

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



N° d'ordre :
N° de série :

Université de Ghardaïa

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du

Diplôme de Master

EN

Sciences biologiques

Option: **Biochimie Appliquée**

Par

BENDOUB Sayah et BENSEMAOUNE Abderrahim

**Isolement et sélection de souches d'actinobactéries
présentant une activité antimicrobienne à partir de sols
de la région de Ghardaïa**

Soutenu publiquement, le, devant le jury composé de :

M. BAKELLI Aissa	Maitre-Assistant A	Univ. Ghardaïa	Président
M. BOURAS Noureddine	Professeur	Univ. Ghardaïa	Examineur
M. BELGHIT Said	Maitre de conférences B	Univ. Ghardaïa	Promoteur

2019/2020

DEDICACES

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

*A mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études par
leur amour, leurs prières et leurs encouragements,*

A la mémoire de mon grand-père

A mes frères et sœurs et la famille BENDOUB,

*A mes très chers amis Mohamed, Mohamed el Amine, Abdelkrim et Bouti
et Bouti,*

A mes amis d'université, Nasreddine, Nasro, Samira, Noredine.

A tous mes professeurs du primaire à l'université,

A tous mes amis,

Je dédie ce travail.

Sayah.

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

A mes chers soeurs et frères Je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A tous mes amies et mes collègues de la promotion

A tous ceux que j'aime.

Abderrahime

REMERCIEMENTS

Avant tous nous remercions **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et sur lequel nous nous appuyons avant toute chose.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Microbiologie université de Ghardaïa

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr **BELGHIT Saïd** Maitre de Conférences B à l'Université de Ghardaïa de nous avoir dirigé, de nous avoir passionnément corrigé ce manuscrit, ainsi que son aide, ses précieux conseils, sa disponibilité et ses encouragements.

Nous tenons à remercier Mr **Bakelli Aissa**, Maitre-Assistant A à l'université de Ghardaïa, qui nous a fait l'honneur en acceptant d'examiner notre travail et de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à remercier également Mr **Bouras Noureddine**, Professeur à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté de donner une partie de son temps précieux pour l'évaluation de ce mémoire et apporter ses remarques pour améliorer notre manuscrit.

Nous tenons à remercier également nos aimables enseignants **M^{elle} Djemouai Nadjette** et **M. Ben bekhti Zineddine** de nous avoir aidés et fournis les germes cibles. .

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de Biologie ainsi que tous les ingénieurs et les techniciens de laboratoire de Microbiologie à l'Université de Ghardaïa pour leur aide et disponibilité, surtout pour leurs gentillesse.

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

Liste des abréviations

ملخص

ABSTRACT

RESUME

Introduction..... 1

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

ACTINOBACTERIES..... 3

1. Définition et notions générales 3

2. Ecologie..... 3

3. Morphologie 4

4. Taxonomie..... 6

4.1. Critères d'identification des actinobactéries 7

4.1.1. Critères morphologiques 7

4.1.2. Critères chimiques 7

4.1.3. Critères physiologiques et biochimiques 8

4.1.4. Critères moléculaires 8

5. Importance des actinobactéries..... 10

ANTIBIOTIQUES 10

1. Classification : 11

2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries et leurs intérêts : 11

ANTIBIORESISTANCE 14

1. La résistance naturelle.....	14
2. La Résistance acquise :	14
MICROORGANISMES CIBLES UTILISES	15
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2. <i>Escherichia coli</i>	15
3. <i>Bacillus subtilis</i> :	16
4. <i>Candida albicans</i>	17

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Isolement des actinobactéries du sol	18
1.1. Prétraitement des échantillons.....	18
1.2. Milieu d'isolement et agents sélectifs	18
1.3. Technique d'ensemencement et conditions d'incubation	19
1.4. Purification des souches	19
2. Etude des propriétés antagonistes.....	21
2.1. Germes cibles	21
2.2. Méthode de stries croisées.....	21

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats	22
1. Isolement des actinobactéries	22
2. Purification.....	22
3. Evaluation du potentiel d'antagonisme des actinobactéries :	24
Discussion	27
Conclusion et perspectives.....	30
Référence bibliographique	31
Annexes.....	43

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries.....	6
Figure 2. Origine des antibiotiques	10
Figure 3. <i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement....	15
Figure 4. <i>Escherichia coli</i> , vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement.	16
Figure 5. Image prise par microscopie électronique de <i>Bacillus subtilis</i>	16
Figure 6 . <i>Candida albicans</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement	17
Figure 7. Protocole d'isolement des actinobactéries à partir de sols de la région de Ghardaïa. ..	20
Figure 8. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode de stries croisées.....	21
Figure 9. Aspect macromorphologique des colonies d'actinobactéries isolées de sol de la région de Metlili sur le milieu ChVB.....	22
Figure 10. Mycélium aérien des souches d'actinobactéries isolées.....	23
Figure 11. Activité antibactérienne de la souche B12.....	26

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique.....	12
Tableau 2. Quelques exemples de molécules antibiotiques et microorganisme Producteurs.....	13
Tableau 3. Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i>	13
Tableau 4. Nombre d'isolats d'actinobactéries provenant de deux échantillons de sol.	244
Tableau 5. Activité antagoniste des 21 isolats d'actinobactéries sélectionnés.	255

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
Ch-VB	Chitine-Vitamines B (milieu de culture)
G+C	Guanine + Cytosine
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project (milieux de culture)
MA	Mycélium Aérien
MS	Mycélium du Substrat
BMR	Bactérie Multi-Résistance
CaCO₃	Carbonate de Calcium
ARNr16S	Acide RiboNucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S
M	Metlili
B	Berriane
E.C	<i>Escherichia coli</i>
B.S	<i>Bacillus subtilis</i>
S.A	<i>Staphylococcus aureus</i>
C.A	<i>Candida albicans</i>
CCM	Chromatographie sur couches minces
Hplc	Chromatographie en phase liquide à haute performance
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV-visible	Ultra-violet visible

عزل واختيار سلالات بكتيريا هيفية ذات نشاط مضاد ميكروبي من خلال أترية من منطقة غرداية

ملخص

تتعلق هذه الدراسة بعزل سلالات بكتيريا هيفية لها نشاط مضاد ميكروبي انطلاقا من عينات أترية نخيل مأخوذة من منطقة غرداية. تم اختيار عينتين لترية من منطقتي بريان ومثلي حيث تم العزل على وسط "كيتين فيتامينات ب" (خالي من الفيتامينات) بوجود أو بدون مضادات حيوية انتقائية. بعد التحضين لمدة 21 يوم، تم اختيار السلالات بالاعتماد على الشكل المرفولوجي، حيث تم عزل وتنقية 57 عزلة. تم تقييم نشاط المضاد الميكروبي لكل هذه السلالات باستعمال طريقة الخطوط العرضية ضد ثلاث سلالات اختبارية بكتيرية: *S. aureus* ATCC699، *B. subtilis* ATCC 6633 و *E. coli* ATCC25922 وسلالة اختبار خميرة *C. albicans* ATCC10231. بينت النتائج وجود 21 عزلة (36%) ذات نشاط مضاد لسلالات البكتيريا المستعملة. أفضل هذه السلالات نشاطا هي السلالة B12 حيث كانت نشطة ضد كل السلالات البكتيرية بمسافات تثبيط تقدر ب 16 مم ضد *S. aureus*، 15 مم ضد *E. coli* و 11 مم ضد *B. subtilis*. لم تثبت النتائج وجود أي نشاط من طرف السلالات الهيفية ضد الخميرة *C. albicans*.

الكلمات المفتاحية: عزل، بكتيريا هيفية، نشاط مضاد ميكروبي، أترية غرداية.

Isolation and selection of strains of actinobacteria exhibiting antimicrobial activity from soils of the Ghardaïa region

Abstract

This study aims the isolation of strains of actinobacteria from soils of Ghardaia region and the demonstration of their antimicrobial activity. The choice of soil samples was carried out from the two regions Berriane and Metlili. The ChV (B) medium with or without selective antibiotics allowed us to isolate a large number of actinobacteria, of which 57 isolates were selected and purified. The evaluation of their antimicrobial activity was carried out using the cross streak method against three bacterial test strains: *S. aureus* ATCC699, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC25922 and a yeast *C. albicans* ATCC10231. The results showed that twenty-one isolates (36%) have exhibited antibacterial activity. The best isolate that showed activity against all target organisms was isolate B12 with the following inhibition diameters: 16mm against *S. aureus*, 15mm against *E. coli* ATCC25922 and 11mm against *B. subtilis*. No activity was recorded by actinobacteria isolates against the yeast *C. albicans*.

Key words: Isolation, Actinobacteria, Antimicrobial activity, Ghardaïa soils.

Isolement et sélection de souches d'actinobactéries présentant une activité antimicrobienne à partir de sols de la région de Ghardaïa

Résumé

Cette étude concerne l'isolement des souches d'actinobactéries à partir de sols de la région de Ghardaïa et la mise en évidence de leur activité antimicrobienne. Le choix des échantillons de sol est effectué à partir des deux régions Berriane et Metlili. Le milieu ChV (B) additionné ou non des antibiotiques sélectifs a permis d'isoler un grand nombre d'actinobactéries dont 57 isolats ont été choisis et purifiés. L'évaluation de leur activité antimicrobienne a été effectuée en utilisant la méthode des stries croisées contre trois souches tests bactériennes : *S. aureus* ATCC699, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC25922 et une levure *C. albicans* ATCC10231. Vingt et un isolats (soit 36%) ont présenté une activité antibactérienne. Le meilleur isolat qui a présenté une activité contre tous les germes cibles était l'isolat B12 avec les diamètres d'inhibition suivants : 16mm contre *S. aureus*, 15mm contre *E. coli* ATCC25922 et 11mm contre *B. subtilis*. Aucune activité n'a été enregistrée par les isolats d'actinobactéries contre la levure *C. albicans*.

Mots clés : Isolement, actinobactéries, activité antimicrobienne, sols de Ghardaïa.

Introduction

Introduction

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défenses qui leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus au moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur résistent (Genne et Siegrist, 2003). Plusieurs travaux publiés, y compris en Algérie, ont signalé l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés. Parmi ces derniers ; certains, comme la colistine, sont utilisés pour traiter les infections à BMR (Bakour *et al.*, 2015 ; Arcilla *et al.*, 2016 ; Berrazeg *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016). Cette résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes et la fréquence de ses infections, ont poussé à intensifier les recherches pour découvrir de nouvelles molécules bioactives (Boubetra *et al.*, 2013).

Les actinobactéries sont un groupe de micro-organismes eubactériens que l'on trouve couramment dans le sol et qui semblent être fortement impliqués dans l'écologie de cet habitat tel que la transformation des biopolymères complexes comme la lignocellulose, l'hémicellulose, la pectine, la kératine et la chitine (Saravanamuthu, 2010). Ils possèdent une importance économique majeure en raison de la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique ayant des applications dans divers domaines industriels, et en particulier pharmaceutiques (Barka *et al.*, 2016). Les actinobactéries sont le pilier des industries d'antibiotiques. Ils jouent un rôle important dans la production de variété de ces molécules extrêmement importants pour notre santé (Chaudhary *et al.*, 2013). Parmi les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries mycéliennes, environ 75% (soit, plus de 7600 molécules) sont produits par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Berdy, 2005 ; Solecka *et al.*, 2012). Plus de 50 taxons rares d'actinobactéries sont rapportés comme étant producteurs de 2500 composés bioactifs, soit plus de 25% du total des métabolites produits par les actinobactéries (Kurtböke, 2012 ; Subramani et Aalbersberg, 2013).

