 et A65, le caractère donneur d'électrons a augmenté de façon assez significative. Par contre, il a baissé pour A64. Mais pour les autres souches, la variation du caractère donneur d'électrons est relativement peu significative.



**Figure 41** : Comparaison du caractère accepteur d'électrons en fonction de [KNO<sub>3</sub>]



**Figure 42** : Comparaison du caractère donneur d'électrons en fonction de [KNO<sub>3</sub>]

Les caractères accepteur/donneur d'électrons sont d'une importance notable dans le phénomène d'adhésion (Van Oss *et al.*, 1988). Le caractère donneur d'électrons des différentes souches d'actinomycètes est fort excepté A46 qui a un fort caractère accepteur d'électrons. Selon Hamadi *et al.* (2004) ; Braindet *et al.*, (1999b) et Rubio, (2000), le caractère accepteur d'électrons est dû aux groupes acides présents sur la surface membranaire tandis que le caractère donneur d'électrons est attribué aux groupes anioniques ou basiques comme les amines, carboxylates ou les phosphates (PO<sub>4</sub>) des phospholipides et des lipo-polysaccharides. Ainsi, selon de nombreux auteurs, une relation existe entre la composition chimique des surfaces microbiennes et les propriétés donneur/accepteur d'électrons. En ce sens, il a été

rapporté par Hamadi *et al.* (2012) que les groupes phosphates participent auhaussement du caractère donneur d'électrons et de l'autre côté, que le caractère accepteur d'électrons est lié à une faible présence d'amines (protéines) et une forte présence de polysaccharides. Il a été rapporté par Boks *et al.* (2008) que la surface des cellules bactériennes a un caractère donneur d'électrons prédominant. Feng *et al.* (2013) ont rapporté qu'un fort caractère donneur d'électrons et un faible caractère accepteur d'électrons est typique des bactéries hydrophiles, tandis qu'un faible caractère accepteur d'électrons et donneur d'électrons est typique des bactéries hydrophobes.

### 3- Influence de la méthode utilisée (MATS ou Angle de Contact) sur les mesures des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes

Les résultats des valeurs de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes en fonction des deux méthodes MATS et angle de contact sont présentés dans les tableaux 22 et 23.

**Tableau 22** : Propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes par deux méthodes MATS et Angle de contact (CAM) (0,1M KNO<sub>3</sub>)

Souches	Hydrophobicité		Donneur d'électrons		Accepteur d'électrons	
	MATS (%)	CAM (°)	MATS(%)	CAM (mjm <sup>-2</sup> )	MATS(%)	CAM (mjm <sup>-2</sup> )
	0,1M KNO <sub>3</sub>	0,1M KNO <sub>3</sub>	0,1M KNO <sub>3</sub>	0,1 M KNO <sub>3</sub>	0,1MKNO <sub>3</sub>	0,1M KNO <sub>3</sub>
A30	48,58	43,85	10,15	51,39	0	4,61
A44	61,02	37,45	0	30,17	0	2,2
A46	37,57	14,9	0	4,33	0	24,25
A49	80,28	29	0	51,78	42,95	0,13
A50	58,55	29,6	0	49,78	0	3,51
A53	30,8	42,5	26,8	58,57	0	0,69
A57	68,39	31,2	0	49,57	1,86	0,08
A58	40	32,45	40	55,9	15	0,17
A60	25,11	46,5	21,93	41,99	19,6	4,48
A63	23,55	27,65	60,8	49,15	19,57	1,01
A64	83,01	38,5	0	48,48	0	2,01
A65	77,07	23,25	0	54,53	12,64	0,7
A76	84,71	28,25	0	49,67	0	0,1
A79	82,2	21,55	0	52,83	0	2,69

**Tableau 23** : Propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes par deux méthodes MATS et Angle de contact (CAM) (1,2M KNO<sub>3</sub>)

Souches	Hydrophobicité		Donneur d'électrons		Accepteur d'électrons	
	MATS (%)	CAM (°)	MATS(%)	CAM (mjm <sup>-2</sup> )	MATS(%)	CAM (mjm <sup>-2</sup> )
	1,2MKNO <sub>3</sub>	1,2MKNO <sub>3</sub>	1,2MKNO <sub>3</sub>	1,2MKNO <sub>3</sub>	1,2MKNO <sub>3</sub>	1,2MKNO <sub>3</sub>
A30	88,64	18	0	30,96	0	6,45
A44	71,3	42	0	49,86	0	8,02
A46	59,46	22,3	0,72	2,97	0	29,65
A49	61,24	26	0	47,17	0	1,63
A50	48,07	29	0	49,62	0	4,86
A53	26,3	22,2	0	33,78	32	0,25
A57	46,26	30,2	15,18	48,41	0	3,38
A58	37	25,8	0	62,26	23	1,25
A60	31,71	42,25	35,1	33,3	0	2,31
A63	61,18	23,25	26,76	46,39	28,18	0,68
A64	36,73	38,35	55,79	41,05	4,84	2,29
A65	37,48	24,9	86,69	68,25	0,34	2,17
A76	39,9	27,6	10,91	47,61	43,72	0,03
A79	59,53	17,75	29,43	48,76	10,09	4,86

En comparant les deux méthodes dans les mêmes conditions, nous remarquons qu'elles ne reflètent pas la même situation.

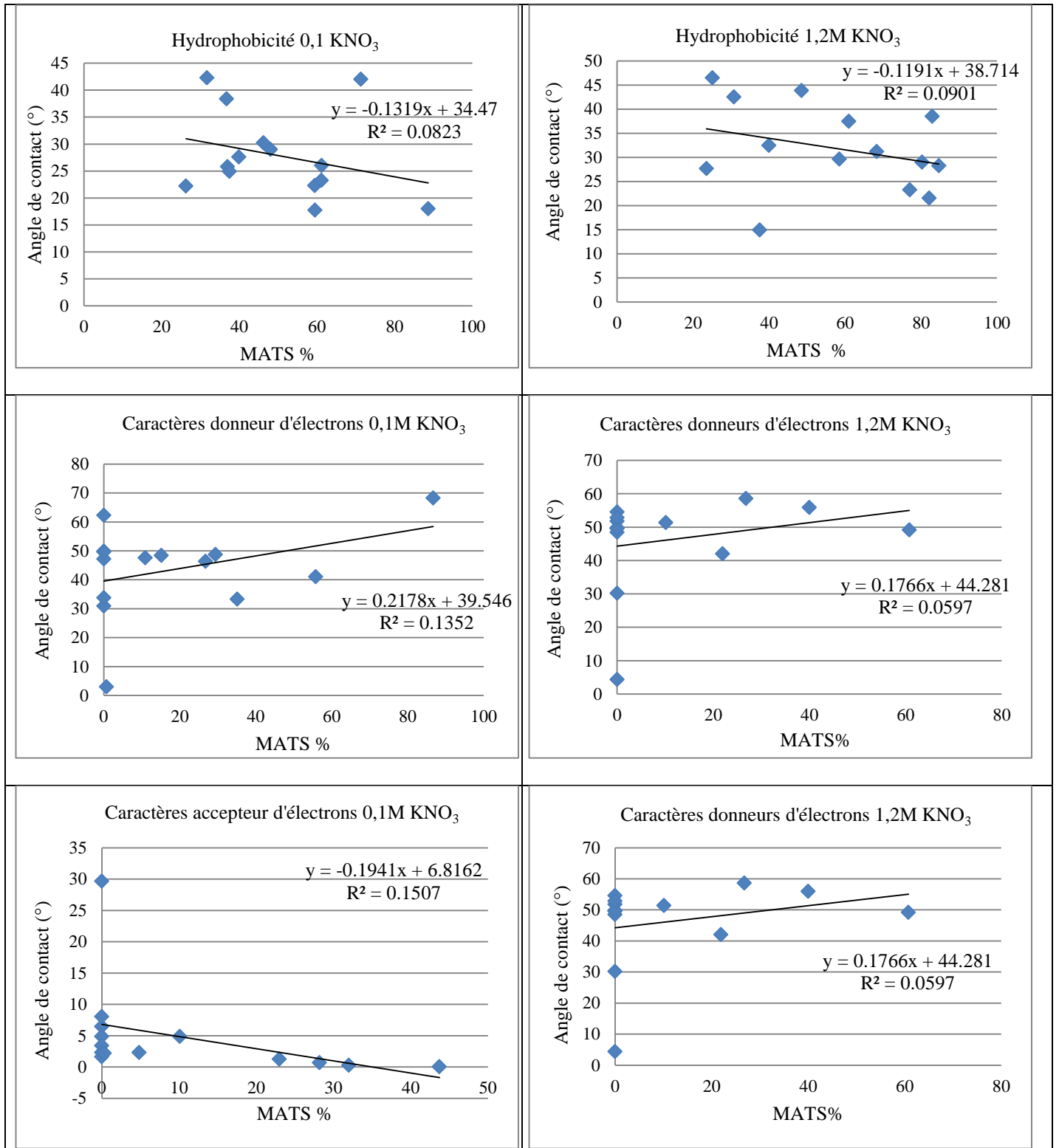
Selon les résultats de la MATS et à 0,1M de KNO<sub>3</sub>, nous remarquons que 42,85% des souches révèlent un caractère hydrophobe très élevé, alors qu'elles deviennent hydrophiles en utilisant la méthode de l'angle de contact. Ce caractère reste le même quel que soit la méthode utilisée en augmentant la force ionique à 1,2M de KNO<sub>3</sub> pour toutes les souches d'actinomycètes, sauf pour 50% d'elles qui sont hydrophobes selon la méthode MATS.

D'après les résultats de la MATS et à 0,1M de KNO<sub>3</sub>, 42,85% des souches d'actinomycètes présentent un caractère donneur d'électrons, alors que d'après l'angle de contact, 100% ont un caractère d'électrons. Ce caractère est élevé lorsqu'il est mesuré par l'angle de contact à 1,2M de KNO<sub>3</sub>, par contre, la mesure par la MATS montre un caractère donneur d'électrons seulement pour 35,71% des souches tandis qu'il est nul pour les autres.

Les souches expriment un caractère accepteur d'électrons lorsqu'elles sont testées par l'angle de contact quel que soit la force ionique. Par ailleurs, les actinomycètes testés par la MATS expriment un caractère accepteur d'électrons pour 42,85% des souches à 0,1M et 1,2M de KNO<sub>3</sub>.

Ces résultats présentent donc une contradiction interne puisque les deux techniques, MATS et angle de contact, ne montrent pas les mêmes résultats pour l'hydrophobicité et les caractères donneur/accepteur d'électrons des souches. Ce paradoxe nous amène à nous interroger sur la nature et l'origine de l'hydrophobicité mesurée par chacune de ces deux techniques.

Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les propriétés physicochimiques évaluées par les deux méthodes : MATS et angle de contact. (Figure. 43).



**Figure 43 :** Corrélation entre les propriétés hydrophobicité et caractères donneur/accepteur d'électrons évaluées par les méthodes Angle de contact et MATS

A ce sujet, Vanhaecke *et al.* (1990) ont entrepris une étude qui avait comme but, d'une part de confirmer ou d'infirmer que l'hydrophobicité constitue bien le facteur clé de l'adhésion bactérienne aux supports, et, d'autre part, de vérifier que les contradictions relevées dans la

littérature quant à cette hypothèse découlaient simplement de la technique mise en œuvre pour déterminer cette hydrophobicité. Ces auteurs ont donc mesuré l'hydrophobicité de 15 isolats de *P. aeruginosa* suspendus dans du PBS (10 mM) à pH neutre (7,5) par 4 techniques indépendantes: l'agrégation aux sels de sulfates d'ammonium (SAT et ISAT), l'angle de contact, la MATH et la cinétique d'adhésion sur acier 304 et 316.

Ces auteurs ont pu effectivement observer que l'adhésion sur les supports testés était bien corrélée avec l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact qui, à son tour, était corrélé au pourcentage d'adhésion aux solvants organiques par une fonction hyperbolique.

De plus, certains isolats, généralement considérés comme hydrophiles par la technique de MATH, présentaient un caractère hydrophobe par la mesure de l'angle de contact (Vanhaecke *et al.* (1990)). De même, certains isolats de *P. aeruginosa* caractérisés comme hydrophobes par la MATH comme 220-R2, 220, PAO-1 et 821/21, sont considérés comme hydrophiles par la technique d'agrégation aux sulfates d'ammonium, et d'autres isolats hydrophiles par la technique de MATH comme 9027, U856/3 et 8111/87 sont extrêmement hydrophobes par la technique de SAT et ISAT.

Latrache *et al.*, (2002) ont mesuré le pouvoir hydrophobe de la surface cellulaire de trois souches d'*Escherichia coli* par trois méthodes : l'absorption sur du p-xylène, la partition de cellules dans un système à deux phases en polyéthylène glycol / dextrane (PEG / DEX) et l'angle de contact. Ils ont montré qu'aucune relation n'a été trouvée entre ces trois méthodes.

Si nous revenons à nos résultats présentés dans les Tableau XX, les caractères d'hydrophobicité et donneur / accepteur d'électrons mesurés par les deux techniques MATS et angle de contact sont différents et ne présentent pas les mêmes résultats, ce qui signifie que les deux méthodes ne mesurent pas la même chose.

Cette contradiction peut être attribuée aux caractéristiques de chaque méthode. Pour l'angle de contact, la mesure de l'hydrophobicité est réalisée sur des cellules bactériennes semi hydratées, et l'interaction évaluée dans cette méthode se fait uniquement entre les molécules d'eau et les cellules bactériennes. Pour l'adhésion microbienne à l'hexadécane dans le cas de la méthode MATS, la mesure de l'hydrophobicité est réalisée sur des cellules totalement hydratées d'une part et, d'autre part, deux types d'interactions sont prises en compte dans cette méthode : une interaction entre les cellules bactériennes et l'hexadécane et l'autre entre les cellules bactériennes et l'eau.



## IV-CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons pu étudier les caractéristiques physico-chimiques telles que l'hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons et le caractère accepteurs d'électrons de quatorze souches d'Actinomycètes isolées à partir de 11 sols de la zone de Béni Amir dans la région Beni Mellal au Maroc et évaluer l'effet de deux méthodes utilisées la MATS et l'Angle de Contact.

A travers cette étude, nous avons montré que le caractère d'hydrophobicité varie en fonction de la méthode de mesure utilisée. Avec la MATS et à faible concentration de  $\text{KNO}_3$ , 42,85% des souches d'actinomycètes sont hydrophobes. Ce caractère a changé en utilisant l'angle de contact pour les mêmes souches. En augmentant la force ionique, 50% des souches sont hydrophobes selon la méthode MATS et 100% des souches sont hydrophiles par la mesure par l'angle de contact.

En ce qui concerne le caractère donneur d'électrons, la mesure par MATS et à faible force ionique a montré que 42,85% des souches d'actinomycètes présentent un caractère basique et toutes les souches ont une affinité cellulaire au chloroforme importante que pour l'hexadécane. Nous notons une augmentation de ce caractère selon l'angle de contact à la forte force ionique, par contre seulement 35,71% des souches expriment un caractère donneur d'électrons alors qu'il est nul pour les autres souches.

Toutes les souches d'actinomycètes expriment un caractère accepteur d'électrons par l'angle de contact quel que soit la force ionique. Seulement 42,85% des souches, à faible force ionique et à forte force ionique, expriment un caractère accepteur d'électrons par la MATS.

Ces résultats nous ont permis de déduire que la technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) permet de compléter les informations déduites par des mesures d'angle de contact quant à l'importance relative des interactions les unes par rapport aux autres.

## Chapitre V :

# INFLUENCE DE CHLORURE DE SODIUM (NaCl) SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SURFACE CELLULAIRE DES ACTINOMYCETES

## I-INTRODUCTION

Les propriétés physicochimiques de la surface cellulaire peuvent être influencées par les structures cellulaires de la surface ((Ljungh and Wadström, 1984, El *et al.*, 2002) ;El Ghmari *et al.*, 2002) et les facteurs environnementaux comme la température, la composition du milieu, la force ionique et le pH.

Si beaucoup de travaux ont étudié l'effet des facteurs environnementaux sur l'hydrophobicité et la charge électrostatique, peu d'études concernant l'effet de ces facteurs sur le caractère donneur d'électrons / accepteur d'électrons ont été publiés (Hamadi and Latrache, 2008), Braindet *et al.*, 1999a ; Braindet *et al.*, 1999b).

Il est donc nécessaire de maîtriser l'évolution des paramètres qui pourraient être en interaction avec les propriétés de surface du microorganisme.

L'objectif de ce chapitre est de rapprocher les actinomycètes des conditions du milieu de leur provenance. Pour cela, nous avons déterminé l'influence du NaCl sur l'hydrophobicité et les caractères donneur/accepteur d'électrons de quatorze souches d'actinomycètes isolées du sol de Béni Amir (Béni Mellal, Maroc) et qui tolèrent, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la salinité.

## II- MATERIELS ET METHODES

### 1- Souches bactériennes, conditions de culture et préparation de la suspension bactérienne.

Quatorze souches d'actinomycètes ont été étudiées. Chaque souche est cultivée dans un milieu solide Bennet pendant 7 jours à 28°C. Après cette culture, les cellules sont raclées du milieu solide et sont mises dans une solution de NaCl de deux forces ioniques différentes 0.1 M et 1.2 M. Pour éliminer les résidus du milieu de culture, les cellules sont lavées par une succession de deux centrifugations (15 min, à 8400g) et remises en suspension dans la solution de NaCl.

## **2- Détermination de l'hydrophobicité et des caractères donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode MATS**

Les cellules bactériennes sont suspendues dans une solution de NaCl (0.1 ou 1.2 M). 2.4 ml de la suspension bactérienne de densité optique entre 0.7 et 0.8 ( $A_0$ ) à 405 nm est vortexés avec 0.4 ml de solvant pendant 90s. Après 15 min de décantation, la densité optique ( $A$ ) de la phase aqueuse est mesurée à 405 nm. Le pourcentage des cellules adhérees au solvant est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ Adhésion} = (1 - A/A_0) * 100.$$

Où  $A_0$  est la densité optique de la suspension bactérienne mesurée à 405 nm avant le mélange. Chaque expérience est répétée trois fois sur trois.

## **3- Détermination de l'hydrophobicité et des caractères donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes par la méthode d'angle de contact**

### **3.1- Préparation de la suspension bactérienne**

La suspension bactérienne est préparée de la même façon que précédemment pour l'étude de la technique de MATS.

## **III- RESULTATS ET DISCUSSION**

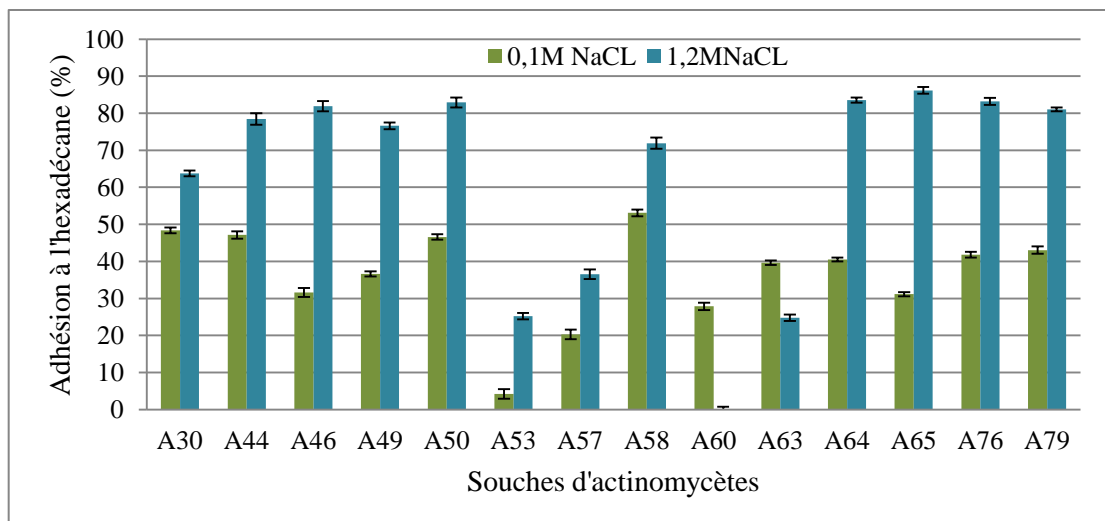
### **1- Effet du sel sur la surface cellulaire des actinomycètes**

#### **1.1- Par la méthode de MATS**

##### **1.1.1- Détermination du caractère hydrophobe /hydrophile des souches d'actinomycètes**

L'hydrophobicité de la surface cellulaire est estimée par la détermination du pourcentage des cellules adhérentes à l'hexadécane.

Le pourcentage des cellules d'actinomycètes adhérentes à l'hexadécane est représenté dans la Figure 44.



**Figure 44** : Adhésion des 14 souches d'actinomycètes à l'hexadécane à deux concentrations de NaCl de 0,1M et 1,2M

A la concentration 0,1 M de NaCl, il apparaît que la souche A58 (53,1%) a un pourcentage d'adhésion à l'hexadécane supérieur à 50% et présente donc un caractère hydrophobe. Les souches A30, A44, A50 ont une affinité pour l'hexadécane respectivement de 48, 47 et 46%, ce qui montre qu'elles sont modérément hydrophiles, tandis que les autres souches A46(33%), A49(36,6%), A57(20,3%), A60(27,8%), A63(39,6%), A64(40,5%), A65(31,1%), A76(41,8%) et A79(43%) sont fortement hydrophiles (faible affinité pour l'hexadécane). La souche A53 (4,21%) à la plus faible affinité pour l'hexadécane est donc la plus hydrophile.

Pour la concentration 1,2M de NaCl, les souches A30, A44, A46, A49, A50, A58, A64, A65, A76 et A79 présentent une affinité pour l'hexadécane supérieure à 50% (63, 78, 81, 76, 82, 71, 83, 86, 83 et 81% respectivement) donc elles sont fortement hydrophobes. Alors que les souches A53 (25,2%), A57 (36,5%), A60 (0%) et A63 (24,7%) sont hydrophiles puisque leur pourcentage de liaison à l'hexadécane ne dépasse pas 50%.

Ces résultats montrent aussi que quand la concentration en NaCl augmente de 0,1 à 1,2M, l'affinité des actinomycètes à l'hexadécane (donc l'hydrophobicité) augmente pour toutes les souches à l'exception d'A60 et A63. Donc, nous pouvons dire que :

**Le caractère d'hydrophobicité augmente considérablement lorsque la concentration en sel augmente de 0,1 à 1,2 M.**

Plusieurs travaux ont étudié l'effet de ces facteurs environnementaux sur l'hydrophobicité et la charge (Beck *et al.*, 1988, Herben *et al.*, 1990, Van der Mei *et al.*, 1993b, Latrache *et al.*, 1994, Latrache, 2001).

L'influence de ces paramètres sur les propriétés de surface peut se traduire par la modification de la composition de la paroi et peut, également, être interprétée en termes de forces de Lifshitz-van der Waals (LW) et de forces acide-base (AB).

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes ((Jana *et al.*, 1999, Friedman, 2000, Majtan and Majtanova, 2000, Pereira and Ou, 2000, Cappello *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, plus l'hydrophobicité des cellules bactériennes augmente, plus l'adhésion devient importante.

Des études ont montré par exemple que l'hydrophobicité peut augmenter le taux de protéines membranaires (déduites du rapport N / C) présentes à la surface des bactéries et réduire la présence de la nature des composés polysaccharidiques (représentés par les O / C ratio) (Mozes *et al.*, 1988, Rubio, 2002, Gómez-Suárez *et al.*, 2002, Hamadi *et al.*, 2004). Ils ont également montré que l'augmentation de la force ionique induit une réduction de la charge électrostatique (van der Wal *et al.*, 1997, Hamadi *et al.*, 2004, Gaboriaud *et al.*, 2006).

L'augmentation de la concentration de 0,1 à 1,2 M de NaCl induit une diminution de la charge électrostatique (van der Wal *et al.*, 1997, Hamadi *et al.*, 2004, Gaboriaud *et al.*, 2006). Cette diminution de la charge électrostatique est attribuée à l'adsorption importante des cations provoquant la neutralisation des groupes chargés présents à la surface des cellules. Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Zahir *et al.* (2016)) qui ont rapporté que l'hydrophobicité évolue avec la salinité.

De plus, la température élevée et la dessiccation peuvent induire une modification phénotypique directe de la composition des membranes microbiennes (Russell N. J., 2002), qui peut être attribuée en partie à des ajustements physiologiques rapides des cellules, permettant aux bactéries de faire face au stress (Petersen S. O *et al.*., 1994, Mroziak A *et al.*., 2004, Billi D *et al.*, 2002). Il semble que l'augmentation de l'hydrophobicité des cellules en surface soit une optimisation de la surface bactérienne vis-à-vis de l'eau pour lutter contre le stress osmotique.

En effet, une goutte d'eau occupe moins de place sur une surface hydrophobe que sur une surface hydrophile. Donc, il y a une diminution du passage du sel dans le cytoplasme.

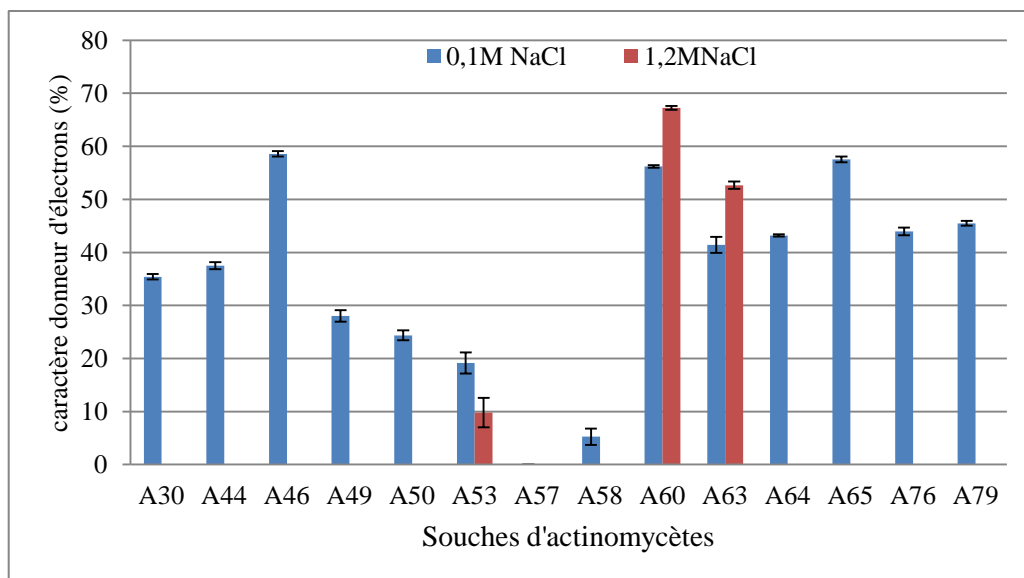
Nous suggérons que les actinomycètes, pour s'acclimater au stress salin, créent un microenvironnement intermédiaire entre la surface bactérienne et l'environnement externe. Ce microenvironnement est un film d'eau, d'une épaisseur assez grande pour protéger la cellule contre l'osmose dont la magnitude augmente avec la concentration en sel. De plus, il est possible qu'il y ait un passage de sel dans ce microenvironnement, créant un gradient de concentration, qui ramollit l'entourage immédiat de la surface cellulaire. Ceci est en accord avec les études rapportant que les fibrilles et les polymères peuvent former des liens forts entre la cellule et une surface solide et encourager le développement du film.

