

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCE DE LA
NATURE ET DE Vie



DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET
DE la VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOTECHNOLOGIE VEGETALE
ET METAGENOMIQUE

N° :.....

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par: ABBES Samiha et BOUTERAA Imane

Intitulé

**Identification phénotypique de quelques isolats
d'actinobacteries présentant une activité
antimicrobienne *vis-à-vis* des microorganismes
pathogènes.**

Soutenu le 25/05/2017 devant le jury composé de:

BENDIF Hamdi MC(B)	Université de M'sila	Président
HARIR Mohamed MA(A)	Université de M'sila	Rapporteur
GUATOUACHE Mourad MA(A)	Université de M'sila	Examineur

Année universitaire : 2016 /2017



Remerciements

Nous remercions Allah tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous avons appris une infinité de choses et qui nous avons aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

*En premier lieu, nous adressons toute notre gratitude a notre encadreur Monsieur **Harir M^{ed}**, nous le remercies pour sa gentillesse, son soutien et pour partager son expérience, nous adressons toute nos reconnaissance pour sa patience, ses conseils, sa compétence, sa disponibilité et sa participation active lors de la rédaction de mémoire.*

*Nos remerciements sont également adressés à Monsieur **Bendif Hamdi** qui a accepté de présider le jury de notre soutenance et pour son aide et conseilles et Monsieur **Guatouache Mourad** qui a accepté d'examiner ce modeste travail, nos remerciement tous les enseignants de département des sciences et de la nature de la vie*

*Nous exprimons également à Monsieur **Meddah Mohamed Tahar** pour leur aide et leurs conseils lors de la rédaction de cette mémoire.*

*Nous adressons nos remerciements également aux Ingénieurs de laboratoires: **Hamza, Asma, Halima, et Hanane, Amel, safia , Hassiba***

Enfin, Nous remercions tous ceux, ce qui participer de prés ou de loin pour la réalisation de ce travail

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Partie Bibliographique

I. Le sol..... 4

I.1. La rhizosphère 4

I.2. Les actinomycètes rhizosphériques 4

II. les Actinobactéries..... 5

II.1. Historique..... 5

II.2. Définition des actinobactéries..... 5

II. 3. Caractéristique générale d'actinobactéries 6

III. Taxonomie et critères de classification des actinobactéries..... 7

III.1. Systématique des actinobactéries..... 7

III.2. Evolution des critères d'identification..... 9

III.3. Critères actuels d'identification..... 10

III .3.1. Caractères morphologiques..... 10

III.3.1.1.Caractéristiques culturelles ou macromorphologiques..... 10

 a. Mycélium aérien..... 11

 b. Mycélium de Substrat..... 11

III .3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques 12

III.3.2. Critères chimiques (chimiotaxonomie)..... 14

III.3.3. Critères physiologiques..... 14

III .3.3.1. Le pH..... 14

III .3.3.2. Température 14

III .3.3.3. Tolérance pour NaCl 15

III.3.4. Critères moléculaires..... 15

VI. Cycle de développement d'actinobactérie..... 16

VI.1. Formation des spores par les actinobactéries..... 18

VI.1.1. Exo-spores..... 18

VI.1.2. Endospores..... 19

V. Habitat d'Actinobactéries	20
V.1. Envirennement terrestres.....	20
V.2. Eaux douces et marines	21
V.3. Air	21
V.5. Composts	22
V.6. Végétaux, animaux et l'homme.....	22
VII. Applications des actinobactéries	22
VII .1. Antimicrobiens.....	23
VII .2. Enzymes.....	24
VII .3. Bioherbicides.....	26
VII .4. Vitamines.....	27
VII .5. Pigments.....	27
VII .6. Bioremédiation.....	28
VIII. Utilisation des actinobactéries en lutte biologique	29

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Prélèvement des échantillons	30
I.1. Sol	30
I.2. Eau	30
I.3. Isolement des actinobactéries	30
I.3.1. Prétraitement de l'échantillon	30
➤ Traitement par la chaleur	30
➤ L'enrichissement des échantillons par l'addition de CaCO ₃	30
I.3.2. Dilution et ensemencement	31
➤ Ensemencement en masse	31
➤ Ensemencement en surface	31
I.3.3. Sélection des actinobactéries	32
I.3.4. Purification et conservation des actinobactéries	32
I.4. Milieux de cultures	32
II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	33
II.1. Les germes cibles.....	33
II .2. Méthode de stries croisées.....	34
II .3.Méthode des cylindres d'agar	34

III. Etude taxonomique	35
III .1. Etude morphologique.....	35
III .1.1. Caractéristiques culturales.....	35
III .1.2. Caractéristiques micromorphologiques	36
IV. Etude physiologique et biochimique	36
IV.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	36
IV.2. Production de pigments mélanoides.....	36
IV.3. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone.....	37
IV.4. Utilisation des acides gras.....	37
IV. 5. Utilisation des acides amines.....	37
IV.6. Croissance en présence d'inhibiteurs.....	37
IV.6.1. Croissance en présence de phénol	37
IV.6. 2. Croissance en présence d'Antibiotiques (amoxicillin et pénicilline).....	37
IV.7. Hydrolyse de l'amidon.....	37
IV.8. Hydrolyse de la gélatine.....	37
IV.9. Hydrolyse de tyrosine	38
IV.10. Hydrolyse de caséine de lait	38
IV.11. Hydrolyse de Tween 80	38
IV.12. Recherche de catalase	38
IV.13. Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S).....	38
IV .14. Utilisation du citrate.....	38
IV.15. Dégradation de l'urée.....	39
IV.16. Production d'indole	39
IV.17. Tests de sensibilité à divers agents physiques.....	39
IV.17.1. Croissance à différentes températures.....	39
IV.17.2.Croissance à différents pH	39
IV.17.3. Croissance à différentes concentration en NaCl.....	39
<u>Chapitre III : Résultat et discussion</u>	
I.1. Prélèvement des échantillons	40
I.2. Isolement des actinobactéries	40
II. Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinobactérie	42
II .1. Méthode de stries croisées	42
II .2. Méthode de disque d'agar	44

III. Etude taxonomique des souches sélectionnées.....	46
III.1. Etude des caractères morphologiques (Aspect cultural).....	46
III .1.1. Etude macroscopique.....	46
III .1.2. Etude microscopique.....	50
III .1.3. Coloration de Gram.....	53
IV.1. Etude physiologique	55
IV .1.1. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	55
IV .1.2. Production de pigments mélanoides	56
IV.1.3. Test croissance en présence d'inhibiteur	57
IV .1.4. Hydrolyse d'amidon.....	57
IV. 1.5. Hydrolyse de gélatine.....	58
IV. 1.6. Hydrolyse de la caséine de lait.....	58
IV .1.7. Hydrolyse de tyrosine.....	59
IV .1.8. Hydrolyse de tween 80.....	59
IV .1.9. Recherche de catalase.....	60
IV .1.10. Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S).....	61
IV .1.11. Utilisation du citrate.....	61
IV .1.12. Dégradation de l'urée	62
IV .1.13. Production d'indole.....	62
IV.2. Testes biochimiques.....	63
IV. 2.1.Utilisation de composé glucidique comme seules sources de carbone.....	63
IV 2.2. Utilisation des acides aminés.....	63
IV.3. Etude physique.....	65
IV.3.1. Croissance à différents valeurs de températures.....	66
IV.3.2. Croissance à différents valeurs de pH	66
IV.3.3. Tolérance au chlorure de sodium.....	67
V.Conclusion.....	68

Références Bibliographiques.

Annexes

Liste des abréviations

ADN : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique.

ARNr16S : **A**cide **R**ibo**N**ucléique codant pour la sous unité **r**ibosomique **16S**.

ATCC: **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

CFU : **U**nité **F**ormant **C**olonie

DO : **D**ensité **O**ptique.

E. coli : *Escherichia coli*.

Ech : Echantillon.

FeSO₄ 7H₂O : sulfate de fer sept fois hydraté.

G + C : **G**uanine + **C**ytosine.

GLM : **G**élose à l'extrait de **l**evure_extrait de **m**alt.

GN : **G**élose **N**utritive.

KH₂PO₄ : phosphate monopotassique.

K₂HPO₄ : phosphate dipotassique.

HCl : Acide chlorhydrique.

ISP : **I**nternational **S**treptomyces **P**roject.

MA : **M**ycélium **A**érien.

MgSO₄ 7H₂O : sulfate de magnésium sept fois hydraté..

MnCl₂ 4H₂O : chlorure de manganèse quatre fois hydraté.

MPPM: modified phenoxazinone production medium

MS : **M**ycélium de **S**ubstrat.

(NH₄)₂ SO₄: sulfate d'ammonium.

P/V : Poids/Volume.

PCR : Reaction en Chaîne par Polymerase

PS : pigment soluble.

Q.s.p : quantité suffisante pour.

Rpm: rotation par minute.

sp : species (espèce).

Trs : Tours.

RF : *Rectus Flexibilis*.

µl : Microlitre.

ZnSO₄ 7H₂O : sulfate de zinc sept fois hydraté.

DAP : Acide Diaminopélimiques

Liste des figures

Figure 1. Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar (a, c Photos des Boîtes des isolates actinobactériens). (b, d Morphologie des colonies) individuelles.....	6
Figure 2. Classification du genre <i>Streptomyces</i> selon Bergy' Manual of Systematic Bacteriology (2006).....	9
Figure 3. Croissance abondante d'un isolat d'actinobactérie sur le milieu d'agar de caséine et amidon. .A. Mycélium aérien. B. côté Inverser d'une boîte montrant le mycélium substrat.....	11
Figure 4. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes.....	12
Figure 5. Types des chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>streptomyces</i>	13
Figure 6. Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de <i>streptomyces</i> sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 30°C /7 jours	13
Figure 7. Organisation du gène codant pour l'ARNr 16S.....	15
Figure 8. Schéma du cycle de vie de <i>Streptomyces</i> dans les conditions naturelles	16
Figure 9. Cycle de vie des <i>streptomyces</i>	17
Figure 10. Morphologies rencontrées aux cours de cultures liquides de <i>streptomyces</i>	18
Figure 11. Hyphe végétatives et conidiospores de <i>S.coelicolor</i> , SI: spores immatures, BP: Bordure de la paroi, SM: spore matures.....	20
Figure 12. Développement du mycélium secondaire en spores	20
Figure 13. Applications biotechnologiques des actinobactéries.....	23
Figure 14. Antibiotiques d'actinobactéries.....	24
Figure 15. Différents types d'enzymes produits par actinobacteria. une. amylase. B. Protéase. C. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation actinobactéria confirme la production d'une enzyme particulière.....	26
Figure 16. Pigment diffusible produit par diverses actinobactéries dans le milieu agar de caséine d'amidon.....	28
Figure 17. Méthode Dilution des échantillons.....	32
Figure 18. Méthode des stries croisées.....	34
Figure 19. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes	

sur milieu Muller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar.....	35
Figure 20. Photo d'un biote mère de l'isolement d'actinobactérie à partir d'un échantillon de sol de Mesif provenant de la wilaya de Msila (dilution 10^{-4}).....	
Figure 21. Activité antimicrobienne des Isolats d' Actinomycètes (D2, Ms1, C) vis-à-vis des souches pathogènes de références (méthode des stries croisée).....	42
Figure 22: Diamètre d'inhibition (mm) de la croissance des souches de références par les Isolats d'actinobactérie (D2, Ms1, C) par la méthode de strie croisée.....	44
Figure 23. Activité antimicrobienne des 03 isolats d'Actinomycètes (D2, Ms1 et C) vis-à-vis des souches de références par la méthode des cylindres d'agar.....	
Figure 24 : Diamètre d'inhibition (mm) de la croissance des souches de références par les isolats d'actinobactérie (D2, Ms1, C) par la méthode de cylindre d'agar.....	46
Figure 25. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat D2 sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).....	51
Figure 26. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat MS1 sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).	
Figure 27. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat C poussant sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) G (x400) (à droite).....	52
Figure 28. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat O5 poussant sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) G (x400) (à droite). observé au microscope optique G (x100) (à gauche) G (x400) (à droite).....	52
Figure 29. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat H1 sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x 400) (à droite).....	52
Figure 30. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat 10 poussant sur milieu ISP ₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).....	53
Figure 31. Coloration de Gram des souches D2, Ms1, C, H1, 10, O5.....	55
Figure 32. Résultat de l'antibiogramme des souches D2, Ms1, C.....	57
Figure 33. Production de pigment mélanoïde sur milieu MPPM et ISP ₇ par l'isolat Ms1.....	58
Figure 34. Hydrolyse d'amidon.....	58
Figure 35. Hydrolyse de la gélatine.....	59
Figure 36. Dégradation da caséine de lait.....	59
Figure 37. Hydrolyse de tyrosine.....	60
Figure 38. Inaptitude de d'hydrolyse de tyrosine.....	60

Figure 39. Inaptitude de dégradation de Tween par les trois souches.....	
Figure 40. Production de catalase.....	61
Figure 41. Absence de catalase	61
Figure 42. Production de H ₂ S.....	61
Figure 43. Utilisation du citrate.....	62
Figure 44. Présence de l'uréase chez D2, C.....	62
Figure 45. Absence de l'uréase chez Ms1	63
Figure 46. Absence d'indole chez D2, Ms1, C.....	63
Figure 47. Dégradation des sucres par les souches D2, Ms1, C.....	63
Figure 48. Croissance optimale de la souche Ms1 sur le milieu ISP ₂ liquide à PH=7.67	64
Figure 49. Croissance optimale de la souche C sur le milieu ISP ₂ liquide	67
NaCL=2%,3%.....	68

Liste des tableaux

Tableau 1. Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries	8
Tableau 2. Habitats de certains actinomycètes	22
Tableau 3. Caractéristique des souches à indicatrices.	33
Tableau 4. Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.....	37
Tableau 5. Situation géographique des stations d'échantillonnage.....	41
Tableau 6. Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des souches testées par la méthode de stries croisées.....	44
Tableau 7. Diamètre d'inhibition de la croissance des souches de références par les Isolats d'actinobactérie(D2, Ms1, C,)......	45
Tableau 8. Caractéristiques macromorphologiques des isolats D2, Ms1, C, 10, H1, et O5 après 21 jours d'incubation sur différents milieux de cultures.....	49
Tableau 9. Caractérisation des isolats d'actinobactéries par l'observation de mycélium de substrat et aérien dans différents milieu de cultures après 7 jours d'incubation.....	50
Tableau 10. Sensibilité des isolats d'actinobactérie aux différents antibiotiques.....	56
Tableau 11. Caractéristiques physiologiques et biochimique des isolats D2, Ms1, C.....	65
Tableau 12. Croissance des isolats d'actinobactérie à différents valeurs de températures....	66
Tableau 13. Test de croissance des souches actinobactérie à différents de pH.....	67
Tableau 14. Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP ₂ et à différentes concentration de NaCl.....	68

Introduction Générale

Introduction Générale

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**). Parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique à notre époque actuelle, les actinomycètes ou bien les actinobactéries qui sont une appellation récente à ces bactéries filamenteuses.