En Algérie, les sols sahariens représentent des écosystèmes assez particuliers et ont montré une richesse et une biodiversité surprenante en actinobactéries, aussi bien les genres et espèces qui sont les plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992) et les plus rares au monde tels que *Actinomadura*, *Catellatospora*, *Couchioplanes*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. (Sabaou *et al.*, 1992; Zitouni, 1995 ; Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998). Plusieurs souches d'actinobactérienne sont révélées être de nouvelles espèces et productrices de nouveaux antibiotiques (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Boudjella *et al.*, 2006 ; Boudjella *et al.*, 2014).

L'objectif principal de ce travail se focalise sur l'isolement et la purification des souches d'actinobactéries produisant d'antibiotiques à partir de sols de la région de Ghardaïa.

Le premier chapitre de ce document est consacré à la présentation bibliographique : données générale sur les actinobactéries, leur distribution dans la nature et leur position taxonomique, des notions sur les antibiotiques et l'antibiorésistance et en terminant ce chapitre par une présentation des microorganismes cibles utilisés.

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes utilisées pour l'isolement et l'évaluation de l'activité antagoniste d'actinobactéries.

Les résultats de l'isolement et l'activité antimicrobienne et leurs discussions sont présentés dans le troisième chapitre.

Une conclusion et des perspectives qui en découlent ainsi que les références bibliographiques clôturent ce document.

CHAPITRE I

Revue bibliographique

ACTINOBACTERIES

1. Définition et notions générales

Les actinobactéries font partie des Eubactéries Gram positives à structure végétative de type mycélien (Pandey *et al.*, 2004 ; Araujo-Melo *et al.*, 2016). Elles 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 (Stackebrandt, 1997; Ventura, 2007 ; Zhi, 2009). Le mot « Actinomycètes » est l'ancien nom des actinobactéries provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». Cette expression utilisée pour les désigner en anglais (Ray fung), ce terme rassemble un grand groupe de bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire, des filaments à croissance centrifuge (Stackebrandt et Schumann, 2006).

En général, les actinobactéries sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990). Elles sont généralement saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes tel *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Loria, 1986) ou encore, pathogènes pour l'homme, telles les infections causées par certaines espèces de *Nocardia*, de *Nocardiosis*, d'*Actinomyces* ou de *Streptomyces* (Lacey, 1997; Peltola *et al.*, 2001).

2. Ecologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinobactéries. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (Mariat et Sebald, 1990). En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air (Reponen *et al.*, 1998).

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires présents dans une grande variété d'habitats en raison de leur grande capacité adaptative. On les retrouve dans le sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, le pollen, les abeilles mellifères, les plantes (endophytes), les lichens et plusieurs autres substrats, avec une préférence très nette pour le sol (Goodfellow et Williams 1983 ; Gonzàlez *et al.*, 2005 ; Khamna *et al.*, 2009 ; Kuang *et al.*, 2015, Shivilata et Satyanarayana, 2015).

Dans le sol, les actinobactéries représentent 80% de la population microbienne totale, ailleurs, dans les sols sahariens, les actinobactéries constituent 15 à 60% de la microflore tellurique. Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à un climat aride, se sont révélés riches en actinobactéries parfois réputés "rares" de par le monde, on les trouve non seulement dans les horizons de surface, mais aussi à plus de 2 mètres de profondeur et en quantité appréciable (Sabaou *et al.*, 1998). Les sols du Sahara Algérien, de par leur appartenance à des écosystèmes variés et particuliers, constituent un potentiel riche en actinobactéries. En effet, les sols des palmeraies ont montré une diversité plus importante que ceux par exemple des sols de la Mitidja (Badis, 1992). Les travaux de Boudjella en 1994 ont montré que les sols sahariens renferment un nombre appréciable d'actinobactéries rares, tels que *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardioipsis*, *Nonomuraea*, *Oerskovia*, *Planobispora*, *Saccharothrix*, etc. Presque tous les autres genres fréquents sont retrouvés aussi, comme *Streptomyces* (qui reste majoritaire), *Nocardia*, *Micromonospora*, etc...

La présence des actinobactéries dans les niches écologique les plus divers montre leur capacité physiologique à croître dans différentes et grande gamme de conditions physico-chimique. Ces capacités extraordinaires sont d'ailleurs exprimées dans le patrimoine génétique de ces bactéries. Cependant plusieurs rôles écologiques de ces bactéries sont encore méconnus (Gina *et al.*, 2016).

3. Morphologie

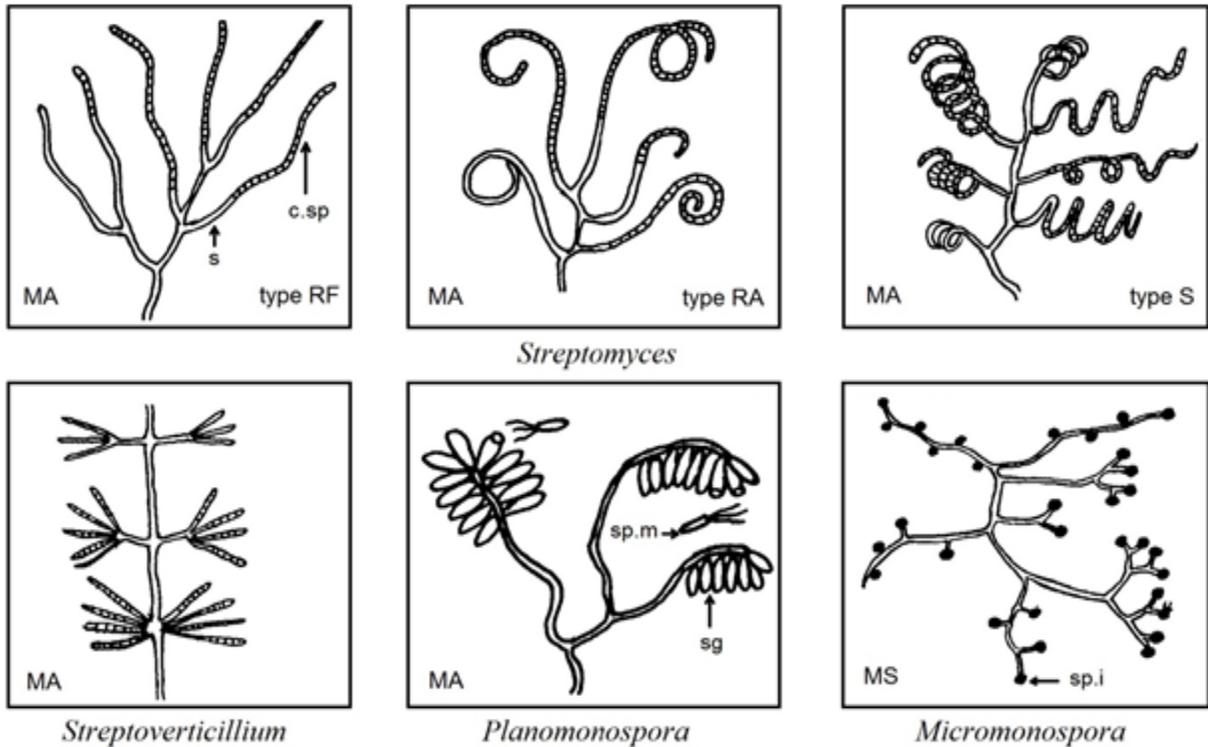
La plus part des genres sont des bâtonnets, non sporulant, de forme irrégulière, Ces bâtonnets peuvent être droits ou légèrement incurvés (Prescott, 2003). Morphologiquement, on peut les classés en deux groupes. Le premier forme seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium). Le second comprend des organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Merizig et Naami, 2015).

Les colonies formées par les actinobactéries sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques (figure 1) qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu
- Des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons (Aouar, 2012).

3.1.Types de spores

Les actinobactéries sont particuliers par la formation de différents types de spores, leurs différenciations rentrent dans leurs critères de classifications. Pour les streptomycètes filamenteuses, les spores sont disposées sur le mycélium aérien, les chaînes de spores peuvent être droites, flexueuses ou en spirales, leurs dispositions peut être en spores libres, ou attachés les unes aux autres pour atteindre jusqu'à 50 spores sur un seul hyphe ou dans des sacs appelés sporanges, cette formation peut résulter d'une segmentation ou désarticulation de ces hyphes (Hopwood, 2007).



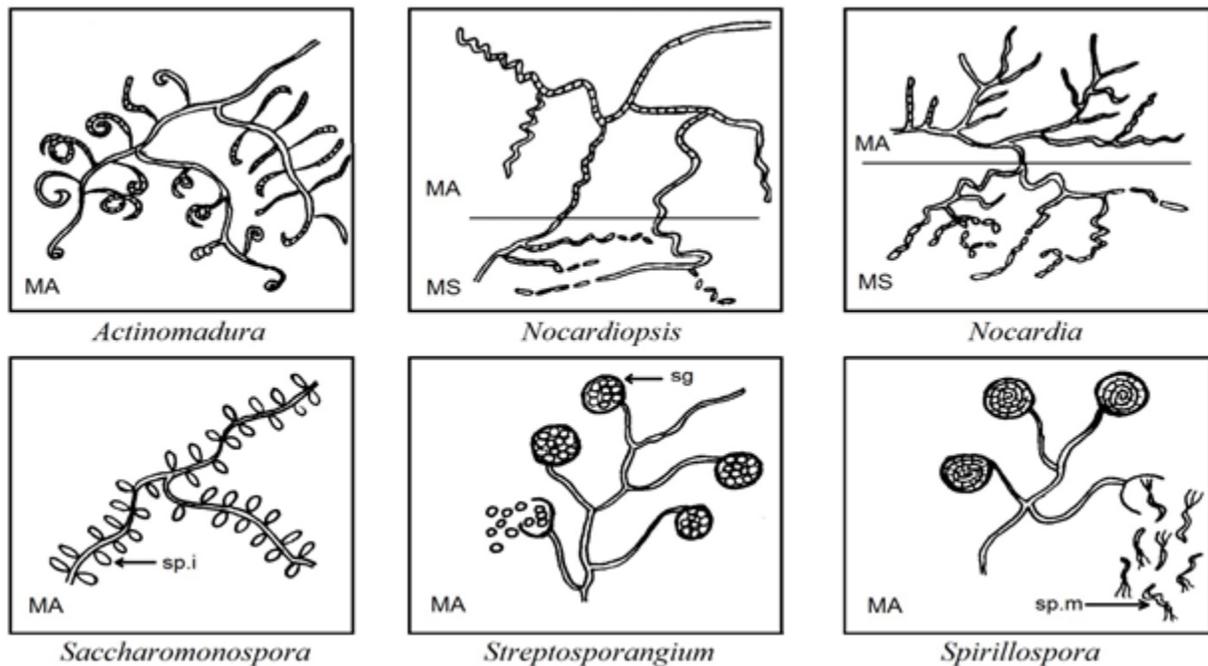


Fig 1. Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries(Sabaou, 1988).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c.sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolées; sp.m., spores mobiles; sg, sporanges.