### 1.1.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons des surfaces des souches d'actinomycètes à 0,1 et 1,2M du NaCl.

#### a-Caractère donneur d'électrons

Le caractère donneur d'électrons est estimé par la différence entre l'affinité cellulaire au chloroforme et à l'hexadécane (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

La figure 45 présente les résultats du caractère donneur d'électrons.



**Figure 45 :** Caractère donneur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1M et 1,2M du NaCl.

À la concentration 0,1M de NaCl, les résultats reflètent un caractère donneur d'électrons bien exprimé pour toutes les souches sauf A57 qui montre un caractère donneur d'électrons nul. Les résultats montrent que le caractère donneur d'électrons des deux souches

A60 (67,2%) et A63 (52,7%) augmente avec l'augmentation de la force ionique, alors qu'il diminue pour la souche A53 (9,79%) ou devient nul pour les autres souches.

**Le caractère donneur d'électrons devient nul pour la majorité des souches en augmentant la concentration de NaCl.**

Le caractère donneur d'électrons (basique) peut être attribué à la présence de groupes basiques, généralement chargés négativement ou neutres, sur la surface cellulaire (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996, Briandet *et al.*, 1999b) tels que les groupes carboxyle ( $\text{COO}^-$ ), le phosphate ( $\text{P}_2\text{O}_4^-$ ) des phospholipides, les lipopolysaccharides ou les lipoprotéines et les groupes  $\text{SO}_4^{2-}$  ((Bellon-Fontaine *et al.*, 1996, Briandet *et al.*, 1999b, Rijnaarts *et al.*, 1995, Rubio, 2002). Selon certains auteurs, les groupements carboxylate et phosphate jouent un rôle prédominant dans la détermination de la charge négative de la surface cellulaire ((Latrache, 1993, Pelletier *et al.*, 1997b, Hamadi, 2005).

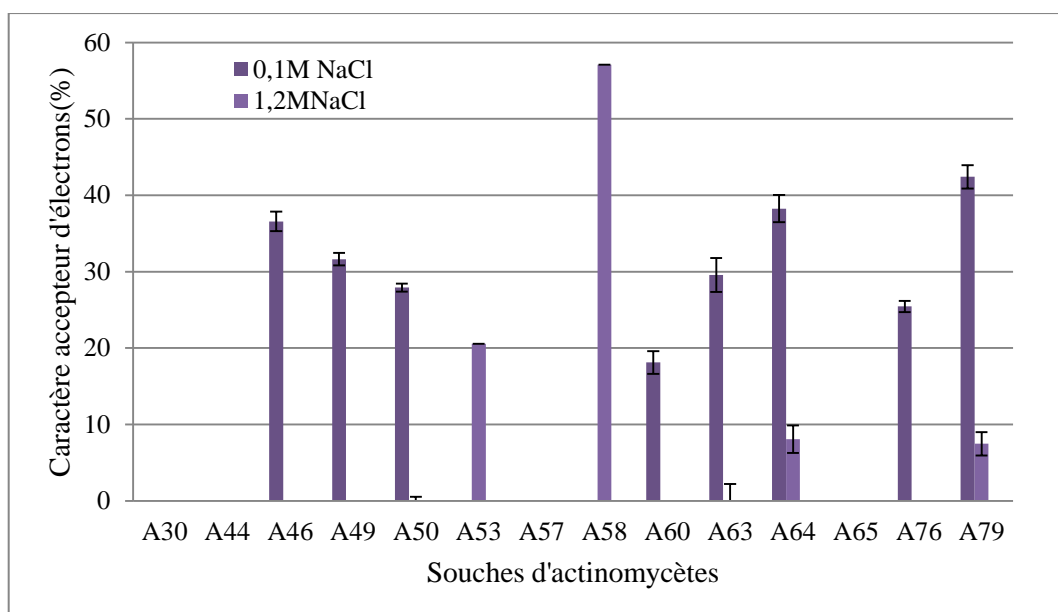
Nos résultats ont montré que pour 2 souches d'actinomycètes A60 et A63 à la force ionique 1,2 M de NaCl (67,24 et 52,66 % respectivement), le caractère donneur d'électrons augmente. Pour toutes les autres souches, ce caractère diminue.

Certains travaux (Pelletier *et al.*, 1997b, Briandet *et al.*, 1999b) dans lesquels la méthode MATS a également été utilisée ont rapporté que les micro-organismes possèdent un caractère donneur d'électrons important et sont hydrophiles. D'autres travaux (Hamadi *et al.* (2004)) ont trouvé que *S. aureus* a un caractère donneur d'électrons à la plus forte force ionique. L'augmentation du caractère basique en fonction de la force ionique peut être expliquée par l'atténuation des interactions électrostatiques, ce qui exalte les interactions basiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Harkes *et al.* (1992) qui ont observé une bonne ( $r=0.84$ ) corrélation à pH neutre entre la composante acide-base de l'énergie libre de surface et ses charges électrostatiques.

#### b-Caractère accepteur d'électrons

Le caractère accepteur d'électrons est estimé par la différence entre l'affinité de la cellule microbienne au diéthyle éther et à l'hexane. Seules les valeurs positives sont considérées comme ayant un caractère accepteur d'électrons (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Les résultats des propriétés accepteur d'électrons de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes sont présentés sur la figure 46.



**Figure 46 :** Caractère accepteur d'électrons à deux forces ioniques : 0,1M et 1,2M du NaCl.

Le caractère accepteur d'électrons figure 46 est important pour huit souches A46 (36,6%), A49 (31,6%), A50 (27,9%), A60 (18,1%), A63 (29,6%), A64 (38,2%), A76 (25,5%) et A79 (42,4%). Pour le reste des souches étudiées A30, A44, A53, A57, A58 et A65, elles ne possèdent pas de caractère accepteur d'électrons. En augmentant la concentration de NaCl à 1,2M, le caractère accepteur d'électrons diminue A64 (8,04%) et A79 (7,48%) ou devient nul, à l'exception de deux souches A53 (20,6%) et A58 (57,1%) pour lesquelles ce caractère augmente.

**En augmentant la concentration de NaCl à 1,2M, le caractère accepteur d'électrons devient nul pour la plupart des actinomycètes étudiés.**

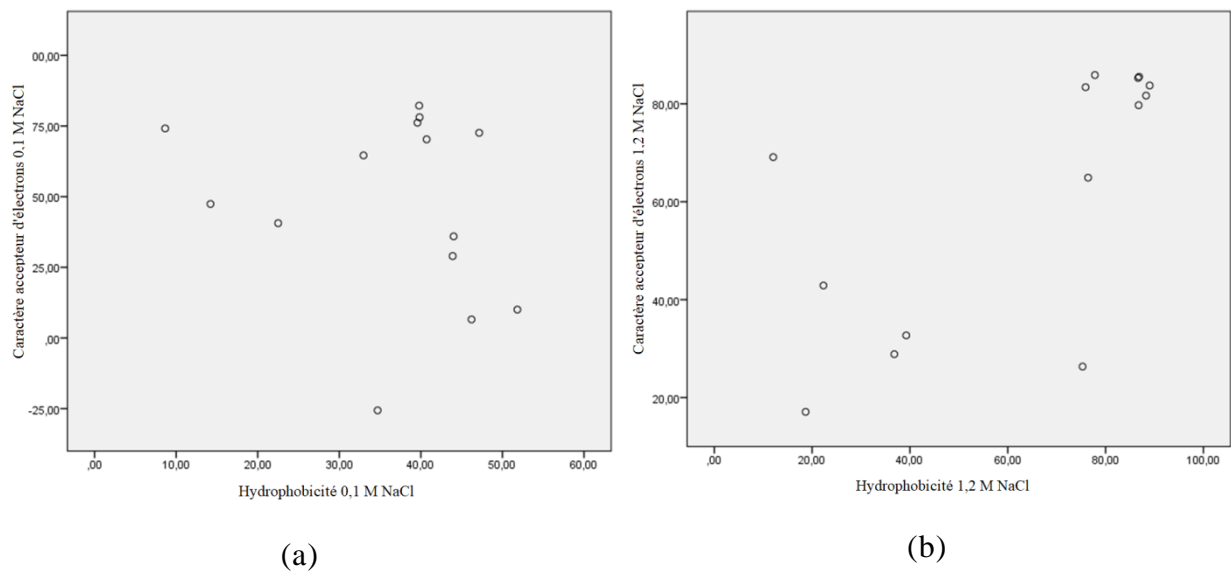
Le caractère accepteur d'électrons est estimé par la différence entre le pourcentage d'adhésion du diéthyle éther et celui de l'hexane (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Son importance peut être attribuée à la présence de groupements acides exposés à la surface cellulaire, comme  $RNH$  ou  $R-OH$  (Rubio, 2002).

Le caractère accepteur d'électrons semble être plus important que le caractère donneur d'électrons à forces ioniques élevées (NaCl 1,2 M) pour les souches A53 (20,6%), A58 (57,1%), A64 (8,07%) et A79 (7,48%). Ce résultat est similaire à ceux obtenus par (Hamadi *et al.*, 2004) qui ont rapporté que le caractère acide de *E. coli* est augmenté lorsque la salinité

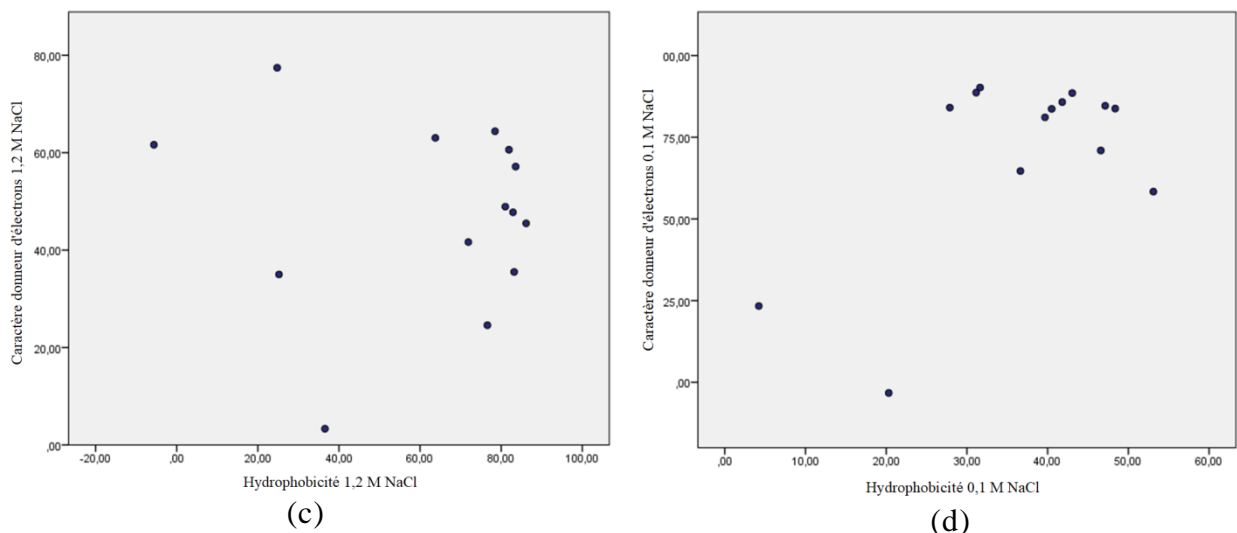


augmente et il est aussi cohérent avec les travaux antérieurs de Sharma and Rao (2002) qui ont appliqué le modèle de van Oss pour mesurer les propriétés de surface d'une centaine de souches. Les souches de *Lactobacillus casei subsp.*, *81 Rhamnosus* et *Streptococcus oralis* H1 ont, par exemple, un caractère plus accepteur d'électrons que le caractère donneur d'électrons.

L'analyse statistique entre l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons à deux concentrations de NaCl a été examinée par le logiciel statistique SPSS V20.



**Figure 47 :** Corrélation entre l'hydrophobicité et le caractère accepteur d'électrons des souches d'actinomycètes. (a) force ionique 0,1 M;  $r = 0,496$  et (b) force ionique 1,2M;  $r = 0,878$ .



**Figure 48 :** Corrélation entre l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons des souches d'actinomycètes. (c) force ionique 0,1 M;  $r = 0,604$  et (d) force ionique 1,2M;  $r = -0,051$

Une forte corrélation positive significative ( $P < 0,01$ ) est obtenue entre le caractère accepteur d'électrons et l'hydrophobicité ( $r = 0,875$ ) à une force ionique élevée (1,2 M). À la force ionique du NaCl 0,1 M, nous avons constaté que le caractère accepteur d'électrons est faiblement corrélé avec l'hydrophobicité ( $r = 0,496$ ) (Figure 47).

Une corrélation significative ( $P < 0,05$ ) entre le caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité des souches d'actinomycètes à 0,1 M en NaCl est également obtenue ( $r = 0,604$ ) (Figure 48). Ce résultat est en accord avec les travaux précédents rapportés par Hamadi et al (2004) qui ont trouvé une bonne corrélation ( $r = 0,91$ ) entre le caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité de *Staphylococcus aureus* à une force ionique de  $10^{-1}$  M. Aucune corrélation significative ( $r = -0,051$ ) entre l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons à 1,2 M NaCl n'a été observée.

Ces résultats nous ont permis de constater que l'augmentation de la corrélation entre le caractère accepteur d'électrons et l'hydrophobicité est influencée par l'augmentation de la concentration du NaCl. Par ailleurs, il n'y a pas de corrélation entre le caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité des souches d'actinomycètes en augmentant la concentration du sel.

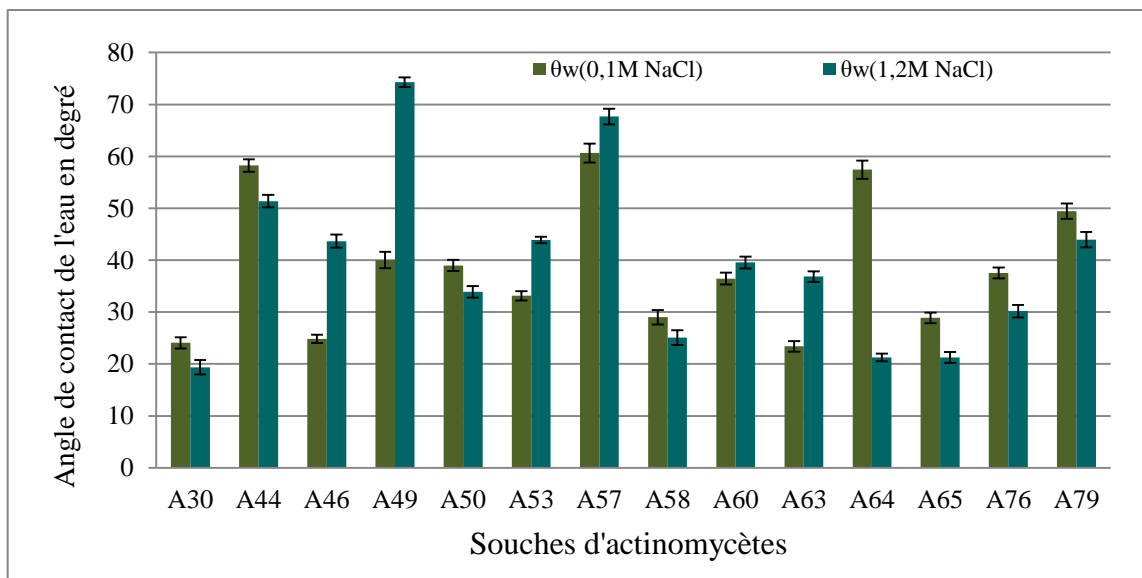
## **1.2- Par la méthode de l'angle de contact**

L'angle de contact a été réalisé sur les souches d'actinomycètes cultivées sur le milieu Bennett liquide. L'angle de contact avec l'eau  $\theta$  water, l'énergie libre de surface ( $\Delta G_{iwi}$ ), le caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et le caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) ont été déterminés.

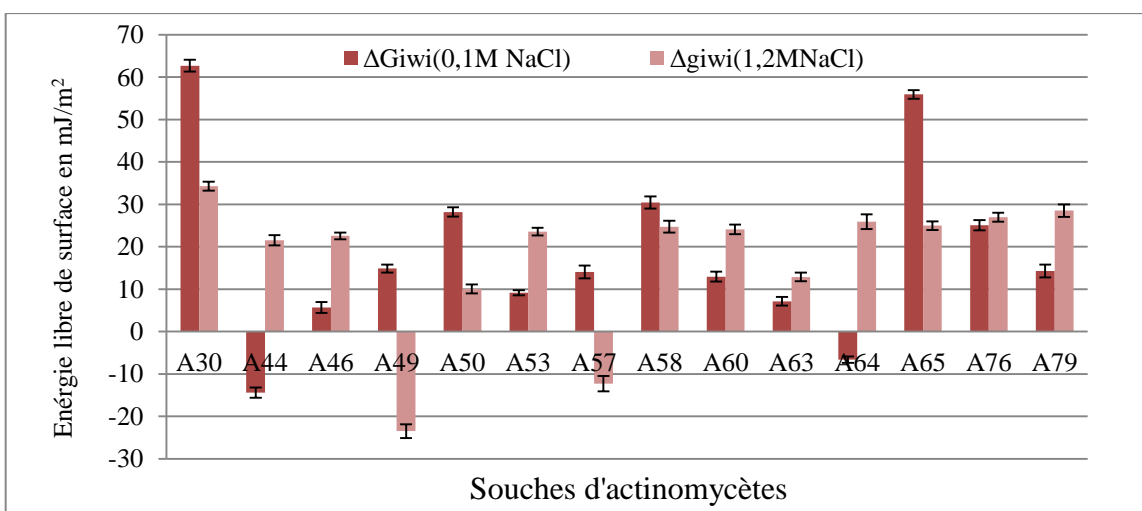
Les composantes énergétiques de la surface bactérienne sont obtenues en mesurant l'angle de contact des 3 liquides purs avec celles de la surface connue. Les trois liquides purs de référence utilisés sont : l'eau distillée, le diiodométhane et le formamide.

### **1.2.1- Détermination de l'hydrophobicité qualitative et quantitative de la surface des actinomycètes**

L'angle de contact utilisant l'eau nous permet d'avoir une idée sur l'hydrophobicité qualitative des surfaces des différentes souches utilisées. Lorsque sa valeur est supérieure à  $65^\circ$ , cela indique que la surface est hydrophobe. Tandis qu'une valeur inférieure à  $65^\circ$  implique l'hydrophilie (Vogler, 1998). Les figures 49 et 50 montrent les valeurs obtenues pour les différentes souches respectivement en présence de NaCl à 0,1 et 1.2M.



**Figure 49** : Hydrophobicité qualitative des actinomycètes en présence de NaCl 0,1 et 1,2M.



**Figure 50** : Energie libre d'interaction de surfaces des souches dans NaCl 0,1 et 1,2M.

Dans ce travail, les résultats montrent que pour les forces ioniques 0,1 et 1,2M de NaCl, 12 souches ont une valeur de  $\theta_w$  inférieure à  $65^\circ$ . Ce qui signifie qu'elles sont toutes hydrophiles. Les valeurs positives de  $\Delta G_{iwi}$  ont également montré que ces actinomycètes sont hydrophiles à l'exception des deux souches A44 et A64 qui présentent une contradiction entre la valeur de l'hydrophobicité qualitative et celle quantitative. Des résultats similaires ont été obtenus par Zahir *et al.* (2016) et Maataoui *et al.* (2014) qui ont trouvé que trois souches de *Streptomyces* étaient hydrophiles. Kautola and Allen (1994) ont constaté que les angles de contact de *Streptomyces levoris* mesurés avec la forme de la goutte axisymétrique analysé par la méthode de diamètre de contact, étaient de  $39,7^\circ$ .

La valeur de l'angle de contact de l'eau pour les souches A49 et A57 est supérieure à  $65^\circ$  indiquant leur hydrophobicité. La valeur de  $\Delta G_{iwi}$  ( $\Delta G_{iwi} < 0$ ) a montré que ces souches sont hydrophobes. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Douglas et al., (1970) et Ruddick et Williams (1976) qui ont rapporté que de nombreuses spores d'actinomycètes sont hydrophobes et que cette hydrophobicité ne semble pas être liée à l'apparition de groupes lipidiques en surface.

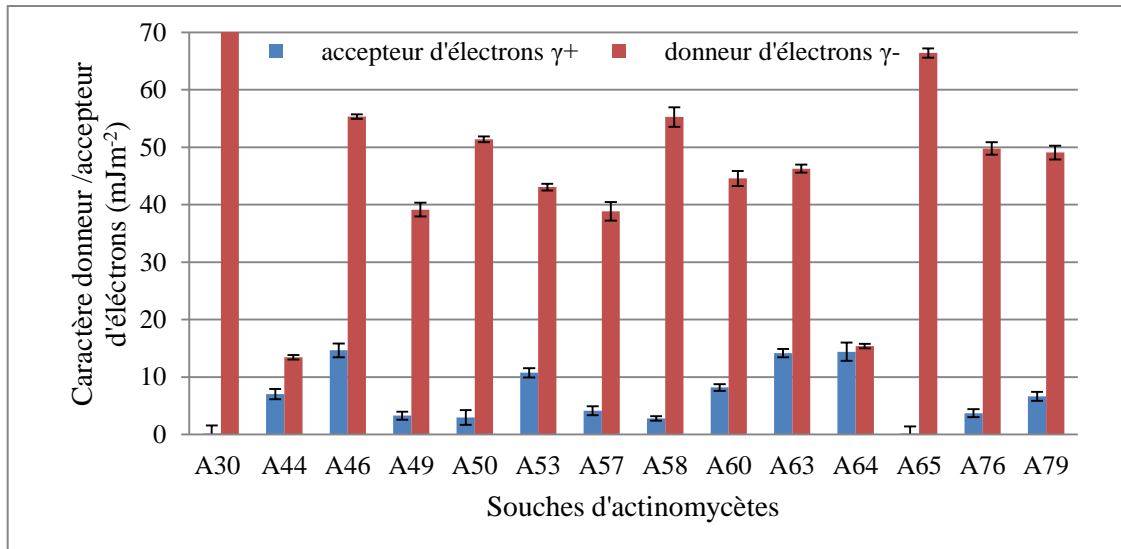
**A la lumière des résultats obtenus, nous avons trouvé que 85,71% des souches d'actinomycètes présentent un caractère hydrophile qualitatif et quantitatif ( $\theta_w < 65^\circ$ ,  $\Delta G_{iwi} > 0$ ) pour les deux concentrations de NaCl.**

Les propriétés des surfaces microbiennes dépendent essentiellement des compositions chimiques de la surface cellulaire. Pour les spores, le caractère hydrophile est notamment corrélé avec les protéines /les ratios de glucides. À cet égard, (Jeffs *et al.*, 1999) ont rapporté que des extraits de spores plus hydrophobes avaient tendance à avoir des rapports protéines / glucides supérieurs. En effet, les spores à surfaces rugueuses étaient hydrophobes, tandis que les spores hydrophiles avaient des surfaces lisses (Jeffs *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré que l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est directement corrélée avec un taux de concentration élevé de N / C et inversement corrélée avec les concentrations de O / C. Cowan *et al.* (1992) , (Bruinsma *et al.* (2001) et Dengis and Rouxhet (1997) ont rapporté que l'hydrophobicité qualitative des levures peut être liée à une concentration plus élevée en protéines.

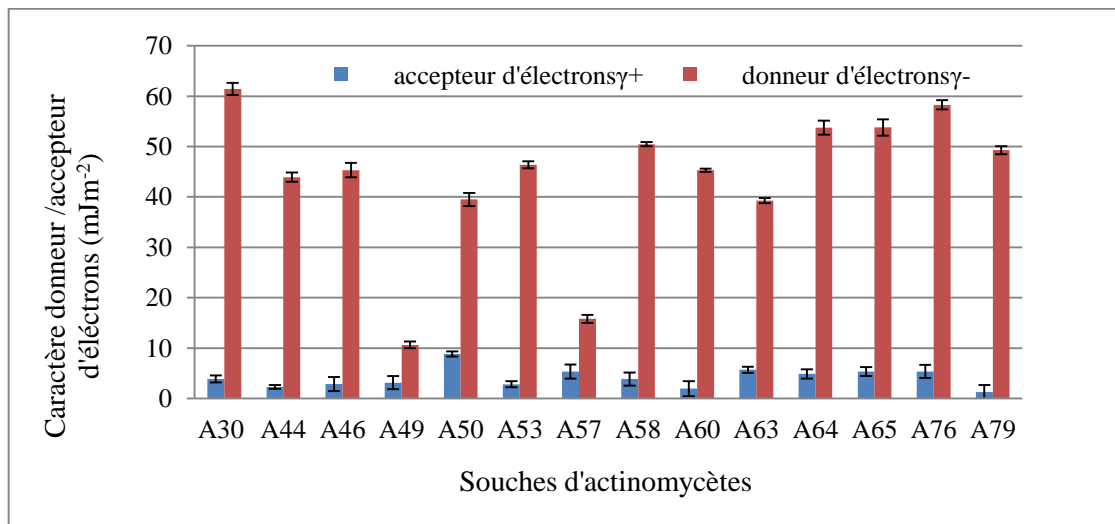
### **1.2.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface des actinomycètes.**

L'angle de contact nous permet d'accéder aux composantes acido-basiques de la surface d'un matériel donnée (Support ou microorganisme).

Les résultats obtenus pour les composantes polaires avec les différentes souches sont représentés sur les figures 51 et 52.



**Figure 51** : Caractère accepteur/donneur d'électrons (NaCl 0,1M)



**Figure 52** : Caractère accepteur/donneur d'électrons (NaCl 1,2M)

En présence de NaCl, nous constatons que toutes les souches ont un caractère donneur d'électrons allant de 13,44 à 72,37 mJ m<sup>-2</sup> pour la force ionique 0,1M et de 10,63 à 61,45 mJ m<sup>-2</sup> pour la force ionique 1,2M. Les résultats montrent également que toutes les souches ont un faible caractère accepteur d'électrons quel que soit la force ionique utilisée. Van der Mei *et al.* (1998), Bos *et al.* (1999), ( Boks *et al.* (2008) et Zahir *et al.*, (2016) ont signalé que les surfaces des cellules bactériennes étaient principalement donneuses d'électrons. El Abed *et al.* (2010) et Seale *et al.* (2008) ont trouvé que la surface des spores avait un caractère donneur d'électrons et un caractère accepteur d'électrons relativement faible.

Les valeurs élevées du caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et les valeurs basses du caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) sont typiquement caractéristiques des bactéries

hydrophiles, alors que les valeurs faibles de  $\gamma^-$  et  $\gamma^+$  sont caractéristiques des bactéries hydrophobes (Van der Mei *et al.*, 1998, Feng *et al.*, 2013).

Plusieurs auteurs ont rapporté la relation entre la composition chimique de la surface des microorganismes et leurs propriétés d'accepteur d'électrons / donneur d'électrons (acide-base). Hamadi *et al.* (2012) ont trouvé que les groupes phosphates contribuent à améliorer la propriété donneur d'électrons et la propriété accepteur d'électrons est liée à une faible concentration en groupes amines. En outre, la propriété accepteur d'électrons est en accord avec une forte concentration de polysaccharides et une faible concentration de protéines.

### 1.3- Effet du NaCl sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire.

Le tableau 24 présente les valeurs de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes selon les méthodes employées MATS et angle de contact à deux forces ioniques.