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes ayant un pourcentage de guanine-cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries. En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (**Goodfellow, 2012**). Si la plupart des actinobactéries sont chimioorganotrophes, mésophiles, neutrophiles, non halophiles et non fixatrices d'azote, il existe cependant une diversité physiologique étonnante puisque l'on retrouve également des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles, des fixateurs d'azote, etc. (**Goodfellow et al., 2012**). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées pratiquement partout dans l'environnement où elles ont pu coloniser plusieurs milieux, y compris les plus extrêmes et où la vie était considérée comme étant impossible (**Tiwari et Gupta, 2013**).

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines: dans le domaine industriel, dans le domaine médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro-alimentaire, etc. (**George et al., 2012; Solecka et al., 2012**). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particulier le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (**Solecka et al., 2012**), mais aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (**Tiwari et Gupta, 2011**). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par ce groupe microbien, telles que les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides, les herbicides, etc. (**Genilloud et al., 2011**). Si la plupart des actinobactéries sont utiles, certaines sont

pathogènes pour l'homme et les animaux ou encore pour les plantes (**Locci, 1994; McNeil et Brown, 1994; Solecka et al., 2012**).

Les chercheurs s'évertuent à isoler perpétuellement de nombreuses souches d'actinobactéries de divers milieux, surtout des milieux où les conditions de vie sont très difficiles (sols salés, sols alcalins, sols acides, marais salants, sols pollués par du pétrole, etc.), en vue de découvrir de nouveaux taxons et également de nouvelles molécules bioactives ayant des activités intéressantes (**Solecka et al., 2012**).

La recherche des actinobactéries productrices de molécules bioactives se fait par des screening, parfois à grande échelle, pour espérer trouver les souches sécrétant des composés très intéressants et capables de faire face à la résistance de plus en plus croissante et inquiétante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques, phénomène qui a pris de l'ampleur durant ces dernières années (**Huttner et al., 2013**). Ces tests peuvent être des screening classiques (ex: méthodes des stries croisées, des cylindres d'agar, de la double couche, etc.). Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine le plus au sein des actinobactérie.. En effet, environ 80% des antibiotiques d'origine actinomycétale sont produits par les espèces de ce genre (**Demain, 2006; Jose et al., 2011**). Par ailleurs, beaucoup d'autres genres d'actinomycètes tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, *Nonomuraea*, etc., ont déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes sur le plan médical (**Genilloud et al., 2010; Flatt et al., 2013; Nakae et al., 2013**).

En Algérie, les sols sahariens et semi-arides se sont révélés très diversifiés en actinobactéries et de nombreux travaux ont été publiés sur ces microorganismes, du point de vue taxonomique dans le but de découvrir de nouvelles espèces (**Zitouni et al., 2004; Boubetra et al. 2013a,b et 2015; Aouiche et al., 2015; Bouras et al., 2015**), de mise en évidence d'une activité antimicrobienne ou de découverte de nouveaux antibiotiques (**Boudemagh et al., 2005; Kitouni et al., 2005; Badji et al., 2006; Bouras et al., 2008; Boudjella et al., 2010; Merrouche et al., 2010, 2011; Boughachiche et al., 2012; Boubetra et al., 2013c; Aouiche et al., 2014; Toumatia et al., 2014; Driche et al., 2015; Yekkour et al., 2015; etc.**

L'objectif principal de notre étude consiste à l'isolement des souches bactériennes appartenant au groupe d'actinomycètes à partir d'échantillons de sols provenu de différents sites des régions d'Algérie , de sélectionner les isolats antagonistes de bactérie pathogènes et toxigènes pour l'Homme (bactéries à Gram+ et Gram- et deux levures) ensuite de les

étudier du point de vue taxonomique en se basant sur leurs caractères morphologique physiologique et biochimiques.

- Le premier chapitre: dans cette mémoire une partie est consacré à une revue bibliographique abordant détaillée sur les actinobactérienes en général ainsi que sur leur métabolisme secondaire des actinobactérienes où nous avons traité succinctement le cycle de développement, le métabolisme général et les actinobactéries producteurs d'antibiotiques en particulier.

- Le deuxième chapitre est consacré à la description du matériel et des méthodes utilisées.

- Le troisième chapitre est réservé à la présentation des résultats et leur discussion. Ces résultats concernent l'isolement des actinobactéries et la mise en évidence de leur activité antagoniste, la sélection des meilleures souches et leur étude taxonomique.

Chapitre I

Revue Bibliographique

I. Le sol

Le sol est constitué d'une phase solide (matière inorganique et des organismes vivants), d'une phase liquide (solution du sol), et d'une phase gazeuse (dioxyde de carbone, de l'oxygène, de l'azote), (**Gobat et al., 2004**). L'«environnement du sol regorge de vie biologique et représente l'un des écosystèmes les plus abondants et diversifiés de la planète et offre de nombreux services écosystémiques (**Hinsinger et al., 2009**). Le boîtier du sol, comprenant la flore, la faune et les micro-organismes, remplit des fonctions qui contribuent au développement, à la structure et à la productivité du sol (**Mc Cauley et al., 2005**).

La disposition spatiale des particules solides résulte en un modèle complexe et discontinu de pores de différentes tailles et formes qui sont plus ou moins remplis d'eau ou d'air, formant

Une caractéristique majeure des sols est donc leur hétérogénéité spatiale et temporelle, due aux liens intimes entre la biologie, la physique et la chimie du système sol – plante (**Young et Ritz 2000 ; Pierret et al., 2007**). L'un des points chauds les plus fascinants de l'activité et de la diversité dans les sols est la rhizosphère (**Jones et Hinsinger., 2008**).

I.1. La rhizosphère

La rhizosphère peut être définie comme le volume de sol autour des racines vivantes, et dont les propriétés sont influencées par la présence et l'activité de la racine, correspondant ainsi à l'interface sol-plante (**Jossi, 2008 ; Hinsinger et al., 2009**). Les modifications apportées aux propriétés physique, chimique et biologiques du sol de la rhizosphère ont une influence significative sur la croissance ultérieure et la santé des plantes (**Richardson et al., 2009**).

La rhizosphère est constituée par la surface des racines (rhizoplan), l'intérieur des racines (endorhizosphère), et du sol rhizosphérique, correspondant au sol environnant soumis à l'influence de la racine (exorhizosphère) (**Jossi., 2008**).

Selon **Hinsinger et al 2009**, elle représente probablement l'habitat le plus dynamique sur terre, et certainement la zone la plus importante en termes de définition de la qualité et de la quantité des ressources alimentaires terrestre de l'homme.

I.2. Les actinomycètes rhizosphériques

Généralement il est admis que dans le sol relativement sec, humique et calcaireux les actinomycètes représentent la fraction dominante de la microflore avec des cellules viables de l'ordre de 10⁶/g sol (**Goodfellow et Williams, 1983**). Cependant dans les sols submergés,

anaérobiques ou acides le nombre est relativement faible 102/g sol sec. **Williams et Wellington (1982)** ont rapporté que parmi les actinomycètes la fréquence d'isolement des *Streptomyces* est de 95,3%, des *Nocardia* de 1,98%, des *Micromonospora* de 1,4%, des *Actinoplanes* de 0,20%, des *Microbispora* de 0,18%, des *Actinomadura* de 0,10%, des *Streptosporangium* de 0,10%, *Thermoactinomyces* 0,14%, *Thermomonospora* 0,22% et des *Pseudonocardia* de 0,06%.

Souvent, un nombre important d'actinomycètes est rencontré dans la rhizosphère que dans le sol environnant, il dépend de l'espèce et de l'âge de la plante (**Goodfellow et Williams, 1983**). L'effet rhizosphérique est exprimé par le ratio R: S (Rhizosphère: Sol). Par exemple, le maïs et la fève abritent de 10 à 18 fois plus d'actinomycètes dans leur rhizosphère par rapport au sol avoisinant (**Abraham et Herr, 1964**). Le R: S des plantes sahariennes varie de 16 à 50 (**Watson et Williams, 1974**).

II. les Actinobactéries

II.1. Historique

Les actinobactéries ont été isolés pour la première fois par **Cohn** en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al., 1984**). Et c'est en 1943 que **S. Waksman** a pu isoler un genre actinomycètes à partir du sol.

Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des actinobactéries. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinobactéries du sol, avec les travaux de **kraisky**, de **Cohn**, de **Waksman** et de **Curtis**.

C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de **Waksman**, de **Lieske**, de **Krassilinkov** entre autre. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les actinobactéries. Elle commence en 1940 et le nom de **Selman Waksman** lui est indissolublement lié (**le minor, 1989**).

II.2. Définition des actinobactérie

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants» (**Lamari, 2006**). Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons. Maintenant, ils sont reconnus comme des

organismes procaryotes. Pourtant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons (**Andriambololona, 2010**).

Les actinomycètes, également connus sous le nom des Actinobacteria (**Perry et al., 2004**), sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires à la morphologie complexe (**Colombié, 2005 ; Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**).

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries formant des filaments minces et ramifiés, septées, bacilles à gram positive (**Dgigal, 2003**); possédant un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (**Larpen, 1989**), saprophytes. La plupart des espèces sont immobiles, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (**Ensign et al., 1993**), aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (**Williams et Wellington, 1982 a ; Goodfellow et Williams, 1983**).

II. 3. Caractéristique générale d'actinobactéria

Les actinobacteria comprend un groupe de microorganismes unicellulaires ramifiés, dont la plupart sont aérobies formant des mycéliums connus sous le nom Mycelium de substrat et aérien. Ils se reproduisent par fission binaire ou par production de spores ou de conidies, et la sporulation des actinobactéries se fait à travers la fragmentation et la segmentation ou la formation de conidies. L'apparence morphologique des actinobactéries (**Figure1**) est compacte, souvent coriace, donnant un aspect conique avec une surface sèche sur les milieux de culture et souvent couverte par le mycélium aérien.

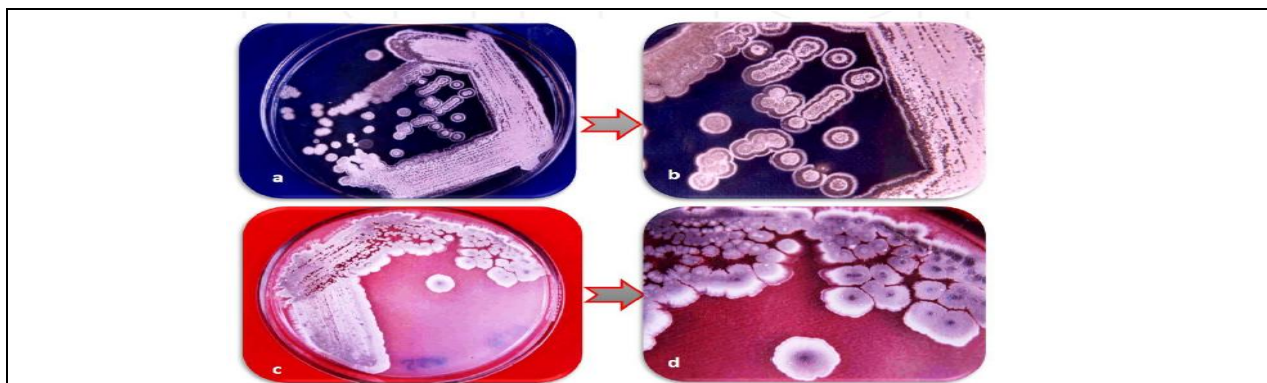


Figure 1. Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar (a ,c Photos des Boites des isolats Actinobacteriens).(b, d Morphologie des colonies individuelles).

III. Taxonomie et critères de classification des actinobactéries

III.1. Systématique des actinobactéries

Les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (**Bergey's manual, 2007**).

Dans la version 2004 du manuel de la systématique bactériologique (Bergey), l'ordre des *Actinomycetales* comptait 9 sous ordres, 38 familles et 121 genres.

Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires (la séquence du gène ARNr 16s).

Actuellement, le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le *Bergey's manual* (2007) renferme une seule classe : *Actinobacteria*, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. (**Bergey's manual, 2007**).