4. Taxonomie

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le Manuel de Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, dont le plus récent comprend un volume en deux parties dédié aux *Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012).

Dans le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ème édition, qui partage les bactéries en 5 volumes :

Volume 1: The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic Bacteria.

Volume 2: The *Proteobacteria*.

Volume 3: The *Firmicutes*.

Volume 4: The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*),

*Acidobacteria, Fibrobactres, Fusobacteria,*Volume 5: The *Actinobacteria*

Dans le volume 5, le phylum *Actinobacteria* est divisé en 6 classes à savoir *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia*.

La classe *Actinobacteria* est à son tour divisée en 16 ordres qui sont *Actinomycetales*, *Actinopolysporales*, *Bifidobacteriales*, *Catenulisporales*, *Corynebacteriales*, *Frankiales*, *Glycomycétales*, *Jiangellales*, *Kineosporiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Incertaedis*.

Actuellement, il existe 4332 espèces, 427 genres, 66 familles et 21 ordres dans la classe des *Actinobacteria* (Schoch, 2020).

4.1. Critères d'identification des actinobactéries

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Badji, 2006 ; Smaoui, 2010).

4.1.1. Critères morphologiques

Badji, 2006 ; rapporte que les caractères morphologiques importants ont trait à la présence, le type (fragmenté ou pas) et la couleur du mycélium aérien (MA) et /ou le mycélium du substrat (MS), la présence ou non de sporophores sur le mycélium, la présence ou non de sporanges, de sclérotés ou de synnemata, la présence de spores, leur forme, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leur nombre et enfin, la production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS). Parfois, il est possible de classer une souche dans un genre donné en se basant sur des critères micromorphologiques tout à fait évidents et particuliers comme par exemple pour les genres : *Micromonospora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc.

4.1.2. Critères chimiques

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*,

Microtetraspora, *Nonomuraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Soccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.), nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (Boudjella, 2007).

Les critères chimiques combinés aux critères morphologiques, permettent de déterminer les genres et même les familles. selon (Lechevalier *et al.*, 1977), Les caractéristiques chimiques sont :

- détermination de la forme isomérique de l'acide diaminopimélique (DAP) (forme LL ou DL) et présence ou non de glycine dans la paroi cellulaire.
- Présence ou non dans les cellules entières de sucres taxonomiquement importants, tels que les couples «arabinose-galactose», «arabinose-xylose», «rhamnose-galactose» ou encore le madurose (3-méthyl-galactose).
- La composition des membranes cellulaires en lipides: les acides mycoliques, les phospholipides, les ménaquinones et les acides gras.

4.1.3. Critères physiologiques et biochimiques

La caractérisation porte en particulier sur la dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques et en plus, la résistance à certains antimicrobiens et la tolérance à des différentes valeurs de température, de pH, et de salinité (Lamari, 2006).

4.1.4. Critères moléculaires

Trois critères sont généralement étudiés :

4.1.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S :

L'analyse de l'ARNr 16S constitue un outil très rapide pour l'identification des espèces. Elle a été utilisée pour les groupes à un niveau supra-générique (Famille, Ordre et même Classe) (Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Richert *et al.*, 2005). Les techniques de base utilisées dans cette étude sont la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Dans ce cas, la partie de l'ADN génomique (ADNr), codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) en particulier 16S (d'une taille de l'ordre de 1600 paires de bases) est amplifiée par PCR, puis les séquences du produit sont alors déterminées. Les séquences obtenues des différents taxons sont soumis à des études de comparaisons (ou encore de phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques. Pour effectuer ces

genres d'études, plusieurs méthodes de calculs ont été mises au point et sont disponibles sous forme de programmes informatisés gratuits sur le Web (Molecular Evolutionary Genetics Analysis ; version 5 (MEGA 5), Philip, Clustal W, etc.).

Selon Kim *et al.*, (2014) lorsque le taux de similarité entre les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S de deux souches est inférieur à 98,65%, ces souches appartiennent à deux espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 98,65%, le placement de deux souches dans une même espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats de l'hybridation ADN-ADN.

4.1.4.2. Taux d'hybridation ADN/ADN

Tout comme l'analyse de l'ARNr, la réassociation ADN-ADN est utilisée de façon certaine pour l'identification des espèces en comparaison avec celles déjà décrites. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance (taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70 % (Wayne *et al.*, 1987; Wellington et Ul-Hassan, 2009).

4.1.4.3. Coefficient de Chargaff ou GC%

Grace au coefficient de Chargaff (G+C%), la définition des actinobactéries (dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55%) a été reconsidérée. Ceci a permis de différencier la lignée des actinobactéries de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram + (G+C inférieur à 55%). De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérés comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinobactéries (Stackebrandt et Woese, 1981 ; Stackebrandt et Schumann, 2006; Wellington et Ul-Hassan, 2009).

Selon Euzéby (2002) les souches bactériennes 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.

5. Importance des actinobactéries

La fonction écologique principale des actinobactéries au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (Prescott *et al.*, 2010). Grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases, etc. (Prakash *et al.*, 2012). En plus de leur rôle dans la décomposition de la matière organique, les actinobactéries sont connues pour leur production de substances biologiquement actives telles les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (Boer *et al.*, 2005).

D'après Anibou *et al.* (2008) une analyse a été réalisée sur le nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse indique que plus de 60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart ont été extraites à partir d'actinobactéries, tels que l'actinomycine D et la mitomycine.

ANTIBIOTIQUES

Les actinobactéries sont considérées comme des candidats potentiels pour la recherche de divers composés intéressants en industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, agricole et autres. Cependant, le plus grand intérêt des actinobactéries reste leur grande capacité à produire des antibiotiques qui peuvent potentiellement détruire ou inhiber divers microorganismes. D'ailleurs, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinobactéries (Figure 2) et plus précisément du genre *Streptomyces* (Sibanda *et al.*, 2010). Et plus de 70% des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (Gundliffe, 2006).

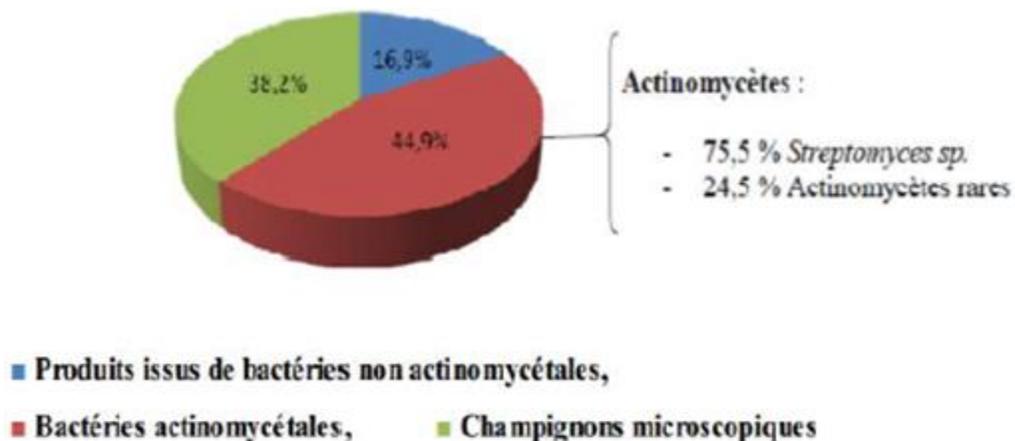


Fig 2. Origine des antibiotiques (Berdy, 2005).

Définition

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire des microorganismes (Coates et Hu, 2007). Selon Singleton. (1994) le mot antibiotique désigne tout produit qui, même de faible concentration, inhibe ou tue certains microorganismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large pour inclure en outre toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés.

Le terme désigne tout composé chimique élaboré par un microorganisme (ou produit par synthèse), dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes sensibles. On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (Prescot, 1995).

1. Classification :

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001). En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles (tableau 1), elles-mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les β - lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptidocycliques, etc.. (Smaoui, 2010).

2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries et leurs intérêts :

Selon Berdy *et al.*, 1987 et Berdy, 2005, les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries peuvent être appartenir aux familles et sous-familles suivantes: glucides et apparentés (glucides purs, aminoglycosides, glycolipides, etc.); lactones macrocyclines (macrolides, polyènes, macrolactames, etc.); quinones et apparentés (tétracyclines, benzoquinones, anthraquinone, anthracyclines, etc.); peptides et dérivés (homopeptides, hétéropeptides, peptolides, etc.); hétérocycles à azote et hétérocycles à oxygène, composés alicycliques (terpènes, oligoterpènes, etc.), aromatiques (composés benzéniques ou non) et aliphatiques

(dérivés des alcanes, dérivés des acides carboxyliques, composés contenant du soufre, du phosphore etc. (tableau 1))

Tableau 1. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Bérdy et *al.*, 1987).

Antibiotiques contenant des glucides	- Glucides purs	- Nojirimycine
	- Aminoglycosides gentamicine, kanamycine.	- Streptomycine,
Lactones macrocycliques	- Glycopeptides	- Vancomycine, ristocétine
	- Macrolides spiramycine	- Erythromycine,
	- Polyènes	- Nystatine, amphotéricine
Quinones et antibiotiques Apparentés	- Macrolactames	- Maytansine
	- Composés polycycliques linéairement accolés	- Tétracyclines
	- Anthraquinones	- Anthracyclines
	- Naphtoquinones	- Rubomycine
Acides aminés et peptides	- Benzoquinones	- Mitomycine, saframycine
	- Dérivés d'acides aminés	- Pénicilline, cyclosérine
	- Homopeptides	- Bacitracine
	- Depsipeptides	- Valinomycine
	- Lipopeptides	- Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	- Hétérocycles non accolés	- Mildiomycine
	- Hétérocycles condensés	- Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- Dérivés du furane	
	- Polyéthers	- Monensine
	- Composés benzéniques	- Chloramphénicol
Antibiotiques aromatiques	- Composés aromatiques condensés	- Griséofulvine
	- Autres dérivés	- Novobiocine
	- Dérivés du cyclo-alcane	- Cycloheximide
	- Terpènes	- Acide marasmique
Antibiotiques alicycliques	- Oligoterpènes	- Acide fusidique
	- Dérivés d'alcanes	- Elaiomycine
Antibiotiques aliphatiques	- Dérivés des acides carboxyliques	
	Aliphatiques	- Cérulénine
	- Composés contenant du phosphore	- Fosfomycine

Tableau 2. Exemples de molécules antibiotiques et microorganisme producteurs (Aboul-Enein et Ali, 2000).

<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomycine
<i>Streptomyces azureus</i>	Thiostreptone
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teicoplanine
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetine
<i>Nocardia mediterranei</i>	Rifamycine
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycine
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycine

Les antibiotiques issus des Actinobactériessont utilisés pour combattre les maladies infectieuses (tableau 3) et en élevage comme adjuvants pour l'alimentation animale en stimulant la croissance et en améliorant le rendement alimentaire ou en protégeant les jeunes en début d'élevage. C'est le cas des bambermycines utilisées chez le porc et les volailles. Et aussi ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine vétérinaire, comme l'ivermectine produite par *Streptomyces avermitilis*, qui est un anthelminthique (contre les nématodes chez les animaux) (Stapley et Woodruff, 1982).