**Tableau 24 :** Propriétés physico-chimiques en fonction de la concentration du NaCl

Souches	Hydrophobicité (%)		Caractère donneur d'électrons (%)		Caractère accepteur d'électrons (%)	
	0,1M NaCl	1,2M NaCl	0,1M NaCl	1,2M NaCl	0,1M NaCl	1,2M NaCl
A30	48,36	63,75	35,41	0	0	0
A44	47,13	78,47	37,49	0	0	0
A46	31,62	81,9	58,57	0	36,57	0
A49	36,63	76,59	28,02	0	31,63	0
A50	46,58	82,91	24,36	0	27,92	0
A53	4,21	25,21	19,13	9,79	0	20,57
A57	20,31	36,53	0	0	0	0
A58	53,09	71,9	5,25	0	0	57,07
A60	27,88	0	56,19	67,24	18,11	0
A63	39,67	24,75	41,42	52,66	29,58	0
A64	40,49	83,56	43,18	0	38,24	8,06
A65	31,14	86,15	57,52	0	0	0
A76	41,8	83,19	43,95	0	25,45	0
A79	43,04	81,01	45,48	0	42,41	7,48

Nous observons que le caractère hydrophobe augmente fortement avec l'augmentation de la concentration en NaCl pour 71,42% des souches, alors que pour 14,28% l'hydrophobicité diminue.

Pour 64,28% des souches, nous observons une diminution du caractère donneur d'électrons avec l'augmentation de la concentration de NaCl, alors que pour 14,28% ce

caractère augmente quand NaCl augmente à 1,2M. Pour 7,14% le changement de la concentration ne provoque pas d'effet sur le caractère donneur d'électrons.

Le caractère accepteur d'électrons diminue en augmentant la concentration du NaCl.

#### 1.4- Etude de l'impact de la nature du sel sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes

Les tableaux ci-dessus présentent la corrélation des valeurs de l'hydrophobicité, du caractère donneur d'électrons et du caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes selon les méthodes MATS et angle de contact en fonction de deux sels et à deux forces ioniques.

**Tableau 25 :** Corrélation des propriétés physico-chimiques selon les deux méthodes : MATS et Angle de contact en fonction du NaCl et du KNO<sub>3</sub>.

	MATS				Angle de contact			
	0,1M NaCl	0,1 M KNO <sub>3</sub>	1,2 M NaCl	1,2 M KNO <sub>3</sub>	0,1M NaCl	0,1 M KNO <sub>3</sub>	1,2 M NaCl	1,2 M KNO <sub>3</sub>
Hydrophobicité (%)				0,499				-0,142
Donneur d'électrons (%)		-0,034		0		0,499		0,324
Accepteur d'électrons (%)		0,352		-0,207		-0,126		-0,14

La confrontation des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire des souches d'actinomycètes avec du NaCl et KNO<sub>3</sub> n'a pas montré de résultats très clairs.

Nous avons étudié, d'une part, les caractéristiques physico-chimiques telles que l'hydrophobie et les caractères donneur/accepteur d'électrons de quatorze souches d'actinomycètes isolées du sol et, d'autre part, l'effet de la force ionique. Nous remarquons que pour 92,85% des souches d'actinomycètes, l'hydrophobicité augmente considérablement lorsque la concentration en sel augmente de 0,1 à 1,2M de NaCl selon les résultats de la MATS. Alors que 7,14 % des souches ont un caractère hydrophile plus marqué et semblent être plus sensibles à la variation de la force ionique.

En outre, contrairement aux souches d'actinomycètes A60 (85%) et A63 (71%) qui présentent un caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) élevé, toutes les autres souches ont ce caractère ( $\gamma^-$ ) très faible. Nous notons également que les souches (A53, A58, A64 et A79) présentent un caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) important. Pour le reste des souches étudiées, elles ne possèdent pas de caractère accepteur d'électrons.

Quel que soit la force ionique de NaCl, nous remarquons que 100% des souches sont hydrophiles et ont un caractère donneur d'électrons élevé et un caractère accepteur d'électrons faible d'après la mesure par l'angle de contact.

#### **IV-CONCLUSION**

A travers cette étude, nous avons étudié l'influence des sels NaCl et KNO<sub>3</sub> à deux concentrations différentes dans le milieu de suspension sur les différentes souches d'actinomycètes. Les résultats ont montré que ces souches ne présentent pas les mêmes caractères physicochimiques. Ce changement des caractères physicochimiques de la surface cellulaire pourrait être le résultat d'une modification des structures de la surface cellulaire par le sel, due à un changement des charges électrostatiques au niveau de la paroi.

Ces propriétés sont très différentes d'une souche à l'autre, ce qui doit être pris en compte dans leur comportement adhésif. De plus, l'effet de la force ionique sur ces propriétés est très marqué, il est donc important d'étudier la relation entre ce comportement et l'écologie de ces bactéries.



## **Chapitre VI :**

### **ETUDE DE L'ADHESION DES ACTINOMYCETES AU SOL**

#### **I-INTRODUCTION**

L'adhésion des microorganismes aux surfaces constitue la première étape dans la formation des biofilms. Elle est gouvernée par des interactions physico-chimiques. Ces interactions dépendent des propriétés physico-chimiques de la surface des microorganismes, de la surface du substrat et des caractéristiques du milieu de suspension. L'hydrophobicité, la charge électrostatique, le caractère donneur d'électrons et le caractère accepteur d'électrons sont les principaux paramètres étudiés.

Tous les facteurs susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface de l'un des éléments mis en jeu dans ce phénomène peuvent ainsi favoriser ou au contraire limiter l'adhésion des microorganismes au substrat.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'adhésion des actinomycètes au sol qui est un substrat de provenance de ces souches. Nous avons aussi étudié l'adhésion sur le verre qui est un substrat de référence.

#### **II- MATERIELS ET METHODES**

##### **1- Caractéristiques physicochimique de la surface du verre.**

Les caractéristiques énergétiques de la surface du verre (hydrophobicité et caractère donneur/accepteur d'électrons) sont déterminées à partir des mesures de l'angle de contact. Les angles de contact ont été réalisés avec trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues: Eau Milli-Q, diiodométhane et formamide.

Les composantes de Lifshitz –Van der Waals ( $\gamma^{lw}$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) du verre ont été déterminées selon l'équation de Yong- Van Oss (1988).

##### **2-Mise au point d'une nouvelle technique pour la caractérisation de la surface des sols par la méthode d'angle de contact**

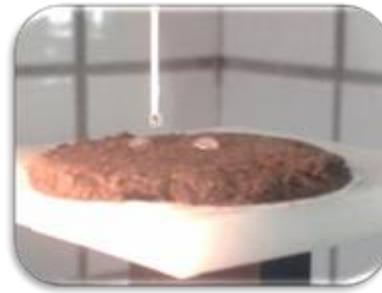
###### **2.1- Protocole**

Une suspension de 10 g de sol mélangée avec 50ml d'eau est filtrée sur un appareil de filtration contenant un filtre de cellulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . La filtration se fait par une pression

négative jusqu'à obtention d'une couche de sol (Figure 53). Puis, la mesure des angles de contact, avec les trois liquides décrits dans le paragraphe précédent, est effectuée (Figure 54).



**Figure 53** : Filtration de la suspension du sol



**Figure 54** : Photo de mesure du sol par angle de contact

### 3- Adhésion prédictives des actinomycètes aux sols

Grâce aux équations de Van Oss, on peut calculer l'énergie totale d'adhésion : L'énergie libre d'interaction ( $\Delta G_{BLS}^{Total}$ ) entre une bactérie (B) et un support (S) dans un liquide (L) est considérée comme la somme de la composante de Van der Waals ( $\Delta G_{BLS}^{LW}$ ), de la composante acide-base ( $\Delta G_{BLS}^{AB}$ ) et de la composante électrostatique.

$$\begin{aligned}
 (\Delta G_{BLS}^{EL}) \quad \Delta G_{BLS}^{Total} &= \Delta G_{BLS}^{LW} + \Delta G_{BLS}^{AB} + \Delta G_{BLS}^{EL} \text{ avec :} \\
 \Delta G_{BLS}^{LW} &= \left( (\gamma_B^{LW})^{1/2} - (\gamma_S^{LW})^{1/2} \right)^2 - \left( (\gamma_B^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2} \right)^2 - \left( (\gamma_S^{LW})^{1/2} - (\gamma_L^{LW})^{1/2} \right)^2 \\
 \Delta G_{BLS}^{AB} &= 2 \left[ (\gamma_L^+)^{1/2} \left[ (\gamma_B^-)^{1/2} + (\gamma_S^-)^{1/2} - (\gamma_L^-)^{1/2} \right] + (\gamma_L^-)^{1/2} \left[ (\gamma_B^+)^{1/2} + (\gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+)^{1/2} \right] - \right. \\
 &\quad \left. (\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2} \right].
 \end{aligned}$$

$\Delta G^{EL}$  est négligeable car les tests de l'adhésion sont réalisés à une force ionique élevée (Gallardo-Moreno *et al.*, 2004).

## 4- Etude de l'adhésion des actinomycètes

### 4.1- Adhésion des actinomycètes au verre

L'adhésion c'est l'ensemble de phénomènes physicochimiques prenant naissance lorsque deux surfaces sont mises en contact.

De nombreuses théories ont été proposées pour expliquer le processus d'adhésion. Notons les théories mécaniques les plus anciennes, de diffusion, électrique, chimique, de couches de faibles cohésions, et celle thermodynamique. Cette dernière est aussi appelée

théorie de mouillage. Énoncée depuis 1970, elle est attribuée aux interactions intermoléculaires qui sont faibles et non dirigées et ainsi un bon contact entre les deux surfaces interagissant est nécessaire. D'où l'importance de la structure et de la composition physicochimiques des deux surfaces. Ainsi, il est possible de modifier des surfaces dans l'optique d'augmenter ou de diminuer le nombre de sites actifs selon le besoin. Les tests d'adhésion sont effectués pour évaluer la capacité de ces bactéries à adhérer au verre dans des conditions de pH, de force ionique et de température données. Dans notre étude, les tests ont été effectués en mode statique.

#### **4.1.1- Prétraitement des surfaces**

Avant de lancer l'adhésion, le verre est d'abord préparé pour éliminer toute éventuelle contamination. Ainsi, les verres sont mis dans l'éthanol pendant 15 min puis rincés 6 fois avec de l'eau distillée puis stérilisés à la vapeur dans l'autoclave.

#### **4.1.2- Adhésion des actinomycètes au verre**

La bioadhésion a été faite en fonction du temps en présence de deux forces ioniques 0,1 et 1,2M de NaCl pendant **3, 24, 48, 72 et 168h**. Les étapes successives du protocole suivi sont :

1. Transvasement des suspensions dans des godets stériles
2. Centrifugation à 8400 tours/min pendant 15min.
3. Ajout du NaCl
4. Transvasement de la suspension sur les verres préalablement placés dans les boîtes de Pétri.

#### **4.1.3- Observation des cellules adhérentes au verre par microscope optique couplé à un ordinateur**

Avant l'observation des lames de verre au microscope, les cellules adhérentes sont séchées à l'air libre et colorées par la coloration de Gram. Puis, elles sont observées au microscope optique muni d'une caméra. C'est ainsi que des captures d'images de microorganismes sur la lame sont effectuées.

#### **4.1.4- Quantification de l'adhésion sur la surface du verre**

La quantification de l'adhésion microbienne a été faite par différentes méthodes. Une des approches consiste à provoquer le détachement des cellules adhérentes d'une plaque de dimensions connues dans un volume de liquide connu et à compter ces cellules dans le volume total de la suspension (Briandet *et al.*, 1999a). L'autre méthode est basée sur l'analyse de l'image de la microscopie à épifluorescence ou de la microscopie électronique à balayage

(Mozes *et al.*, 1988). Cette méthode consiste à évaluer seulement le pourcentage de la surface occupée. Hamadi *et al.* 2005 ont utilisé le programme Matlab® pour déterminer le nombre de cellules adhérentes et le pourcentage de la surface occupée par ces cellules. Ce pourcentage est déterminé en multipliant le rapport de la surface occupée par rapport à la surface totale par 100.

$$\% \text{ Adhésion} = \% \text{ Surface occupée} = (\text{Surface occupée} / \text{Surface totale}) * 100.$$

#### 4.2- Adhésion des actinomycètes aux sols

Les études de l'adhésion des bactéries se fait sur des surfaces solides telles que le verre, l'acier et d'autres matériaux très utilisés dans les industries alimentaires et médicales.

Dans cette partie, nous avons choisi d'étudier le comportement adhésif des actinomycètes vis-à-vis de leur milieu naturel ; le sol sous forme de granules.

Il est nécessaire d'adapter la méthode d'étude de l'adhésion à un protocole convenable vu la particularité de ce support.

L'adhérence des bactéries a été déterminée en utilisant la méthode décrite par (Huysman et Verstraete 1993b).

##### 4.2.1- Protocole

Un volume de 100 ml d'une culture d'actinomycètes sur milieu Benett liquide est centrifugé (15 minutes à 8400 g) pour éliminer le surnageant contenant le milieu de culture. Le culot obtenu est, ensuite, lavé par une succession de trois centrifugations (15 minutes à 8400 g) par une solution de NaCl 1,2 M pour éliminer les résidus du milieu de culture. Enfin, les cellules sont remises en suspension dans la solution de NaCl.

Dix millilitres de la suspension bactérienne lavée ont été ajoutés à 1 g du sol stérile dans un tube à essai. Le mélange est vortexé pendant 60s puis laissé décanter pendant 15 min.

Un millilitre de la couche supérieure aqueuse a été recueilli et sa DO est mesuré à 405nm.

Un ensemble de tubes contenant 10ml de NaCl et 1 g de sol a été utilisé comme le contrôle de l'ajustement des densités optiques obtenues.

L'équation suivante a été utilisée pour calculer l'adhérence des cellules bactériennes au sol :

$$\{[\text{OD}_i - (\text{OD}_f - \text{OD}_c)] / \text{OD}_i\} * 100$$

OD<sub>i</sub> : DO initiale, OD<sub>f</sub> : DO finale, OD<sub>c</sub> : DO de la suspension de contrôle

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1- Caractérisation physicochimiques des supports.

##### 1.1- Caractérisation physico-chimique du verre.

Les études sur les propriétés du verre ont fait l'objet depuis plusieurs années de plusieurs publications en utilisant des techniques analytiques (microscopie, infrarouge, XPS et angle de contact ...). C'est pour ces raisons que nous l'avons choisi comme support modèle dans cette étude. L'angle de contact a été utilisé pour la caractérisation physicochimique des supports.

##### 1.1.1- Détermination de l'hydrophobicité et du caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface du verre

L'hydrophobicité  $\theta_w$ , les composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) du verre ainsi que l'énergie libre d'interaction du verre sont résumés dans le Tableau 26.

**Tableau 26** : Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) du verre.

Surface	Angle de contact (°)			Composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) en ( $mJm^{-2}$ )				Hydrophobicité ( $mJm^{-2}$ )
	$\theta_w$	$\theta_f$	$\theta_d$	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\gamma_{ab}$	$\Delta G_{wi}$
Verre	36,14 (2,23)	46,28 (5,11)	59,52(2,9)	28,79	0,73	54,90	12,70	38,61

L'écart-type est donné entre parenthèse

D'après ce tableau, nous pouvons déduire que la surface du verre présente un caractère hydrophile ( $\theta_w = 36,14^\circ$ ), un caractère donneur d'électrons important ( $\gamma^- = 54,90 mJ.m^{-2}$ ) et un caractère accepteur d'électrons faible ( $\gamma^+ = 0,73 mJ.m^{-2}$ ). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hamadi *et al.* (2009) qui ont rapporté une valeur d'angle de contact de l'ordre de  $35,7^\circ$ .

##### 1.2- Caractérisation physicochimique de la surface du sol

##### 1.2.1- Détermination de l'hydrophobicité de la surface des 11 sols étudiés

Les résultats de l'hydrophobicité qualitative et quantitative des sols étudiés sont résumés dans le Tableau 27.

**Tableau 27** : Hydrophobicité qualitative ( $\theta_w$ ) mesurée par l'angle de contact et quantitative ( $\Delta G_{iwi}$ ) des 11 sols étudiés

Echantillons	Angle de contact (°)			Hydrophobicité ( $mJm^{-2}$ )
	$\theta_w$	$\theta_f$	$\theta_d$	$\Delta G_{iwi}$
SOL1	29±(0,4)	29±(0,7)	64±(2,1)	23
SOL2	34±(0,7)	43±(0,8)	72±(1,3)	31
SOL3	33,7±(0,8)	33,2±(1,2)	38,9±(1,4)	26,22
SOL4	21±(0,5)	46±(0,9)	88±(1,5)	36
SOL5	34±(1,1)	52±(1,2)	56±(0,9)	59
SOL6	44±(1,9)	80±(1,3)	44±(1,2)	35
SOL7	44±(0,9)	33±(0,9)	44±(0,8)	6
SOL8	25±(1,7)	35±(1,7)	42±(1,3)	43
SOL9	50±(1,2)	74±(0,6)	65±(2,3)	52
SOL10	45±(1,1)	90±(0,9)	78±(1,4)	63
SOL11	40,7±(0,8)	28,7±(0,7)	55,6±(1,1)	8,41

$\theta_w$  Angle de contact avec l'eau,  $\theta_f$  Angle de contact avec du formamide,  $\theta_d$  Angle de contact par rapport au diiodométhane,  $\Delta G_{iwi}$  : Energie libre d'interaction ;  
L'écart-type est donné entre parenthèse

A la lumière des résultats obtenus (tableau 25), nous constatons que tous les supports présentent un caractère hydrophile de point de vue qualitatif ( $\theta_w$  est inférieur à  $65^\circ$ ) (Vogler, 1998). Le sol S4 est le plus hydrophile ( $\theta_w = 21^\circ$ ). Il présente une forte salinité de 9,05 dS/m. Par contre, le sol S9 est le moins hydrophile ( $\theta_w = 50^\circ$ ). Il présente une faible salinité de 2,23dS/m. Le sol S10 est plus hydrophile ( $\theta_w = 21^\circ$ ). Il présente une salinité de 2,57 dS/m, par contre le sol S7 est le moins hydrophile ( $\theta_w = 50^\circ$ ) et il présente une salinité de 2,52 dS/m.

### 1.2.2- Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface des 11 sols.

Les propriétés acido-basiques des bactéries sont calculées à partir des mesures des angles de contact effectuées avec de l'eau, du diiodométhane et du formamide. Les composantes de Lifshitz-Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) de la surface des supports étudiés ont été calculées à partir de l'équation de Yong- Van Oss (1988).

Les résultats des caractères donneur d'électrons et accepteur d'électrons de la surface des sols sont résumés dans le Tableau 28.

**Tableau 28 :** Caractères donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) des 11 sols mesurés par l'Angle de contact

Echantillons	Angle de contact (°)			Composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) en ( $mJm^{-2}$ )			
	$\theta_w$	$\theta_f$	$\theta_d$	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\gamma^{AB}$
SOL1	29±(0,4)	29±(0,7)	64±(2,1)	26	4	48	26
SOL2	34±(0,7)	43±(0,8)	72±(1,3)	22	3	53	23
SOL3	33,7±(0,8)	33,2±(1,2)	38,9±(1,4)	40,08	0,33	46,57	7,89
SOL4	21±(0,5)	46±(0,9)	88±(1,5)	14	5	70	37
SOL5	34±(1,1)	52±(1,2)	56±(0,9)	31	0	65	1
SOL6	44±(1,9)	80±(1,3)	44±(1,2)	37	9	95	57
SOL7	44±(0,9)	33±(0,9)	44±(0,8)	38	1	32	12
SOL8	25±(1,7)	35±(1,7)	42±(1,3)	39	0	58	6
SOL9	50±(1,2)	74±(0,6)	65±(2,3)	26	1	70	19
SOL10	45±(1,1)	90±(0,9)	78±(1,4)	18	5	110	45
SOL11	40,7±(0,8)	28,7±(0,7)	55,6±(1,1)	31,04	3,08	33,78	20,42

$\gamma^{LW}$  : Les composantes de Lifshitz-Van der Waals,  $\gamma^-$ : donneur d'électrons,  $\gamma^+$ : accepteur d'électrons  
L'écart-type est donné entre parenthèse.

Les 11 sols ont montré un caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) bien exprimé avec des valeurs largement élevées 48 ; 53 ; 46,57 ; 70 ; 65 ; 95 ; 32 ; 58 ; 70 ; 110 ; 33,78  $mJm^{-2}$  pour les sols S1 ; S2 ; S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 ; S10 et S11 respectivement.

Le caractère accepteur d'électrons de tous les sols exprime des valeurs faibles à négligeables allant de 0  $mJm^{-2}$  pour les sols S3, S5 et S8 qui sont moyennement salins à 9  $mJm^{-2}$  pour le sol S6 qui est très salin.

Ces caractéristiques physicochimiques des sols se rapprochent de celles du verre.

La surface du substrat peut avoir plusieurs caractéristiques qui jouent un rôle très important dans le processus de l'adhésion (Christensen and Characklis, 1990). Les propriétés physico-chimiques de la surface du substrat, l'hydrophobicité et le caractère donneur /accepteur d'électrons gouvernent la vitesse et le taux d'adhésion. En effet, selon les caractéristiques énergétiques de la surface solide étudiée, l'adhésion microbienne peut être augmentée ou diminuée, d'une part et, d'autre part, la répartition des cellules adhérentes aux surfaces solides peut être différente (Van Pelt *et al.*, 1985). La plupart des études, réalisées dans des domaines d'applications diverses, ont montré que les micro-organismes adhèrent

plus difficilement aux matériaux hydrophiles (verre, métaux) présentant une forte affinité pour l'eau et les solvants polaires qu'aux matériaux hydrophobes (polyéthylène, polystyrène, téflon).

Dans le paragraphe suivant, nous allons déterminer les prévisions de l'adhésion des actinomycètes sur les supports caractérisés.

## **2- L'adhésion prédictive des actinomycètes aux supports.**

Bien que les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhésion microbienne soient encore mal compris et n'aient donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physico-chimiques de la surface microbienne et celles des supports sont des facteurs déterminants de l'adhésion initiale (Van Oss *et al.*, 1986, Bellon-Fontaine *et al.*, 1990, Gallardo-Moreno *et al.*, 2002, Bayouhd *et al.*, 2006).

De ce fait, plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour prédire le phénomène de l'adhésion des particules colloïdales aux surfaces dont l'approche de DLVO étendue développée par Van Oss. En utilisant cette approche, l'énergie totale de l'adhésion des bactéries sur les différents supports étudiés ainsi que ses composantes acide-base (AB) et Lifshitz-Van der Waals (LW) sont calculées par les équations issues du modèle de Van Oss (Van Oss, 1994).

### **2.1- Adhésion prédictive des actinomycètes au verre**

Nous avons étudié l'adhésion prédictive sur le verre en utilisant le NaCl au lieu de KNO<sub>3</sub> pour se rapprocher des conditions de vie des actinomycètes étudiés. Nous avons choisi les concentrations de NaCl de 0,1M et une concentration très élevée 1,2M qui correspond à 70g de NaCl/l.

En utilisant l'approche de DLVO développée par van Oss, l'énergie totale (non électrostatique) de l'adhésion des micro-organismes sur les différentes variétés de bois étudiées ainsi que leurs composantes acide-base (AB) et Lifshitz -Van der Waals (LW) ont été calculées par les équations issues du modèle de Van Oss (Van Oss 1994; Hadjiev et al 2007; Bellon-Fontaine et al 1990; Bayouhd et al 2006).

#### **✓ Force ionique 0,1M de NaCl**

Les résultats obtenus pour l'adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre à la concentration 0,1M du NaCl sont représentés dans le tableau 29.



**Tableau 29** : Adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre (NaCl 0,1M)

Souches	$\Delta G_{LW}$	$\Delta G_{AB}$	$\Delta G_{TOT}$
A30	-1,92	-8,48	-10,4
A44	-0,09	-3,21	-3,3
A46	3,04	5,82	8,9
A49	0,00	-5,46	-5,5
A50	-2,24	-11,89	-14,1
A53	2,00	-13,49	-11,5
A57	1,32	-19,14	-17,8
A58	-0,26	-5,62	-5,9
A60	1,46	0,08	1,5
A63	6,67	-50,80	-44,1
A64	-0,66	-17,84	-18,5
A65	-0,36	-12,65	-13,0
A76	0,33	-12,43	-12,1
A79	3,77	-13,83	-10,1

$\Delta G_{LW}$  : Energies libres de Van der Waals ;  $\Delta G_{AB}$  : Energies acide-base ;  $\Delta G_{TOT}$  : Energies totales

Nous constatons que les valeurs de l'énergie libre totale non électrostatique pour les souches d'actinomycètes A30(-10,4) ; A44(-3,3) ; A49(-5,5) ; A50(-14,1) ; A53(-11,5) ; A57(-17,8) ; A58(-5,9) ; A63(-44,1) ; A64(-18,5) ; A65(-13,0) ; A76(-12,1) et A79(-10,1) sont négatives, ce qui montre une adhésion au verre théoriquement favorable. Par contre, l'adhésion est défavorable pour les souches A46(8,9) et A60(1,5).

✓ **Force ionique 1,2M de NaCl**

Le tableau 30 présente les résultats obtenus pour l'adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre à la concentration 1,2M du NaCl.

**Tableau 30** : Adhésion prédictive des actinomycètes sur le verre (NaCl 1,2M)

Souches	$\Delta G_{LW}$	$\Delta G_{AB}$	$\Delta G_{TOT}$
A30	0,37	-1,60	-1,23
A44	0,86	-19,27	-18,41
A46	0,86	-5,34	-4,5
A49	2,02	-1,33	0,7
A50	0,51	-1,23	-0,7
A53	3,53	-12,30	-8,8
A57	0,20	-28,57	-28,4
A58	-1,45	-8,69	-10,1
A60	0,48	-6,37	-5,9
A63	0,40	-2,47	-2,1
A64	-1,03	-7,60	-8,6
A65	-0,72	-14,32	-15,0
A76	0,84	-1,91	-1,1
A79	-0,68	-14,11	-14,8

$\Delta G_{LW}$  : Energies libres de Van der Waals ;  $\Delta G_{AB}$  : Energies acide-base ;  $\Delta G_{TOT}$  : Energies totales

D'après les résultats obtenus, il apparaît que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion dépend essentiellement à la fois des micro-organismes et du support. L'adhésion est défavorable pour la souche A49(0,7). Par contre, l'adhésion théorique des souches A30(-1,23) ; A44(-18,41) ; A46(-4,5) ; A50(-0,7) ; A53(-8,8) ; A57(-28,4) ; A58(-10,1) ; A60(-5,9) ; A63(-2,1) ; A64(-8,6) ; A65(-15,0) ; A76(-1,1) et A79(-14,8) est thermodynamiquement favorable.