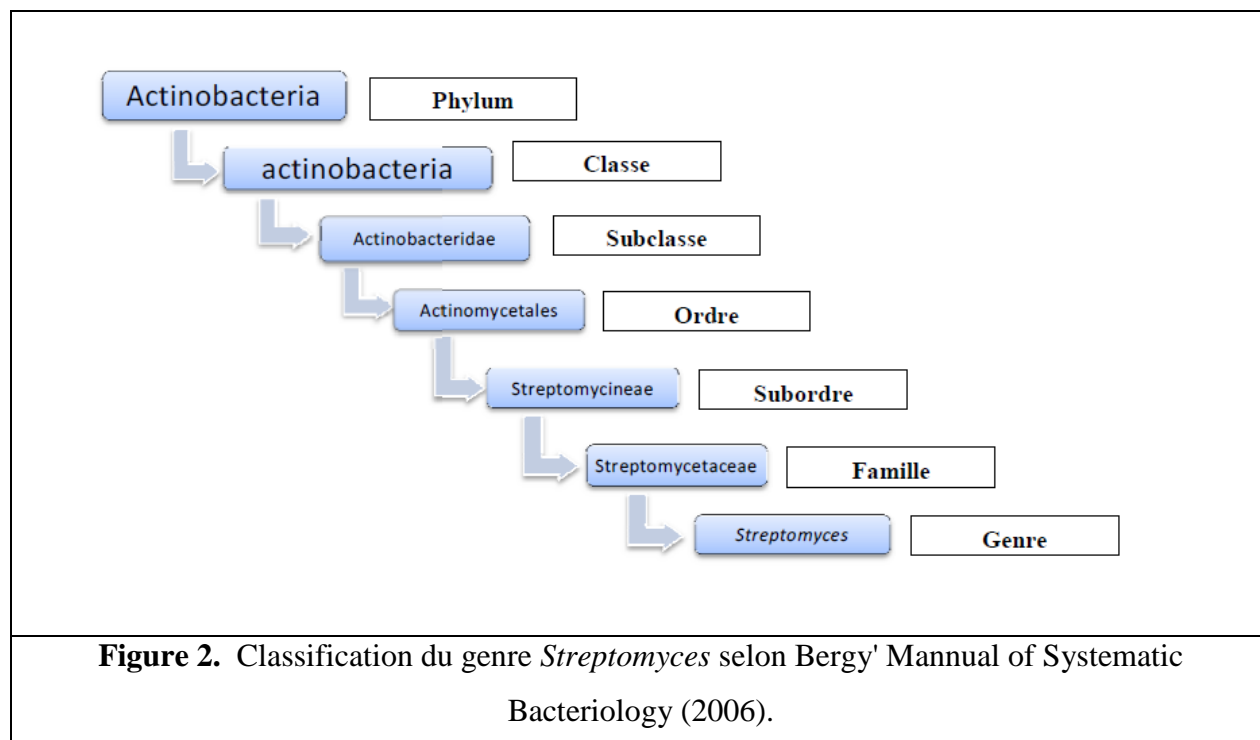
Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines *Corynebactéries*, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (**Ventura et al., 2007**) et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

Les actinobactéries possèdent des aspects biologiques caractéristiques tels que des formes de croissance mycéliennes ainsi qu'une capacité de production d'une large variété de métabolites secondaires incluant la majorité des antibiotiques.

D'après les systèmes conventionnels de classification des différents auteurs (**Baldacci, 1958; Couch, 1963; Krassilnikov, 1949; Lechevalier et al. 1961; Cross et al. 1963; Nonomura et Ohara, 1957; Waksman, 1961**), les espèces actinomycetales sont groupées ensembles dans des genres ou des familles séparées sur la base de leur caractéristiques morphologiques et écologiques (**Yamaguchi, 1965**), chimiques, physiologiques et moléculaires.

Tableau 1. Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries (Goodfellow *et al.*, 2012).

<i>Classes</i>	<i>Orders</i>	<i>Familles</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>
	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae</i>
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardioidaceae</i>
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
<i>Streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopticaceae, Thermomonosporaceae</i>	
<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>
<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>
<i>Rubrobacteria</i>	<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Thermophilia</i>	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>
	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteraceae, Conexibacteraceae, Patulibacteraceae</i>



III.2. Evolution des critères d'identification

La systématique bactérienne a subi plusieurs modifications durant les trois dernières décennies dues à l'application de nouvelles techniques biochimiques, chimiques, génétiques, numériques et biologie moléculaire. (Abbas, 2006).

Cette évolution fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Lors de la première période, seuls les critères macro- et micro-morphologiques, permettaient de distinguer les différents genres entre eux.

Cette période s'est étendue jusqu'au début des années 60, (Pridham *et al.*, 1958; Tresner *et al.*, 1961, rapporté par Zitouni, 2005).

La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de la chimiotaxonomie qui est basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels les acides aminés (Becker *et al.*, 1964 ; Staneck et Roberts, 1974), les sucres cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1970a). Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (Mordarska *et al.*, 1972; Minnikin *et al.*, 1977), les phospholipids (Lechevalier *et al.*, 1977 ; Minnikin *et al.*, 1977), les ménaquinones et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990). La chimiotaxonomie combinée aux critères morphologiques fut d'un apport essentiel dans la différenciation de nouveaux genres.

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990 combine l'outil informatique aux tests physiologiques.

La taxonomie numérique basée sur des tests physiologiques analysés par ordinateur grâce à des logiciels adéquats a permis d'apporter beaucoup de clarté (**Grund et Kroppenstedt, 1990**).

Bien que les résultats obtenus étaient assez concluants, les taxonomistes abandonnèrent ces critères au profit des critères moléculaires, beaucoup plus performants.

La dernière période, fut celle de l'application des méthodes d'analyse génétiques et moléculaires, qui ont débuté durant les années 80.

Pour ce fait, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine - cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, etc.

III.3. Critères actuels d'identification

La systématique des actinobactéries est basée actuellement sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et génétiques. Certains genres sont facilement identifiables par leur micromorphologie particulière, comme les *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, etc., mais dans la plupart des autres cas, la détermination des chimiotypes est indispensable. Tel est le cas pour les genres *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nonomuræae*, *Saccharopolyspora*, *Nocardioides*, *Streptomyces* (à un degré moindre), etc.

Les caractères physiologiques et génétiques sont quant à eux, indispensables pour l'identification des espèces et sous-espèces.

III 3.1. Caractères morphologiques

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturelles sur différents milieux de culture et aux caractéristiques micromorphologiques.

III.3.1.1. Caractéristiques culturelles ou macromorphologiques

Il s'agit alors de noter :

- la présence ou l'absence de mycélium aérien (MA).
- la couleur du MA et du mycélium du substrat (MS).

- la production et la couleur des pigments diffusibles.
- la production ou non de pigments mélanoïdes.

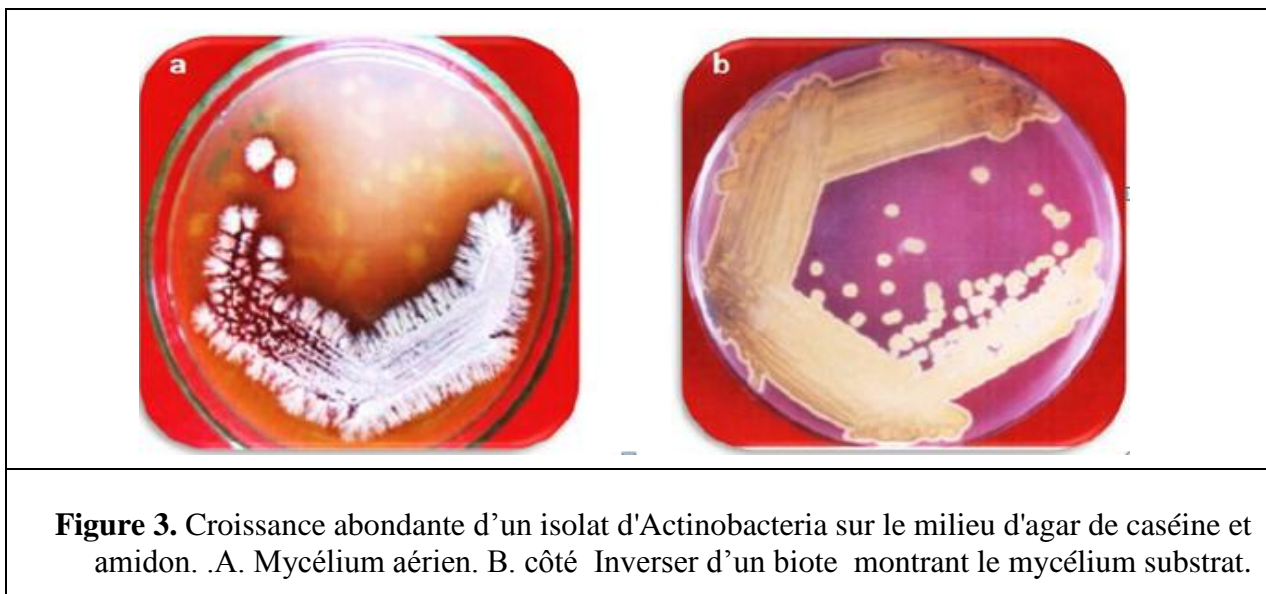
Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

a. Mycélium aérien

Le mycélium aérien est habituellement plus épais que le mycélium du substrat (**Figure 3**). Le mycélium aérien montre une différenciation suffisante selon laquelle un éventail varié d'isolats peut être séparé en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions fixés. Ceci est désigné comme l'un des critères les plus importants pour la classification du genre *Streptomyces* en espèces, comprenant une structure (cotonnière, veloutée ou en poudre), une formation d'anneaux ou de zones concentriques et de pigmentation.

b. Mycélium de Substrat

Le mycélium de substrat d'Actinobactéries ont différentes taille, forme et épaisseur (**figure 3**). Sa couleur varie de blanc ou pratiquement incolore à jaune, marron, rouge, rose, orange, vert ou noir.



III .3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon **Nouredine**, (2006) et **Boudjella**, (2007).

- La fragmentation on non du MS ;
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaines) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) ;
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores ;
- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...) ;
- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les sclérotés, etc...

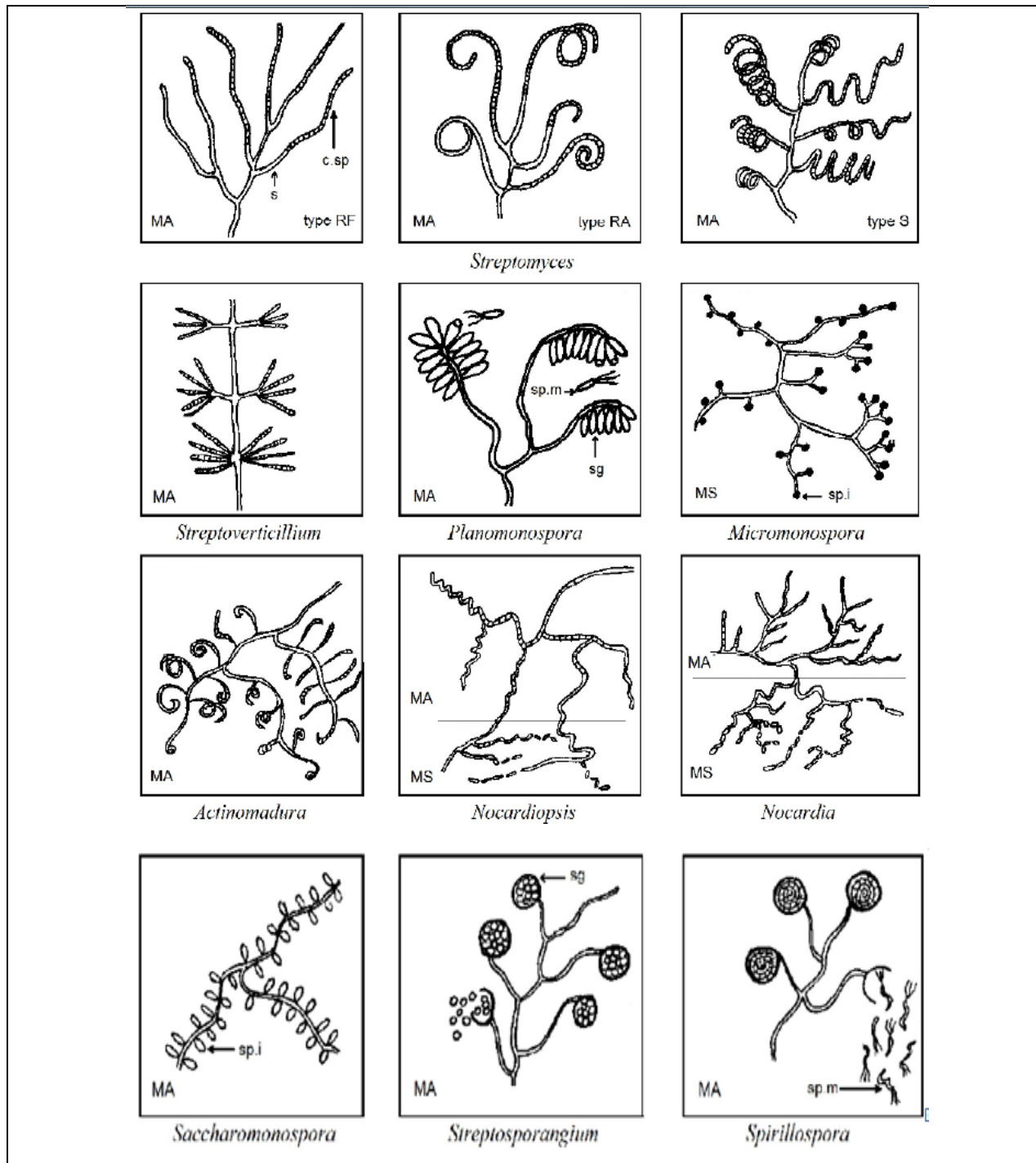


Figure 4. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (*In Sabaou, 1988*).

MA, mycélium aërien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaines de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaîne en crochets ou en boucles); *S, Spira* (chaines siralées); S; sporiphore; c.sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolées; sp.m., spore mobiles; sg, sporanges.