Tableau 3. Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Chater, 2006).

Typhoïde	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Tuberculose et lèpre	Rifamycine	<i>Amycolatopsis</i> (<i>Streptomyces medeteranei</i>)
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	Vancomycine	<i>Amycolatopsis</i> (<i>Streptomyces orientalis</i>)
Cancer <i>coeruleorubidus</i>	Daunomycine	<i>Streptomyces</i>
Pathogènes résistants à la pénicilline	Acide clavularique	<i>Streptomyces clavulingerus</i>

ANTIBIORESISTANCE

Dès 1940, juste après la découverte de la pénicilline, Abraham et Chain avaient mis en évidence l'existence de résistance à cet antibiotique chez *E coli*. Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes. La fréquence de la résistance aux agents pathogènes microbiens continue de croître à un rythme alarmant partout dans le monde (Ravikumar *et al.*, 2010). Rappelons que la résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel. En effet, les bactéries vivant dans l'environnement d'autres organismes, comme des champignons ou autres bactéries qui synthétisent des substances antimicrobiennes, ne peuvent survivre et se multiplier qu'en développant des mécanismes de résistance à ces substances (AMCRA, 2020).

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par plusieurs mécanismes. Quelques espèces bactériennes sont résistantes de façon naturelle, à une ou plusieurs classes d'antibiotiques (Tenover, 2006). La résistance bactérienne aux antibiotiques est naturel ou acquis (Yala *et al.*, 2001).

1. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est présente chez toutes les souches d'une espèce bactérienne donné, par l'expression d'une protéine innée empêchant l'antibiotique d'accéder à sa cible, C'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosae* face à l'ampicilline (Madigan *et al.*, 2012).

2. La Résistance acquise :

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (Wright, 2007).

MICROORGANISMES CIBLES UTILISES

1. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est une coque à Gram positif, sphérique, de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, immobile, non sporulé, parfois encapsulé (Sperber et Tatini, 1975; Foster, 1996). Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Elles sont : indole (-), acétone (+) et uréase(+). Ces bactéries sont aéro-anaérobie facultative (Liesse Iyamba, 2012). La température optimale de croissance est de 37 °C et le pH optimal est de 7,5. *Staphylococcus aureus* est un pathogène d'origine alimentaire importante, et une cause majeure des intoxications alimentaires dans le monde. Il produit de nombreuses exotoxines, telles que les entérotoxines (SES), toxines exfoliatives A et B (ETA et ETB) (Dinges *et al.*, 2000).

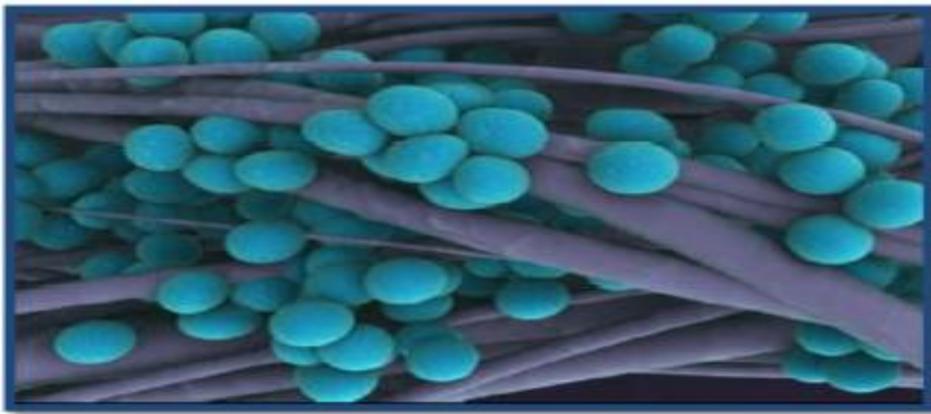


Fig 3. *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007).

2. Escherichia coli

Les espèces du genre *Escherichia coli* forment un groupe de bacilles à Gram négatif mobiles ou immobiles, de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles peuvent se multiplier à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5 (Brisabois *et al.*, 1997). *Escherichia coli* est un habitant du tractus intestinal des humains et des animaux, considéré comme un indicateur de contamination fécale dans les aliments. Elle peut être facilement diffusée dans différents écosystèmes à travers la chaîne alimentaire (Ryu *et al.*, 2012).

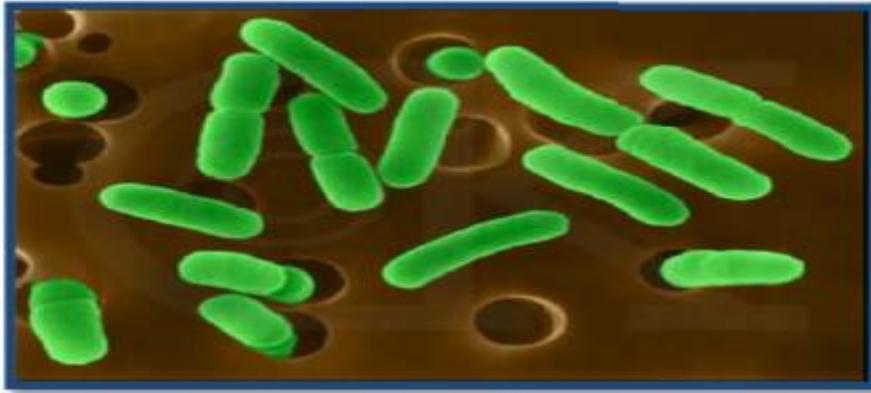


Fig 4. *Escherichia coli* vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement (Camille, 2007).

3. *Bacillus subtilis* :

Bacille à Gram positif, gros, droit, mobile par des cils péritriches, capsulé, en forme de bâtonnets de $2\mu\text{m}$ de diamètre et dont la longueur peut atteindre $7\mu\text{m}$, formant des spores ellipsoïdales ou cylindriques en position centrale, paracentrale ou subterminales dans le corps bactérien. Elle peut croître entre 10 et 55°C avec un optimum entre 28 et 30°C . La croissance se fait à pH entre 5.5 et 8.5 . Des valeurs de pH élevées peuvent être tolérées (Bouhairi, 2017). C'est une bactérie aérobie pouvant se développer en anaérobiose par fermentation en présence de nitrate comme accepteur final d'électrons (Nakano *et al.*, 1997). Elle est une Bactérie antagoniste de nombreux champignons pathogènes et utilisé comme moyen de lutte biologique contre de nombreuses cultures et particulièrement contre la pourriture grise des vignes (Sonenshein *et al.*, 2002).

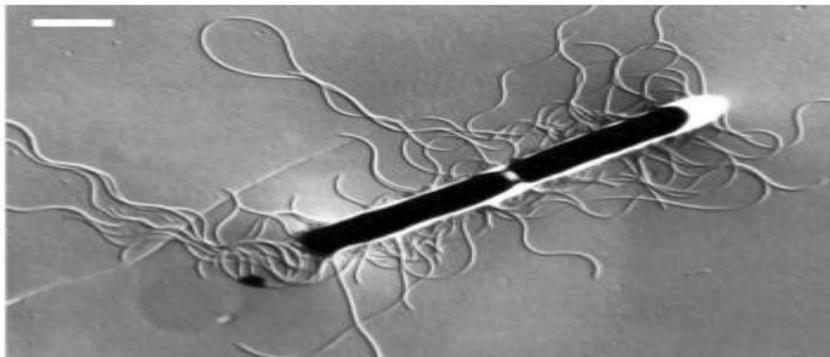


Fig 5. Image prise par microscopie électronique de *Bacillus subtilis* (Luis, 2008).

4. *Candida albicans*

Cette levure vit à l'état saprophyte dans le tube digestif humain où elle est présente dès les premiers mois de la vie, transmise par contact maternel (Agbo-Godeau et Guedj, 2005). Elle existe sous la forme d'éléments unicellulaires bourgeonnants ou d'un pseudo-mycélium (Feigin et Cherry, 2004). Certaines conditions favorisent son passage à un stade pathogène (Bonn et Blanc, 2008 ; Hopp et Blatensweiler, 2009).

L'infection découle habituellement de la prolifération opportuniste du microorganisme, lorsque la flore normale est détruite par des antibiotiques à large spectre ou par d'autres facteurs (humidité, pH acide, personnes immunodéprimées) (Regnault, 2002).

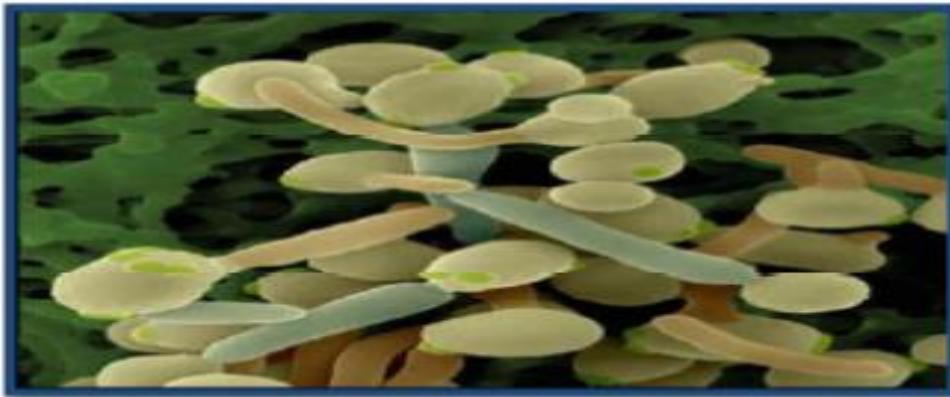


Fig 6. *Candida albicans* vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007).

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

1. Isolement des actinobactéries du sol

A partir des palmeraies de deux régions de Ghardaïa (Metlili et Berriane), un prélèvement de chaque région a été réalisé dans des conditions d'asepsie. Après avoir écarté les trois premiers centimètres de la couche superficielle du sol. Une quantité (100g) de sol rhézosphérique a été prélevée aseptiquement à une profondeur d'environ 15 à 20 cm à l'aide d'une grande cuillère stérile. Après écartement des gros débris, ces échantillons ont été séchés à l'air ambiant et broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre. Ensuite, sont déposés dans des bocaux préalablement stérilisés et immédiatement conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation après les avoir apportés au laboratoire (Pochon et Trdieux, 1962).

1.1. Prétraitement des échantillons

- **Le premier prétraitement (T1)** Consiste à chauffer dix grammes de chaque échantillon à 60°C pendant 60 minutes (Takizawa *et al.*, 1993).

- **Le deuxième prétraitement (T2)** consiste à traiter 1 g de sol de chaque échantillon avec 0.1 g de CaCO₃. Le mélange est mis dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant sept jours à 30°C (El-Nakeeb et Lechevalier, 1963).