## **2.2-Adhésion prédictive des actinomycètes aux sols**

### ✓ **Force ionique 0,1M de NaCl**

Les résultats obtenus pour l'énergie libre non électrostatique à la concentration 0,1M du NaCl sont représentés dans le tableau 31 :

**Tableau 31** : Energie totale ( $\Delta G_{TOT}$ ) de l'adhésion des micro-organismes aux différents sols de la région de Béni Amir à 0,1 M de NaCl

Bactéries	$\Delta G_{TOT}$ (mJm <sup>-2</sup> )										
	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5	Sol 6	Sol 7	Sol 8	Sol 9	Sol 10	Sol 11
<b>A30</b>	-7,5	-8,6	-9,53	-6	-13,2	-7,9	-12	-12,7	-9,61	-7,56	-13,01
<b>A44</b>	-3,16	-3,22	-3,26	-3,1	-3,4	-3,18	-3,4	-3,4	-3,27	-3,17	-3,43
<b>A46</b>	4,25	-4,8	7,48	1,8	13,3	4,89	11,4	12,5	7,61	4,35	12,99
<b>A49</b>	-5,46	-5,46	-5,46	-5,5	-5,5	-5,46	-5,5	-5,5	-5,46	-5,46	-5,46
<b>A50</b>	-10,74	-12,02	-13,11	-8,9	-17,4	-11,2	-16	-16,8	-13,2	-10,81	-17,16
<b>A53</b>	-14,52	-13,37	-12,4	-16,1	-8,6	-14,1	-9,8	-9,1	-12,31	-14,45	-8,78
<b>A57</b>	-19,82	-19,06	-18,41	-20,9	-15,9	-19,54	-16,7	-16,3	-18,36	-19,77	-16,02
<b>A58</b>	-5,49	-5,64	-5,77	-5,3	-6,3	-5,55	-6,1	-6,2	-5,78	-5,5	-6,23
<b>A60</b>	-0,67	0,17	0,88	-1,8	3,7	-0,37	2,7	3,3	0,94	-0,62	3,51
<b>A63</b>	-7,5	-8,6	-9,53	-6	-13,2	-7,9	-12	-12,7	-9,61	-7,56	-13,01
<b>A64</b>	-17,5	-17,88	-18,2	-17	-19,5	-17,64	-19	-19,3	-18,23	-17,52	-19,4
<b>A65</b>	-12,46	-12,67	-12,84	-12,2	-13,5	-12,54	-13,3	-13,4	-12,86	-12,47	-13,5
<b>A76</b>	-12,6	-12,41	-12,25	-12,9	-11,6	-12,53	-11,8	-11,7	-12,23	-12,59	-11,64
<b>A79</b>	-15,77	-13,6	-11,77	-18,8	-4,6	-14,98	-7	-5,6	-11,61	-15,64	-4,95

A partir des résultats obtenus (Tableau 31), nous pouvons déduire que toutes les souches ont adhéré sur les 11 sols à l'exception de A46 et A60 qui présentent un  $\Delta G_{TOT} \geq 0$ .

Nous pouvons classer les souches en fonction de leur adhésion prédictive selon les couleurs de la plus sombre à la plus claire.

Le classement des souches en fonction de  $\Delta G_{TOT}$  est comme suite : A64 > A57 > A65 > A76 > A50 > A79 > A53.

Pour les autres souches, l'adhésion théorique ne présente pas de valeurs significatives.

✓ **Force ionique 1,2M de NaCl**

Les résultats obtenus pour l'énergie libre non électrostatique à la concentration 1,2M du NaCl sont représentés dans le tableau 32

**Tableau 32** : Energie totale ( $\Delta G_{TOT}$ ) de l'adhésion des micro-organismes aux différents sols de la région de Béni Amir à 1,2 M de NaCl

Bactéries	$\Delta G_{TOT}$ (mJm <sup>-2</sup> )										
	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5	Sol 6	Sol 7	Sol 8	Sol 9	Sol 10	Sol 11
<b>A30</b>	-1,78	-1,57	-1,4	-2,08	-0,7	-1,71	-0,93	-0,8	-1,38	-1,77	-0,73
<b>A44</b>	-20,1	-19,18	-18,39	-21,4	-15,3	-19,77	-16,32	-15,75	-18,32	-20,05	-15,46
<b>A46</b>	-5,78	-5,29	-4,87	-6,47	-3,23	-5,61	-3,77	-3,47	-4,84	-5,76	-3,32
<b>A49</b>	-2,19	-1,03	-0,05	-3,82	3,81	-1,77	2,54	3,25	0,04	-2,13	3,61
<b>A50</b>	-1,49	-1,2	-0,95	-1,9	0,04	-1,38	-0,29	-0,11	-0,92	-1,47	-0,01
<b>A53</b>	-14,12	-12,09	-10,37	-16,95	-3,63	-13,38	-5,86	-4,61	-10,23	-14	-3,98
<b>A57</b>	-28,67	-28,56	-28,46	-28,84	-28,07	-28,63	-28,20	-28,12	-28,45	-28,67	-28,09
<b>A58</b>	-7,94	-8,78	-9,48	-6,78	-12,25	-8,24	-11,33	-11,85	-9,54	-7,99	-12,11
<b>A60</b>	-6,62	-6,34	-6,11	-7	-5,19	-6,52	-5,49	-5,32	-6,09	-6,6	-5,24
<b>A63</b>	-2,68	-2,45	-2,26	-3	-1,5	-2,6	-1,75	-1,61	-2,24	-2,67	-1,54
<b>A64</b>	-7,07	-7,66	-8,17	-6,24	-10,14	-7,29	-9,49	-9,85	-8,21	-7,1	-10,04
<b>A65</b>	-13,95	-14,37	-14,72	-13,38	-16,09	-14,1	-15,64	-15,89	-14,75	-13,98	-16,02
<b>A76</b>	-2,35	-1,86	-1,45	-3,02	0,15	-2,17	-0,38	-0,08	-1,42	-2,32	0,07
<b>A79</b>	-13,76	-14,15	-14,48	-13,22	-15,77	-13,9	-15,34	-15,58	-14,51	-13,78	-15,7

A partir des résultats obtenus (Tableau 32), nous pouvons déduire que toutes les souches pourraient adhérer sur les 11 sols à l'exception de A49, A50 et A76 qui présentent une adhésion prédictive  $\Delta G_{TOT} \geq 0$ .

Nous pouvons classer les souches en fonction de leur capacité d'adhésion prédictive selon la couleur : de la plus sombre à la plus claire.

Le classement en fonction de  $\Delta G_{TOT}$  est comme suite : A57 > A44 > A65 > A79 > A53 > A58.

Pour les autres souches, l'adhésion théorique ne présente pas de valeurs significatives et les valeurs de  $\Delta G_{TOT}$  sont proches de zéro.

D'après cette approche, l'adhésion des cellules bactériennes n'est énergétiquement favorisée que lorsque  $\Delta G_{TOT}$  est négative (Busscher, 1984). L'analyse de nos résultats a montré que l'adhésion théorique est favorable ( $\Delta G_{TOT} < 0$ ) pour toutes les souches bactériennes caractérisées par un  $\Delta G^{AB}$  négatif. Ceci indique que leur adhésion théorique est gouvernée essentiellement par les interactions acido-basiques ( $\Delta G_{AB}$ ). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse avancée par Van Oss *et al* (1994) qui ont rapporté que l'énergie des interactions acido-basiques est deux fois plus importante que celle des autres interactions.


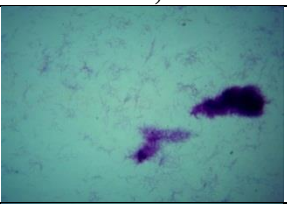
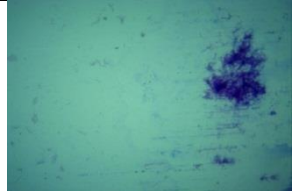
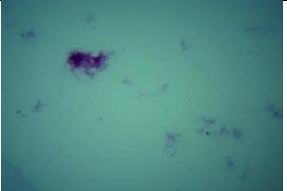
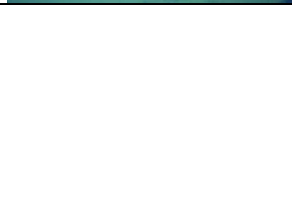

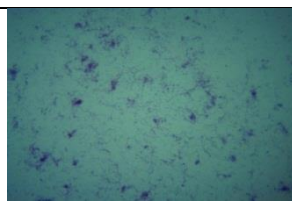
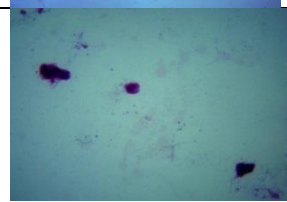


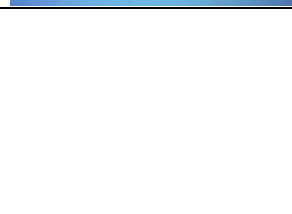
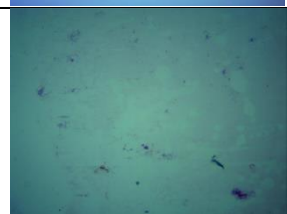

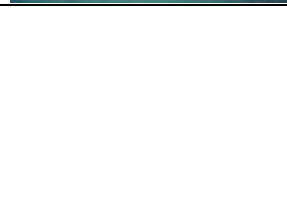
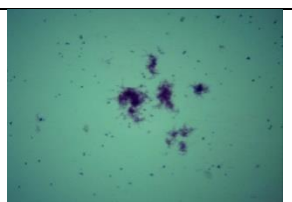
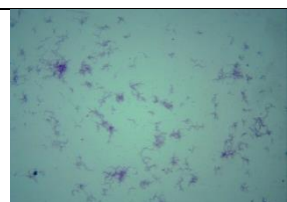


De ce fait, d'après les résultats obtenus, nous pouvons remarquer que les souches adhèrent de la même manière vis-à-vis des sols ; il n'y a pas une grande variabilité dans l'adhésion d'un sol à un autre malgré leurs caractéristiques physicochimiques différentes. Par contre, la différence de l'adhésion est claire d'une souche à l'autre.

### **3- Adhésion expérimentale des actinomycètes**

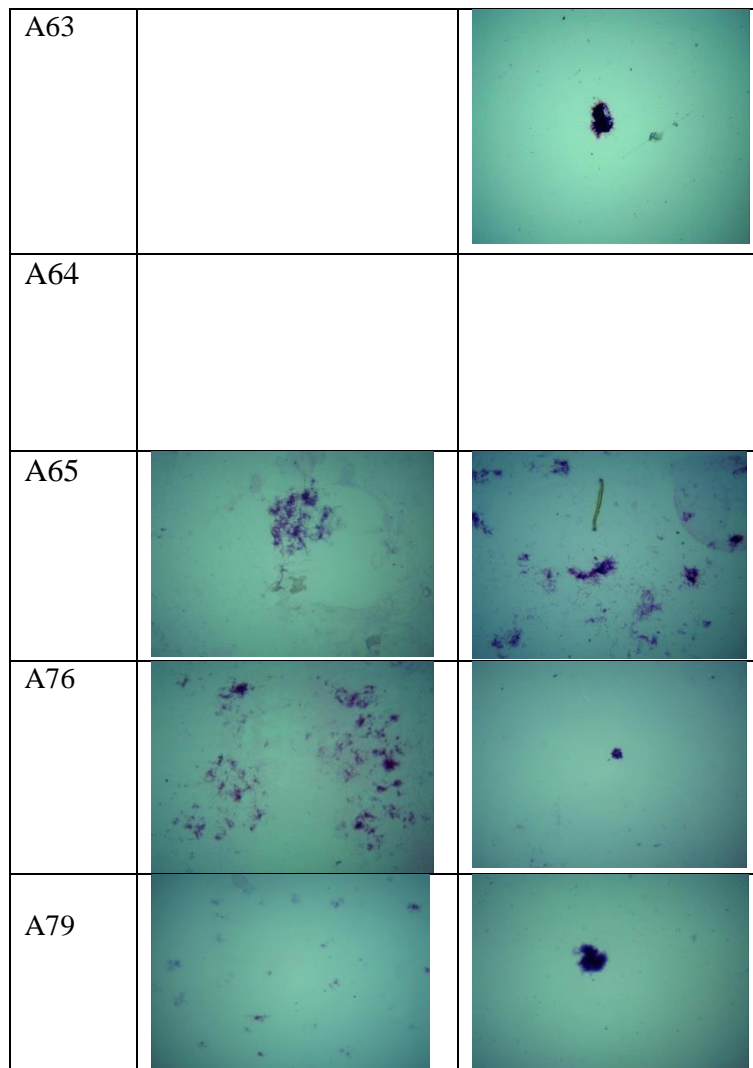
#### **3.1- Adhésion des actinomycètes au verre**

L'adhésion microbienne est le résultat des phénomènes physico-chimiques, cependant les caractéristiques de la surface bactérienne jouent un rôle important dans le développement de ce phénomène. Dans ce contexte, le but de ce chapitre consiste, en premier lieu, à étudier l'adhésion des actinomycètes au verre qui est utilisé comme support modèle et, en second lieu, à étudier l'effet de la force ionique à 0,1 et 1,2M de NaCl sur l'adhésion de ces bactéries. Les forces ioniques utilisées ici sont les mêmes que celles employées pour la caractérisation physicochimique des actinomycètes.

Nous avons utilisé un microscope optique pour l'observation des résultats de ce phénomène d'adhésion. Les résultats sont montrés dans la figure 55.

Souches	3H 0,1M	3H 1,2M
A30		
A44		
A46		
A49		
A50		
A53		
A57		
A58		
A60		





**Figure 55** : Adhésion des actinomycètes au verre. Observation par microscope optique à 3h à 0,1M et 1,2M de NaCl (Gr : x400).

Nous remarquons qu'après le lavage des lames à l'eau distillée, les bactéries adhèrent sur le verre tout en conservant leur architecture. Nous observons une différence au niveau de l'adhésion et de la morphologie des actinomycètes entre les lames après 3h d'incubation.

L'adhésion microbienne sur un substrat est considérée comme le résultat des interactions physico-chimiques entre le substrat et la cellule microbienne. Ces résultats corrélerent bien avec les caractéristiques physico-chimiques rapportées dans les chapitres précédents. Selon l'approche thermodynamique, un microorganisme hydrophile adhère bien sur un substrat hydrophile et vice versa. En effet, nous avons montré dans le chapitre précédent que les souches d'actinomycètes ont un caractère hydrophile et un caractère donneur d'électrons important et le verre est hydrophile et possède un caractère donneur d'électrons important et un caractère accepteur d'électrons faible (Hamadi and Latrache, 2008).

Nos résultats sont en accord avec les études précédentes réalisées dans notre laboratoire ZAHIR (2017) et les travaux effectués par Hamadi (2005) sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

La quantification de l'adhésion microbienne se fait par différentes méthodes, une approche consiste à provoquer le détachement des cellules adhérentes d'une plaque de dimensions connues dans un volume de liquide connu et à compter ces cellules dans le volume total de la suspension (Braindet et al 1999). L'autre méthode est basée sur l'analyse de l'image de la microscopie à épifluorescence ou microscope électronique à balayage (Mozes et al 1987). Cette méthode consiste à évaluer seulement le pourcentage de la surface occupée par les microorganismes.

Hamadi et al. (2005) ont utilisé le programme Matlab® pour déterminer le nombre de cellules adhérentes et le pourcentage de la surface occupée par ces cellules. Ce pourcentage est déterminé en multipliant le rapport de la surface occupée par rapport à la surface totale par 100.

$$\% \text{ Adhésion} = \% \text{ Surface occupée} = (\text{Surface occupée} / \text{Surface totale}) * 100$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 33.

Tableau 33 : Pourcentage de la surface occupée par les cellules adhérentes pour les différentes souches d'actinomycètes à deux forces ioniques (0,1 et 1,2M de NaCl) sur le verre.

Souches	3h (0,1M)	3h (1,2M)
A30	7,86	9,02
A44	5,43	7,16
A46	5,01	8,06
A49L	5,22	6,29
A50	5,02	5,03
A53	0	5,23
A57	0	0
A58	5,04	5,43
A60	0	10,75
A63	0	5,73
A64	0	0
A65	5,2	5,26
A76	5,17	5,63
A79	5,12	5,64

D'après les résultats présentés dans le Tableau 33 et la Figure 55, le pouvoir adhésif des quatorze souches d'actinomycètes au verre varie d'une souche à l'autre et en fonction de la force ionique.

➤ A force ionique 0,1M de NaCl

Pour la force ionique 0,1M de NaCl et après 3h de contact, nous avons observé que 64,28% des souches d'actinomycètes ont montré un pourcentage de surface occupée de 5,01 à 7,86%. Pour les souches A53, A57, A60, A63 et A64, elles ne montrent pas d'adhésion jusqu'à 3 heures de contact avec le verre.

➤ A force ionique 1,2M de NaCl

Pour la force ionique 1,2M de NaCl, les souches d'actinomycètes présentent un pourcentage d'adhésion important après 3h de contact avec le verre. 85,71% des souches ont un pourcentage allant de 5,03 à 10,75%, alors que les deux souches A57 et A64 n'ont pas adhéré.

En ce qui concerne les souches A57 et A64, nous remarquons qu'aucun pourcentage de cellules adhérentes n'a été obtenu pour les deux forces ioniques 0,1 et 1,2M de NaCl.

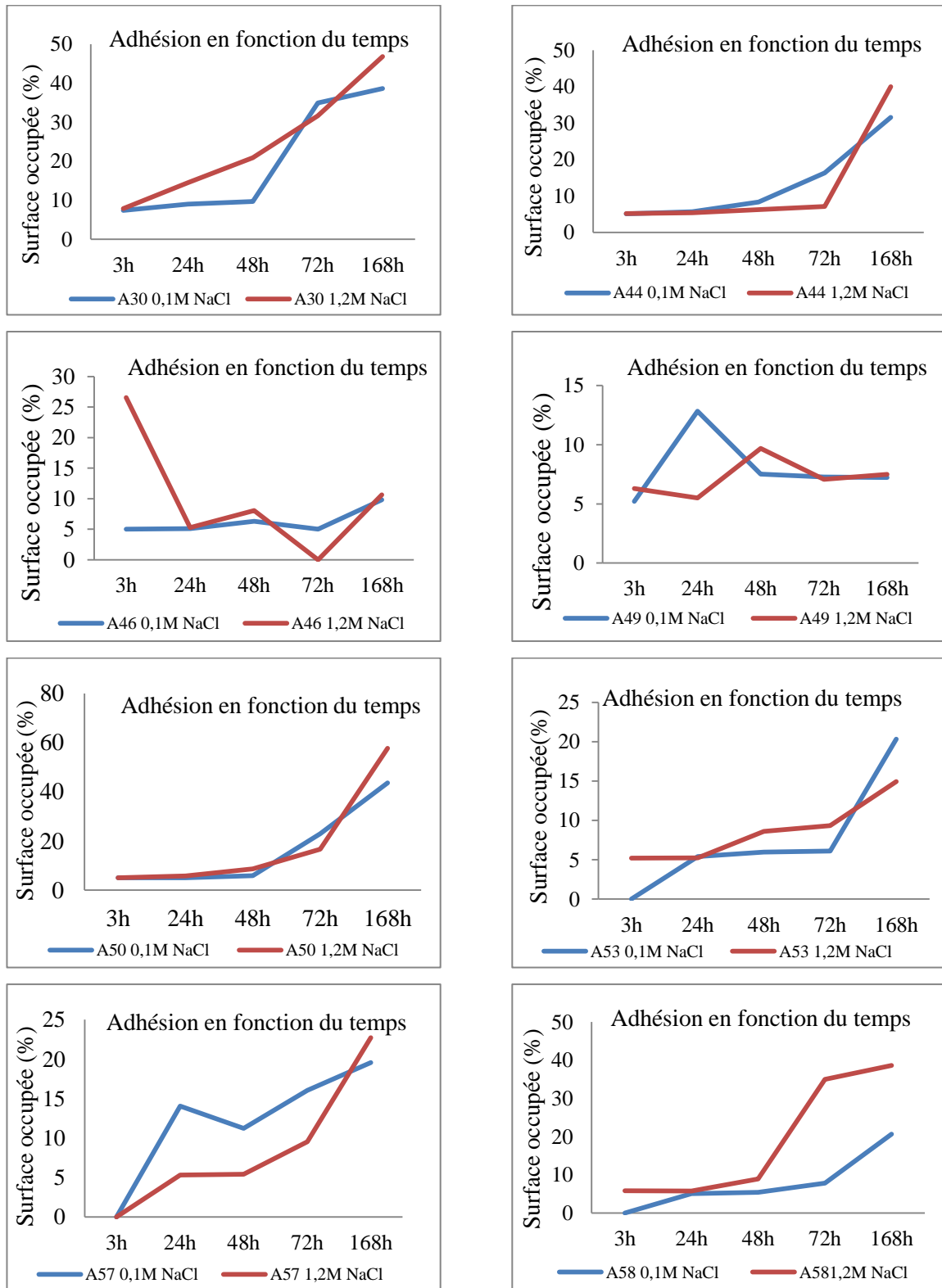
Les souches testées ont montré une capacité d'adhésion sur le verre plus ou moins importante à la forte force ionique 1,2M de NaCl.

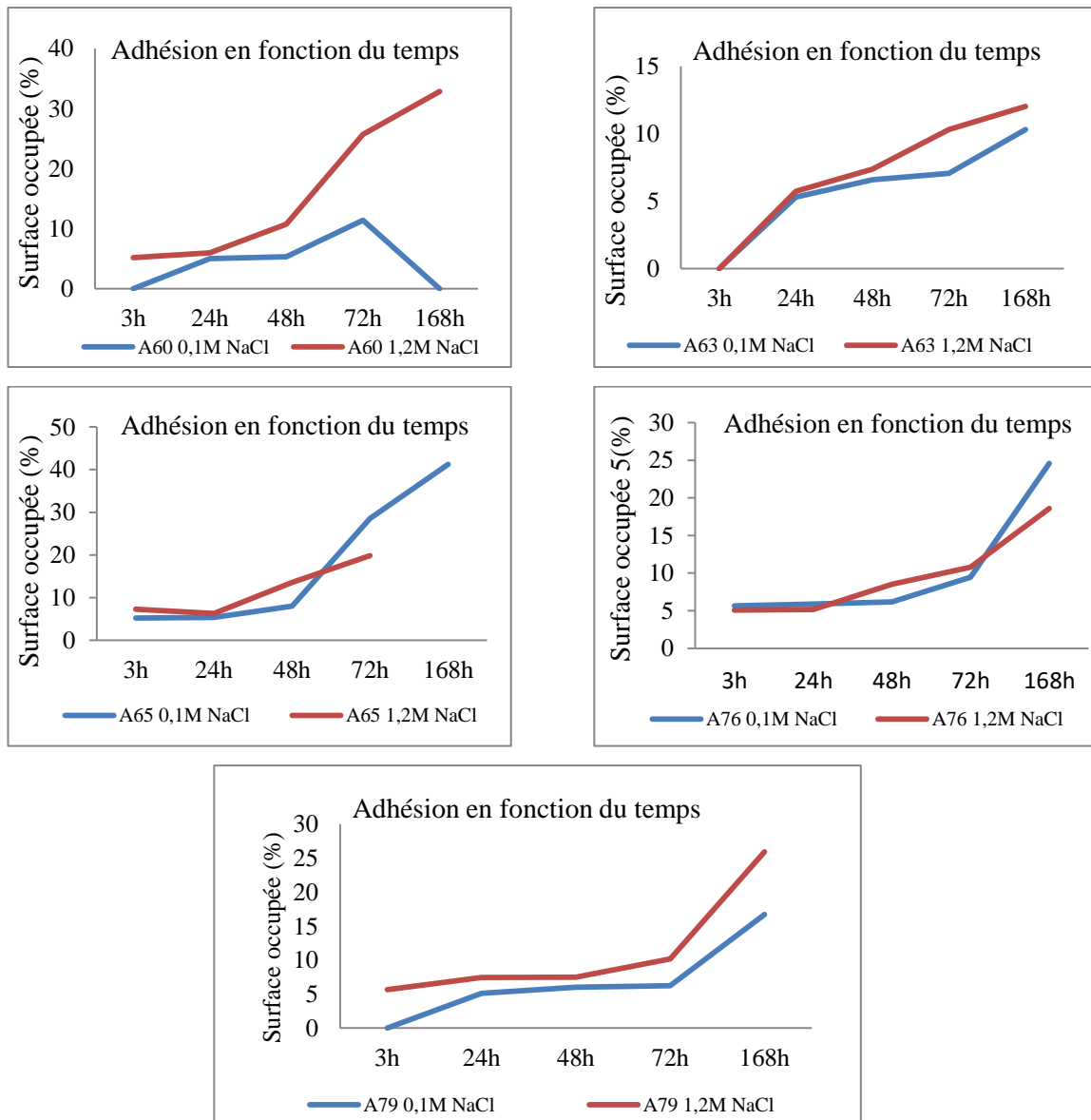
Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à examiner l'effet de la force ionique sur l'adhésion. Les résultats obtenus montrent que la force ionique a un effet sur le pourcentage d'occupation de la surface du verre. En effet, l'augmentation de la force ionique entraîne une augmentation très nette du pourcentage de la surface occupée par les cellules adhérentes des actinomycètes. Cette augmentation peut être liée à une diminution des répulsions électrostatiques car à force ionique élevée, la charge de la surface cellulaire est faible. D'après la théorie DLVO, une augmentation de la force ionique est accompagnée d'une diminution de la longueur de Debye. Cette diminution conduit à une réduction de la barrière énergétique qui va être surmontée par la cellule. Ainsi celle-ci adhère sur le support. Nos résultats sont en accord avec les différents résultats publiés (Jucker *et al.*, 1996, Rijnaarts *et al.*, 1996, Rijnaarts *et al.*, 1999, Barnes *et al.*, 1999) qui montrent que l'augmentation de la force ionique favorise l'adhésion microbienne à un substrat.

### **3.2. Effet du temps de contact sur le taux d'adhésion des quatorze souches d'actinomycètes**

Vue que le cycle de vie des actinomycètes est plus long que les autres bactéries, nous avons essayé de prolonger le temps de contact de ces souches avec le verre pendant 3, 24, 48, 72 et 168 heures et toujours à deux forces ioniques différentes (Annexe 6).

La figure 56 présente le pourcentage des souches d'actinomycètes adhérentes sur le verre en fonction du temps de contact et à deux concentrations de NaCl (0,1M et 1,2M).





**Figure 56 :** Pourcentages de bactéries adhérees sur le verre en fonction du temps en présence de deux concentrations de NaCl (0,1M et 1,2M).

Nous remarquons que sur la figure 56, l'évolution de l'adhésion pour les différentes souches en fonction du temps augmente avec des vitesses différentes d'une souche à l'autre.

Nous observons que pour les souches A30, A50, A58, A60, A63, A65, A76 et A79, les pourcentages de surface occupée sont plus importants en présence des deux forces ioniques. Les pourcentages à 1,2M de NaCl demeurent toujours supérieurs à ceux en présence de 0,1M de NaCl jusqu'à 168h. En ce qui concerne les souches A44, A53 et A57, ce sont les pourcentages de surfaces occupées obtenues à 0,1M de NaCl qui demeurent supérieurs à ceux en présence de 1,2M de NaCl jusqu'à 72h. Pour les souches A46 et A49, la tendance dans l'évolution des pourcentages de surfaces occupées est plus ou moins stable pour les deux concentrations de NaCl.