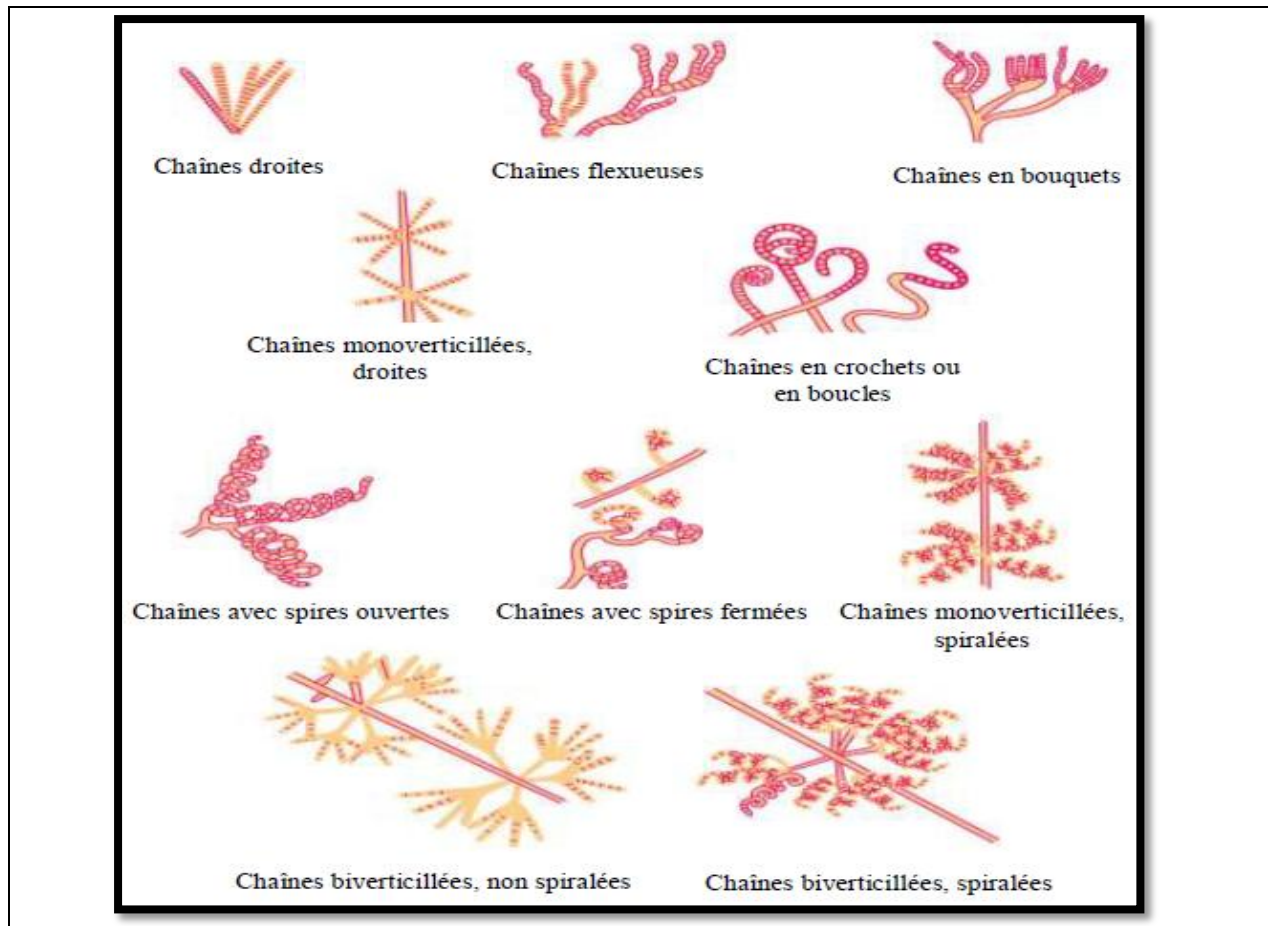


Figure 5. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* (Bergey's Manuel, 2012).

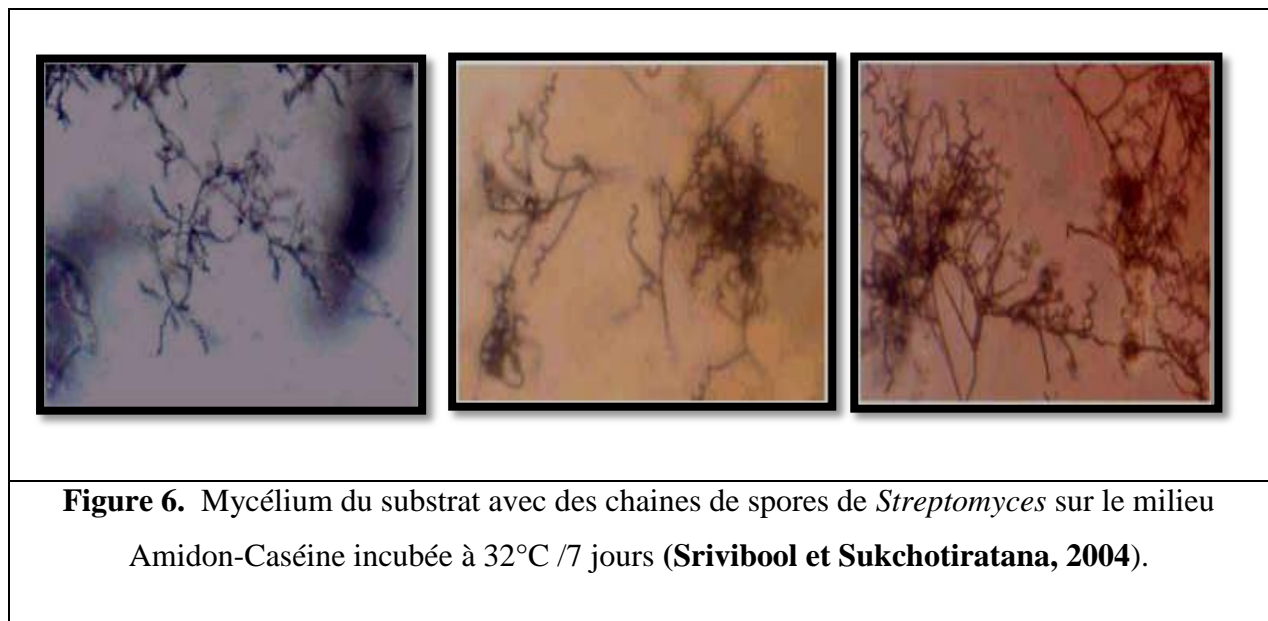


Figure 6. Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de *Streptomyces* sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours (Srivibool et Sukchotiratana, 2004).

III.3.2. Critères chimiques (chimiotaxonomie)

L'étude des caractéristiques chimiques des actinobactéries consiste en l'analyse des constituants cellulaires.

Les critères chimiques combinés aux critères morphologiques, permettent de déterminer les genres et même les familles. Les caractéristiques chimiques essentielles 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 (Lechevalier *et al.*, 1977), les ménaquinones et les acides gras

III.3.3. Critères physiologiques

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

III .3.3.1. Le pH

La plupart des actinobactéries 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 inférieures à 4 (McKinney, 2004), telle est le cas pour les souches acidophile tel que : *Streptacidiphilus jiangxiensis* (Huang *et al.*, 2004) et *Streptacidiphilus oryzae* (Wang *et al.*, 2006).

III .3.3.2. Température

Les actinobactéries 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 thermocrophilus* (Kim *et al.*, 2000) et même psychrophiles (Holt *et al.*, 1994).

III .3.3.3. Tolérance pour NaCl

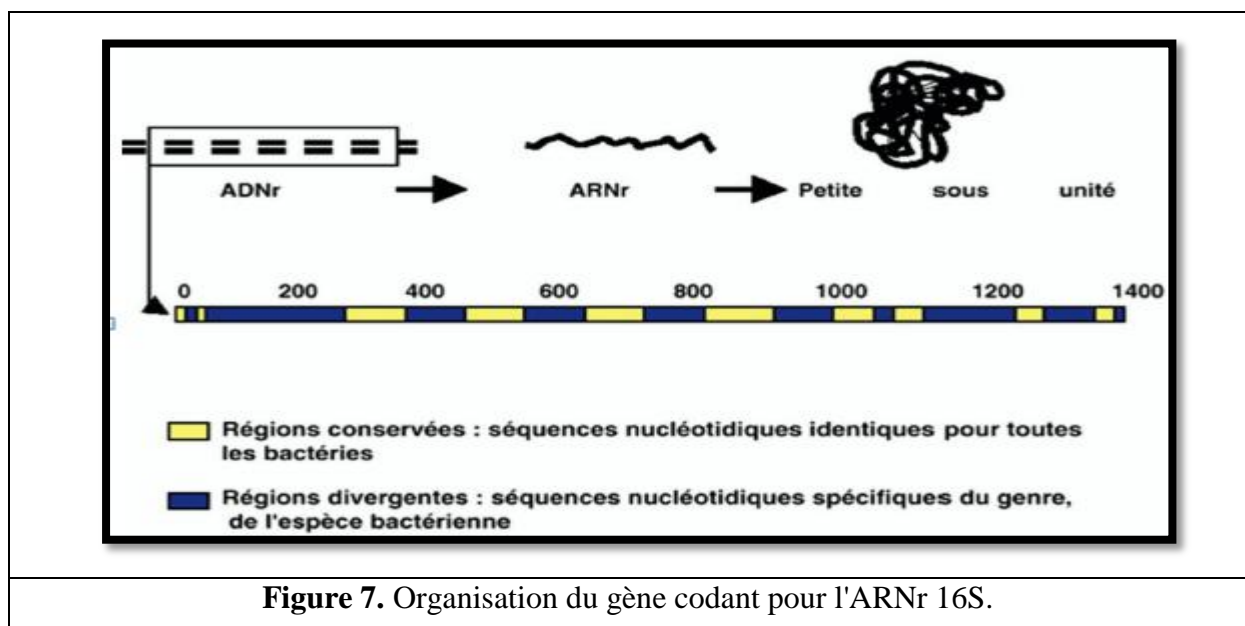
Selon leurs exigences en NaCl, les microorganismes sont divisés en deux groupes :

- **Les halophiles** : Ont besoin de sel (Na Cl) 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 (tolère de 6 à 8 % de NaCl (Poids/Volume) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V) ; et les extrêmement tolérants (se développe de 0 % jusqu'à saturation NaCl) (Messaoudi, 2012).

III.3.4. Critères moléculaires

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commencent lentement à être remplacés par les techniques moléculaires. Grâce à la biologie moléculaire, plusieurs alternatives sont maintenant possibles dans un délai de quelques jours seulement à comparer à quelques semaines avec les méthodes traditionnelles.

Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques.



IV. Cycle de développement d'actinobactérie

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinobactéries possèdent un cycle de vie complexe (**Figure 8**), qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (**Danilenko et al., 2005**). Il débute par la germination d'une spore, processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie et non fragmenté et se développent par croissance apicale (**O'Gara et al., 2008**).

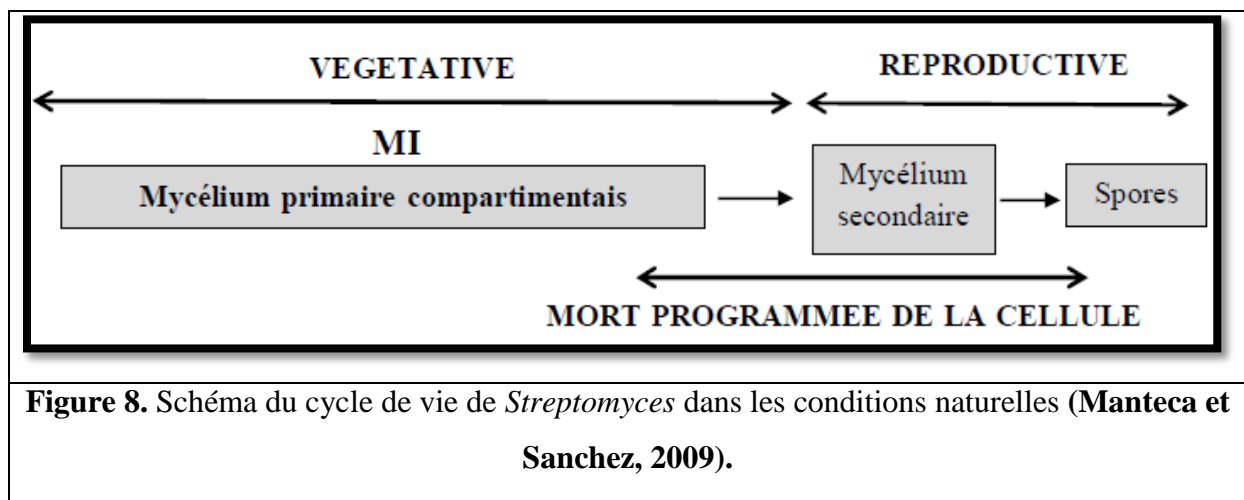


Figure 8. Schéma du cycle de vie de *Streptomyces* dans les conditions naturelles (**Manteca et Sanchez, 2009**).

Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, qui sont des agents de dissémination (**Kim et al., 2004 ; Smaoui, 2010**). Ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement. La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (**Choulet, 2006**). Le mycélium du substrat s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment-là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**). Le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du MS (**Ou et al., 2008**). Lorsque la croissance du mycélium aérien s'arrête, contrairement au mycélium végétatif, des septas sont formés à des intervalles réguliers le long de l'hyphes formant des compartiments uni-génomiques. Si les spores sont localisées dans des sporanges,

on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinobactéries sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*....etc.) (Prescott *et al.*, 2010).

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. C'est un processus hautement régulé (McCormick et Flärdh, 2012). Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement: la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

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

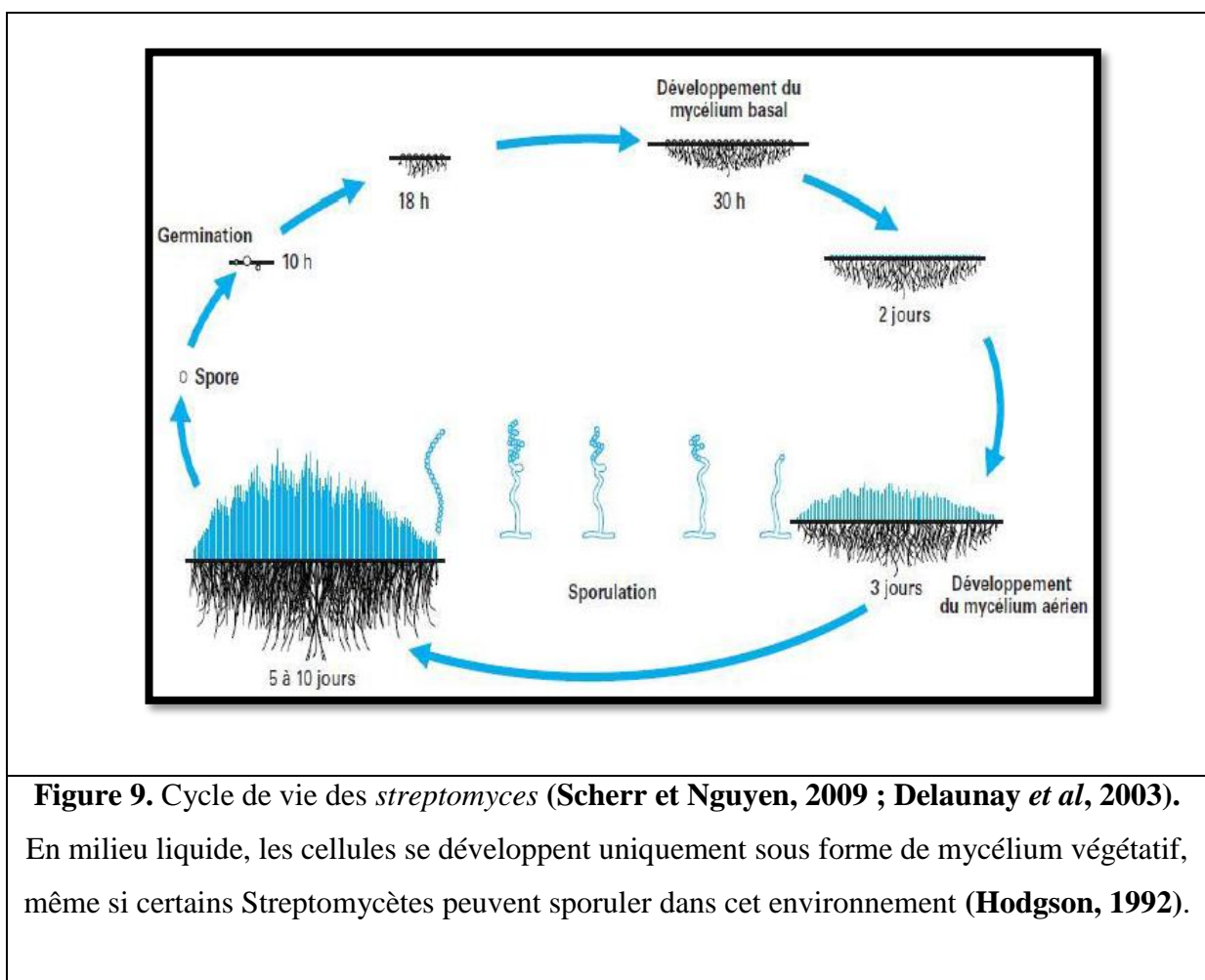


Figure 9. Cycle de vie des *streptomyces* (Scherr et Nguyen, 2009 ; Delaunay *et al.*, 2003).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement (Hodgson, 1992).