1.2. Milieu d'isolement et agents sélectifs

Le milieu utilisé pour l'isolement des actinobactéries est le milieu chitine-vitamines B agar (ChVB) préconisé par Hayakawa et Nonomura (1984) ; sa composition est donnée en annexe 2. L'utilisation d'agents sélectifs antibactériens à des concentrations précises au milieu CH-V a donné des résultats positifs pour la sélection des souches de *Streptomyces* et d'autre genres qui sont rares de par le monde (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998). En nous inspirant de ces résultats, nous avons donc utilisé trois antibiotiques: streptomycine (10 mg/L) et pénicilline et chloramphénicol (25 mg/L).

Pour empêcher la croissance des champignons, souvent invasifs, le milieu est amendé d'un antifongique, cycloheximide, à 50 mg/L.

1.3. Technique d'ensemencement et conditions d'incubation

Deux suspensions mères ont été préparées après avoir mis un gramme de chaque échantillon de sol Metlili (M) et Berriane (B) dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile et agitées au Vortex pendant cinq minutes. Quatre dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) ont été réalisées pour chaque échantillon.

Une solution d'antifongique (cycloheximide 50mg/L) est stérilisée par filtration sur membrane type millipore (de 0,22 μm de porosité) est ajouté pour tous les milieux même témoin. Les antibiotiques et l'antifongique sont ajoutés aseptiquement au milieu d'isolement en surfusion (après autoclavage).

Des aliquotes de 0,1 mL de chaque dilution des deux échantillons sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement avec cycloheximide, mais sans agents sélectifs pour le témoin (T), et avec l'un des trois antibiotiques utilisés pour les autres boîtes de Pétri. Deux essais sont effectués par dilution. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C et examinées régulièrement du 7^{ème} au 21^{ème} jour.

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinobactéries, l'ensemble des colonies isolées sont observées sous microscope optique (Leica DMLS) grossissement x10 et x40 (Williams et Cross, 1971).

1.4. Purification des souches

Parmi un grand nombre des isolats d'actinobactéries, poussant sur le milieu CH-V avec la présence ou pas des antibiotiques sélectifs, 90 isolats sont choisis en se basant sur des critères morphologiques : (45 colonies de l'échantillon de Metlili et 45 de l'échantillon Berriane). Toutes ces colonies sont observées au microscope optique aux grossissements 100 et 400. Les différentes colonies sélectionnées sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, puis sont déposées et purifiées par stries sur le milieu ISP2. Le repiquage est répété jusqu'à l'obtention de l'isolat pur. L'incubation est faite à 30°C pour une durée de 15 à 21 jours. Les boîtes sont ensuite conservées à 4°C dans le réfrigérateur du labo.

Le protocole général suivi pour l'isolement d'actinobactéries est présenté dans la figure 7.

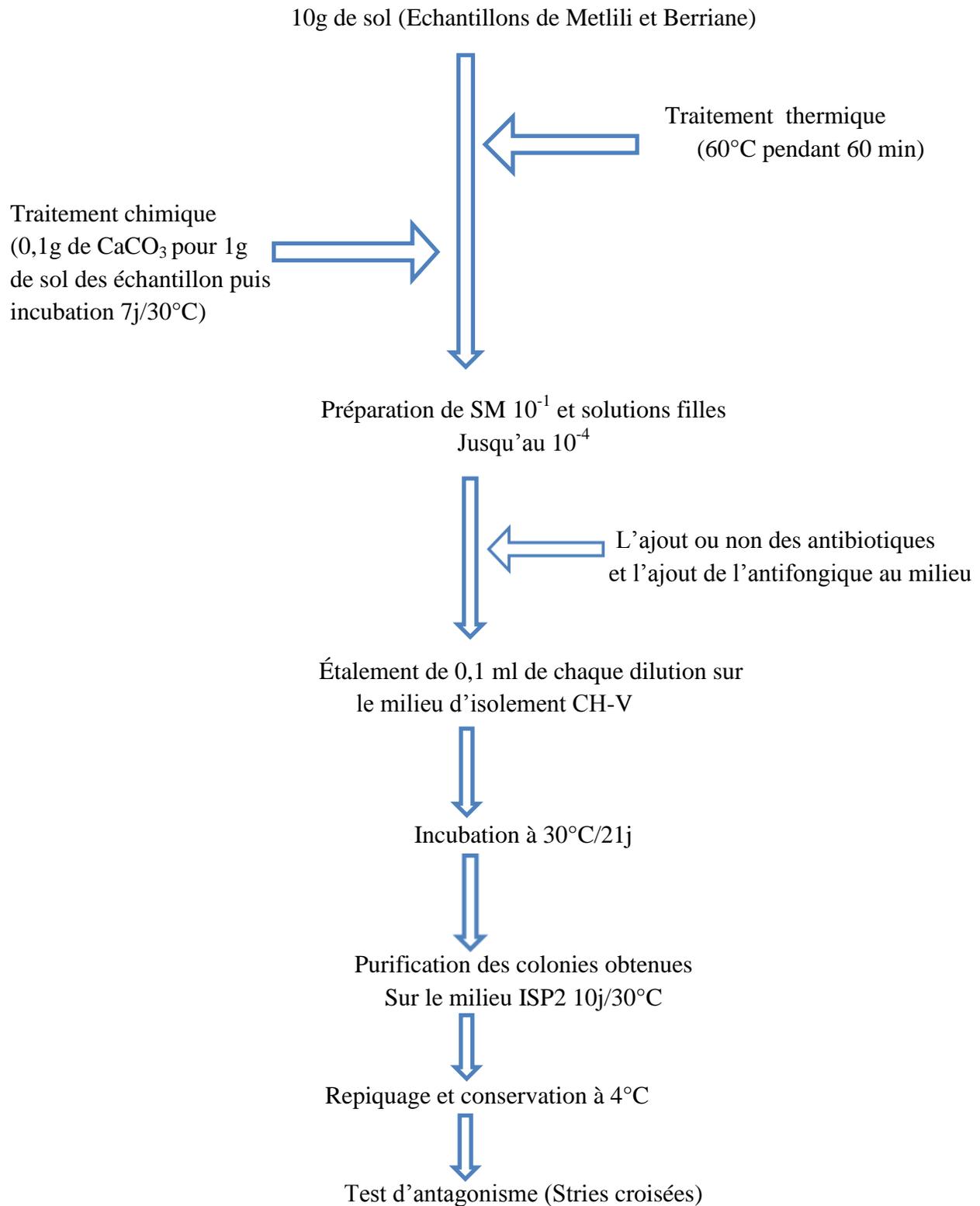


Figure 7. Protocole d'isolement des actinobactéries à partir de sols de la région de Ghardaïa

2. Etude des propriétés antagonistes

2.1. Germes cibles

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries, quatre souches tests ont été utilisées. Deux souches sont des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* ATCC699), Une souche est une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC25922) plus une levure (*Candida albicans* ATCC10231). Ces souches tests sont obtenues aimablement par nos chers professeurs M^{lle} Djemouai N. et M. Ben bekhti Z.

2.2. Méthode de stries croisées

Le but de cette étude est de sélectionner parmi les isolats, ceux présentant une activité antibiotique intéressante contre les germes-cibles

L'activité antimicrobienne de 57 isolats obtenus après l'étape de purification, est évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu solide ISP2 ; Cette méthode consiste à ensemencer les souches d'actinobactéries à tester sous forme d'un seule trait à la surface du milieu solide ISP2 en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 10 jours à 30°C, les souches cibles sont ensemencées perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et la levure respectivement. La lecture des résultats s'effectue en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures des souches cibles et l'isolat d'actinobactérie.

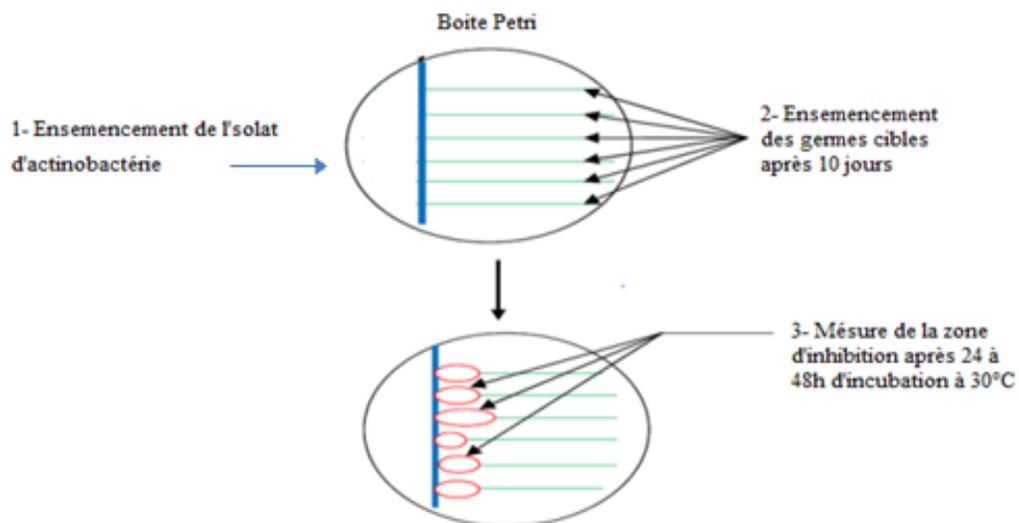


Figure 8. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode de stries croisées (Boubtra *et al.*, 2013)

CHAPITRE III

Résultats et discussions

Résultats

1. Isolement des actinobactéries

L'isolement des actinobactéries à partir des deux échantillons de sols sahariens de la région de Ghardaïa a été réalisé en utilisant le milieu ChVB (exempt de vitamine). Ce milieu additionné ou non d'agents sélectifs s'est révélé favorable pour la sélection des actinobactéries (Boudjella, 1994). Au cours de l'incubation, les boîtes ont été examinées à l'œil nu et aussi au microscope optique. Les colonies qui ont montré, les caractéristiques morphologiques des actinobactéries, en particulier la formation du mycélium aérien et du mycélium de substrat avec des filaments très fins, sont considérées comme des actinobactéries (Figure 9).

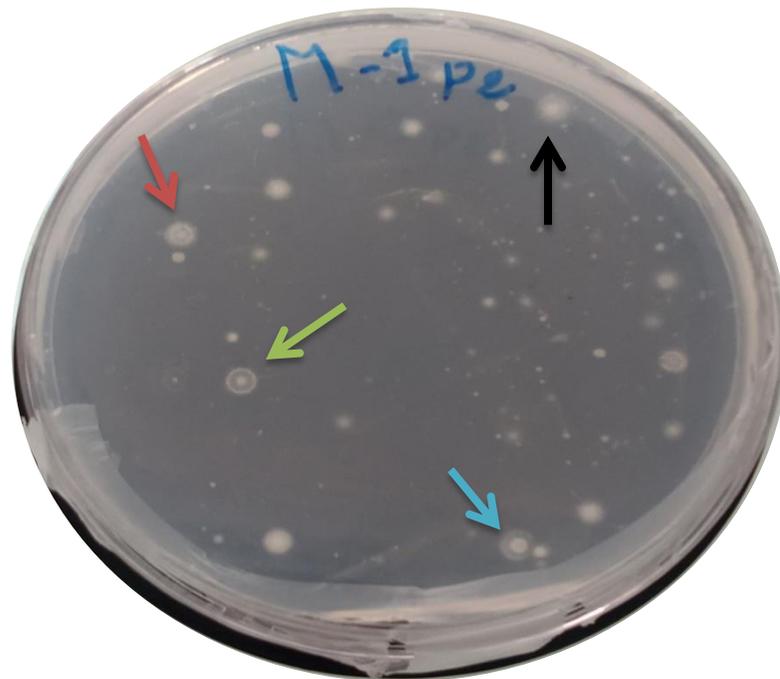


Figure 9. Aspect macromorphologique des colonies d'actinobactéries isolées de sol de la région de Metlili sur le milieu ChVB (photo originale).