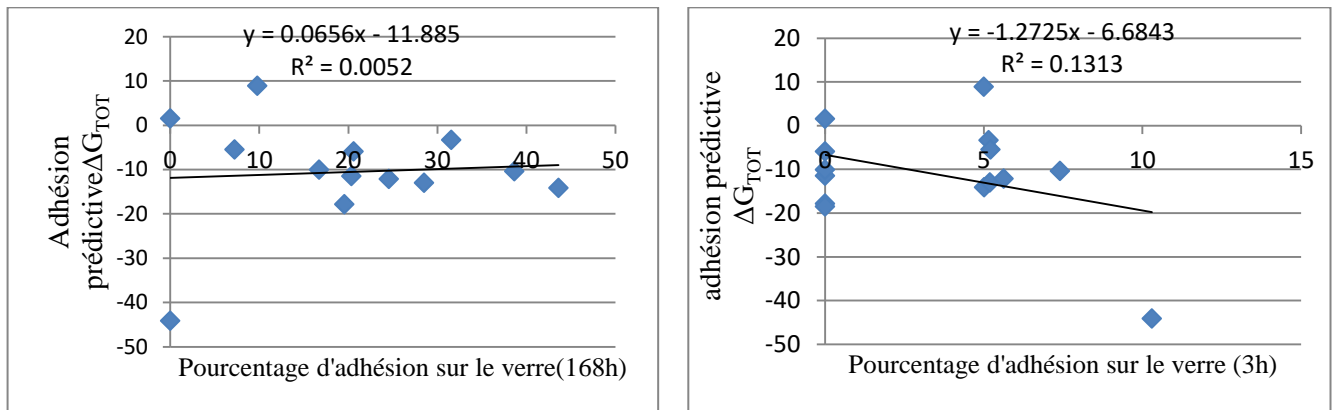
D'après la figure 56, nous constatons que le pourcentage de surface occupée est variable pour les souches d'actinomycètes étudiées. La capacité d'adhésion n'est pas un phénomène continu et linéaire en fonction du temps (de 3h à 168h) pour les quatorze souches d'actinomycètes.

Vu que les espèces d'actinomycètes présentent des différences plus ou moins marquées par rapport au cycle biologique des streptomycètes et vu que chaque espèce possède une particularité liée aux métabolismes et aux sécrétions, ceci explique la variation des surfaces de ces microorganismes et donc une différence de leur adhésion.

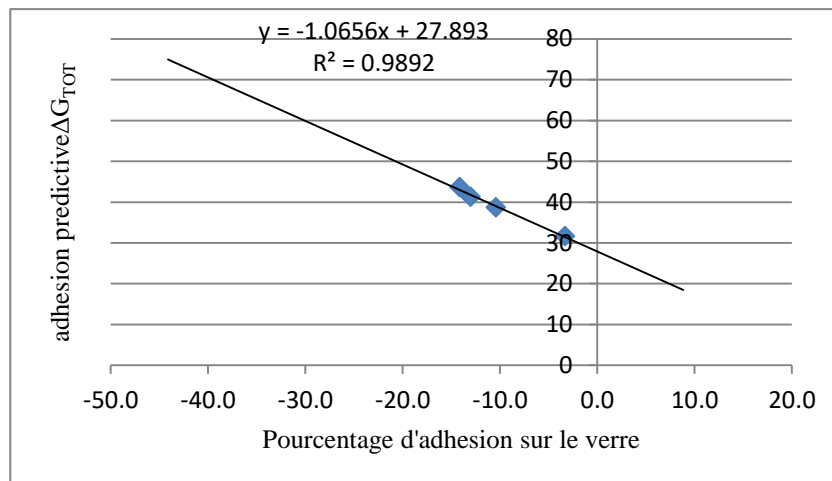
Pour les souches qui n'ont pas montré des résultats exploitables, nous supposons que soit leurs cycles de vie sont plus importants que l'intervalle de temps choisi dans ces expériences et donc le temps d'incubation choisi n'est pas suffisant, soit ces actinomycètes sont incapables de coloniser les substrats inertes. En effet, Alonso (2015) ont rapporté que *Cellulomonas uda* est capable d'adhérer sur les substrats nutritifs, particulièrement la cellulose, alors qu'elle est incapable d'adhérer sur les substrats inertes.

Ces résultats indiquent la présence d'autres interactions entre les bactéries et le verre qui peuvent réduire l'adhésion. Sachant qu'à pH neutre, la plupart des microorganismes ainsi que le verre sont tous les deux chargés négativement (*Hermesse et al., 1988, Rijnaarts et al., 1993, Boonaert et al., 2001*), donc les interactions entre eux seraient répulsives. Ce qui appuie encore plus cette hypothèse, ce sont les travaux de *Mozes et al., (1987) et van Loosdrecht et al. (1989)* qui ont rapporté que l'adhésion d'un microorganisme ayant une charge négative importante et un caractère hydrophile sur un substrat hydrophile est défavorable.

**Corrélation entre l'adhésion prédictive  $\Delta G_{TOT}$  et l'adhésion sur le verre des souches d'actinomycètes.**



**Figure 57 :** Corrélation entre l'adhésion prédictive ( $\Delta G_{TOT}$ ) et l'adhésion sur le verre



**Figure 58 :** Corrélation entre l'adhésion prédictive ( $\Delta G_{TOT}$ ) et l'adhésion sur le verre pour les valeurs supérieures à 30%

La comparaison de  $\Delta G_{TOT}$  et les valeurs expérimentales de l'adhésion sur le verre n'a pas révélé de corrélation significative (Figure 57). Cette constatation est la même quel que soit le temps de contact pris pour la mesure de l'adhésion expérimentale puisqu'elle n'évolue pas linéairement en fonction du temps (3h, 24h, 48h, 72h, 168h), avec par exemple un maximum de 30% de la surface occupée.

Nous avons donc essayé de chercher une éventuelle corrélation entre le maximum d'adhésion expérimentale obtenu et l'adhésion prédictive  $\Delta G_{TOT}$ . Aucune corrélation n'a été obtenue, mais en considérant les valeurs supérieures à 30% de la surface occupée, une très bonne corrélation entre les deux paramètres ( $R^2 = 0,9892$ ) a été constatée (Figure 58).

Des auteurs comme (Van Loosdrecht *et al.* (1987)) ont déjà investigué des corrélations de ce genre entre les phénomènes d'adhésion aux solvants MATS et les propriétés physicochimiques de la surface cellulaires des bactéries. De plus, dans notre laboratoire Hamadi et al (2008) ont rapporté qu'à partir de 6% de l'adhérence à l'hexadécane, une corrélation significative ( $r = 0,8$ ) à l'intérieur de la même espèce entre les deux méthodes : adhésion aux solvants MATS et hydrophobicité de la surface des cellules évalué par l'angle de contact a été trouvé.

Ici, dans ce travail, nous montrons que la physicochimie de la surface à travers le modèle de Van Oss,  $\Delta G_{TOT}$  devrait être considérée dans la prévision de l'adhésion des actinomycètes sur le verre à partir de 30%. Ce résultat mérite d'être approfondi et élargi avec d'autres souches et éventuellement d'autres espèces.

### **3.3- Adhésion des actinomycètes aux sols**

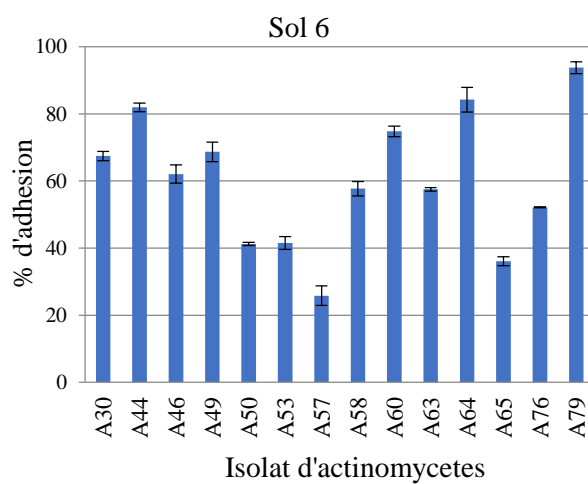
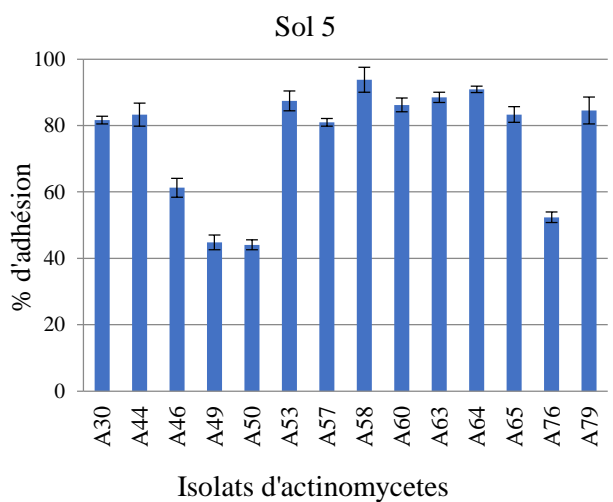
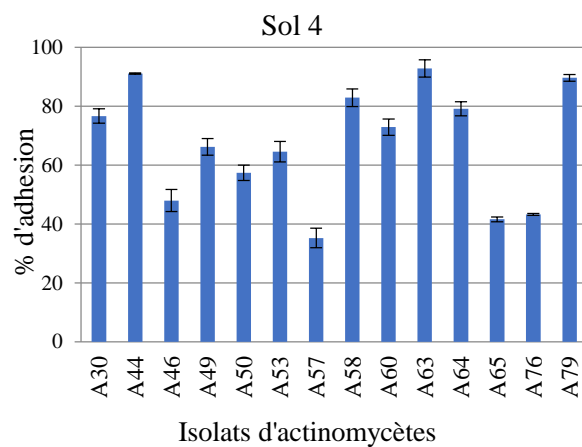
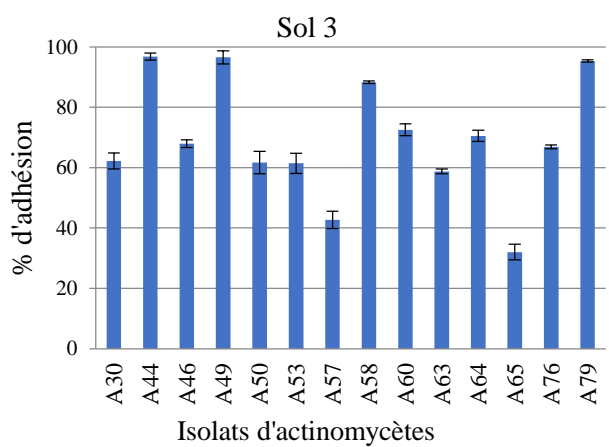
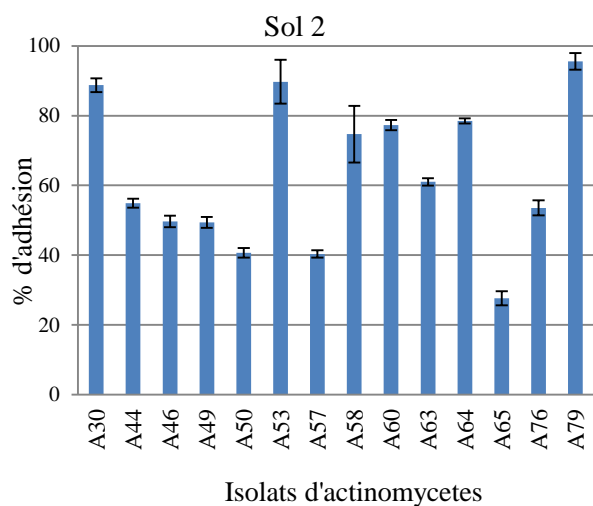
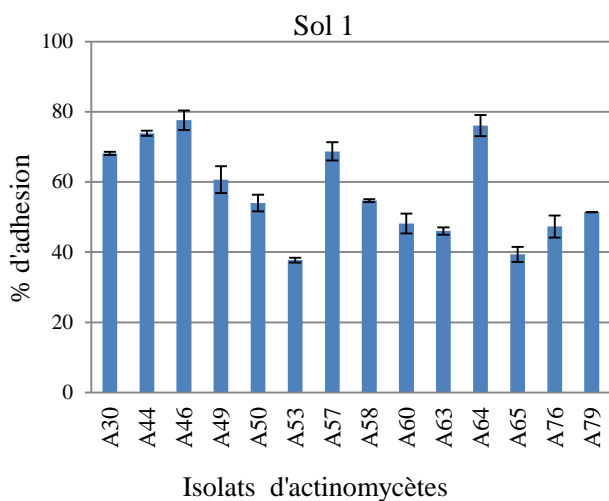
Dans le sol, plusieurs fonctions agronomique et environnementale sont assurées par les actinomycètes. Parmi ces fonctions, nous trouvons la décomposition des substances organiques, la fixation biologique de l'azote grâce à une nitrogénase dans le genre *Frankia* (Baker and Okami, 1988), la dégradation des substances les plus récalcitrantes à savoir la cellulose et la lignine (McCarthy and Broda, 1984, Kluepfel *et al.*, 1986), l'attaque des substances humiques qui contiennent une part importante de l'azote du sol, cette décomposition est donc d'une grande importance pour la fertilité du sol. Ainsi, une augmentation de la croissance des plantes est obtenue par addition des mycéliums d'actinomycètes dans le sol. Donc la stabilité et le comportement des actinomycètes dans le sol auraient des conséquences pratiques sur leur physiologie.

Cette partie sur l'étude de l'adhésion des souches d'actinomycètes aux particules des sols est un travail préliminaire pour comprendre le comportement de ces microorganismes, leur écologie et leur physiologie. Il permet essentiellement d'établir la possibilité de moduler leurs fonctions.

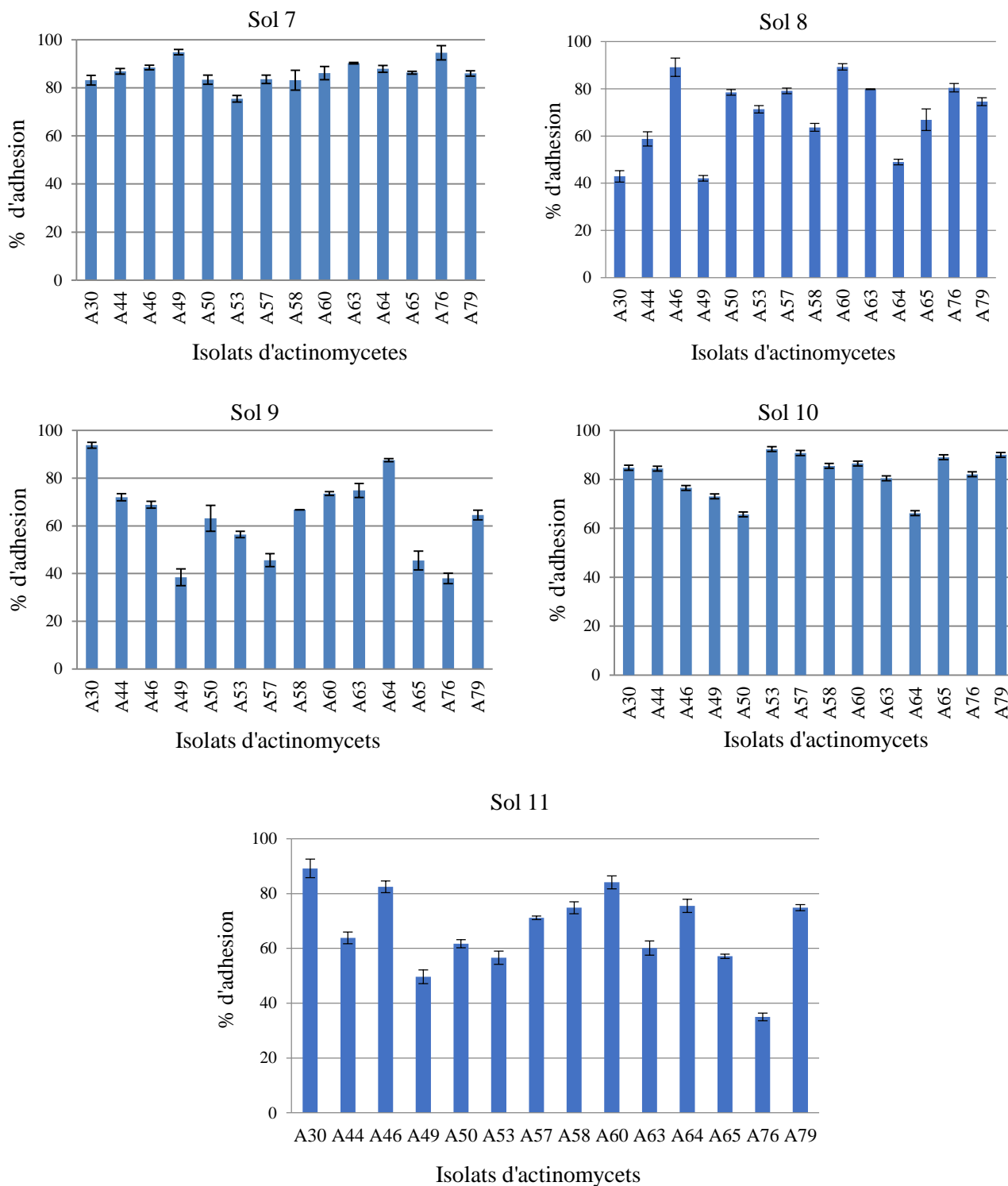
Le test d'adhésion a été réalisé en appliquant une force ionique élevée de 1,2M de NaCl pour rapprocher les souches d'actinomycètes des milieux de leur provenance.

Les résultats obtenus dans la figure 59 montrent le pourcentage d'adhésion des souches d'actinomycètes aux 11sols étudiés.





**Figure 59:** Pourcentages d'adhésion des actinomycètes isolés aux sols étudiés



**Figure 59** (suite): Pourcentages d'adhésion des actinomycètes isolés aux sols étudiés

En ce qui concerne le sol11, les souches A44 (73,9%), A46 (77,6%) et A64 (76,1%) ont montré un pourcentage d'adhésion supérieur à 70%, alors que les souches A53, A60, A63, A65 et A76 présentent respectivement des pourcentages de 37,7 ; 48,2 ; 46 ; 39,4 et 47,3%.

Les souches adhérees au sol 2 ont montré un pourcentage d'adhésion supérieur à 70% pour A30 (88,75%), A53 (89,72%), A58 (74,69%), A60 (77,28%), A64 (78,47%) et A79 (95,59%). Par contre, les autres souches ont un pourcentage d'adhésion inférieur à 50%.

Pour le sol3, la majorité des souches présentent un pourcentage d'adhésion supérieur à 60% sauf pour A57 (42,7%) et A65 (32%).

Pour le sol 4, toutes les souches adhèrent à plus que 50% excepté A46, A57, A65 et A76 qui présentent des pourcentages d'adhésion de 47,95 ; 35,20 ; 41,58 et 43,26% respectivement.

Les souches A30, A44, A53, A57, A58, A60, A63, A64, A65 et A79 adhèrent fortement au sol 5 avec des pourcentages supérieurs à 80%, tandis que A46, A44 et A76 présentent des pourcentages d'adhésion de 61,2 ; 44,8 et 52,3 % respectivement.

Les souches A50, A53, A57 et A65 adhèrent faiblement au sol 6 avec des pourcentages de 41,22 ; 41,50 ; 25,83 et 36,11% respectivement par rapport aux autres souches pour lesquelles il dépasse 50%.

Les 14 souches présentent un pourcentage d'adhésion au sol 7 très fort supérieur à 70%. Ce sol est caractérisé par un pH basique, une faible humidité et un taux de salinité élevé.

Pour le sol 8, à l'exception des souches A30 (42,93%) ; A49 (42,08%) et A46 (48,96%) qui présentent un faible pourcentage d'adhésion, les autres souches ont des pourcentages supérieurs à 50%.

Pour le sol 9, seules les souches A49 (38,4%) ; A57 (45,6%) ; A65 (45%) et A76 (38%) montrent un faible pourcentage d'adhésion, alors que les autres dépassent les 50%.

Toutes les souches adhèrent bien au sol 10 en présentant des pourcentages d'adhésion supérieurs à 60%.

Les pourcentages d'adhésion des souches A30(89,2%) ; A44(63,9%) ; A46(82,5%) ; A50 (61,7%) ; A57(71,1%) ; A58(74,8%) ; A60(84,1%) ; A63(60,1%) ; A64(75,5%) et A79(74,9%) au sol 11 sont supérieurs à 60%, alors que les souches A49(49,6%), A53 (56,6%) et A76(35%) présentent de faibles pourcentages.

Nous remarquons que cette étude de l'adhésion des souches d'actinomycètes aux différents sols ne présente pas les mêmes résultats. Ceci pourrait s'expliquer par la variation des caractéristiques physicochimiques de ces différents sols.

Les souches qui ont montré une plus haute valeur d'adhésion ont donc une affinité élevée pour le sol utilisé dans l'essai, alors que celles suspendues dans l'eau pendant un temps moins important que les autres et sont également moins mobiles dans le sol et sont transportées passivement sur des distances plus courtes par l'eau montrent un faible pourcentage d'adhésion.

Ces résultats sont similaires à ceux de Huysman and Verstraete (1993) qui ont suggéré que la rétention cellulaire dans le sol est fonction de type de bactérie ainsi que des propriétés du sol. Aussi Zahir et al (2016) ont rapporté des résultats similaires avec des pourcentages d'adhésion à l'argile des différentes souches d'actinomycètes supérieurs à 70%.

De nombreuses études ont rapporté les effets de divers paramètres environnementaux, tels que l'ajout de NaCl sur la croissance et l'adhérence des bactéries (de Carvalho and da Fonseca, 2007, Facey *et al.*, 2011). Il est connu que l'adhérence bactérienne est dictée par des forces à longue et courte distances entre bactéries et substrat (Van Oss, 2003). Les forces de Liefshitz-Van der Waals et les forces électriques à double couche qui sont des forces à longue portée (plusieurs nanomètres). Les premières sont attractives et les secondes peuvent être à la fois attractives et répulsives. En revanche, les interactions acides de Lewis fonctionnent à courte distance (Busscher *et al.*, 2008).

La physicochimie des surfaces définit l'étendue de ces forces et décide ainsi de l'interaction entre les surfaces qui se rapprochent. Les interactions sont également influencées par les propriétés du liquide environnant. La force ionique affecte l'épaisseur de la double couche électrique (Hamadi *et al.*, 2004) et, de ce fait, les interactions électrostatiques, favorisant ainsi l'adhésion cellulaire à la surface.

Le rôle de la fluidité et de la composition de la membrane sur la survie des bactéries à des températures et à une salinité extrême ont été décrites précédemment (Busscher *et al.*, 1997). La plupart des mécanismes d'adaptation concernent le maintien de la phase de gel bicouche de la membrane, assurant ainsi son bon fonctionnement (Sinensky, 1974). Carpenter and Crowe (1989) ont rapporté que le maintien de l'intégrité de la membrane chez les

organismes anhydrobiotiques constituait un mécanisme central de la tolérance à la dessiccation. Ainsi, la structure de la membrane est modifiée phénotypiquement en réponse aux modifications du stress environnemental. Les adaptations peuvent inclure une adhérence au substrat (Lang S *et al.*,1998).

De plus, les actinomycètes, bactéries à Gram positif, sont connus pour être tolérants à la dessiccation (Uhlířová *et al.*, 2005) , mais ils peuvent être sensibles aux chocs thermiques osmotiques et aux températures élevées. Le sel affecte les structures cellulaires de surface. Plusieurs études ont indiqué que les propriétés physicochimiques de la surface cellulaire pouvaient être modifiées en fonction de la structure cellulaire superficielle (Briandet R *et al.*,2000) et de facteurs environnementaux tels que la température, la composition du milieu, la force ionique et le pH (Latrache H *et al.*,1994).

Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol sont complexes et imprévisibles du fait que plusieurs interactions peuvent avoir lieu entre les ions, les bactéries et les particules du sol (Polonenko *et al.*, 1986) . Puisque la membrane cytoplasmique bactérienne est perméable à l'eau mais non à la plupart des métabolites, un choc hyper ou hypoosmotique provoque un efflux ou un influx d'eau accompagné, respectivement, d'une diminution ou d'une augmentation concomitante du volume cytoplasmique. Vu la rigidité de la paroi bactérienne, le choc hypoosmotique n'entraîne généralement qu'une légère augmentation du volume cytoplasmique. Par contre, le choc hyperosmotique a pour conséquence de considérables contractions du volume cytoplasmique. L'importance de cette plasmolyse dépend de l'osmolarité du milieu mais non de la nature du soluté. L'exposition des bactéries à des conditions d'hyperosmolarités a comme résultat une diminution de l'activité de l'eau cytoplasmique. Les protéines et d'autres macromolécules biologiques ont une activité optimale entre certaines limites de valeurs de l'activité de l'eau, en dehors desquelles celle-ci est perturbée. La plasmolyse entraîne la dénaturation des enzymes (Yancey *et al.*, 1982) et donc l'inhibition de processus physiologiques tels l'accumulation de nutriments (Roth *et al.*, 1985) ou la réplication de l'ADN (Meury, 1988)

#### **IV-CONCLUSION**

L'adhésion est dépendante non seulement des propriétés de surfaces microbiennes mais aussi de celles des supports (surface des matériaux) dont les rôles sont ainsi déterminants dans ce processus d'adhésion (Hamadi *et al.*, 2005). Les propriétés de surface des

microorganismes dépendent de la composition de la surface de ces derniers et surtout de leur composition chimique.

Dans ce chapitre, nous avons exploré la capacité d'adhésion à deux forces ioniques de quatorze souches d'*Actinomycètes* isolées de 11 sols de la zone de Béni Amir dans la région de Beni Mellal au Maroc, sur deux supports de nature différente : un support inerte, le verre, et un support actif, le sol.

Nous avons déterminé, en premier lieu, la caractérisation physico-chimique de la surface des deux supports étudiés : le verre et le sol. Ces derniers présentent un caractère relativement hydrophile, un caractère donneur d'électrons bien exprimé et un caractère accepteur d'électrons faible.

En second lieu, nous avons fait appel à l'apport de l'approche théorique pour prévoir l'adhésion de toutes les bactéries sur ces supports. Les résultats de cette prédiction théorique ont montré que l'adhésion au verre des différentes souches semble thermodynamiquement favorable et à l'inverse celle des souches A46 ; A60 et A49 sont défavorables alors que pour l'adhésion sur le sol, la majorité des souches ont adhéré sur les 11 sols testés.

En troisième lieu, nous avons procédé à l'étude de l'adhésion expérimentale des souches d'actinomycètes. La majorité des souches ont montré une adhésion sur le verre à l'exception de la souche A64. Les résultats obtenus montrent qu'une augmentation de la force ionique conduit à une augmentation de l'adhésion des actinomycètes quel que soit le temps de contact (3 à 168h).

Les résultats ont montré aussi que le prolongement du temps de contact conduit à une augmentation du taux d'adhésion. Aussi, les 14 souches d'actinomycètes montrent un taux d'adhésion important vis-à-vis des différents sols étudiés à la force ionique 1,2M du NaCl.

## CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était d'explorer les caractéristiques de distribution écologiques des actinomycètes en environnement extrême de différents sites de sol du périmètre Tadla Azilal région de Béni Amir ( Béni Mellal , Maroc) connus par une salinité élevée et élucider le phénomène de l'adhésion chez les actinomycètes par les caractéristiques physicochimiques de leurs surfaces. Ce phénomène étant, jusqu'à présent, mal connu chez ce groupe mystérieux de microorganismes. En effet l'analyse bibliographique a montré que les connaissances sur l'adhésion et la formation des biofilms chez les actinomycètes sont rares.

L'essentiel des travaux actuellement menés s'attache à élargir la liste des espèces nouvelles découvertes, et à déchiffrer leur métabolisme secondaire, vu le grand nombre de métabolites synthétisés par ce groupe de bactéries.