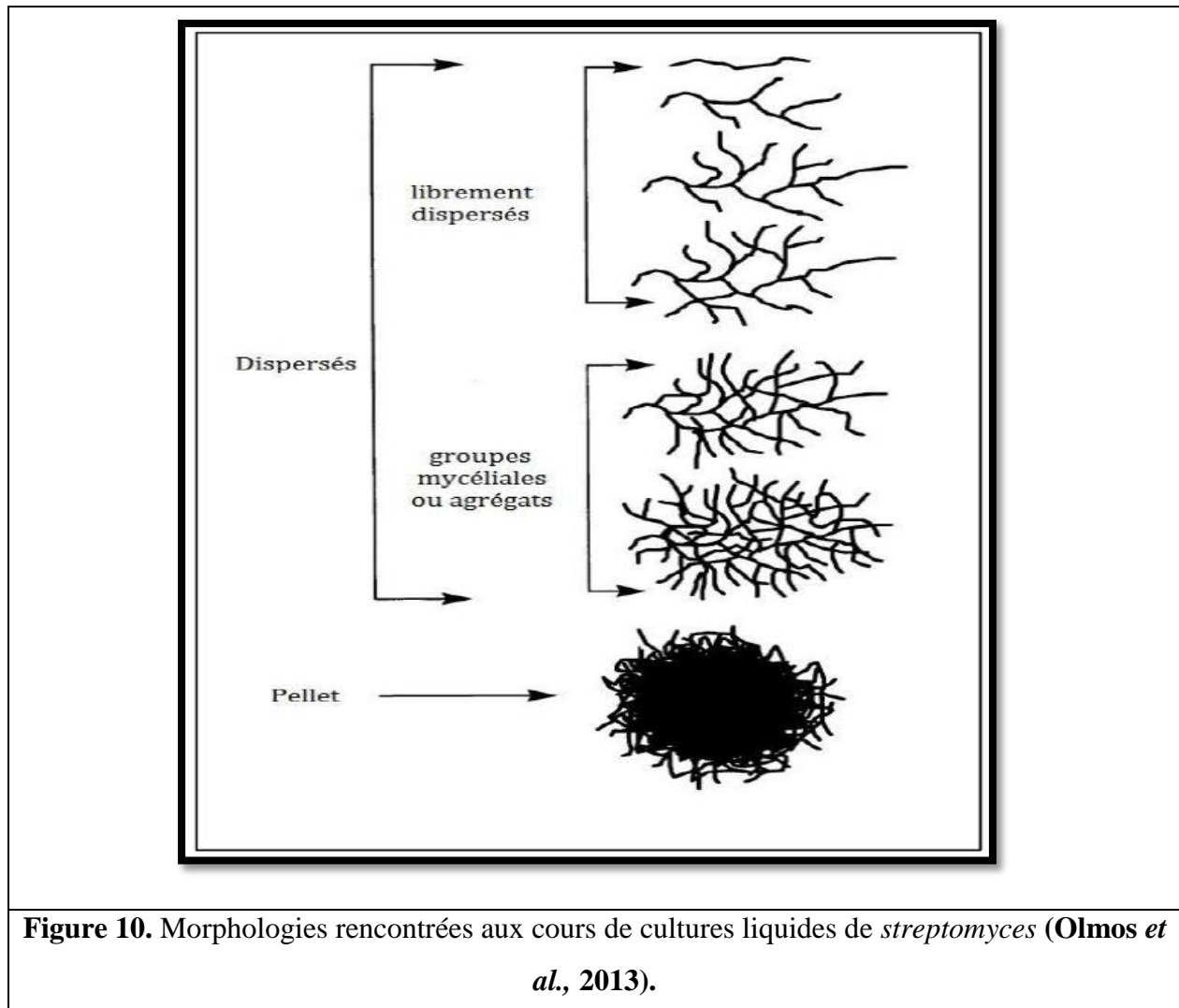


Figure 10. Morphologies rencontrées aux cours de cultures liquides de *streptomyces* (Olmos *et al.*, 2013).

IV.1. Formation des spores par les actinobactéries

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exo-spores et endospores (Theilleux, 1993), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Saffroy, 2006). Les exo-spores sont le type le plus fréquent et peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes mais les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités (Kitouni, 2007).

IV.1.1. Exo-spores

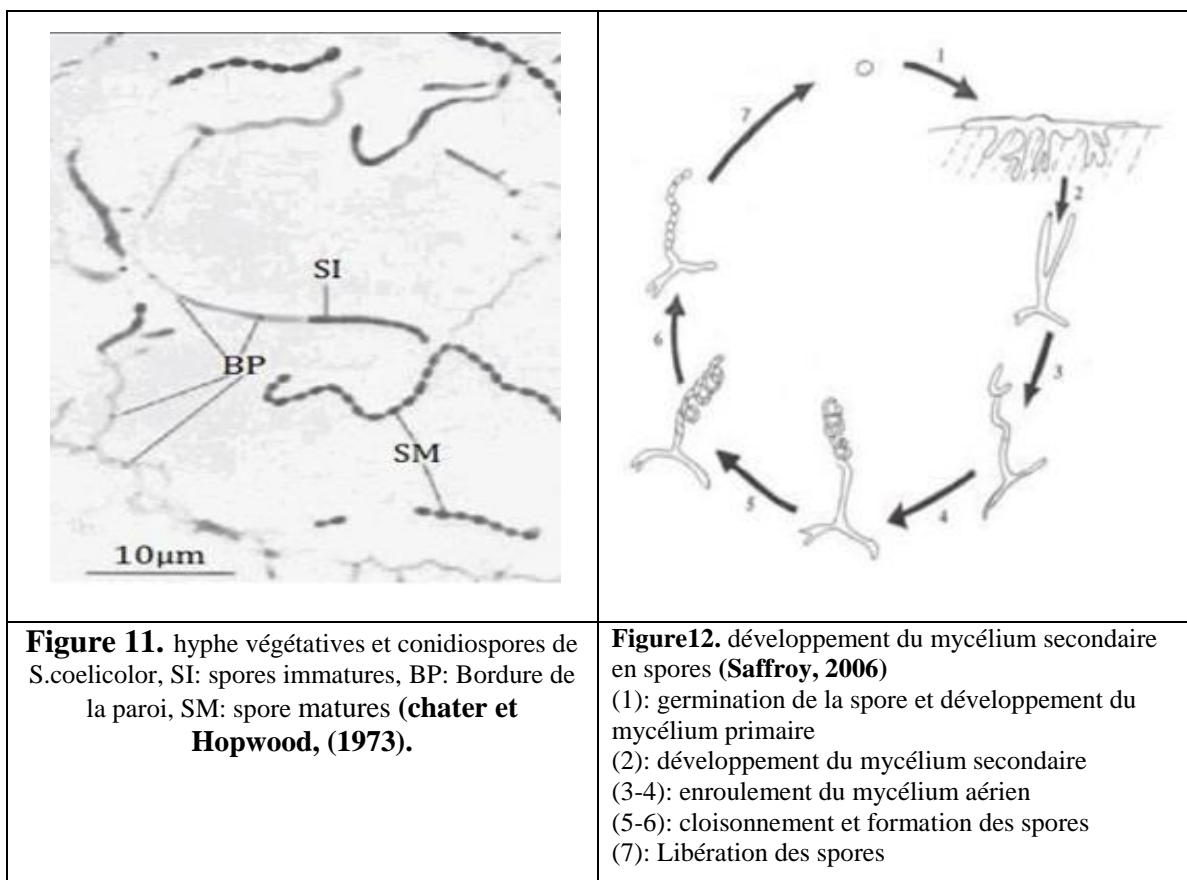
Les actinobactéries forment généralement des exo-spores qui peuvent avoir des formes très variables. Les exo-spores naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène (Kitouni, 2007). Ainsi, la formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes avec enveloppe est la plus fréquente et

se retrouve notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*. La formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre avec *Micromonospora*. Ces spores sont dépourvues de structures spécialisées. Ces exo-spores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire :

- Un seul nucléoïde correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *Streptomyces*. Le contenu du génome des exo-spores est plus riche en ADN mais moins en ARN que celui du mycélium du substrat.
- Des ribosomes dissociables en sous-unités 30 S et 50 S.
- Un système membranaire intracytoplasmique.
- Des vacuoles.
- Une membrane cytoplasmique.

IV1.2. Endospores

Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Dans ce groupe, une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (**Locci et Sharples, 1984**). On parle ainsi de « sporulation entérothallique », caractéristique des genres *Planomonospora* et *Dactylosporangium*, lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale et de « sporulation holothallique », caractéristique du genre *Thermoactinomyces*, lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe (**Kitouni, 2007**). Les endospores sont produites par des actinobactéries thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des Bacillaceae. Elles contiennent une paroi externe épaisse, multicouche et résistante, qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associées à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermoactinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (**Sykes et Skinner, 1973**).



V. Habitat d'Actinobactéries

V.1. environnement terrestres

Le sol demeure l'habitat le plus important pour les actinobactéries dont les streptomycètes existant en tant que composante majeure de leur population. Selon de nombreux rapports, *Streptomyces* a été rencontré pour être le genre abondant le plus isolé dans chaque études. Les Actinobactéries Terrestres présentent divers potentiels antimicrobiens intéressants. (**Oskay AM, et al.; 2005**) Acétabactéries isolées qui avaient la capacité de produire de nouveaux antibiotiques à forte activité antibactérienne. Dans la rhizosphère de mangrove anoxique, les espèces d'Actinobacterial telles que *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardioform* ont été abondantes, soit 1000 à 10000 fois plus petites que les terres arables en raison de l'influence de courant des marées (**Tan H, et al.; 2009**). De même, *Nocardia* isolée du sol de mangrove a produit de nouveaux métabolites cytotoxiques qui inhibaient fortement les lignées cellulaires humaines, telles que l'adénocarcinome gastrique (**Schneider K, et al.; 2006**) Le sol de désert est également considéré comme un environnement terrestre extrême où seules certaines espèces, en particulier les Actinobactéries, utilisent souvent le *Microcoleus* comme source de

nourriment . Il existe plusieurs rapports montrant la distribution des Actinobactéries dans divers endroits, tels que le sol sablonneux (Cario, Égypte, Falmouth, MA), le sol alcalin noir (Karnataka, Inde), le sol limoneux sablonneux (Keffi Metropolis, Nigéria, Presque Isle, PA) , Le sol de dessert alcalin (Wadi El Natrun, Égypte, Wadi Araba, Égypte) et le sol de dessert subtropical (Thar, Rajasthan), où *Streptomyces* sp. étaient dominants suivis par les autres organismes, tels que *Nocardia*, *Nocardioopsis* et *Actinomycetes* (**Cundell et Piechoski, 2016**) . Dans l'étude de (**Nithya K et al, 2015**) 134 Acétabactéries cultivables morphologiquement distinguées ont été isolées à partir de 10 échantillons de sol différents de désert, et les isolats ont un degré variable d'activité antibactérienne contre les agents bactériens pathogènes. Egalement, les actinobactéries jouent un rôle majeur dans la communauté microbienne de la rhizosphère dans le renouvellement de la matière organique végétale récalcitrante et, par conséquent, la région des rhizosphères est considérée comme l'un des meilleurs habitats pour l'isolement de ces microorganismes. (**Priyadharsini et Dhanasekaran, 2015**) dans son étude isolent 45 colonies morphologiquement distinctes de 12 sols de rizières différents et ont observé leur capacité à inhiber la croissance de *Cyperus rotundus*. Les isolats incluent *Streptomyces* sp ., *Streptoverticillium* sp..

V.2. Eaux douces et marines

Les Actinobactéries sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Microspora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa saveur. ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (**Xu et al, 1996 ; Hwang et al., 2001**).

V.3. Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinobactéries sont des contaminants importants de notre environnement. Les spores de certains actinomycètes se développent dans des matériaux détériorés provoquant, lorsqu'elles sont inhalées, des maladies respiratoires. Les spores d'actinobactéries thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air (**Mazodier, 1974**).

V.5. Composts

Des actinobactéries sont isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autre thermotolérants tel que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocadia* (Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997 ; Song et al., 2001). Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Zermane, 2007).

V.6. Végétaux, animaux et l'homme

Dans la distribution naturelle des actinobactéries, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'homme. Parmi les exemples les mieux connus, il faut citer : *Streptomyces scabies*, *Actinomyces bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia asteroides* et *Micropolyspora faeni* (Zermane, 2007).