Note : Les flèches indiquent quelques colonies d'actinobactéries après 21 jours d'incubation à 30°C.

2. Purification

Après 21 jours d'incubation (période nécessaire pour la croissance des actinobactéries), 90 colonies ont été choisies en se basant sur des critères morphologiques (observation à l'œil nu et au microscope photonique (Zeiss) aux grossissements 100 et 400). Afin de les purifier, ces

colonies ont été transférées et ensemencées par la méthode d'épuisement sur un nouveau milieu ISP2. Parmi les 90 colonies, seuls 57 isolats (tableau 4) ont pu croître et ont présenté les caractéristiques macros et micro morphologique des actinobactéries. Selon la couleur du mycélium aérien nous avons pu diviser ces isolats en 4 groupes (Figure 10).

Groupe 1: est constitué de 30 isolats (soit 52,6 %) avec un MA blanc.

Groupe 2: regroupe 17 isolats (soit 29,8%) avec un MA brun.

Groupe 3: contient 9 isolats (soit 15,7%) ayant un MA rouge-orangé

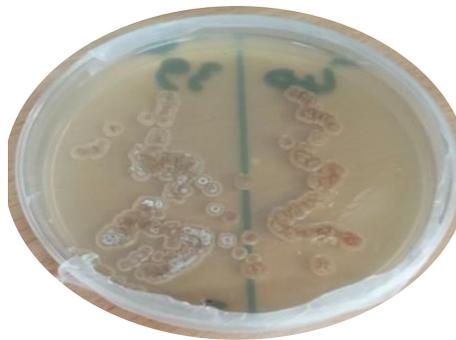
Groupe 4: comprend un seul isolat (1,8%) qui a un MA vert-grisâtre.



MA rouge-orange / MA blanc



MA vert-grisâtre



MA brun

Figure 10. Mycélium aérien des souches d'actinobactéries isolées (photos originales).

Tableau 4. Isolats d'actinobactéries provenant des deux échantillons de sol (M et B).

Couleur du MA	Echantillon de sol de :		Total
	Metlili	Berriane	
Blanc	M5, M6, M10, M12, M17, M18, M21, M24, M25, M26, M29, M30	B ⁷ , B1, B3, B4, B7, B8, B11, B12, B13, B18, B27, B28, B30, B32, B35, B36, B38, B39	30
Brun	M1, M9, M14, M15, M27, M28, M37, M39, M40	B5, B6, B14, B16, B17, B37, B40, B41	17
Rouge-orangé	M2, M13, M19, M20, M20, M22	B15, B29, 31	9
vert-grisâtre	/	B24	1
Total	27	30	57

Note : MA=Mycélium Aérien, B=Berriane ; M=Metlili.

3. Evaluation du potentiel d'antagonisme des actinobactéries :

Tous les 57 isolats ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes par la méthode de stries croisées (figure 11) qui donne une idée générale sur la potentialité d'activité antimicrobienne des isolats (Boubetra *et al.*, 2013). Cette méthode a permis de détecter l'effet inhibiteur des isolats d'actinobactéries vis-à-vis 4 souches tests des germes cibles utilisés. Parmi les 57 isolats testés par cette méthode, 21 ont présenté des activités antibactériennes soit (36%). Cependant, l'activité contre la levure *Candida albicans* est nulle chez tous les isolats.

Les valeurs d'activité des 21 isolats contre les germes tests utilisés sont illustrées dans le tableau 5.

Tableau 5. Activité antagoniste des isolats d'actinobactéries sélectionnés.

Isolats actifs	Diamètre d'inhibition contre les germes-cibles en mm			
	<i>E.c</i>	<i>B.s</i>	<i>S.a</i>	<i>C.a</i>
B36	2.5	16	00	00
B36'	07	08	19	00
B35	04	16	02	00
B4	03	00	00	00
B32	00	12.5	02	00
B20	10	08	11	00
B39	9.5	06	11	00
M24	01	02	11	00
M17	03	02	00	00
M3	4.5	7.5	06	00
B28	00	02	03	00
B35	02	01	06	00
B12	15	11	16	00
B15	01	06	00	00
B13	01	00	00	00
M7	00	02	03	00
M26	04	05	7.5	00
B42	03	09	11	00
B6	8	02	05	00
M5	03	01	6	00
M6	01	01	03	00

Note : E.C: *Escherichia coli*, B.S: *Bacillus subtilis*, S.A: *Staphylococcus aureus*, C.A: *Candida albicans*

D'après ce tableau, deux tiers des isolats actifs sont provenus de l'échantillon du sol de Berriane (soit 14 isolats). Tandis que, le tiers qui reste est provenu de L'échantillon du sol de Metlili (soit 7 isolats).

Les résultats ont montré que tous les isolats ont présenté une activité moyenne à faible contre la souche test *E. coli* sauf les deux isolats M7 et B32 ayant une activité nulle. La meilleure valeur d'activité contre cette souche a été obtenue par l'isolat B12, il s'agit de 15mm de diamètre (figure 11). Presque les mêmes remarques ont été enregistrées contre la souche test *Bacillus subtilis*. Cependant, les meilleurs isolats actifs dans ce cas sont B32, B35 et B36 avec les diamètres d'inhibition suivants : 12,5 ; 16 et 16mm successivement. Les deux isolats B4 et B13 ne sont pas actifs contre cette souche. En ce qui concerne l'activité contre *Staphylococcus aureus*, nous avons remarqué une augmentation du nombre des isolats sans activité, il s'agit de B36, B4, M17, B13 et B15. Par contre, les isolats les plus actifs sont B36' et B12 avec les diamètres d'inhibition 19 et 16mm successivement. Le reste des isolats, leurs activités oscillent entre 2 et 11mm de diamètre.

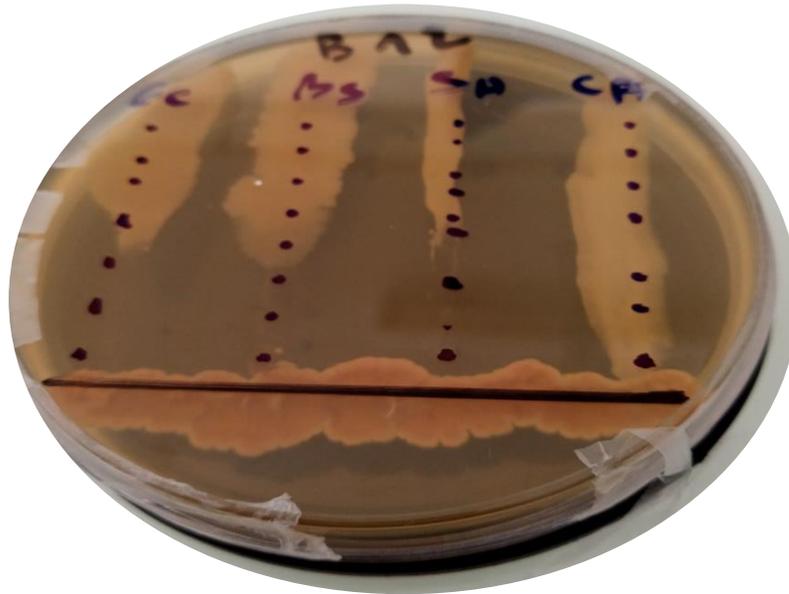


Figure 11. Activité antimicrobienne de la souche B12 (photo originale).

E.C: *Escherichia coli*, B.S: *Bacillus subtilis*, S.A: *Staphylococcus aureus*, C.A: *Candida albicans*

Discussion

Notre objectif de travail était l'isolement des souches d'actinobactéries ayant une activité anti-microbienne à partir de sols de la région de Ghardaïa. Le choix de cette région est justifié par les résultats obtenus des travaux effectués auparavant par Sabaou *et al.* (1992) ; Meklat, (2012) ; Aouiche *et al.* (2014: 2015) ; Driche *et al.* (2015) ; Belghit *et al.* (2016) lesquelles ont montré la richesse des sols de Ghardaïa en actinobactérie et ont révélé la grande capacité des isolats récoltés à produire des molécules antimicrobiennes intéressantes. L'isolement des actinobactéries productrices de substances bioactives à partir des écosystèmes extrêmes nécessite une méthode de performance pour leur sélection qui doit passer par l'élimination d'autres microorganismes, qui par leurs facultés d'envahissement, gênent la croissance des actinobactéries. Le prétraitement thermique ou chimique au carbonate calcium rend le milieu moins favorable à la croissance des bactéries autres que les actinobactéries et donc minimise les contaminants (Nonomura et Ohara, 1969 ; Cavalla et Eberlin, 1994). Dans ce but, nous avons traité nos échantillons par un prétraitement thermique à 60°C pendant 60min et un prétraitement chimique en carbonate calcium (CaCO₃).

L'isolement des actinobactéries a été réalisé en utilisant le milieu ChVB préconisé par Hayakawa et Nonomura (1987) additionné ou non d'agents sélectifs. Celui-ci a été adopté en se basant sur des travaux antérieurs effectués par plusieurs chercheurs (Boudjella, 1994; Meklat, 2012) qui ont confirmé sa préférence pour l'isolement des actinobactéries. En effet, ce milieu à base de chitine a permis aux actinobactéries (connues pour leur croissance relativement lente) de mieux s'exprimer et de croître par rapport aux bactéries non mycéliennes et aux champignons. La chitine est un substrat très difficile à dégrader et favorable à la croissance plus ou moins sélective des actinobactéries lesquelles l'utilisent comme source de carbone et d'azote à la fois, en produisant des chitinases (Domergues et Mangenot, 1970). L'addition des antibiotiques antibactériens tels que la streptomycine, la pénicilline et le chloramphénicol permet d'éliminer ou de diminuer fortement le nombre de bactéries non mycéliennes indésirables et le cycloheximide (antifongique) empêche la croissance des champignons (Sabaou *et al.*, 1998 ; Driche., 2010).

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté une différence importante du nombre de colonies d'actinobactéries isolées à partir des deux échantillons : Berriane et Metlili. Ainsi, le plus grand nombre des colonies isolées est observé dans les boîtes de Petri obtenues à partir de

l'échantillon des palmeraies de Berriane. Selon Lee et Hwang (2002), trois facteurs écologiques sont les plus importants qui influent sur le nombre et la diversité des actinobactéries dans le sol sont : le pH, la matière organique et l'humidité. D'autre facteur sont aussi important comme la température du sol, le type du sol, la végétation et l'emplacement géographique...etc. (Adegboye *et al.*, 2012).