L'originalité de ce travail réside, en plus de sa forte interdisciplinarité, dans le choix d'un type de microorganisme particulier par sa biologie et sa morphologie, et dont la vie sociale en biofilm reste, encore à ce jour. Cette approche notamment les conditions écologiques particulières comme la salinité des sols a nécessité la mise au point de plusieurs protocoles expérimentaux pour adapter les méthodes d'études ordinairement utilisées dans ce domaine.

Notre étude est effectuée dans la région de béni Amir dont les sols souffre d'un problème de salinité très élevée.

Deux étapes principales ont été définies pour répondre aux objectifs de ce travail :

- L'isolement des actinomycètes halotolérants à partir des sols de la région de béni Amîr connue par un taux de salinité élevé.

- La caractérisation physicochimique de la surface des actinomycètes, en évaluant l'hydrophobicité et le caractère donneur/accepteur d'électrons, dans le but d'élucider leur comportement adhésif sur les surfaces solides. Une investigation, sur l'effet du degré de salinité sur les caractères physicochimiques de la surface bactérienne, s'est imposée.

Cette étude nous a permis d'avoir des données intéressantes sur la distribution des actinomycètes isolés des sols de la région de Béni Amir. Il a été montré que la distribution de ces bactéries varie d'un sol à l'autre, la diversité et la richesse des actinomycètes étant

associées aux facteurs environnementaux du sol, à savoir la matière organique, l'humidité, le pH, la salinité.

Pour cela, nous avons sélectionné 11 échantillons de sol prélevé tout au long du périmètre Tadla Azilal région de Béni Amir (Beni Mellal, Maroc). Une caractérisation physicochimique des différents sols étudiés a été réalisée, cette analyse a montré que l'ensemble des échantillons représentent des écosystèmes extrêmes,

L'identification des isolats a été réalisée par outil moléculaire en se basant sur l'amplification par PCR de l'ADN 16S. Des amorces FGPS 6 et FGPS 1509 ont été utilisées dans cette étude. Après comparaison des séquences d'ADN avec la banque de données « Gen-banque », sur 80 souches, 30 souches identifiées ont été assimilés au genre *Streptomyces* avec des pourcentages d'homologies de 99 à 100 %.

Un test de tolérance au chlorure de sodium a été réalisé sur le milieu SMM additionné de différentes concentrations de NaCl (0 ; 50 ; 70 ; 100) g/l. A partir des résultats obtenus nous avons pu déduire que les souches d'actinomycètes n'exigent pas la présence de NaCl dans leur milieu pour croître quelque soit l'origine de la salinité. Ce sont des actinomycètes halotolérantes. Ainsi nous avons reparti les souches d'actinomycètes isolées du sol de Béni Amir en 2 groupes :

-Le premier groupe est composé de 61 souches et qui ont pu croître sur le milieu contenant la concentration 50g /L de NaCl ; ce qui correspond à 76,25% de l'ensemble des actinomycètes.

-Le second groupe est composé de 14 souches qui sont capables de pousser sur le milieu SMM à concentration de NaCl de 70g /l; ce qui représente 17,5% de l'ensemble des actinomycètes.

L'activité antibactérienne et antifongique des souches d'actinomycètes isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar.

✓ 61 souches (76,25 %) parmi les 80 souches testées, ont montré une activité antibactérienne contre au moins un des germes cibles testés (*salmonella sp ATCC381* (61,25%), *k.pneumonia ATCC13883* (2,5%), *E.coli ATCC25922* (10%), *E.coli CCMMB4* (3,75%), *Micrococcus luteus ATCC 381* (5%).



✓ L'études antifongiques, sur 80 souches actives, 40 souches (50%) ont montré une activité contre *Candida albicans* CCMML15, 15 souches (48,38%) contre *Fusarium oxysporum* 27, 17 souches (54,83%) contre *Verticillium dahlia* V22 et 23 souches (74,19%) contre *Rhizoctonia*.

Par ailleurs, les 14 souches ayant montré une tolérance à la plus grande concentration de sel 70 g/l testé ont montré une activité antibactérienne et antifongique.

Déchiffrer la complexité du comportement adhésif chez ce groupe de bactéries a exigé le développement de plusieurs techniques d'étude adaptées, respectant leur morphologie filamenteuse. Pour cette fin, nous avons mis en œuvre:

-La mise au point d'une nouvelle technique pour la caractérisation de la surface des sols par la méthode d'angle de contact.

-La mise au point d'une technique pour estimer l'adhésion des bactéries sur un support particulier, sous forme de particules du sol.

Les propriétés physicochimiques de la surface cellulaire sont considérablement différentes d'une souche à l'autre, ce qui devrait être pris en compte dans leur comportement adhésif. La force ionique a provoqué un effet très marqué sur ces propriétés, il est donc important d'étudier la relation de ce phénomène avec l'écologie de ces bactéries en matière de comportement adhésif.

Par ailleurs, dans ce travail nous avons évalué l'effet de deux méthodes utilisées à savoir l'adhésion microbienne aux solvants (MATS) méthode simple mais jamais utilisée pour les actinomycètes et la méthode de l'Angle de Contact dédiée à l'analyse physicochimique fine des surfaces. En comparant les deux méthodes dans les mêmes conditions, nous remarquons qu'elles ne présentent pas la même relativité. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les propriétés physicochimiques évaluées séparément par ces deux méthodes. Une discussion en termes d'interaction mise en œuvre par chaque méthode au niveau de la surface cellulaire a été discutée sur la base de la littérature concernant les études réalisées sur d'autres espèces microbiennes.

L'effet du sel NaCl a été examiné par les deux méthodes. Par la méthode MATS, les résultats obtenus montrent que la surface des souches d'actinomycètes gagne un caractère plus hydrophobe lorsque le taux du sel augmente du 0,1 à 1,2 M. Globalement le caractère donneur

d'électrons diminue quand on augmente la concentration du NaCl. Cette variation est moins marquée pour le caractère accepteur des électrons. Une bonne corrélation est obtenue entre l'hydrophobie et le donneur d'électrons à 0,1 M, mais il existe une forte corrélation entre l'hydrophobicité et le caractère accepteur des électrons à 1,2 M.

Si la concentration du NaCl n'a pas montré d'effet clair sur l'hydrophobicité qualitatif estimée par l'Angle de Contact. 85,71 % des surfaces cellulaires étudiées présentent un caractère hydrophile. De même, toutes les souches ont un caractère donneur d'électron élevé et un caractère accepteur d'électron faible

Après avoir mis au point une nouvelle technique adaptée à la caractérisation de la surface des sols.

La suite de notre travail a donc été consacrée à la caractérisation physico-chimique de la surface des 11 sols de la région de béni Amir pour pouvoir prédire et éventuellement moduler le comportement adhésif sur ces sols qui présentent un caractère hydrophile, tous les sols ont un caractère donneur d'électrons fort et largement supérieur à celui d'accepteur d'électrons.

Ces résultats nous ont permis de caractériser de point de vue thermodynamique, les différentes souches d'actinomyètes afin de pouvoir investiguer la relation entre ces caractères et leurs adhésion microbienne aux sols. D'après les résultats obtenus, il n'y a pas une grande variabilité de l'adhésion d'un sol à un autre. Les propriétés physicochimiques tel que la matière organique, l'humidité, le pH, la salinité semblent na pas avoir d'effet sur cette adhésion prédictive. Par contre la différence est marquée d'une souche à l'autre.

Dans la continuité de ces travaux de thèse, Nous avons mis en évidence une technique pour estimer l'adhésion des bactéries sur un support particulier, sous forme de particules du sol. Par ce choix, on a visé de rapprocher les conditions expérimentales de celles du milieu de vie. L'influence des facteurs de l'environnement sur le comportement adhésif s'est traduite par une adhésion importante en présence du sel avec des différents pourcentages.

Nous supposons que l'augmentation de l'hydrophobicité pourrait diminuer l'étalement de la goutte de l'eau sur la surface bactérienne, et donc pourrait provoquer une optimisation de la surface de contact; ce qui diminuerait la concentration du sel dans l'environnement immédiat de la bactérie

Contrairement au sol, sur le verre la concentration du sel n'a pas marqué une grande influence sur l'adhésion de ses souches qui semble être faible.

Par ailleurs, nous avons cherché une corrélation éventuelle entre le maximum d'adhésion expérimentale et l'adhésion prédictive  $\Delta G_{TOT}$ . Aucune corrélation n'a été obtenue. Cependant en considérant les valeurs supérieures à 30% de la surface occupée une très bonne corrélation a été constatée. La cinétique de l'adhésion nous a permis d'affirmer les prédictions d'adhésion à travers l'énergie libre non électrostatique d'adhésion.

Un certain nombre de perspectives sont donc envisageables à l'issue de ce travail,

- Approfondir les connaissances sur le comportement adhésif des bactéries en faisant appel à d'autres techniques microscopiques : microscopie électronique à balayage (MEB), microscope confocal, microscope en épifluorescence.
- Etudier le comportement adhésif des actinomycètes sur différentes surfaces, dans l'objectif de leur valorisation dans d'autres domaines biotechnologiques.
- Etudier la composition de la paroi des actinomycètes par différentes techniques biochimiques et spectrales en vue d'expliquer d'avantage les phénomènes interfaciques.
- Etudier le pouvoir antiadhésif vis-à-vis d'autres microorganismes de l'industrie agroalimentaire et du domaine médical pour une valorisation biotechnologique innovante.

## Références

- ABSOLOM, D. R., LAMBERTI, F. V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., VAN OSS, C. J. & NEUMANN, A. W. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 90-97.
- AFIFI, M., ATTA, H., ELSHANAWANY, A., ABDOUL-RAOUF, U. & EL-ADLY, A. 2012. Biosynthesis of hygromycin-B antibiotic by *Streptomyces crystallinus* AZ151 isolated from Assiut, Egypt. *Bacteriol J*, 2, 46-65.
- ALONSO, A. N. 2015. Hydrophobic nature and effects of culture conditions on biofilm formation by the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *AIMS MICROBIOLOGY*, 1, 1-10.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25, 3389-3402.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59, 143-169.
- AMORY, D., ROUXHET, P. & DUFOUR, J. 1988. Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 79-84.
- ARUL JOSE, P. & JEBAKUMAR, S. R. D. 2013. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Frontiers in microbiology*, 4, 240.
- ASTHER, M., BELLON-FONTAINE, M. N., CAPDEVILA, C. & CORRIEU, G. 1990. A thermodynamic model to predict *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 adhesion to various solid carriers in relation to lignin peroxidase production. *Biotechnology and bioengineering*, 35, 477-482.
- AVRIL, M. 1992. Tumeur de Buschke-Löwenstein. *La Presse Médicale*, 21, 811-815.
- BADJI, B., RIBA, A., MATHIEU, F., LEBRIHI, A. & SABAOU, N. 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 211-219.
- BAIZE, D., SABY, N., DESLAIS, W., BISPO, A. & FEIX, I. 2006. Analyses totales et pseudo-totales d'éléments en traces dans les sols. *Principaux résultats et enseignements d'une collecte nationale. Étude et Gestion des Sols*, 13, 181-200.
- BAKER, D. & OKAMI, Y. Opportunities for autecological studies of *Frankia*, a symbiotic actinomycete. Biology of actinomycetes. Proceedings of the Seventh International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 1988. 271-276.
- BALAGURUNATHAN, R., XU, L. & JANG, C. 1996. Diversity of soil actinomycetes from South India and South China. *Actinomycetes*, 7, 89-94.
- BALDACCI, E. 1962. Tendances actuelles de la classification des actinomycetes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*, 4, 633-646.
- BARAKATE, M., OUHDOUCH, Y., OUFDOU, K. & BEAULIEU, C. 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 49-54.
- BARBOUCHI, M., ABDELFATTAH, R., CHOKMANI, K., AISSA, N. B., LHISSOU, R. & EL HARTI, A. 2015. Soil salinity characterization using polarimetric InSAR coherence: Case studies in Tunisia and Morocco. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*, 8, 3823-3832.
- BARNES, L.-M., LO, M., ADAMS, M. & CHAMBERLAIN, A. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4543-4548.
- BASILIO, A., GONZALEZ, I., VICENTE, M., GORROCHATEGUI, J., CABELLO, A., GONZALEZ, A. & GENILLOU, O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of applied microbiology*, 95, 814-823.
- BAYOUDH, S., OTHMANE, A., BETTAIEB, F., BAKHROUF, A., OUADA, H. B. & PONSONNET, L. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering: C*, 26, 300-305.

- BECK, G., PUCHELLE, E., PLOTKOWSKI, C. & PESLIN, R. Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 1988. Elsevier, 655-664.
- BECKER, B., LECHEVALIER, M. & LECHEVALIER, H. 1965. Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 13, 236-243.
- BELLON-FONTAINE, M.-N. & CERF, O. 1991. Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces: facteurs influant sur l'adhésion. *Industries alimentaires et agricoles*, 108, 13-17.
- BELLON-FONTAINE, M.-N., MOZES, N., VAN DER MEI, H., SJOLLEMA, J., CERF, O., ROUXHET, P. & BUSSCHER, H. 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, 17, 93.
- BELLON-FONTAINE, M.-N., RAULT, J. & VAN OSS, C. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7, 47-53.
- BELYAGOUBI, L. 2014. *Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens*.
- BERDY, J. 2005. Bioactive Metabolites, a personal view. *J Antibot*, 58, 1-26.
- BIGNELL, D., OSKARSSON, H. & ANDERSON, J. 1981. Association of actinomycetes with soil-feeding termites: a novel symbiotic relationship? *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt.: Supplemente*.
- BOKS, N. P., NORDE, W., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 2008. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology*, 154, 3122-3133.
- BOONAERT, C. J., DUFRÈNE, Y. F., DERCLAYE, S. R. & ROUXHET, P. G. 2001. Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 22, 171-182.
- BOS, R. & BUSSCHER, H. J. 1999. Role of acid–base interactions on the adhesion of oral streptococci and actinomyces to hexadecane and chloroform—influence of divalent cations and comparison between free energies of partitioning and free energies obtained by extended DLVO analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 169-177.
- BOS, R., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23, 179-230.
- BOUDJELLA, H., BOUTI, K., ZITOUNI, A., MATHIEU, F., LEBRIHI, A. & SABAOU, N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161, 288-298.
- BOUDJELLA, H., BOUTI, K., ZITOUNI, A., MATHIEU, F., LEBRIHI, A. & SABAOU, N. 2007. Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *Journal of applied microbiology*, 103, 228-236.
- BOUGHACHICHE, F., REGHIOUA, S., OULMI, L., ZERIZER, H., KITOUNI, M., BOUDEMAGH, A. & BOULAHROUF, A. 2005. Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Aïn Mlila. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 5-10.
- BOULANÉ-PETERMANN, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10, 275-300.
- BOULANGE-PETERMANN, L., BAROUX, B. & BELLON-FONTAINE, M.-N. 1993. The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *Journal of adhesion science and technology*, 7, 221-230.
- BOULANGÉ-PETERMANN, L., RAULT, J. & BELLON-FONTAINE, M. N. 1997. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling*, 11, 201-216.

- BRETON, A., THEILLEUX, J., SANGLIER, J. & VIOBIS, G. 1989. Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *Larpen JP, et Sanglier JJ (eds) Biotechnologies des antibiotiques. Masson, Paris, 33-70.*
- BRIANDET, R., LERICHE, V., CARPENTIER, B. & BELLON-FONTAINE, M.-N. 1999a. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection, 62, 994-998.*
- BRIANDET, R., MEYLHEUC, T., MAHER, C. & BELLON-FONTAINE, M. N. 1999b. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and environmental microbiology, 65, 5328-5333.*
- BROSIUS, J., DULL, T. J., SLEETER, D. D. & NOLLER, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology, 148, 107-127.*
- BRUGNONI, L., CUBITTO, M. & LOZANO, J. 2011. Biofilm formation under laminar flow conditions of yeast isolated from an apple juice processing plant. *Journal of food process engineering, 34, 49-66.*
- BRUINSMA, G., VAN DER MEI, H. & BUSSCHER, H. 2001. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials, 22, 3217-3224.*
- BRYSSINE, G. 1961. Etude sur l'évolution des sols des Beni-Amir et de leur salure sous l'effet des irrigations. *Cah. Rech. Agron.(Rabat), 12, 71-109.*
- BUSSCHER, H., BELLON-FONTAINE, M. N., MOZES, N., VAN DER-MEI, H., SJOLLEMA, J., CERF, O. & ROUXHET, P. 1990. Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallel plate flow cell. *biofouling, 2, 55-63.*
- BUSSCHER, H., GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. & VAN DER MEI, H. 1997. Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials, 34, 201-209.*
- BUSSCHER, H. J., NORDE, W. & VAN DER MEI, H. C. 2008. Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces. *Appl. Environ. Microbiol., 74, 2559-2564.*
- BUSSCHER, H. J., WEERKAMP, A. H., VAN DER MEI, H. C., VAN PELT, A., DE JONG, H. P. & ARENDS, J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol., 48, 980-983.*
- CAI, Y., XUE, Q., CHEN, Z. & ZHANG, R. 2009. Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai lake water and lakeside saline soil. *J. Sustain. Develop, 2, 107-110.*
- CAPPELLO, S., ATTARDO, A., WU, X., IWASATO, T., ITOHARA, S., WILSCH-BRÄUNINGER, M., EILKEN, H. M., RIEGER, M. A., SCHROEDER, T. T. & HUTTNER, W. B. 2006. The Rho-GTPase *cdc42* regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nature neuroscience, 9, 1099.*
- CARPENTER, J. F. & CROWE, J. H. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry, 28, 3916-3922.*
- CHARGAFF, E., VISCHER, E., DONIGER, R., GREEN, C. & MISANI, F. 1949. The composition of the desoxyribose nucleic acids of thymus and spleen. *Journal of Biological Chemistry, 177, 405-416.*
- CHATER, K. 1999. David Hopwood and the emergence of *Streptomyces* genetics. *International Microbiology, 2, 61-68.*
- CHRISTENSEN, B. & CHARACKLIS, W. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. *Biofilms, 93, 130.*
- CHUN, J., BAE, K. S., MOON, E. Y., JUNG, S.-O., LEE, H. K. & KIM, S.-J. 2000. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 50, 1909-1913.*

- COLMEGNA, I., RODRIGUEZ-BARRADAS, M., YOUNG, E. J., RAUCH, R. & CLARRIDGE, J. 2003. Disseminated Actinomyces meyeri infection resembling lung cancer with brain metastases. *The American journal of the medical sciences*, 326, 152-155.
- COMPÈRE, C., BELLON-FONTAINE, M. N., BERTRAND, P., COSTA, D., MARCUS, P., POLEUNIS, C., PRADIER, C. M., RONDOT, B. & WALLS, M. 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*, 17, 129-145.
- COOK, A. E. & MEYERS, P. R. 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53, 1907-1915.
- CORPE, W. A. 1970. Attachment of marine bacteria to solid surfaces. *Adhesion in biological systems*, 73-87.
- COWAN, M., VAN DER MEI, H., ROUXHET, P. & BUSSCHER, H. 1992. Physico-chemical and structural properties of the surfaces of Peptostreptococcus micros and Streptococcus mitis as compared to those of mutans streptococci, Streptococcus sanguis and Streptococcus salivarius. *Microbiology*, 138, 2707-2714.
- CUPERUS, P. L., VAN DER MEI, H. C., REID, G., BRUCE, A. W., KHOURY, A. H., ROUXHET, P. G. & BUSSCHER, H. J. 1993. Physicochemical surface characteristics of urogenital and poultry lactobacilli. *Journal of colloid and interface science*, 156, 319-324.
- DE CARVALHO, C. C. & DA FONSECA, M. M. R. 2007. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *BioTechniques*, 42, 616-620.
- DEMAIN, A. L. & DIJKHUIZEN, L. 2006. Ecology and industrial microbiology. Elsevier Current Trends.
- DENGIS, P. B. & ROUXHET, P. G. 1997. Surface properties of top-and bottom-fermenting yeast. *Yeast*, 13, 931-943.
- DERJAGUIN, B. & LANDAU, L. 1941. The theory of stability of highly charged lyophobic sols and coalescence of highly charged particles in electrolyte solutions. *Acta Physicochim. URSS*, 14, 58.
- DICKSON, J. S. & KOOHMARAIE, M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 55, 832-836.
- DIETZ, A. & MATHEWS, J. 1971. Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups. *Applied microbiology*, 21, 527-533.
- DINON, E. & GERSTMANS, A. 2008. L'influence du pH sur l'assimilation des éléments nutritifs du sol par les plantes et sur la variété des plantes. *Université de Liège, Printemps Des Sciences*.
- DOMMERMUES, Y. & MANGENOT, F. 1970. Ecologie microbienne du sol. Masson.
- DONADIO, S., SOSIO, M. & LANCINI, G. 2002. Impact of the first Streptomyces genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Applied microbiology and biotechnology*, 60, 377-380.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15, 167-193.
- DUFRENE, Y. F. 2002. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of bacteriology*, 184, 5205-5213.
- EL ABED, S., HAMADI, F., LATRACHE, H., IRAQUI, H. M. & IBNSOUDA, K. S. 2010. Adhesion of Aspergillus niger and Penicillium expansum spores on Fez cedar wood substrata. *Annals of microbiology*, 60, 377-382.
- EL, A. G., LATRACHE, H., HAMADI, F., EL, M. L., EL, A. B., HAKKOU, A. & BOURLIOUX, P. 2002. Influence of surface cell structures on physicochemical properties of Escherichia coli. *The new microbiologica*, 25, 173-178.
- EL ALAOU, A. 2007. Fertilisation minérale des cultures. Les éléments minéraux secondaires et-oligo éléments. *Bull Mens Inf PNTTA*, 156, 1.
- EL ANTAKI, A. & EL BOUSTANI, M. 1991. [Sheet drainage and management in the irrigated perimeter of Tadla [Morocco]]. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Veterinaires*.

- EL HARTI, A., LHISSOU, R., CHOKMANI, K., OUZEMOU, J.-E., HASSOUNA, M., BACHAOUI, E. M. & EL GHMARI, A. 2016. Spatiotemporal monitoring of soil salinization in irrigated Tadla Plain (Morocco) using satellite spectral indices. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 50, 64-73.
- FACEY, P. D., SEVCIKOVA, B., NOVAKOVA, R., HITCHINGS, M. D., CRACK, J. C., KORMANEC, J., DYSON, P. J. & DEL SOL, R. 2011. The *dpsA* gene of *Streptomyces coelicolor*: induction of expression from a single promoter in response to environmental stress or during development. *PLoS One*, 6, e25593.
- FAO 2002. The salt of the earth: hazardous for food production, World Food Summit. Five years later. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 10-13 June, Rome, Italy. <http://www.fao.org/worldfoodsummit/focus1.htm>.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- FENG, W., SWIFT, S. & SINGHAL, N. 2013. Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 43-50.
- FINANCE, C., OUHDOUCH, Y., JAQUES, A. & BONALY, R. 1985. Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycétales isolées à partir des milieux naturels. *Ann. Biol. Clin.(Paris)*, 43, 652.
- FLÄRDH, K. & BUTTNER, M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 36.
- FLETCHER, E. L., WEISSMAN, B. A., EFRON, N., FLEISZIG, S. M., CURCIO, A. J. & BRENNAN, N. A. 1993. The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Current eye research*, 12, 1067-1071.
- FLETCHER, M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170, 2027-2030.
- FRIEDMAN, S. L. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 2247-2250.
- GABORIAUD, F., DAGUE, E., BAILET, S., JORAND, F., DUVAL, J. & THOMAS, F. 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. *colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52, 108-116.
- GALINSKI, E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in microbial physiology*. Elsevier.
- GALLARDO-MORENO, A., GONZALEZ-MARTIN, M., BRUQUE, J., PEREZ-GIRALDO, C. & GOMEZ-GARCIA, A. 2002. Temperature influence on the physicochemical surface properties and adhesion behaviour of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Journal of adhesion science and technology*, 16, 1215-1223.
- GALLARDO-MORENO, A., GONZÁLEZ-MARTÍN, M., PEREZ-GIRALDO, C., BRUQUE, J. & GOMEZ-GARCIA, A. 2004. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of colloid and interface science*, 271, 351-358.
- GARRITY, G. M., BELL, J. A. & LILBURN, T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- GAUCHER, G. & BURDIN, S. 1974. *Géologie, géomorphologie et hydrologie des terrains salés: contribution aux techniques d'amélioration des terrains salés*, Presses universitaires de France.
- GAVÍN, R., MERINO, S., ALTARRIBA, M., CANALS, R., SHAW, J. G. & TOMÁS, J. M. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS microbiology letters*, 224, 77-83.
- GAZENKO, S., REPONEN, T., GRINSHPUN, S. & WILLEKE, K. 1998. Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Applied and environmental microbiology*, 64, 4410-4415.



- GÓMEZ-SUÁREZ, C., BRUINSMA, G. M., RAKHORST, G., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 2002. Hydrophobicity of peritoneal tissues in the rat. *Journal of colloid and interface science*, 253, 470-471.
- GOODFELLOW, M. & WILLIAMS, S. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 37, 189-216.
- GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the Actinomycetales. Symp Ser Soc Appl Bacteriol, 1973.
- GUILLEMOT, G., VACA-MEDINA, G., MARTIN-YKEN, H., VERNHET, A., SCHMITZ, P. & MERCIER-BONIN, M. 2006. Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 126-135.
- GUPTA, R., LANTER, J. M. & WOESE, C. R. 1983. Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science*, 221, 656-659.
- GUTIERREZ, C. M., KAMEKURA, M., HOLMES, M. L., DYALL-SMITH, M. L. & VENTOSA, A. 2002. Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ("H. alicantei") strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentensis* sp. nov. *Extremophiles*, 6, 479-483.
- HACENE, H., SABAOU, N., BOUNAGA, N. & LEFEBVRE, G. 1994. Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbios*, 79, 81-85.
- HAMADI, F. 2005. Effet des conditions environnementales sur les propriétés physico-chimiques de la surface des bactéries et sur leur adhésion au verre: Rôle des différentes propriétés physico-chimiques dans le phénomène d'adhésion.
- HAMADI, F. & LATRACHE, H. 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 65, 134-139.
- HAMADI, F., LATRACHE, H., EL GHMARI, A., ELLOUALI, M., MABRROUKI, M. & KOUIDER, N. 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *ANNALS OF MICROBIOLOGY*, 54, 213-226.
- HAMADI, F., LATRACHE, H., ZAHIR, H., EL ABED, S., ELLOUALI, M. & SAAD, I. K. 2012. The relation between the surface chemical composition of *Escherichia coli* and their electron donor/electron acceptor (acid-base) properties. *Res J Microbiol*, 7, 32-40.
- HAMADI, F., LATRACHE, H., ZEKRAOUI, M., ELLOUALI, M. & BENGOURRAM, J. 2009. Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1302-1305.
- HARKES, G., VAN DER MEI, H., ROUXHET, P., DANKERT, J., BUSSCHER, H. & FEIJEN, J. 1992. Physicochemical characterization of *Escherichia coli*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 20, 17-32.
- HAYAKAWA, M., ISHIZAWA, K. & NONOMURA, H. 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.*, 66, 367-373.
- HENIS, Y. 1986. Soil microorganisms, soil organic matter and soil fertility. *The role of organic matter in modern agriculture*. Springer.
- HERBEN, P. F., MOZES, N. & ROUXHET, P. G. 1990. Variation of the surface properties of *Bacillus licheniformis* according to age, temperature and aeration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1033, 184-188.
- HERMESSE, M., DEREPPE, C., BARTHOLOME, Y. & ROUXHET, P. 1988. Immobilization of *Acetobacter acetii* by adhesion. *Canadian journal of microbiology*, 34, 638-644.
- HIEMENZ, P. C. & RAJAGOPALAN, R. 1997. *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*, CRC press.
- HILALI, L., KHATTABI, A., NSSARLAH, N., MALKI, A. & FINANCE, C. 2002. Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques a partir du milieu naturel marocain. *Rev. biol. Biotechnol*, 2, 49-53.