Tableau 2. Habitats de certains actinobactéries (Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
<i>Frankia</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Micrmonospora</i>	L'eau douce, les sédiments, les soles humides.
<i>Nacrodia/ amarae</i>	Les boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Les déjections animales, l'eau, le sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Le sol, la litière végétale, l'eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost.

VII. Applications des Actinobactéries

Les actinobactéries sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines. Ils sont également une source prometteuse de large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle. Une grande fraction d'antibiotiques sur le marché provient d'Actinobacteria. Ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement du cancer et les immunomodifiants qui améliorent la réponse immunitaire. Ils ont la capacité de dégrader une

large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aromatiques et aliphatiques. Ils effectuent des transformations microbiennes de composés organiques, un domaine de grande valeur commerciale. Les membres de nombreux genres d'Actinobacteria peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de haute valeur. Les actinobactéries sont également importantes dans la biotechnologie végétale, car les souches avec une activité antagoniste contre les agents pathogènes végétale sont utiles dans la lutte biologique. Leur potentiel métabolique offre un domaine de recherche important. Ici, nous avons une brève description des applications importantes des Actinobactéries.

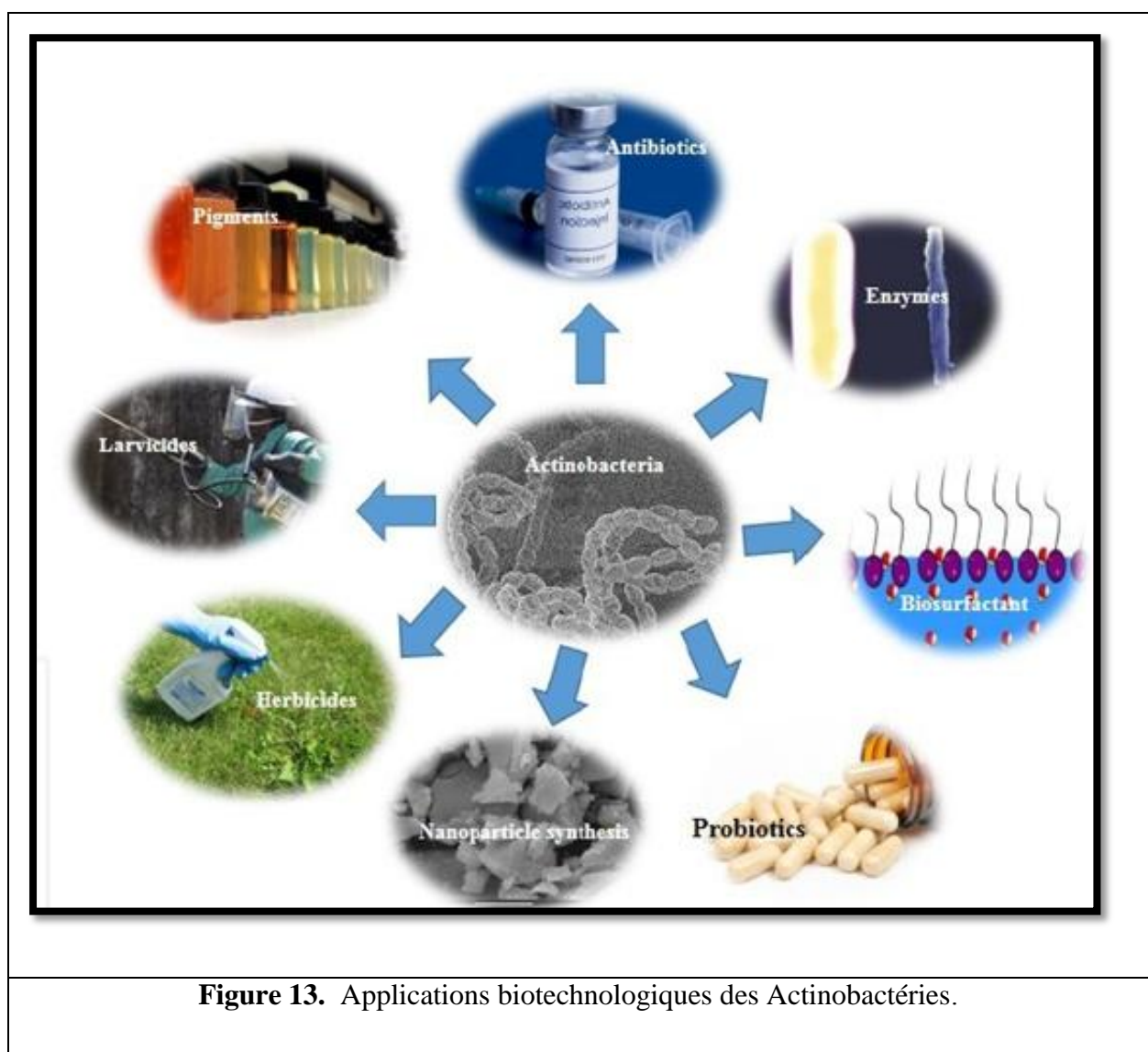


Figure 13. Applications biotechnologiques des Actinobactéries.

VII .1. Antimicrobiens

Les actinobactéries jouent un rôle important dans la production de médicaments variés qui sont extrêmement important pour notre santé et notre nutrition. Récemment, les maladies dues à des bactéries pathogènes multirésistants augmentent vigoureusement, et ainsi la recherche de nouveaux antibiotiques est efficace contre les agents pathogènes multirésistants. On a observé que les produits naturels ayant de nouvelles structures possèdent des activités biologiques utiles (**Dancer, 2004**) La nature reste toujours la source la plus riche et la plus polyvalente propice aux nouveaux antibiotiques, bien qu'il y ait des progrès considérables dans les domaines de la synthèse chimique et de la biosynthèse synthétique des composés antibactériens. La nature toxique de certains antibiotiques a conduit à leur utilisation limitée, bien que des milliers d'antibiotiques aient été découverts jusqu'à la date. Pour résoudre ce problème, la recherche de nouveaux antibiotiques qui sont plus efficaces et qui ne comporte aucun effet secondaire toxique est en cours. Comme déjà Mentionné, l'un des principaux problèmes de santé est la résistance aux antibiotiques. Une approche pour résoudre ce problème est de rechercher de nouveaux antibiotiques avec de nouveaux mécanismes d'action. La figure montre qu'une majorité d'antibiotiques proviennent de microorganismes, en particulier des espèces Actinobacteria. Près de 80% des antibiotiques mondiaux connus pour être dérivés d'Actinobacteria, principalement des genres Streptomyces et Micromonospora (**Jensen et al., 1991; Hassan et al.,2011**).

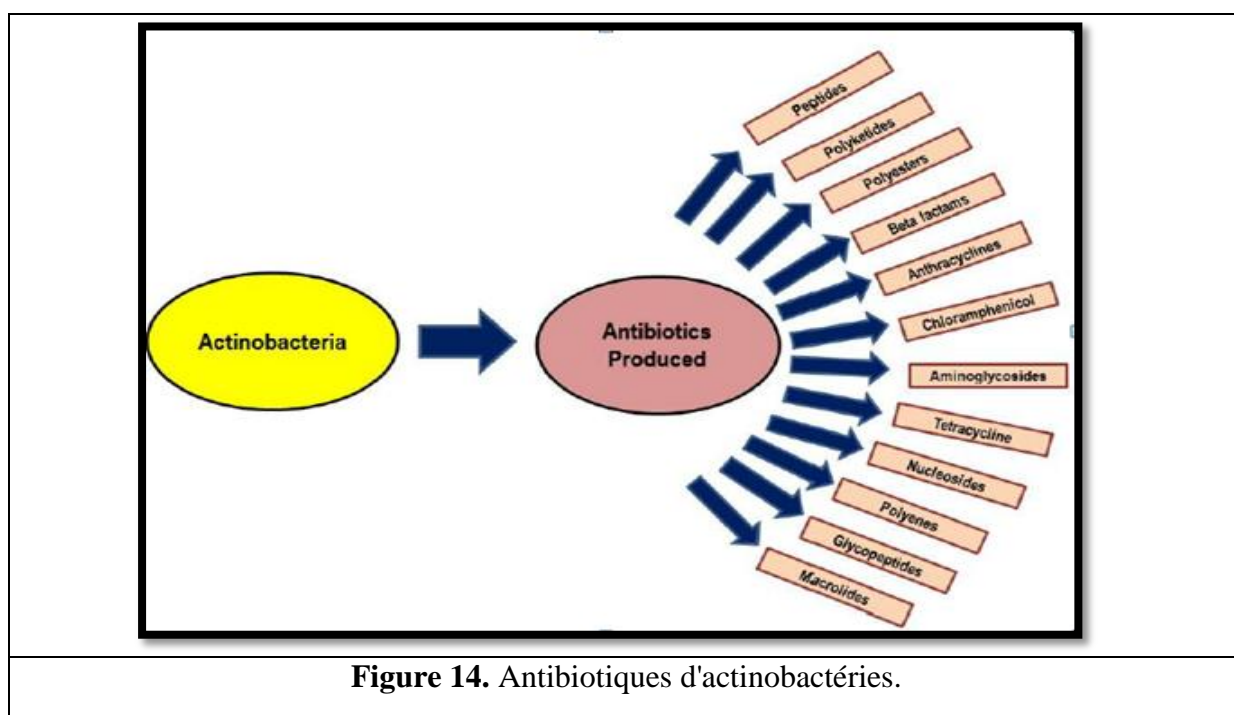


Figure 14. Antibiotiques d'actinobactéries.

VII .2. Enzymes

Une grande variété d'enzymes biologiquement actives sont produites à la fois par des actinobactéries marines et terrestres (**figure 15**). Ils sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules, ce qui les aide à effectuer une digestion extracellulaire. Cette enzyme est très importante dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier en raison de leur capacité à dégrader l'amidon (**Pandey et al., 2000**). Un autre aspect important de Actinobacteria est la production de cellulases, qui constituent une collection d'enzymes hydrolytiques qui hydrolysent les liaisons glucosidiques de la cellulose et des dérivés apparentés de cello-digosaccharide. La lipase est produite à partir de divers actinobactéries, bactéries et champignons et est utilisé dans les industries des détergents, des denrées alimentaires, des oléochimiques, des paramètres de diagnostiques, et aussi dans les industries de domaine pharmaceutiques (**Schmid et Verger, 1998**). Beaucoup d'actinobactéries ont été isolées de diverses sources naturelles, ainsi que dans les tissus végétaux et les sols rhizosphériques. Les fonctions biologiques des Actinobactéries dépendent principalement de sources à partir desquelles les bactéries sont isolées. Les actinobactéries, en particulier les streptomycètes, sont connues pour sécréter des proteases multiples dans le milieu de culture (**Sharmin et al., 2005**). De même, les Actinobactéries ont été révélées être une excellente ressource pour la L-asparaginase, qui est produite par une gamme d'Actinobactéries, principalement celles isolées des sols, telles que *S. griseus*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces albidoflavus* et *Nocardia sp* (**Dejong, 1972; Narayana et al., 2008**). les racines et les rhizomes de plusieurs plantes médicinales thaïlandaises telles que le citron (*Cymbopogon citratus*) et le gingembre (*Zingiber officinale*) ont longtemps été utilisés dans la médecine traditionnelle thaïlandaise pour les maux d'estomac et le traitement de l'asthme. Le sol de Rhizosphère de ces plantes peut être une source attrayante d'Actinobacteries, qui a la capacité de produire de nouveaux métabolites secondaires. Des enzymes telles que la catalase, la chitinase et l'uréase sont également produites à partir d'actinoabactéries. Plus intéressant, la kératinase, une enzyme qui dégrade la plume de poulet de volaille, a été produite avec succès à partir de *Nocradiopsis sp. SD5* isolé des déchets de plumes dans Tamil Nadu, Inde (**Saha et al., 2013**). De même, les Actinobactéries isolées à partir d'intestins de poulet et de chèvre ont montré la présence de diverses enzymes telles que l'amylase, la protéase, la phytase et la lipase (**Latha et Dhanasekaran, 2013**).

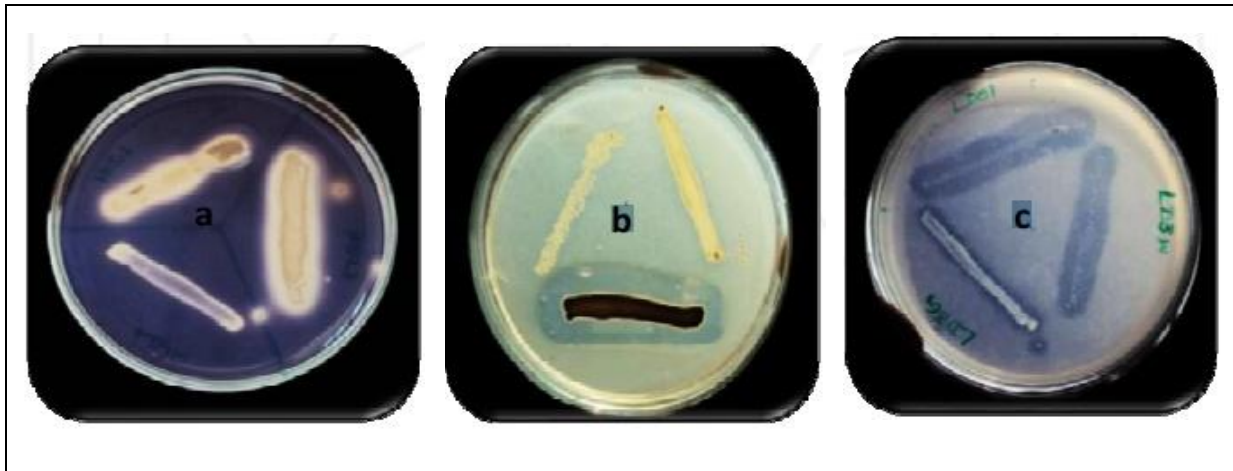


Figure 15. Différents types d'enzymes produits par Actinobacteria. une. Amylase. B. Protease. C. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation Actinobacteria confirme la production d'une enzyme particulière.