Au total 90 isolats ont été sélectionnés morphologiquement (macro et micro-morphologiquement) parmi un grand nombre d'actinobactéries mis en évidence. Les colonies d'actinobactéries sont reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat (Boudemagh, 2007). Après leur purification sur le milieu ISP2, il y a que 57 isolats ayant pu pousser. Tous ces isolats ont fait l'objet d'un screening de production des antibiotiques sur le milieu solide ISP2 en utilisant la méthode des stries croisées. Les résultats obtenus ont révélé la production d'antibiotiques antibactériens chez 21 isolats parmi les 57 (soit 36%). Ce pourcentage est inférieur à celui obtenu par Allik, (2013) (61%) et supérieur à celui obtenu par Boudemagh. (2007) (7,4%). Mais, comme nos isolats ont été choisis parmi un grand nombre d'actinobactéries, notre pourcentage n'a pas une grande signification car il ne représente pas la totalité des actinobactéries.

Il s'est avéré que le sol des palmerais de Berriane est le plus riche en actinobactéries actives avec un pourcentage de 66%, par rapport au sol des palmerais de Metlili où le taux d'activité était 33%. D'après Kattere et Andren (2001), le nombre et l'activité des microorganismes changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs.

Les résultats obtenus d'antagonisme ont montré que la souche B12 est la plus performante. En effet, elle a des diamètres d'inhibition contre toutes les souches tests bactériennes à savoir : 16mm contre *S aureus*, 15mm contre *E coli* et 11mm contre *B subtilis*. Deux souches B35 et B36 sont plus actives contre *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 16mm pour chacune. La souche B36' est la plus active contre *S aureus* (19mm d'inhibition). En général, nous avons remarqué que l'activité antagoniste des germes cibles à Gram positif est plus ou moins importante que celle contre le germe cible à Gram négatif. Selon Sateesh *et al.* (2011), les

bactéries à Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de natures lipopolysaccharidiques (LPS). Ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace. Plusieurs études ont montré la même chose. A titre d'exemple, Cwala *et al.* (2011) ont testé l'activité antimicrobienne de l'extrait brut de quatre espèces appartenant à trois genres d'actinobactéries. Les résultats trouvés indiquent que les extraits sont plus actifs sur des bactéries à Gram positif que sur des bactéries à Gram négatif.

En ce qui concerne l'activité des isolats contre la souche test levurienne *Candida albicans*, celle-ci est apparue très résistante. Car, une absence totale d'activité a été enregistrée pour toutes les actinobactéries contre cette souche. Il est à noter que certains genres ou espèces de levure ou champignon peuvent être naturellement plus résistants à un agent antifongique que d'autres genres ou espèces, à cause de leurs différences anatomiques et/ou moléculaires (Gauthier, 2007). Outre, parmi les molécules à activité antimicrobienne, la gamme des antifongiques est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens (Domenico, 1999). Les travaux de Hacène *et al.* (1994), démontrent que 11,18 % de l'ensemble des actinobactéries isolées du Sahara Algérien ont une activité antifongique. Les travaux de Belghit, (2010) confirme également les mêmes résultats. En effet, sur 171 souches d'actinobactéries isolées des sols Sahariens, il y a que 5 souches ayant une activité contre *Candida albicans*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour objectif, la recherche d'actinobactéries présentant une activité antimicrobienne à partir de sols des palmerais de la région de Ghardaïa. Deux échantillons de sols de (Metlili et Berriane) ont été choisis et prélevés pour l'isolement. Ainsi, le milieu ChVB (exempt de vitamine) additionné ou non d'antibiotiques sélectifs a permis d'isoler parmi un grand nombre d'actinobactéries 57 isolats. Le screening d'activité antimicrobienne réalisé par la méthode de stries croisées sur tous ces isolats a montré la présence de 21 isolats (soit 36%) entre eux ayant une activité antagoniste contre les souches tests utilisées. Les isolats ayant montré une activité importante sont : B32, B35, B36, B36' et B12. L'isolat B12 a présenté une bonne activité contre tous les germes cibles bactériens. Une absence totale de l'activité pour tous les isolats a été remarquée contre le germe cible *Candida albicans*.

En réalité, nous aurions aimé terminer la suite de notre travail mais la crise sanitaire du Covid 19 nous a fait une entrave.

Compte tenu de nos résultats préliminaires obtenus, plusieurs perspectives peuvent être proposées pour les isolats les plus intéressantes à savoir :

- Poursuivre l'identification morphologique, chimique, biochimique, physiologique et moléculaire (séquençage de l'ADNr 16S).
- Déterminer la cinétique de production des antibiotiques sur milieux liquides
- Etudier la stabilité des activités antimicrobiennes
- Réaliser l'extraction des antibiotiques avec des solvants de polarité différente et déterminer les meilleurs solvants d'extraction.
- Effectuer la semi purification des fractions actives par CCM et la détermination de leurs localisations par révélation microbiologique.
- Faire la purification finale des antibiotiques par HPLC.
- Réaliser l'étude spectroscopique (UV-visible, infrarouge, Spectrométrie de masse et RMN) pour les produits actifs purs et la détermination de leurs structures chimiques.

*Références
bibliographiques*

Référence bibliographique

- **Aboul-enein, H. Y., Ali, I. (2000).** Marcocyclic Antibiotics As Effective chiral Selector Resolution by liquid chromatography and capillary Electrophoresis. *Chromatographia*. 52, 679-691.
- **Abraham, E. P. et Chain, E. (1940).** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837-837.
- **Adegboye, M. F., Babalola, O. (2012).** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research*. 7. N° 15. 2255-2261.
- **Agbo-Godeau, S. Guedj, A. (2005).** Mycoses buccales. *EMC-Stomatologie* 1:30-41.
- **Aggoune-Khinache, N., Bensorsa, D., Henniche, F. Z., Daoudi, M., Abdouni, MA., Chabani, A., Tiouit, D. et Naim, M. (2008).** Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 39, 413-414.
- **Allik, M. L. (2013).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques « Essai d'identification phénotypique et chimiotaxonomique ». Mémoire de Master: Biotechnologie Microbienne : Université A. MIRA de Bejaia.
- **AMCRA (Antimicrobial Consumption et Resistance in Animals). (2020).** Antibiotiques et antibiorésistance. <https://www.amcra.be/fr/antibiotiques-et-antibioresistance/>. Consulté le 16/09/2020.
- **Anibou, M., Chait, A., Ziad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y. et Benherref, A. (2008).** Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *Jornal mondial de microbiologie et biotechnologie*. 24, 2019–2025p.
- **Aouar, L. (2006).** Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Mémoire de magister : Microbiologie appliqué constantine, Algérie.
- **Aouar, L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat : Sciences En Biochimie et Microbiologie Appliquées : Université Mentouri-Constantine. 218p.

- **Aouiche, A., Bijani, C., Zitouni, A., Mathieu, F. et Sabaou, N. (2014).** Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces spp.* PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal de Mycologie Médicale*. 24 (2):17–23.
- **Aouiche, A., Bouras, N., Mokrane, S., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N. et Klenk, H. (2015).** *Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 107 (1): 291–296.
- **Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Matamoros, S., Melles, D. C., Penders, J., de Jong, M. D., et Schultsz, C. (2016).** Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 147-149.22.
- **Araujo-Melo, R. D. O., Igor, F. A. C., Maria, C. V., Janete, M., Kêsia, X. R. F., Luana, C. B. B. et Coelho, L. C. (2016).** Actinobacteria : Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application. *British Biotechnology Journal*. vol 15(4).
- **Badis, A. (1992).** Les actinomycètes du sol de la Mitidja: détermination des espèces, distribution écologique et aptitude à la dégradation des acides humiques. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 173p.
- **Badji, B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226p.
- **Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E. et Tillequin, F. (2007).** Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea sp.* NM94. *J. Ind. Microbiol.*, 34: 403-412.
- **Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. et Sabaou, N. (2006).** Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura sp.*, AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, 52: 373-382.
- **Bakour, S., Olaitan, A. O., Ammari, H., Touati, A., Saoudi, S., Saoudi, K., et Rolain, J. M. (2015).** Emergence of colistin-and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 279-285.
- **Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., et van Wezel, G. P. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

- **Belghit, S. (2010).** Recherche dans les sols sahariens algériens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans*. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 94 p.
- **Belghit, S., Driche, E.H., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Badji, B. et Mathieu, F. (2016).** Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi. Journal de Mycologie médicale, (26) : 160-169.
- **Berdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58: 1-26.
- **Berdy, J., Aszalos, A., McNitt, K. L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- **Berrazeg, M., Hadjadj, L., Ayad, A., Drissi, M., et Rolain, J. M. (2016).** First detected human case in Algeria of mcr-1 plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(11), 6996-6997.
- **Boer, W. D., Folman L. B., Summerbell, R. C. et Boddy, L. (2005).** Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiol. 29:795-811.
- **Bonn et Blanc J.M. (2008).** Annales de dermatologie et vénéréologie, Item 87-Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : *Candida albicans*.135(115):42-48.
- **Boubetra, D., Sabaou. N., Zitouni. A., Bijani, C., Lebrihi, A., et Matieu, F., (2013).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a saharan soil. Micrological Research. 186, 223-230.
- **Boudemagh, A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine, Algérie, 128p.
- **Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. et Sabaou, N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research, 161 (4), 288-298.
- **Boudjella, H. (1994).** Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177p.

- **Boudjella, H., Laamari, L., Bouti, K., Sabaou, N. (2014).** Activité antilevurienne d'une souche d'actinobactérie appartenant au genre *streptosporangium* et isolée d'un sol saharien. Algeria journal of arid environment, 2 :3-18.
- **Boudjella, H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger). pp177.
- **Bouhairi, S. (2017).** *Bacillus subtilis* : Caractère et Application. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-RABAT. 91p.
- **Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M. F. (1997).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 16(1) : 452-471.
- **Camille, D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, 476 pages. (p 320,341, 296,248, 250, 358,359).
- **Cavalla, M., Eberlin, T. (1994).** Isolement des *Streptomyces* du sol. L'opéron XIX, 13 17.
- **Chater, K. F. (2006).** *Streptomyces* inside out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Phil. Trans. R. Soc. B, 361, 761–768p.
- **Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., et Shrivastava, S. (2013).** Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(8 SUPPL).
- **Coates, A. et Hu, Y. (2007).** Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. Brit. J. Pharmacol. 152: 1147-1154.
- **Currie, C. R. (2016).** Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and Their Bioenergy Applications. Annual Review of Microbiology, 70(1), 235–254.
- **Cwala, Z., Igbinsola, E. O., Okoh, A. I. (2011).** Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Vol. 5. N°: 2. Pp118-124.
- **Di Domenico, B. (2012).** Novel Antifungal drugs. curropin Microbial, (2):509-515.
- **Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M., (2000).** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews, 13: 16–34.