- HILBERT, L. R., BAGGE-RAVN, D., KOLD, J. & GRAM, L. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International biodeterioration & biodegradation*, 52, 175-185.
- HOLT, R. A. & LAWTON, J. 1994. The ecological consequences of shared natural enemies. *Annual review of Ecology and Systematics*, 25, 495-520.
- HOPWOOD, D. & MERRICK, M. 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriological reviews*, 41, 595.
- HORINOUCI, S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci*, 7, 2045-2057.
- HUANG, G.-B., ZHU, Q.-Y. & SIEW, C.-K. 2004. Extreme learning machine: a new learning scheme of feedforward neural networks. *Neural networks*, 2, 985-990.
- HUSMARK, U. & RÖNNER, U. 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 557-562.
- HUSMARK, U. & RÖNNER, U. 1993. Adhesion of *Bacillus cereus* spores to different solid surfaces: cleaned or conditioned with various food agents. *Biofouling*, 7, 57-65.
- HUYSMAN, F. & VERSTRAETE, W. 1993. Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 83-90.
- IBNSOUDA, K. S., LATRACHE, H. & BOUTAHARI, S. 2012. Theoretical effect of cedar wood surface roughness on the adhesion of conidia from *Penicillium expansum*. *Annals of microbiology*, 62, 1361-1366.
- ILIĆ, S. B., KONSTANTINOVIĆ, S. S. & TODOROVIĆ, Z. B. 2005. UV/VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Facta universitatis series: Med Biol*, 12, 44-46.
- ISIK, K., GENCBAY, T., ÖZDEMİR-KOCAK, F. & CIL, E. 2014. Molecular identification of different actinomycetes isolated from East Black Sea region plateau soil by 16S rDNA gene sequencing. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 878-887.
- JANA, T., SRIVASTAVA, A., CSERY, K. & ARORA, D. 1999. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Canadian journal of microbiology*, 46, 28-37.
- JEFFREY, L. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7.
- JEFFS, L. B., XAVIER, I. J., MATAI, R. E. & KHACHATOURIANS, G. G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the general *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 936-948.
- JIANG, P., BERTONE, J., HWANG, K. & COLVIN, V. 1999. Single-crystal colloidal multilayers of controlled thickness. *Chemistry of Materials*, 11, 2132-2140.
- JUCKER, B. A., HARMS, H. & ZEHNDER, A. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of bacteriology*, 178, 5472-5479.
- KALYANI, N. T. & DHOBLE, S. 2012. Organic light emitting diodes: Energy saving lighting technology— A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2696-2723.
- KANDLER, O. 1970. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20, 491-507.
- KAUTOLA, H. & ALLEN, D. 1994. Surface tension measurements on filamentous broths. *Biotechnology techniques*, 8, 83-86.
- KEESOM, W. 1921. Van der Waals attractive force. *Physikalische Zeitschrift*, 22, 129-141.
- KERBAB, S. 2018. *Les Actinomycètes d'un sol salé: rôle des osmoprotecteurs naturels*.

- KIM, B., SAHIN, N., MINNIKIN, D. E., ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J., MORDARSKI, M. & GOODFELLOW, M. 1999. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 7-17.
- KIM, B. S., MOON, S. S. & HWANG, B. K. 2000. Structure Elucidation and Antifungal Activity of an Anthracycline Antibiotic, Daunomycin, Isolated from *Actinomyces roseola*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 1875-1881.
- KIM, S. B., SEONG, C. N., JEON, S. J., BAE, K. S. & GOODFELLOW, M. 2004. Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54, 211-214.
- KIS-PAPO, T., OREN, A., WASSER, S. & NEVO, E. 2003. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microbial Ecology*, 45, 183-190.
- KITOUNI, M., BOUDEMAGH, A., OULMI, L., REGHIOUA, S., BOUGHACHICHE, F., ZERIZER, H., HAMDIKEN, H., COUBLE, A., MOUNIEE, D. & BOULAHROUF, A. 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 45-51.
- KLEIN, M., SADIKI, A. & JANICKA, J. 2003. Investigation of the influence of the Reynolds number on a plane jet using direct numerical simulation. *International journal of heat and fluid flow*, 24, 785-794.
- KLUEPFEL, D., SHARECK, F., MONDOU, F. & MOROSOLI, R. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 230-234.
- KRASIL'NIKOV, N. A. 1958. Mikroorganizmy pochvy i vysshie rasteniia.
- LABEDA, D. P. 1992. DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene*, 115, 249-253.
- LABEDA, D. P. & KROPPESTEDT, R. M. 2000. Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 331-336.
- LAKSHMIPATHY, D. T. & KRISHNAN, K. 2009. A report on the antidermatophytic activity of actinomycetes. *Int J Integr Biol*, 6, 132-136.
- LANGE, L., BREINHOLT, J., RASMUSSEN, F. W. & NIELSEN, R. I. 1993. Microbial fungicides—the natural choice. *Pesticide science*, 39, 155-160.
- LARPENT, J.-P. 2000. *Introduction à la nouvelle classification bactérienne: les principaux groupes bactériens*, Tec & Doc.
- LATRACHE, H. 1993. *Les propriétés de la surface d'Escherichia coli uropathogène et leur variation après culture en présence de concentrations subinhibitrices de nitroxoline*. Paris 11.
- LATRACHE, H. 2001. Étude physico-chimique de la surface des cellules d'Escherichia Coli.: Relation entre la composition chimique de la surface des cellules et les propriétés physico-chimiques d'E. coli.
- LATRACHE, H., EL, G., KARROUA, M., HAKKOU, A., AIT, M., EL, B. & BOURLIOUX, P. 2002. Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *The new microbiologica*, 25, 75-82.
- LATRACHE, H., MOZES, N., PELLETIER, C. & BOURLIOUX, P. 1994. Chemical and physicochemical properties of *Escherichia coli*: variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2, 47-56.
- LE MINOR, L., SANSONETTI, P., RICHARD, C., GRIMONT, F., MOLLARET, H. & BERCOVIER, H. 1989. Entérobactéries. *Bactériologie médicale. Paris: Flammarion*, 389-472.
- LECHEVALIER, H. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. *The prokaryotes*, 1015-1922.
- LECHEVALIER, M. & LECHEVALIER, H. 1986. Biology of actinomycetes not belonging to the genus *Streptomyces*. *Biotechnology Series[BIOTECHNOL. SER.]. 1986*.
- LECHEVALIER, M. P. 1968. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 71, 934-944.

- LECHEVALIER, M. P. & LECHEVALIER, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20, 435-443.
- LEENAARS, A. A. 1988. *Suicide notes: Predictive clues and patterns*, New York: Human Sciences Press.
- LEMRISS, S., LAURENT, F., COUBLE, A., CASOLI, E., LANCELIN, J., SAINTPIERRE-BONACCIO, D., RIFAI, S., FASSOUANE, A. & BOIRON, P. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian journal of microbiology*, 49, 669-674.
- LHISSOU, R., EL HARTI, A. & CHOKMANI, K. 2014. Mapping soil salinity in irrigated land using optical remote sensing data. *Eurasian Journal of Soil Science*, 3, 82.
- LI, W.-J., KROPPESTEDT, R. M., WANG, D., TANG, S.-K., LEE, J.-C., PARK, D.-J., KIM, C.-J., XU, L.-H. & JIANG, C.-L. 2006. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56, 1089-1096.
- LI, Z., KAWAMURA, Y., SHIDA, O., YAMAGATA, S., DEGUCHI, T. & EZAKI, T. 2002. *Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 1205-1209.
- LIESKE, R. 1921. *Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Actinomyceten)*, Borntraeger.
- LJUNGH, Å. & WADSTRÖM, T. 1984. Fimbriation in relation to hydrophobicity of bacteria in urinary tract infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 3, 568-570.
- LOQMAN, S., BARKA, E. A., CLÉMENT, C. & OUHDOUCH, Y. 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 81-91.
- LYONS, A. & PRIDHAM, T. 1971. *Streptomyces torulosus* sp. n., an unusual knobby-spored taxon. *Applied microbiology*, 22, 190-193.
- MAATAOUI, H., BARKAI, H., SADIKI, M., HAGGOU, A., IBNSOUDA KORAICHI, S. & ELABED, S. 2014. Physicochemical characterization of actinomycetes isolated from decayed cedar wood: contact angle measurement. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 28, 2046-2053.
- MAGNUSSON, D. & ENDLER, N. S. 1977. *Personality at the crossroads: Current issues in interactional psychology*, Lawrence Erlbaum Associates; New York: distributed by the Halsted Press ....
- MAJTAN, V. & MAJTANOVA, L. 2000. Effect of quaternary ammonium salts and amine oxides on the surface hydrophobicity of *Enterobacter cloacae*. *CHEMICAL PAPERS-SLOVAK ACADEMY OF SCIENCES*, 54, 49-52.
- MARCHAL, N., BOURDON, J.-L. & RICHARD, C. 1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.
- MARIAT, F. & M., S. 1990. Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. *Le Minor, Edition Médecine-Science. Flammarion. France*.
- MCCARTHY, A. J. & BRODA, P. 1984. Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against [<sup>14</sup>C] lignin-labelled wheat lignocellulose. *Microbiology*, 130, 2905-2913.
- MCELDOWNEY, S. & FLETCHER, M. 1986. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 460-465.
- MCKINNEY, J. C. & GAMMIE, C. F. 2004. A measurement of the electromagnetic luminosity of a Kerr black hole. *The Astrophysical Journal*, 611, 977.
- MESSAOUDI, S., AZIBANI, F., DELCAYRE, C. & JAISSE, F. 2012. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Molecular and cellular endocrinology*, 350, 266-272.
- MEURY, J. 1988. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*, 149, 232-239.
- MISSANTE, G. 1963. Les sols du Tadla et leur répartition schématique au 1/500 000. *Al Awamia*, 9, 155-190.

- MOREIRA, C. G., CARNEIRO, S. M., NATARO, J. P., TRABULSI, L. R. & ELIAS, W. P. 2003. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 226, 79-85.
- MOZES, N., AMORY, D., LEONARD, A. & ROUXHET, P. 1989. Surface properties of microbial cells and their role in adhesion and flocculation. *Colloids and surfaces*, 42, 313-329.
- MOZES, N., LÉONARD, A. & ROUXHET, P. G. 1988. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 945, 324-334.
- MOZES, N., MARCHAL, F., HERMESSE, M., VAN HAECHE, J., REULIAUX, L., LEONARD, A. & ROUXHET, P. 1987. Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 439-450.
- NETT, J. & ANDES, D. 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. *Current opinion in microbiology*, 9, 340-345.
- NEU, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*, 60, 151.
- NEUMANN, A., GOOD, R., HOPE, C. & SEJPAL, M. 1974. An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *Journal of colloid and interface science*, 49, 291-304.
- NORMAND, D., LOMPRES, L. & CORNAGGIA, C. 1992. Laser-induced molecular alignment probed by a double-pulse experiment. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, 25, L497.
- O'DONNELL, A. 1985. Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, 131-144.
- O'DONNELL, A., MINNIKIN, D., GOODFELLOW, M. & PARLETT, J. 1982. The analysis of actinomycete wall amino acids by gas chromatography. *FEMS Microbiology Letters*, 15, 75E-78E.
- OKAMI, Y. & OKAZAKI, T. 1978. Actinomycetes in marine environments. *Nocardia and streptomycetes*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany, 145-151.
- ONG, W. & MACKIE, K. 1999. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in the primate spinal cord. *Journal of neurocytology*, 28, 39-45.
- OREN, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56-63.
- ORSKOV, J. 2012. *Investigations into the Morphology of the Ray Fungi*, Levin And Munksgaard Publishers.; Copenhagen.
- OSKAY, A. M., ÜSAME, T. & CEM, A. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 3, 441-446.
- OUHDOUCH, Y., BARAKATE, M. & FINANCE, C. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 37, 69-74.
- PALMER, J., FLINT, S. & BROOKS, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34, 577-588.
- PAMBOUKIAN, C. R., GUIMARÃES, L. M. & FACCIOTTI, M. C. R. 2002. Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 17-21.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. & BELLON-FONTAINE, M.-N. 1997a. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1725-1731.
- PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. & BELLON-FONTAINE, M.-N. 1997b. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and environmental microbiology*, 63, 1725-1731.
- PEREIRA, S. & OU, Z. 2000. SF Pereira, ZY Ou, and HJ Kimble, *Phys. Rev. A* 62, 042311 (2000). *Phys. Rev. A*, 62, 042311.

- PETROVIC~, U., GUNDE-CIMERMAN, N. & PLEMENITAS~, A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular microbiology*, 45, 665-672.
- PIETTE, J. & IDZIAK, E. S. 1992. A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat. *Applied and environmental microbiology*, 58, 2783-2791.
- POCHON, J. & TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol.
- POLONENKO, D., MAYFIELD, C. & DUMBROFF, E. 1986. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. *Plant and soil*, 92, 417-425.
- POMPERMAYER, D. M. & GAYLARDE, C. C. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17, 361-365.
- POORTINGA, A. T., BOS, R., NORDE, W. & BUSSCHER, H. J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface science reports*, 47, 1-32.
- POPHAM, A. E. 1931. *Italian Drawings Exhibited at the Royal Academy, Burlington House, London, 1930*, Oxford University Press.
- PRESCOTT, C. E. 2010. Litter decomposition: what controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils? *Biogeochemistry*, 101, 133-149.
- PROVOST, F., LAURENT, F., UZCATEGUI, L. & BOIRON, P. 1997. Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *Journal of clinical microbiology*, 35, 1157-1160.
- QIN, Y., DRUZHININA, I. S., PAN, X. & YUAN, Z. 2016. Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology advances*, 34, 1245-1259.
- RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N., KROPPESTEDT, R. M. & STACKEBRANDT, E. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 1088-1092.
- RAMAGE, G., WALLE, K. V., WICKES, B. L. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2001. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 18, 163-170.
- RANGASWAMI, H., BULBULE, A. & KUNDU, G. C. 2004. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IKB $\alpha$  kinase-dependent nuclear factor  $\kappa$ B-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 38921-38935.
- REICHL, U., KING, R. & GILLES, E. D. 1992. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 39, 164-170.
- REPONEN, T., GAZENKO, S., GRINSHPUN, S., WILLEKE, K. & COLE, E. 1998. Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and environmental microbiology*, 64, 3807-3812.
- RICHARDS, L. A. 1969. *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*, United States Department Of Agriculture; Washington.
- RIJNAARTS, H. H., NORDE, W., BOUWER, E. J., LYKLEMA, J. & ZEHNDER, A. J. 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3255-3265.
- RIJNAARTS, H. H., NORDE, W., BOUWER, E. J., LYKLEMA, J. & ZEHNDER, A. J. 1996. Bacterial deposition in porous media: effects of cell-coating, substratum hydrophobicity, and electrolyte concentration. *Environmental science & technology*, 30, 2877-2883.
- RIJNAARTS, H. H., NORDE, W., LYKLEMA, J. & ZEHNDER, A. J. 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 191-197.
- RIJNAARTS, H. H., NORDE, W., LYKLEMA, J. & ZEHNDER, A. J. 1999. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 179-195.
- ROBERTS, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 1, 5.

- ROSE, A., MANIGUET, S., MATHEW, R. J., SLATER, C., YAO, J. & RUSSELL, A. E. 2003. Hydride phase formation in carbon supported palladium nanoparticle electrodes investigated using in situ EXAFS and XRD. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5, 3220-3225.
- ROSENBERG, M. 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 22, 289-295.
- ROSENBERG, M. & DOYLE, R. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance.
- ROSENBERG, M. & KJELLEBERG, S. 1986. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Advances in microbial ecology*. Springer.
- ROTH, W. G., LECKIE, M. P. & DIETZLER, D. N. 1985. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 126, 434-441.
- ROUXHET, P. & MOZES, N. 1990. Physical chemistry of the interface between attached microorganisms and their support. *Water science and technology*, 22, 1-16.
- ROUXHET, P., MOZES, N., DENGIS, P., DUFRÊNE, Y., GERIN, P. A. & GENET, M. 1994. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2, 347-369.
- RUBIO, C. 2002. *Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention*. Université Paris 6.
- SABAOU, N., BOUDJELLA, H., BENNADJI, A., MOSTEFAOUI, A., ZITOUNI, A., LAMARI, L., BENNADJI, H., LEFÈBVRE, G. & GERMAIN, P. 1998. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 9, 147-153.
- SACRAMENTO, D. R., COELHO, R. R. R., WIGG, M. D., LINHARES, L. F. D. T. L., DOS SANTOS, M. G. M., SEMÊDO, L. T. D. A. S. & DA SILVA, A. J. R. 2004. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 225-229.
- SAFFROY, S. 2006. *Etude du métabolisme carboné chez Streptomyces pristinaespiralis*. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- ŞAHİN, N. & UĞUR, A. 2003. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turkish Journal of Biology*, 27, 79-84.
- SANASAM, S. & NINGIHOJAM, D. S. 2010. Screening of Local Actinomycetes Isolates in Man i pur for Antı candidal Activity. *Asian Journal of Biotechnology*, 2, 139-145.
- SANGLIER, J. & TRUJILL, M. 1997. Substances bioactives produites par les actinomycètes, stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, 12, 269-276.
- SARMA, S. D. 2001. Spintronics: A new class of device based on electron spin, rather than on charge, may yield the next generation of microelectronics. *American Scientist*, 89, 516-523.
- SCHEUERMAN, T. R., CAMPER, A. K. & HAMILTON, M. A. 1998. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of colloid and interface science*, 208, 23-33.
- SEALE, R., FLINT, S., MCQUILLAN, A. & BREMER, P. 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 731-737.
- SHARMA, P. & RAO, K. H. 2002. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Advances in colloid and interface science*, 98, 341-463.
- SHIRLING, E. T. & GOTTLIEB, D. 1966a. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16, 313-340.
- SHIRLING, E. T. & GOTTLIEB, D. 1966b. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16, 313-340.
- SINENSKY, M. 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, 522-525.

- SMAOUI, S. 2010. *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés.*
- SOLINGEN, P., MEIJER, D., KLEIJ, W. A., BARNETT, C., BOLLE, R., POWER, S. D. & JONES, B. E. 2001. Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. *Extremophiles*, 5, 333-341.
- STACKEBRANDT, E., RAINEY, F. A. & WARD-RAINEY, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 479-491.
- STANLEY, P. M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian journal of microbiology*, 29, 1493-1499.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28, 2731-2739.
- TAMURA, S., PARK, Y., TORIYAMA, M. & OKABE, M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *Journal of fermentation and bioengineering*, 83, 523-528.
- TANG, S.-K., WANG, Y., LOU, K., MAO, P.-H., XU, L.-H., JIANG, C.-L., KIM, C.-J. & LI, W.-J. 2009. *Kocuria halotolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from a saline soil in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 1316-1320.
- THEILLEUX, J., LEVEAU, J. & BOUIX, M. 1993. The actinomycetes. *Industrial Microbiology: Microorganisms of Industrial Interest*. Tec & Doc Lavoisier Paris, France.
- TORTORANO, A., CABRINI, E. & VIVIANI, M. 1979. Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med*, 8, 69-74.
- TREJO-ESTRADA, S., PASZCZYNSKI, A. & CRAWFORD, D. 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 81-90.
- UHLÍŘOVÁ, E., ELHOTTOVA, D., TŘISKA, J. & ŠANTRŮČKOVÁ, H. 2005. Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia microbiologica*, 50, 161.
- VAN DER MEI, H., BOS, R. & BUSSCHER, H. 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 11, 213-221.
- VAN DER MEI, H., DE VRIES, J. & BUSSCHER, H. 1993a. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4305-4312.
- VAN DER MEI, H., NAUMANN, D. & BUSSCHER, H. 1993b. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Archives of oral biology*, 38, 1013-1019.
- VAN DER WAL, A., MINOR, M., NORDE, W., ZEHNDER, A. J. & LYKLEMA, J. 1997. Electrokinetic potential of bacterial cells. *Langmuir*, 13, 165-171.
- VAN KEULEN, G., JONKERS, H. M., CLAESSEN, D., DIJKHUIZEN, L. & WÖSTEN, H. A. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 185, 1455-1458.
- VAN LOOSDRECHT, M., NOREE, W. & ZEHNDER, A. Influence of cell surface characteristics on bacterial adhesion to solid supports. Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnology, 1987. 227-227.
- VAN LOOSDRECHT, M. C., LYKLEMA, J., NORDE, W. & ZEHNDER, A. J. 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology*, 17, 1-15.
- VAN OSS, C. 1993. Acid—base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 78, 1-49.
- VAN OSS, C. 1994. Interfacial forces in aqueous media. Marcel Dekker, New York. *Interfacial forces in aqueous media*. Marcel Dekker, New York., -.
- VAN OSS, C., GOOD, R. & CHAUDHURY, M. 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of colloid and Interface Science*, 111, 378-390.



- VAN OSS, C., JU, L., CHAUDHURY, M. & GOOD, R. 1989. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 128, 313-319.
- VAN OSS, C. J. 1996. *Forces interfaciales en milieux aqueux*, Masson, SA.
- VAN OSS, C. J., CHAUDHURY, M. K. & GOOD, R. J. 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88, 927-941.
- VAN PELT, A., WEERKAMP, A., UYEN, M. H., BUSSCHER, H. J., DE JONG, H. P. & ARENDS, J. 1985. Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1270-1275.
- VANHAECKE, E., REMON, J., MOORS, M., RAES, F., DE RUDDER, D. & VAN PETEGHEM, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 788-795.
- VARGHESE, R., NISHAMOL, S., SUCHITHRA, R., JYOTHY, S. & HATHA, A. M. 2012. Distribution and antibacterial activity of actinomycetes from Shola soils of tropical montane forest in Kerala, South India. *Journal of Environment*, 1, 93-99.
- VELHO-PEREIRA, S. & KAMAT, N. M. 2010. Digital image analysis of actinomycetes colonies as a potential aid for rapid taxonomic identification.
- VENTURA, M., CANCHAYA, C., TAUCH, A., CHANDRA, G., FITZGERALD, G. F., CHATER, K. F. & VAN SINDEREN, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71, 495-548.
- VERGNAULT, H. 2004. *Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé*. Toulouse, INSA.
- VERWEY, E. J. W. 1962. Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer.
- VOGLER, E. A. 1998. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 74, 69-117.
- WAKSMAN, S. A. & HENRICI, A. T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 46, 337.
- WANG, Z. L. & SONG, J. 2006. Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays. *Science*, 312, 242-246.
- WARD, S. 1974. Consumer socialization. *Journal of consumer research*, 1, 1-14.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173, 697-703.
- WILLIAMS, S. & VICKERS, J. 1988. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*, 88, 265-270.
- WOLF, D. C. & WAGNER, G. H. 2005. Carbon transformations and soil organic matter formation. *Principles and applications of soil microbiology*, 2, 285-332.
- WOO, J.-H., KITAMURA, E., MYOUGA, H. & KAMEI, Y. 2002. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2666-2675.
- WOO, P., LAU, S., TENG, J., TSE, H. & YUEN, K.-Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 908-934.
- YANCEY, P. H., CLARK, M. E., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMERO, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-1222.
- ZAHIR 2017. Caractérisation physico-chimique de la surface d'actinomycètes isolés de la région de Beni Mellal et étude de leur pouvoir d'adhérence et antiadhésif contre *Escherichia coli*.
- ZAHIR, H., HAMADI, F., MALLOUKI, B., IMZILN, H. & LATRACHE, H. 2016. Effect of salinity on the adhesive power actinomycetes in soil. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7, 3327-3333.
- ZANANE, C., LATRACHE, H., ELFAZAZI, K., ZAHIR, H. & ELLOUALI, M. 2018. Isolation of actinomycetes from different soils of Beni Amir Morocco.

- ZENOVA, G., GRYADUNOVA, A., DOROSHENKO, E., LIKHACHEVA, A., SUDNITSYN, I., POCHATKOVA, T. & ZVYAGINTSEV, D. 2007. Influence of moisture on the vital activity of actinomycetes in a cultivated low-moor peat soil. *Eurasian Soil Science*, 40, 560-564.
- ZHI, X.-Y., LI, W.-J. & STACKEBRANDT, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 589-608.
- ZVYAGINTSEV, D., BAB'EVA, I. & ZENOVA, G. 2005. Soil biology. *Moscow: Moscow State University*, 445.