VII .3. Bioherbicides

Une autre application intéressante de l'Actinobacteria est l'utilisation de leurs métabolites secondaires comme herbicides contre les herbes indésirables et les mauvaises herbes. *Streptomyces saganonensis* produit des herbicides et des herbimycines qui contrôlent les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. L'anisomycine, produite par *Streptomyces* sp., est un type d'inhibiteur de croissance pour les mauvaises herbes herbacées annuelles telles que le gazons de crabe et les mauvaises herbes à feuilles larges; L'anisomycine peut détruire la capacité des plantes à synthétiser la chlorophylle de même, le bialaphos, un métabolite de *Streptomyces viridochromogenes*, est largement utilisé pour contrôler les mauvaises herbes herbacées annuelles et pérennes et les mauvaises herbes à feuilles larges en inhibant la synthèse de la glutamine. L'anisomycine peut produire de petites graines de barnyardness et crabe commun mort au-dessus de 50 ppm et inhiber la croissance de radicule inférieure à 12,5 ppm. Sa synthetase peut accumuler de l'ammoniac et contrôler la phosphorylation photosynthétique, provoquant la mort de la plante (Xiliang , 1994) . *S. hygroscopicus* produit de la coformycine carbocyclique et de l'hydantocidine, ce qui peut réduire la synthetase de l'aclenylosuccinate en augmentant le contenu de l'ATP et en retenant la synthèse (Pillmoor , 1998). De plus, la phthoxazoline, l'hydantocidine et l'homoalanosine de *Streptomyces* sp. Peut contrôler plusieurs mauvaises herbes (Yan Chu, 1993). (Dhanasekaran *et al.*, 2010) ont signalé que *Streptomyces* sp. avaient la capacité d'inhiber la croissance d'*Echinochilora crusgalli*. Aussi bien, *Streptomyces* sp. KA1-3, KA1-4, KA1-7 et

KA23A ont été trouvés hautement efficace contre *E. rotundus* (Dhanasekaran *et al.*, 2012) . Activité herbicide des composés bioactifs N-phénylpropanamide et N (naphtalène-1-yl) propanamide de *Streptomyces* sp. KA1-3 Priyadharsini *et al.*,2013 ; Priyadharsini *et al.*, 2013) a également été évalué.

VII .4. Vitamines

La vitamine B12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des Actinobactéries .L'isolement de la vitamine B12 à partir des fermentations d'Actinobacteria(Rickes *et al.*, 1948 ; Lichtman *et al.*, 1949) a suscité un intérêt considérable pour la production possible de vitamines par des fermentations microbiennes. L'addition de sels de cobalt aux médias semble être un précurseur pour toutes les Actinobactéries pour produire de la vitamine. Comme le cobalt est un agent bactéricide assez efficace, ce précurseur doit être ajouté avec précaution. Les fermentations produisant les antibiotiques streptomycine, auréomycine, griseine et néomycine produiront aussi de la vitamine B12 si le milieu est complété par du cobalt sans affecter les rendements des substances antibiotiques. Plusieurs autres études ont suggéré que certains Actinobacteria qui ne produise pas des antibiotiques produisant plus de cette vitamine que celles qui produisent des antibiotiques. On a montré que les actinobactéries produisaient d'autres vitamines hydrosolubles, avec des études spéciales sur la production de thiamine et le dérivé d'acide pteroylglutamique qui favorise la croissance de certaines souches de *Leuconostoc citrovorum* et de la coenzyme A.

VII .5. Pigments

Étant donné que les colorants synthétiques ont des limites telles que l'utilisation de produits chimiques dangereux pour leur production, la création de problèmes de sécurité des travailleurs et la génération de déchets dangereux, les pigments micro-orientés sont très préoccupants. En particulier, les actinobactéries sont caractérisées par la production de divers pigments sur des milieux naturels ou synthétiques (**figure 16**) et sont considérées comme une caractéristique culturelle importante dans la description des organismes. Tous les changements phénotypiques induits par des influences environnementales aideront les Actinobactéries car ils se vantent de morphologies de colonies distinctives et produisent une variété de pigments et de filaments de ramification appelés hyphes aérienne, ce qui leur confère une apparence caractéristique floue. Ces pigments apparaissent habituellement dans différentes nuances de bleu, violet, rouge, rose, jaune, vert, brun et noir, qui peuvent être

dissoutes dans le moyen ou il peut être retenu dans le mycélium. Les pigments produits par *Streptomyces* peuvent être soit des endopigments (liés à certaines structures cellulaires), soit des exopigments (excrétés dans le milieu environnant). Parfois, les antibiotiques différents produits par les Actinobactéries sont considérés comme des pigments. Comme la formation du pigment est influencée par le pH du milieu, l'aération, la température de la croissance et les sources de carbone et d'azote, on connaît un peu de la nature chimique exacte des pigments. Sa formation est également liée aux mécanismes respiratoires, aux mécanismes de défense et à la protection aux ultraviolettes. Ces microbes ont également la capacité à synthétiser et à excréter les pigments noirs, la mélanine ou le mélanoïde, qui sont considérés comme un critère utile pour les études taxonomiques. L'industrie textile produit et utilise environ 1,3 million de tonnes de colorants, pigments et précurseurs de colorants, d'environ 23 milliards de dollars, dont la quasi-totalité est fabriquée de façon synthétique fournit une liste de pigments de différentes Actinobactéries.

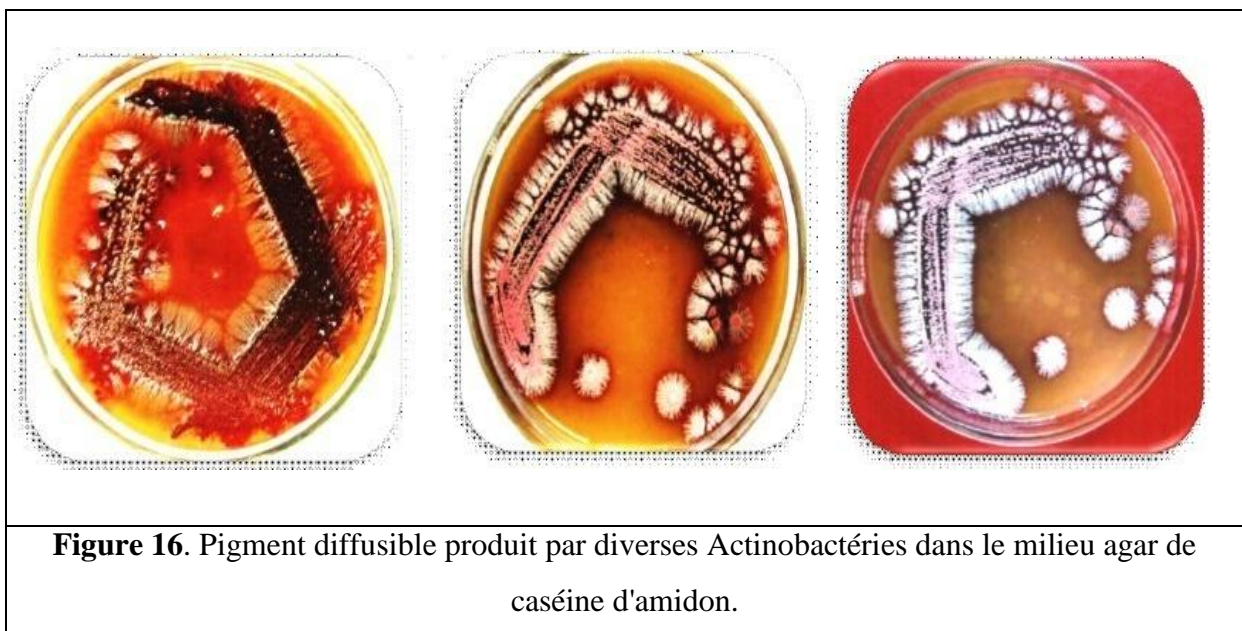


Figure 16. Pigment diffusible produit par diverses Actinobactéries dans le milieu agar de caséine d'amidon.

VII .6. Bioremédiation

Les actinobactéries possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour une application dans la bioremédiation des sols contaminés par des polluants organiques. Dans certains sites contaminés, les Actinobactéries représentent le groupe dominant parmi les agents dégradants (**Johnsen et al., 2002**). Ils jouent un rôle important dans le recyclage du carbone organique et peuvent dégrader les polymères complexes. **Sanscartier et al** (**Sanscartier et al., 2009**) ont signalé que la plus grande utilisation d'hydrocarbures pétroliers est largement utilisés dans notre vie quotidienne, en tant que composés chimiques et

combustibles, est devenue l'un des contaminants les plus courants des grandes surfaces du sol et est finalement considéré comme un problème environnemental majeur. Certains rapports suggèrent que la flore de *Streptomyces* pourrait jouer un rôle très important dans la dégradation des hydrocarbures. De nombreuses souches d'Actinobactérien ont la capacité de solubiliser la lignine et de dégrader les composés liés à la lignine en produisant des enzymes dégradant la cellulose et l'hémicellulose et la peroxydase extracellulaire. Des espèces d'Actinobactérie ont la capacité de vivre dans un environnement huileux et peuvent donc être utilisées dans Bioremédiation pour réduire les polluants pétroliers. *Nocardiopsis* sp. SD5 a dégradé les déchets de plumes en produisant de l'enzyme kératinase (Saha *et al.*, 2013).

VIII. Utilisation des actinobactéries en lutte biologique

Dans le cas de la pathologie végétale, la lutte biologique est la lutte menée contre les maladies des plantes au moyen de micro-organismes antagonistes. Les actinobactériennes possèdent les principales propriétés de l'antagoniste idéal, défini par plusieurs auteurs. Ces critères laissent supposer que ce groupe de micro-organismes peut jouer un rôle primordial dans le domaine de la protection des plantes contre leurs bio-agresseurs.

- ❖ Le taux de multiplication est très élevé. La forte sporulation permet une importante dissémination.
- ❖ Le taux élevé de colonisation de la rhizosphère et leur maintien en conditions défavorables.
- ❖ Une adaptation à la vie aérienne et souterraine le met en contact direct avec de nombreux pathogènes.
- ❖ Les facultés antagonistes des actinomycètes s'expliquent de façon diverses (compétition spatiale et nutritionnelle, hyper parasitisme et antibiose).
- ❖ La phytopathogénie chez les actinobactériennes est inconnue.
- ❖ Enfin, la grande variabilité des souches en ce qui concerne les propriétés physiologiques et antagonistes et leur expression, peut rendre la sélection difficile.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est l'étude phénotypique de quelques souches d'actinobactéries isolées à partir de la région de Hammam Dahlaa , Mesif et Boussada de la Wilya de Msila et Okhdeir de la Wilya Bechar, de Djelfa et de Constantine.

I. Prélèvement des échantillons

1. Sol

Les prélèvements du sol ont été réalisés dans des conditions d'asepsie après écartement des gros débris (pierres, racines, ect.), ensuite une quantité suffisante de terre est prélevée du sol (100g), jusqu'à 10 centimètres de profondeur, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile, ces échantillons ont été séchés à l'air ambiant et broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre et faciliter l'isolement des souches d'actinomycétales. Ces échantillons sont conservés à 4°C pendant 1-2 jours au maximum pour ne pas affecter sa contenance initiale en microorganismes afin de les transporter au laboratoire (**Chronakova et al, 2010; Awad et al., 2009 ; Ceylan et al, 2008**).

2. Eau

Les échantillons d'eaux, ont été prélevés au niveau de source thermale de Hammam Dahlaa région du M'sila.

I.3. Isolement des actinobactéries

I.3.1. Prétraitement des échantillons

Avant l'isolement, les échantillons du sol subis un prétraitement pour augmenter le nombre des actinobactéries, pour cela deux prétraitements ont été appliqués:

- **Traitement par la chaleur:** chauffage de l'échantillon à 110°C pendant minutes après éparpiller l'échantillon sur le papier aluminium pour permettre un bon traitement (**Bouras et al., 2013 ; Awad et al., 2009**). Le but étant de réduire la quantité des bactéries à Gram négatif (**Jeffrey, 2008**) ;
- **Traitement de l'échantillon avec du CaCO₃** (carbonate de calcium),

Une quantité de CaCO₃ égale à 1/10 par rapport la quantité de l'échantillon est ajoutée puis le mélange, est incubé à une température de 26-30°C pendant 2 jours (**kampfer, 2006; Oskay 2009**); Ce prétraitement a pour effet la réduction de la flore fongique ainsi que l'augmentation du nombre d'actinobactérie contenue dans chaque échantillon (**Arshad et al, 2012**). 5 ml d'eau est agité en présence de **phénol** à 35 mg pendant 10 minutes et est filtré à travers une membrane millipore (0,45 µ m). Les spores d'actinobactéries sont récupérées en agitant la

membrane avec des billes de verres stériles de 4 mm de diamètre dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L).

I.3.2. Dilution et ensemencement

Une quantité de 1g de l'échantillon de sol est ajouté à 9 ml d'eau distillée stérile ou bien 9 ml d'eau physiologique stérile et agiter bien comme à l'aide du vortex deux fois pendant 5 minutes pour permettre une bonne dispersion de la charge microbienne dans le tube et avoir en fin de compte une solution mère ; puis établir une dilution jusqu' à 10^{-4} (**Arasu et al., 2009 ; Boudemagh, 2007 ; Kitouni, 2007**).

➤ **Ensemencement en masse**

Cette méthode consiste à déposer tout d'abord 0.1 ml de dilution 10^{-4} dans une boîte de pétri, puis coulé environ 15ml de milieu ISP₂ ou Bennett en surfusion. Les boîtes sont agitée par un mouvement circulaire lent, afin d'homogénéiser le contenu des boîtes. Les boîtes sont incubées pendant à 30°C pondant 7 jours.

➤ **Ensemencement en surface**

Cette méthode consiste à déposer 0.1ml de chaque échantillon correspondant soit à la dilution 10^{-4} à la surface de milieu de culture ISP₂ ou Bennett, puis étalé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 30°C.