- **Dommergues, Y. et Mangenot, F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.
- **Driche, E. (2010).** Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Thèse de Magister en microbiologie, ENS de Kouba.
- **Driche, E. H., Belghit, S., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Badji, B. (2014).** A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*, (65): 1341-1350.
- **El-Nakeeb, M. A. et Lechvalier, H. A., (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 11. 75-77.
- **Euzeby, J. P. (2002).** List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- **Feigin, R. D., et Cherry, J. (2004).** Text book of paediatric infectious diseases, 5th Edition, V. B. Sanders company. Canada.
- **Foster, T. (1996).** *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- **Gauthier, C. (2007).** Étude structure-fonction des transporteurs ABC de *Candida albicans* impliqués dans la résistance aux agents antifongiques. Thèse de Doctorat. P 29.
- **Genne, D., Siegrist, H. (2003).** De l'antibiogramme à la prescription d'un Antibiotique. *Forum Med Suisse*. 20; 464-468.
- **Gina, R. L., Carlos, C., Chevrette, M., Horn, H., McDonald, B., Stankey, R., Fox, B.,**
- **González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. et Genilloud, O. (2005).** Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*. 54: 401–415.
- **Goodfellow, M. et Williams, S. T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:189-216.
- **Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., Withman, W. B. (2012).** *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria* (2^{ème} Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083p.

- **Gundliffe, E. (2006).** Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 500-506.
- **Hacène, H., Sabaou, N., Bounaga, N. et Lefebvre, G. (1994).** Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios*, 79, 81-85.
- **Hayakawa, M. et Nonomura, H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, 65, 501-509.
- **Hayakawa, M., Nonomura, H. (1984).** HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japon.p. 6.
- **Hopp, U., Baltensweiler, J. (2009).** Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses Moniliases ou Monilioses, causes et facteurs de risque. France.
- **Hopwood, D. A. (2007).** *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press.
- **Janaki, T. (2017).** Enzymes From *Actinomycetes*. *International Journal of Chem. Tech. Researc.*, 10(2): 176-182.
- **Kattere, T., Andoren, O. (2001).** The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass dynamics-descriptions and application examples. *Ecol Model*, 136 (2-3): 191–207.
- **Khamna, S., Yokot, A. et Lumyong, S. (2009).** *Actinomycetes* isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 649-655.
- **Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. et Chun, J. (2014).** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64 (2): 346-351.
- **Kuang, W., Li, J., Zhang, S. et Long, L. (2015).** Diversity and distribution of *Actinobacteria* associated with reef coral *Poritelutea*. *Front. Microbiol.*6: 1-13.
- **Kurtböke, D. İ. (2012).** Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93:1843–1852.
- **Labeda, D. P. et Kroppenstedt, R. M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnema taceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 331-336.
- **Lacey, J. (1997).** *Actinomycetes* in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 4, 1 13-121.

- **Lakshmipathy, D. et Krishnan, K. (2010).** Isolation and Characterization of Antagonistic *Actinomycetes* from Marine Soil. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. Vol (2):001-006.
- **Lamari, L., Zitouni A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. et Tillequin, F. (2002a).** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix sp.* SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 55, 696-701.
- **Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi ; A., Germain, P., Seguin, E. et Tillequin, F. (2002b).** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix sp.* SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, 55, 702-707.
- **Lamari, N. L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p.156.
- **Lechevalier, M. P. et Lechevalier, H. A. (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 315-316.
- **Lechevalier. M. P., De Bievre. C., Lechevalier., H. A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.
- **Lee, Y.J., Hwang, B. K. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.*, 48(5):407-17.
- **Liesse Iyamba, J. M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat, université libre de Bruxelles. p 131.
- **Loria, R. (1986).** Characterization of *Streptomyces spp.* causing potato scab in the Northeast. *Am. Potato J.*, 63, 440.
- **Madigan, M. T., Martinko J. M., Stahl, D. et Clark, D. P. (2012).** Brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
- **Mariat, F. et Sebald, M. (1990).** Actinomycètes. In: *Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.

- **Meklat, A. (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 162p.
- **Merizig, H. NAAMI, F. (2015).** Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de Ouargla. Mémoire Master Académique. Microbiologie fondamentale et appliquée. Université Kasdi Merbah Ourgla, 65p.
- **Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache S., Tazir M., Guatier V., Arlet, G. et Bakour, R. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie.*, G, 319-325.
- **Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P. et Clark, D. P. (1997).** Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth. *Journal of bacteriology.* 179(21):7.
- **Nonomura, H., Ohara Y. (1969).** Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. *J Ferment Technol.*, 47:463–469.
- **Pandey B., Ghimire P., Agrawal VP.(2004).** Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *Acad. Sci Technol*, 4(3):1-4.
- **Peltola, J. S. P., Anderson, M. A., Kampfer, P., Auling, G., Kropenstedt, R. M., Busse, H. J., Salkinoja-Salone, M. S. et Rainey, F. A. (2001).** Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocarioopsis* species, *N. exhalans* ssp. nov. and *N. umidischholae* sp. Nov. *Appl. Env. Microbiol.*, 67, 4293-4304.
- **Pochon, J. et Tardieux, P., (1962).** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St. Mandé. pp. 110-111.
- **Prakash, A., Satyanarayana, T. et Johri, B. N. (2012).** Microorganisms in Environmental Management. Springer. Pp: 819.
- **Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2010).** Microbiologie. De Boeck: Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088. Press, London.9-26. *Rodococcus aethrivorans* sp.
- **Prescott, L., Harley, J. P. et Klein, D. A. (1995).** Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. Pp 506–517.
- **Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2003).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2ème édition. Pp 537-542.

- **Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob-Inbaneson, S. et Vinodkumar, T. (2010).** Bioactivepotential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens. *J. Environ. Biol.*, 31(3):387–9.
- **Regnault, J. P. (2002).** Eléments de microbiologie et d'immunologie. Microorganismes eucaryotes. Canada:70-71.
- **Reponen, T. A., Gazenko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K. et Cole, E. C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10), 3807-3812.
- **Richert, K., Brambilla, E. et Stackebrandt, E. (2005).** Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from *microbacteria*, order *Actinomycetales*. *Journal of Microbiological Methods*, 60(1) 115-123.
- **Ryu, S. H., Lee, J. H., Park, S. H., Song, M. O., Park, S. H., Jung, H. W., Lee, Y. K. (2012).** Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *International journal of food microbiology*, 159(3): 263- 266.
- **Sabaou, N. (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat En Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192 p.
- **Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L. et Bennadji, H. (1998).** les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse.*, 9 (2), 147-153.
- **Sabaou, N., Hacène, H., Bennadji, A., Bennadji, H. et Bounaga, N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, 38, 1066-1073.
- **Saravanamuthu, R. (2010).**Industrial Exploitation of Microorganisms, I. K. International Pvt. Ltd., 304p.
- **Sateesh, V., Naikpatil., Rathod J. L. (2011).** Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. 3(10). PP: 48-53.
- **Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., et Karsch-Mizrachi, I. (2020).** NCBI Taxonomy: a comprehensive

update on curation, resources and tools. Database : the journal of biological databases and curation, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.

- **Shivlata, L. et Satyanarayana, T. (2015).** Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6: 1-29.
- **Sibanda, T., Leonard, V., Mabinya, L. V., Mazomba, N., Akinpelu, D. A., Bernard, K., Olaniran, A. O. et Okoh. A. I. (2010).** Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int. J. Mol. Sci. Vol* : 11. N° 7. 2612–2623p.
- **Singleton, P. (1994).** Bactériologie. Masson. France. Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A. (1995). Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. Pp 506–517.
- **Smaoui, S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.
- **Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. et Rajnisz, M. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.* 373-390p.
- **Sperber, W. H. et Tatini, S. R. (1975).** Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 29: 502-505.
- **Stackebrand, E., Schumann, P. et Prauser, H. (2006).** Family *Cellulomonadaceae*. *Prokaryotes*, 983-997.
- **Stackebrandt, E. et Woese, C.R. (1981).** The evolution of prokaryotes. *Synop. Soc.*
- **Stackebrandt, E., Rainey, F.A. et Ward-Rainey, N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 47(2): 479–491.
- **Stackebrandt, E., et Schumann, P. (2006).** Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. *Prokaryotes*, 3, 297–321.
- **Stapley, E. O., Woodruff, H. B. (1982).** Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolate from a soil Japan. In: *Trends in antibiotic Research. Japan.* : 154-170.
- **Subramani ; R. et Aalbersberg, W. (2013).** Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery .*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9291–9321.

- **Takizawa, M., Colwell, R. R. et Hill, R. T. (1993).** Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 997-1002.
- **Tenover, F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.*, 34, S3-10.
- **Touati, A. (2006).** Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux β -lactamines des souches d'entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Béjaia. Doctorat soutenu à l'Université A. Mira de Béjaia.
- **Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. et van Sinderen, D. (2007).** Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(3): 495–548.
- **Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsk, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murry, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. et Trüper, H. G. (1987).** Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37: 463-464.
- **Wellington, E. M. et Ul-Hassan, A. (2009).** Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- **Williams, S.T. et Cross, T. (1971).** "Actinomycetes." In *Methods in microbiology*. Booth C. Ed., Academic Press, London. 4. 295-334.
- **Wright, G. D. (2007).** The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity.
- **Yala, D., Merad, A. S., Mohamed, D. et OuarKorich, M. N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° 91.
- **Yanat, B., Machuca, J., Yahia, R. D., Touati, A., Pascual, Á., et Rodríguez-Martínez, J. M. (2016).** First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 760.
- **Zhi, X.Y., Li, W.J. et Stackebrandt, E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59 (Pt 3): 589–608.

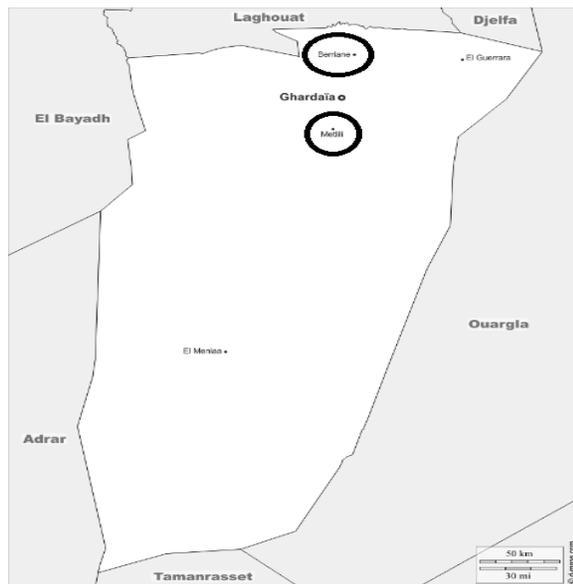
- **Zitouni, A. (1995).** Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (actinomycetales) dans les sols sahariens: Taxonomie numérique; extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés, Thèse de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177p.
- **Zitouni, A. (2005).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 230 p.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. et Sabaou, N. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Res. Microbiol., 156 (10): 984-993.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. et Lebrihi A. (2004b).** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. J. Antibiot., 57, 367-372.
- **Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. et Labeda, D. P. (2004a).** *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. Int. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1377-1381.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 :

SITES DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL



Annexe 2 :**MILIEUX DE CULTURE :****I- Milieu d'isolement :**

Chitine : chitine 2g, K₂HPO₄ 0,2g, NaCl 0,3g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄, 7H₂O 10mg, agar 18g, eau distillé 1000ml, pH 7,5

3- Milieux de purification et de test d'antagonisme.**3.1. Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

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.

Annexe 3 :**Isolats d'actinobactéries sélectionnées**

La souche B1



les souches B15 et B16



La souche B29



la souche B12



Les souches M25 et M26



les souches B13 et B14



La souche B32



les souches B27 et B28



Les souches M19 et M20