# *Annexes*

## Annexe 1

**Tableau 1:** Caractères morphologiques des souches d'actinomycètes isolées.

N° des souches	Site d'isolement	Taille des colonies	Couleur du mycelium aerien	Couleur du mycelieu de substrat	Pigmentation
1	SITE 6	PETITE	BLANCHE	BLANCHE	-
2	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
3	SITE 6	PETITE	BLANCHE	MARRON	-
4	SITE 5	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	JAUNE FONCE
5	SITE 7	PETITE	GRIS CLAIR	JAUNE FONCE	-
6	SITE 3	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	JAUNE
7	SITE 5	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
8	SITE 6	PETITE	GRIS CLAIR	JAUNE CLAIRE	-
9	SITE 9	PETITE	JAUNE	JAUNE	-
10	SITE 9	PETITE	BLANCHE	JAUNE FAONCE	JAUNE CLAIRE
11	SITE 1	PETITE	GRIS	MARRON	MARRON CLAIR
12	SITE 1	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
13	SITE 4	PETITE	ORANGE	MARRON	MARRON
14	SITE 1	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
15	SITE 4	PETITE	MARRON CLAIR	MARRON CLAIR	-
16	SITE 9	PETITE	BLANCHE	JAUNE CLAIRE	-
17	SITE 4	PETITE	MARRON CLAIR	MARRON CLAIR	-
18	SITE 4	PETITE	BLANCHE	BLANCHE	-
19	SITE 4	PETITE	GRIS CLAIR	JAUNE FONCE	JAUNE
20	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
21	SITE 1	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
22	SITE 6	PETITE	GRIS	MARRON FONCE	MARRON CLAIR
23	SITE 1	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
24	SITE 4	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
25	SITE 4	PETITE	MARRON	MARRON	MARRON
26	SITE6	PETITE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
27	SITE 6	PETITE	MARRON	MARRON FONCE	MARRON
28	SITE5	PETITE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
29	SITE 6	PETITE	JAUNE FONCE	JAUNE FONCE	-
30	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE PALE	-
31	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
32	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
33	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
34	SITE 5	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
35	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
36	SITE 6	MOYENNE	JAUNE	JAUNE	-
37	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
38	SITE 6	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE PALE	-
39	SITE 5	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE PALE	-
40	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
41	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-

## *Annexe1*

**Tableau 1(suite):** Caractères morphologiques des souches d'actinomycètes isolées.

N° des souches	Site d'isolement	Taille des colonies	Couleur du mycelium aerien	Couleur du mycelieu de substrat	Pigmentation
42	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
43	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
44	SITE 6	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE	-
45	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE FONCE	-
46	SITE 6	MOYENNE	BLANCHE	MARRON	-
47	SITE 4	PETITE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
48	SITE 4	MOYENNE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
49	SITE 4	MOYENNE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
50	SITE 6	PETITE	JAUNE PALE	JAUNE PALE	-
51	SITE 5	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE	-
52	SITE 1	PETITE	GRIS	MARRON	JAUNE
53	SITE 1	PETITE	JAUNE	JAUNE POUSSIN	-
54	SITE 6	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE POUSSIN	JAUNE
55	SITE 6	PETITE	BLANCHE	JAUNE POUSSIN	JAUNE
56	SITE6	PETITE	BLANCHE	JAUNE POUSSIN	JAUNE
57	SITE 4	MOYENNE	BLANCHE	BLANCHE	-
58	SITE 2	MOYENNE	GRIS	BLANCHE	-
59	SITE 2	PETITE	GRIS	GRIS	-
60	SITE 4	MOYENNE	GRIS	GRIS	
61	Site 4	MOYENNE	GRIS	MARRON FONCE	MARRON FONCE
62	site6	MOYENNE	GRIS	JAUNE	-
63	site 1	PETITE	Gris	JAUNE CLAIRE	-
64	SITE 4	PETITE	GRIS	MARRON FONCE	MARRON FONCE
65	SITE 4	PETITE	GRIS	GRIS	-
66	SITE 1	PETITE	BLANCHE	JAUNE	-
67	SITE 1	PETITE	BLANCHE	BLANCHE	-
68	SITE4	PETITE	BLANCHE	BLANCHE	-
69	SITE6	PETITE	GRIS	BLANCHE	-
70	SITE 1	MOYENNE	BLANCHE	JAUNE	-
71	SITE6	PETITE	ROUGE	ROUGE	-
72	SITE6	MOYENNE	ROUGE	ROUGE	-
73	SITE4	PETITE	GRIS	MARRON FONCE	MARRON
74	SITE 6	MOYENNE	ROUGE	ROUGE	-
75	SITE 6	MOYENNE	ROUGE	ROUGE	-
76	SITE 4	MOYENNE	GRIS	MARRON FONCE	MARRON
77	SITE 6	MOYENNE	GRIS	JAUNE	-
78	SITE 6	MOYENNE	ROUGE	ROUGE	-
79	site 4	MOYENNE	GRIS	MARRON	MARRON
80	SITE 6	MOYENNE	GRIS	JAUNE FONCE	-

## Annexe 2

**Tableau 20:** Test de croissance des souches actinomycètes sur milieu MMS à différentes concentrations de NaCl

Actinomycete isolates	NaCl concentration			
	0g/L	50g/L	70g/L	100g/L
A1	+++	-	-	-
A2	+++	-	-	-
A3	+++	-	-	-
A4	+++	+	-	-
A5	+++	-	-	-
A6	+++	-	-	-
A7	+++	++	-	-
A8	+++	++	-	-
A9	+++	++	-	-
A10	+++	++	-	-
A11	+++	++	-	-
A12	+++	++	-	-
A13	+++	++	-	-
A14	+++	-	-	-
A15	+++	+	-	-
A16	+++	++	-	-
A17	+++	++	-	-
A18	+++	++	-	-
A19	+++	++	-	-
A20	+++	++	-	-
A21	+++	++	-	-
A22	+++	++	-	-
A23	+++	+	-	-
A24	+++	++	-	-
A25	+++	+	-	-
A26	+++	++	-	-
A27	+++	++	-	-
A28	+++	++	-	-
A29	+++	++	-	-
A30	+++	+++	++	-
A31	+++	++	-	-
A32	+++	++	-	-
A33	+++	+++	-	-
A34	+++	+	-	-
A35	+++	++	-	-
A36	+++	+++	-	-
A37	+++	+	-	-
A38	+++	+	-	-
A39	+++	-	-	-
A40	+++	++	-	-

(-) Pas de croissance, (+) croissance lente, (++) croissance modérée (+++) croissance abondante

## Annexe 2

**Tableau 20(Suite):** Test de croissance des souches actinomycètes sur milieu MMS à différentes concentrations de NaCl

Actinomycete isolates	NaCl concentration			
	0g/L	50g/L	70g/L	100g/L
A41	+++	+	-	-
A42	+++	-	-	-
A43	+++	--	-	-
A44	+++	+++	+++	-
A45	+++	+	-	-
A46	+++	+	+	-
A47	+++	+	-	-
A48	+++	+++	-	-
A49	+++	++	++	-
A50	+++	-	+	-
A51	+++	-	-	-
A52	+++	++	-	-
A53	+++	+++	++	-
A54	+++	-	-	-
A55	+++	+++	-	-
A56	+++	+	-	-
A57	+++	+	+	-
A58	+++	+++	++	-
A59	+++	+	-	-
A60	+++	+++	+++	-
A61	+++	-	-	-
A62	+++	+	-	-
A63	+++	++	++	-
A64	+++	+	+	-
A65	+++	+++	+++	-
A766	+++	+	-	-
A67	+++	-	-	-
A68	+++	+	-	-
A69	+++	-	-	-
A70	+++	+	-	-
A71	+++	-	-	-
A72	+++	+	-	-
A73	+++	-	-	-
A74	+++	+	-	-
A75	+++	+	-	-
A76	+++	+++	++	-
A77	+++	-	-	-
A78	+++	-	-	-
A79	+++	+++	+++	-
A80	+++	+	-	-

(-) Pas de croissance, (+) croissance lente, (++) croissance modérée (+++) croissance abondante

### Annexe 3

**Tableau 21 : Activité antibactérienne présentée par les actinomycètes du sol de Beni Amir**

Souches d'actinomycetes	Zone d'inhibition (mm)				
	Souches test				
	Salmonella sp CCMMB17	<i>Klebsielle pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>E. coli</i> CCMMB4	Micrococcus luteus ATCC381
A1	20	-	15	15	-
A2	20	-	-	-	-
A3	19	-	-	-	-
A4	20	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-
A6	20	-	-	-	-
A7	19	-	-	-	-
A8	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-
A10	18	-	-	-	-
A11	16	-	-	-	-
A12	18	-	-	-	-
A13	18	-	-	-	-
A14	25	-	-	-	-
A15	16	-	-	-	-
A16	20	-	-	-	-
A17	17	-	-	-	-
A18	13	-	-	-	-
A19	17	-	-	-	-
A20	-	-	-	-	-
A21	19	-	-	-	-
A22	-	-	-	-	-
A23	21	-	-	-	-
A24	22	-	-	-	-
A25	16	-	-	-	-
A26	13	-	13	13	16
A27	11	-	-	-	-
A28	-	-	-	-	-
A29	13	-	15	14	12
A30	20	-	-	-	-
A31	19	-	-	-	-
A32	20	-	-	-	-
A33	-	-	-	-	-
A34	18	-	-	-	-
A35	-	-	-	-	-
A36	18	-	-	-	14
A37	15	12	-	12	-
A38	-	-	-	12	-
A39	20	-	-	11	-
A40	20	-	-	-	10
A41	19	-	-	-	-
A42	11	-	-	-	-
A43	17	-	-	-	-

(-) pas d'effet



### Annexe 3

**Tableau 21(suite) : Activité antibactérienne présentée par les actinomycètes du sol de Beni Amir**

Souches d'actinomycetes	Zone d'inhibition (mm)				
	Souches test				
	<i>Salmonella sp</i> CCMMB17	<i>Klebsielle pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>E. coli</i> CCMMB4	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC381
A44	19	-	-	-	-
A45	-	-	13	-	-
A46	18	-	-	-	-
A47	19	-	-	-	-
A48	20	-	-	-	-
A49	19	-	-	-	-
A50	16	-	-	-	-
A51	21	-	-	-	-
A52	21	-	-	-	-
A53	-	-	-	-	-
A54	18	-	-	18	-
A55	-	-	-	-	-
A56	-	14	-	-	-
A57	-	-	-	-	-
A58	14	-	-	-	-
A59	10	-	-	-	-
A60	-	-	-	-	-
A61	-	-	-	-	-
A62	18	-	-	-	-
A63	-	-	-	-	-
A64	-	-	-	-	-
A65	13	-	-	-	-
A66	-	-	-	-	-
A67	-	-	-	-	-
A68	-	-	-	-	-
A69	-	-	-	-	-
A70	-	-	-	-	-
A71	-	-	-	-	-
A72	-	-	-	-	-
A73	15	-	-	-	-
A74	-	-	-	-	-
A75	-	-	-	-	-
A76	-	-	-	-	-
A77	-	-	-	-	-
A78	-	-	-	-	-
A79	18	-	-	-	-
A80	-	-	-	12	-

(-) pas d'effet

## Annexe 4

**Tableau 22:** Activité antifongique des isolats d'actinomycètes

Souches d'actinomycètes	Zone d'inhibition (mm)			
	Souches test			
	<i>Fusarium oxysporum</i> A27	<i>Verticillium dahliae</i> V22	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Candida albicans</i> CCMML15
A1	-	-	-	18
A2	-	-	-	20
A3	-	-	-	20
A4	-	-	-	20
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	21
A7	-	-	-	21
A8	-	-	-	-
A9	-	-	-	-
A10	5	-	12	17
A11	10	12	11	-
A12	7	-	-	17
A13	-	6	10	-
A14				-
A15				-
A16	-	-	4	18
A17	-	9	10	-
A18	-	-	5	13
A19	5	-	5	16
A20	-	-	-	-
A21	-	-	2	18
A22	-	-	8	15
A23	-	-	-	20
A24	6	10	5	22
A25	-	-	-	-
A26	5	2	15	12
A27	10	12	10	13
A28	-	-	-	-
A29	6	-	12	20
A30	-	-	-	20
A31	-	-	-	18
A32	5	-	-	20
A33	-	-	-	-
A34	-	-	-	25
A35	-	-	-	-
A36	10	12	11	19
A37	-	6	-	16
A38	-	-	-	-
A39	-	-	-	23
A40	7	9	17	19

(-) pas d'effet

## Annexe 4

**Tableau 22(Suite):** Activité antifongique des isolats d'actinomycètes

Souches d'actinomycètes	Zone d'inhibition (mm)			
	Souches test			
	<i>Fusarium oxysporum</i> A27	<i>Verticillium dahliae</i> V22	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Candida albicans</i> CCMML15
A41	-	-	-	16
A42	-	-	-	13
A43	-	-	-	16
A44	-	6	5	18
A45	5	9	3	-
A46	-	-	-	19
A47	-	-	-	18
A48	0	10	2	21
A49	0	10	10	21
A50	-	-	-	14
A51	-	-	-	-
A52	10	12	-	20
A53	-	-	-	-
A54	-	-	-	17
A55	-	-	-	-
A56	-	-	-	-
A57	-	-	-	-
A58	7	13	8	-
A59	-	-	-	-
A60	5	10	6	-
A61	-	-	-	-
A62	-	-	-	25
A63	-	-	-	-
A64	-	-	-	18
A65	-	9	11	-
A66	-	-	-	-
A67	-	-	-	-
A68	-	-	-	-
A69	-	-	-	-
A70	-	-	-	-
A71	-	-	-	-
A72	-	-	-	-
A73	-	-	-	13
A74	-	-	-	-
A75	-	-	-	-
A76	-	-	-	-

(-) pas d'effet

## *Annexe 5*

### **Composition des milieux de culture**

#### **-Bennett**

Extrait de levure 1g  
Extrait de viande 1g  
Peptone pancréatique de caséine 2g  
Glucose 10g  
Agar 15g  
Eau distillée 1000 mL  
pH 7,2

#### **-Mueller Hinton**

Infusion de viande de boeuf 2 g  
Amidon 15 g  
Hydrolysate de caséine 17,5g  
Agar 17 g  
Eau distillée 1000 mL  
pH 7,3

#### **-Milieu ISP2**

Glucose: 4 g  
Extrait de levure: 4 g  
Extrait de malt: 10 g ;  
Eau distillée q.s.p. 1000 ml ;  
Agar:20 g. pH 7,2

#### **-Milieu ISP3**

Farine d'avoine : 20 g  
Solution saline standard : 1 mL  
Agar: 20 g ;  
Eau distillée q.s.p.  
1000 ml. pH 7,2.

\* Solution saline standard: FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0.1 g  
eau distillée q.s.p. 100 ml.

## *Annexe 5*

### **Composition des milieux de culture**

#### **-Milieu ISP4**

Amidon: 10 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O

1 g ; NaCl: 1 g ;

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g ;

CaCO<sub>3</sub>: 2 g ;

Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ;

Agar : 20 g ;

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

pH 7,2.

#### **-Milieu ISP 7**

Glycérol 15 g

L-tyrosine 0,5 g

L-asparagine 1,0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g

NaCl 0,5 g

FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,01 g

Agar 20 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,2 –7,4

#### **-Bouillon Sabouraud**

Peptone de gélatine 10g

Glucose 20g

Eau distillée 1000mL

pH 5,6

**-Citrato de Simmons**

Ammonium dihydrogenophosphate 1g

Phosphate de dipotassique 1g

Chlorure de sodium 5g

Citrate de sodium 2g

Sulfate magnésium 0,2g

Bleu de bromothymol 0,08g

Agar 15g

Eau distillée 1000 mL

pH 6,8

### Annexe 6

Adhésion des actinomycètes au verre. Observation par microscope optique à 3h, 24h, 48h, 72h et 168h à 0,1 et 1,2M de NaCl (Gr : x400).

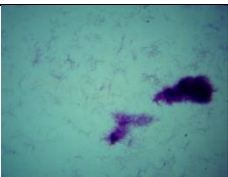
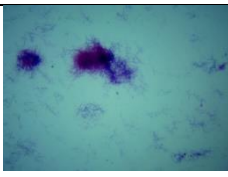
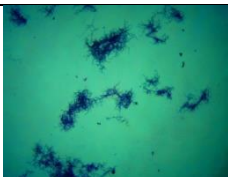
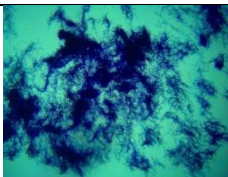
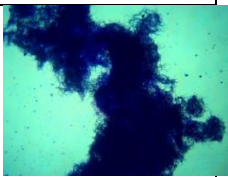
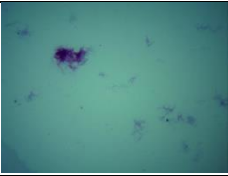

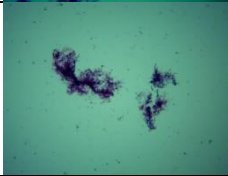
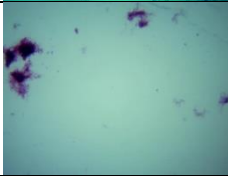
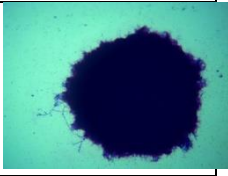



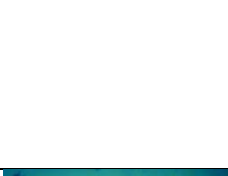
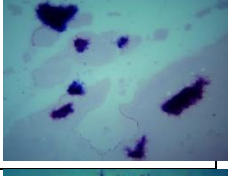
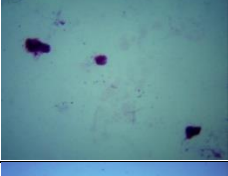


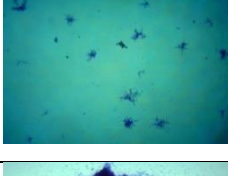
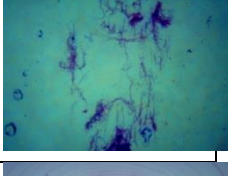
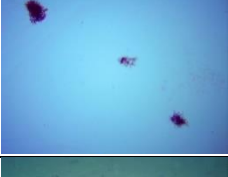
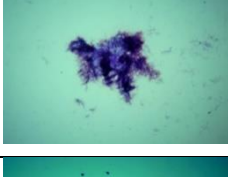
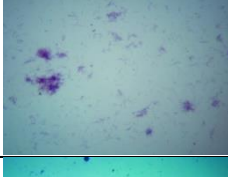
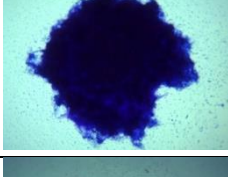
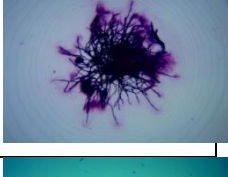


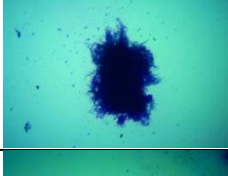
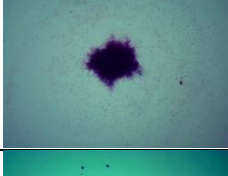
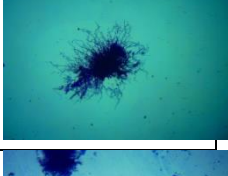
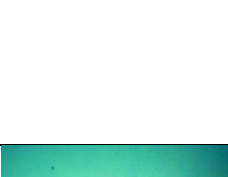



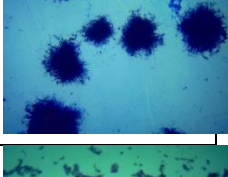
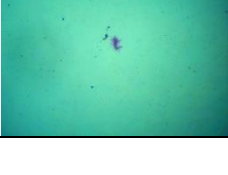

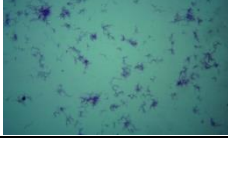
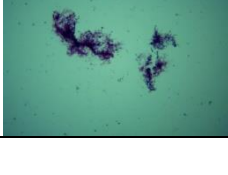
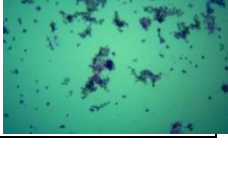
#### 0,1M NaCl


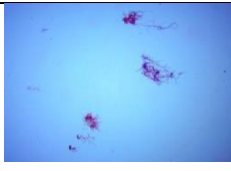
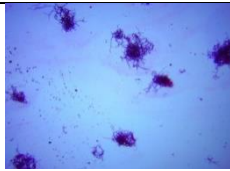
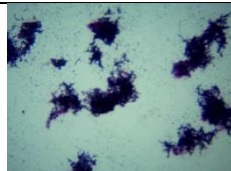
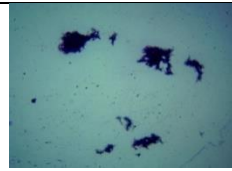
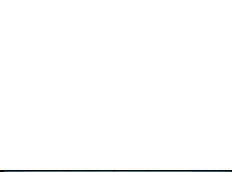
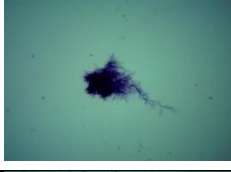

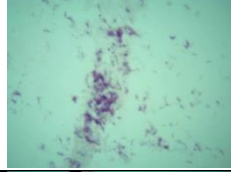
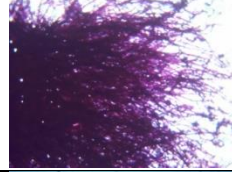
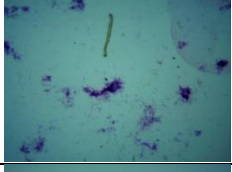
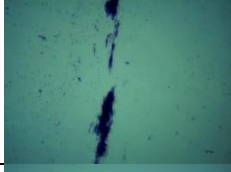
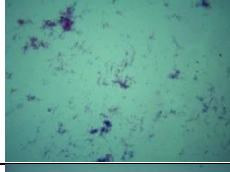
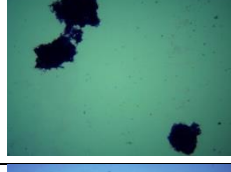
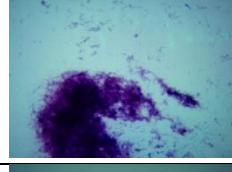

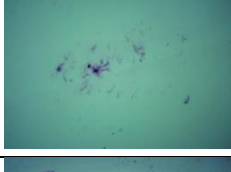


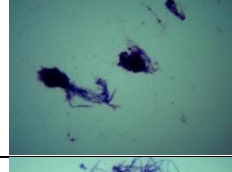
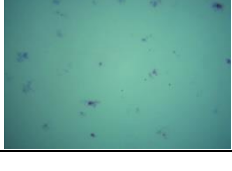
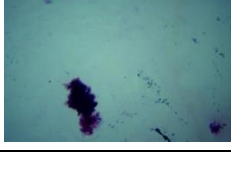
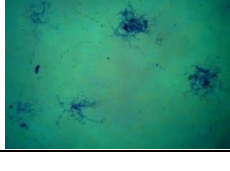
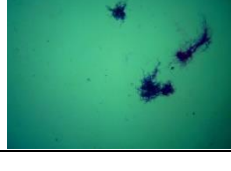
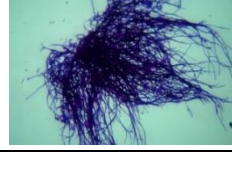
Souches	3H	24H	8H	72H	168H
A30					
A44					
A46					
A49					
A50					
A53					
A57					
A58					

Souches	3H	24H	48H	72H	168H
A60					
A63					
A65					
A76					
A79					



### 1.2 M NaCl

Souches	3H	24H	48H	72H	168H
A30					
A44					
A46					
A49					
A50					
A53					
A57					
A58					

Souches	3H	24H	48H	72H	168H
A60					
A63					
A65					
A76					
A79					

## Annexe 7

### Croissance des actinomycètes aux différentes sources de carbone

Isolats	Glucose	Maltose	Mannitol	Arabinose	Lactose	Fructose	saccharose	Galactose	Citrate	Nitrate réduction
A1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	+++	+++	++	+	+++	+++	++	-	++	-
A4	++	+++	-	-	+	-	-	-	+++	-
A5	+	+	-	+	+	++	++	-	+++	-
A6	+	+++	-	-	+	+	-	-	-	-
A8	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A11	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+
A12	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A13	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
A16	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	+++	-
A17	++	+	-	-	+	-	-	-	+++	-
A18	+	+++	-	+	+	++	++	-	+++	-
A19	+	+++	-	-	+	+	-	-	-	-
A20	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
A21	+	+	-	+	+	++	++	-	+++	-
A24	+++	+++	-	-	+	+	-	-	-	-
A25	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
A28	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A29	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
A31	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A32	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
A35	+++	+	++	+	+++	+++	++	-	++	+
A37	+++	+++	-	-	+	-	-	-	+++	-
A38	+	++	-	+	+	++	++	-	+++	-
A39	+++	+	-	-	+	+	-	-	-	-
A40	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A42	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A45	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
A47	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A48	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
A51	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	-	+++	-
A52	++	+++	-	-	+	-	-	-	+++	-
A54	+	++	-	+	+	++	++	-	+++	-
A55	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-

Isolats	Glucose	Maltose	Mannitol	Arabinose	Lactose	Fructose	saccharose	Galactose	Citrate	Nitrate réduction
A56	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A59	+++	+	-	+	+	++	++	-	+++	-
A62	+++	+++	-	-	+	+	-	-	-	-
A66	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
A67	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A68	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
A69	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
A70	+	+++	-	-	+	-	-	-	+++	-
A71	+	+	-	+	+	++	++	-	+++	-
A72	+	+++	-	-	+	+	-	-	-	-
A73	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
A74	+++	+	-	+	+	++	++	-	+++	-
A75	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-
A77	+	+	-	-	+	-	-	-	+++	-
A78	+	+++	-	+	+	++	++	-	+++	-

## Annexe 8

### Sensibilité aux antibiotiques

Isolats	Amoxicilline 2µg	Amoxicilline 30µg	Chloramphenicol 30µg	Tétracyclin e30µg	Erythromycine 15µg	Gentamicine 10µg
A1	R	R	S	S	S	S
A2	S	S	S	S	S	S
A4	S	R	S	S	S	S
A5	R	R	S	S	S	S
A6	R	R	S	S	S	S
A8	S	R	S	S	S	S
A9	R	R	S	S	S	S
A11	R	R	S	S	S	S
A12	R	R	S	S	S	S
A13	R	R	S	S	S	S
A16	S	S	S	S	S	S
A17	S	R	S	S	S	S
A18	R	R	S	S	S	S
A19	R	R	S	S	S	S
A20	R	R	S	S	S	S
A21	R	R	S	S	S	S
A24	S	R	S	S	S	S
A25	R	R	S	S	S	S
A28	R	R	S	S	S	S
A29	R	R	S	S	S	S
A31	R	R	S	S	S	S
A32	S	S	S	S	S	S
A35	S	R	S	S	S	S
A37	R	R	S	S	S	S
A38	R	R	S	S	S	S
A39	R	R	S	S	S	S
A40	S	S	S	S	S	S
A42	S	R	S	S	S	S
A45	R	R	S	S	S	S
A47	R	R	S	S	S	S
A48	R	R	S	S	S	S
A51	R	R	S	S	S	S
A52	S	R	S	S	S	S
A54	R	R	S	S	S	S
A55	S	S	S	S	S	S

Isolats	Amoxicilline 2µg	Amoxicilline 30µg	Chloramphenicol 30µg	Tétracyclin e30µg	Erythromycine 15µg	Gentamicine 10µg
A56	S	R	S	S	S	S
A59	R	R	S	S	S	S
A62	R	R	S	S	S	S
A66	R	R	S	S	S	S
A67	R	R	S	S	S	S
A68	S	R	S	S	S	S
A69	R	R	S	S	S	S
A70	R	R	S	S	S	S
A71	S	R	S	S	S	S
A72	R	R	S	S	S	S
A73	R	R	S	S	S	S
A74	S	R	S	S	S	S
A75	R	R	S	S	S	S
A77	R	R	S	S	S	S
A78	S	R	S	S	S	S

## Annexe 9

### Effet de la température et pH

Isolats	Température de croissance		pH		
	45°C	28°C	4	9	12
A1	+++	+++	++	+++	+++
A2	++	+++	++	+	+
A4	-	+++	++	++	++
A5	+++	+++	+++	+++	++
A6	-	+++	+	+	+++
A8	-	+++	++	+	+
A9	+++	+++	+++	+	+
A11	+++	+++	+++	+	
A12	+++	+++	+++	+	+
A13	+++	+++	++	+++	+++
A16	+++	+++	+++	+	+
A17	-	+++	++	++	+++
A18	+++	+++	+++	+	+
A19	-	+++	+	+++	+++
A20	-	+++	-	-	-
A21	+++	+++	++	+++	+++
A24	++	+++	++	+	+
A25	-	+++	++	++	++
A28	+++	+++	+++	+++	++
A29	-	+++	+	+	+++
A31	-	+++	++	+	+
A32	+++	+++	+++	+	+
A35	+++	+++	+++	+	
A37	+++	+++	++	+++	+++
A38	++	+++	++	+	+
A39	-	+++	++	++	++
A40	+++	+++	+++	+++	++
A42	-	+++	+	+	+++
A45	-	+++	++	+	+
A47	+++	+++	+++	+	+
A48	+++	+++	+++	+	
A51	+++	+++	+++	+	+
A52	+++	+++	++	+++	+++
A54	+++	+++	+++	+	+
A55	+++	+++	++	+++	+++

Isolats	Température de croissance		pH		
	45°C	28°C	4	9	12
A56	++	+++	++	+	+
A59	-	+++	++	++	++
A62	+++	+++	+++	+++	++
A66	-	+++	+	+	+++
A67	-	+++	++	+	+
A68	+++	+++	+++	+	+
A69	+++	+++	+++	+	
A70	+++	+++	+++	+	+
A71	+++	+++	++	+++	+++
A72	+++	+++	+++	+	+
A73	-	+++	++	++	+++
A74	+++	+++	+++	+	+
A75	-	+++	+	+++	+++
A77	-	+++	-	-	-
A78	-	+++	-	-	-