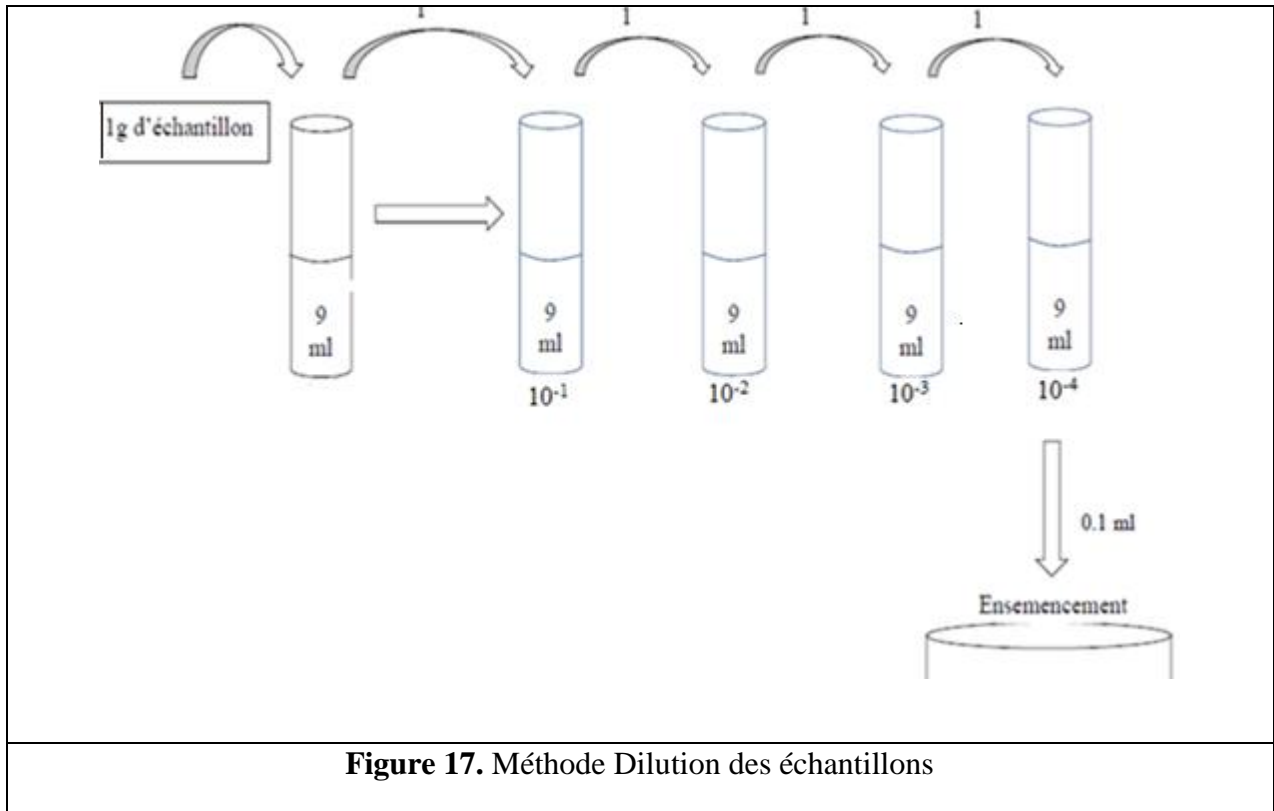


Figure 17. Méthode Dilution des échantillons

I.3.3. Sélection des actinobactéries

Après incubation des boîtes pétri pendant 7 jours à une température de 30°C et en conditions d'aérobiose; les actinobactéries ont été isolées selon leurs critères morphologiques, macroscopiques (Awad *et al.*, 2009), qui sont en général: morphologie des spores, couleur des spores, mycélium du substrat, pigment solubles et la production de la mélanine (Balasubramaniam *et al.*, 2011) et microscopique par observation directe sous microscope optique (grossissement x10) (Boussaber *et al.*, 2012).

I.3.4. Purification et conservation des actinobactéries

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode de stries sur des boîtes pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 7 jours à 30°C. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention de souches pures. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles pour conserver la stabilité génétique des souches (Kitouni, 2007; Boussaber *et al.*, 2012).

I.4. Milieux de cultures

Deux milieux de cultures recommandés pour l'isolement des actinobactéries, ont été utilisés, qui sont:

- Milieu Bennett (Lee *et al.*, 2011);

- Milieu ISP₂ (Ara *et al*, 2012).

La composition de chaque milieu de culture est donnée dans l'annexe. Le pH de chaque milieu de culture est ajusté à raison de 7.2 ± 0.2 avant la stérilisation.

II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolée

II.1. Les germes cibles

Un criblage préliminaire pour évaluer le pouvoir antagoniste des isolats d'actinobactérie a été réalisé sur plusieurs germes cibles, principalement des bactéries et des levures pathogènes pour l'homme provenant de l'Institut Pasteur d' Alger, certaines d'entre elles sont cataloguées dans des collections mondiales ATCC (American Type Culture Collection).

Les microorganismes cibles utilisés sont les suivantes:

Tableau 3. Caractéristique des souches à indicatrices.

Bactérie	Gram	Code
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC10876
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 2035
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 9372
<i>Kelebsiella pneumoniae</i>	Négatif	ATCC 4352
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922
<i>Candida albicans</i>	Levures	ATCC 10231
<i>Sacchromyces servisiae</i>		ATCC 10231

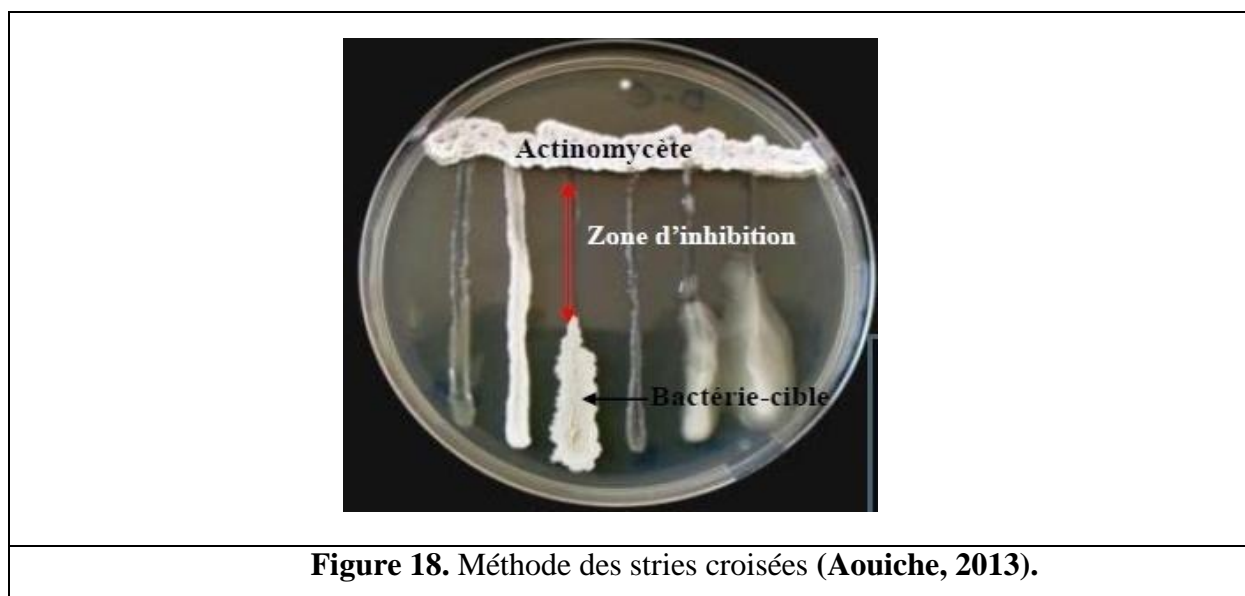
Chaque souche bactérienne ou levure est revivifiée dans 9 ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées.

A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. C'est pour cela chaque souche de cette culture estensemencée en stries sur une boîte de pétri contenant du milieu gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées.

II .2. Méthode de stries croisées

L'activité antimicrobienne des isolats est évaluée par la méthode des stries croisées sur Milieu ISP₂. Celle-ci consiste à ensemencer les souches à tester sous forme d'un seule trait à la surface du milieu solide 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'actinomycète.

Les boîtes sont incubées à 37°C de 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 de la souche cible et de la souche test (actinobactéries).



II .3. Méthode des cylindres d'agar

L'activité antibactérienne des isolats a été également évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Muller Hinton. Les actinobactéries sont ensemencés en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP₂. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 15 jours (Meklat, 2012). Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emport pièce à partir de ce milieu déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par le germe cible (Djinni, 2009).

Remarque:

- le mycélium est en contact avec la gélose.
- L'inoculum des microorganismes cibles ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes après de sa préparation à fin d'éviter la diminution des nombres des bactéries.

Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d’être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d’inhibition sont mesurées après 24h d’incubation à 37°C. La **figure 19** illustre les étapes de cette méthode.

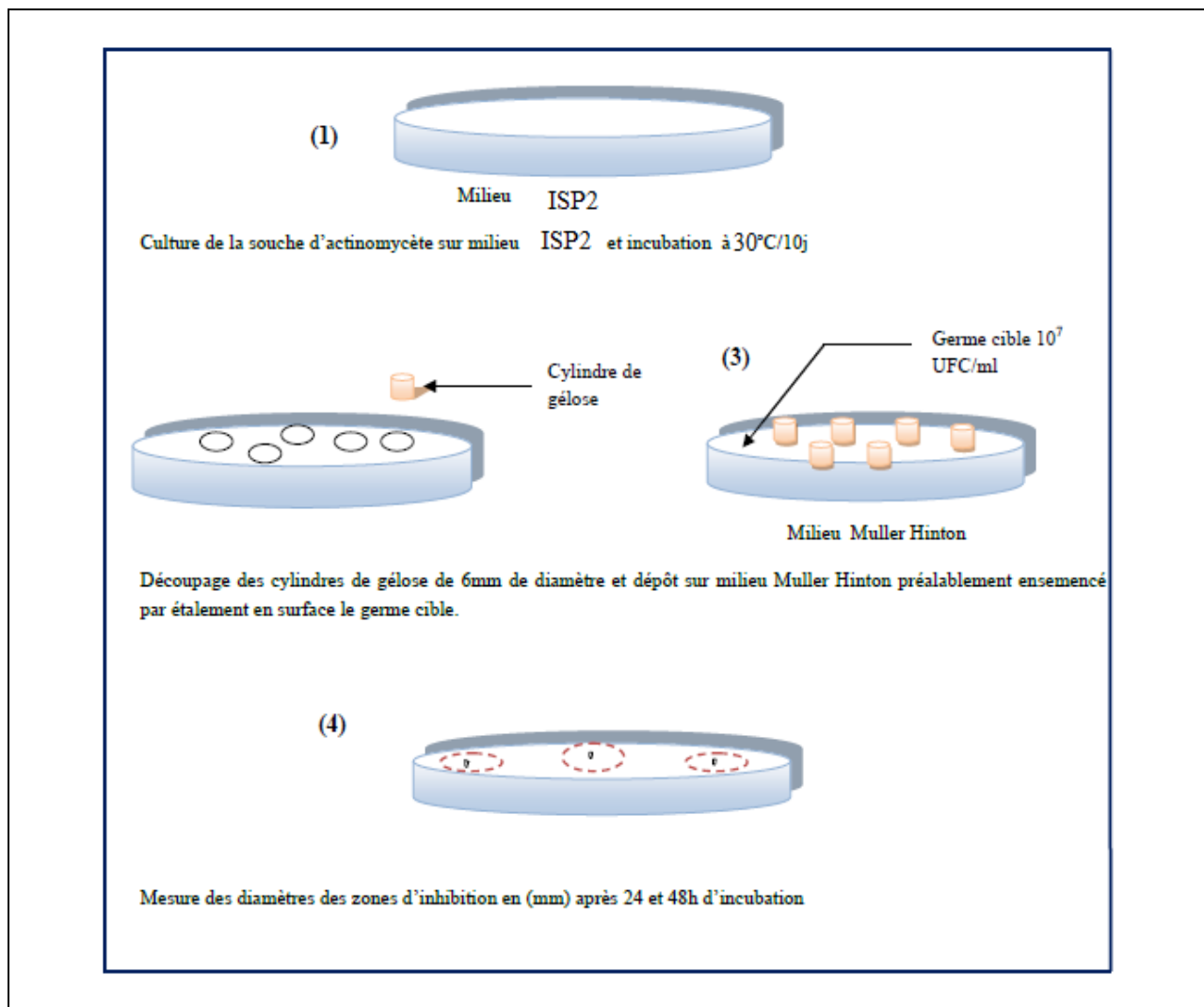


Figure 19. Mise en évidence de l’activité antimicrobienne des isolats d’actinobactérie sur milieu Muller-Hinton par la méthode des cylindres d’agar (**Bastide et al., 1986**).

III. ETUDE TAXONOMIQUE

III .1. Etude morphologique

Les meilleurs isolats présentant une activité antagonistes vis-à-vis des microorganismes cibles ont fait l’objet d’une étude taxonomique.

III .1.1. Caractéristiques culturelles

Cette étude repose sur l’observation de la croissance et de la couleur des mycélia aérien et du substrat ainsi que des pigments diffusibles. Les caractéristiques culturelles des colonies sont

notées après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C sur les milieux ISP₂, ISP₃, ISP₄, et ISP₇ recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)**, ainsi que sur les milieux : gélose nutritive et Bennett, GLM, MPPM. La composition des milieux est donnée en annexe. Les couleurs du mycélium aérien et du substrat sont définies à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC-NBS).

III .1.2. Caractéristiques micromorphologiques

La micromorphologie des chaînes de spores des isolats est observée directement sur les différents milieux cités précédemment, à l'aide d'un microscope optique, à deux grossissements (X10 et X40).

IV. Etude physiologique et biochimique

Une série de tests physiologiques discriminants, généralement utilisés par les taxonomistes pour la différentiation entre les espèces des actinomycètes, est retenue pour l'identification de nos souches. Ces tests sont cités ci-après et les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture sont donnés en annexe.

IV.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Sur le milieu Mueller Hinton, la souche d'actinomycète est ensemencée en surface. Les disques d'antibiotiques (**tableau 4**) 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 (**Chun *et al.*, 1998; Monciardini *et al.*, 2003**).

Tableau 4. Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Antibiotiques	charge (µg/disque)
Chloramphénicol (C)	30
Ofloxacin (ofx)	5
Lincomycin (L)	10
Amoxicillin (AX)	25
Nitrofuratoïn (F)	300

IV.2. Production de pigments mélanoïdes

La mise en évidence des pigments mélanoïdes est réalisée sur les milieux gélosés ISP₇ (tyrosine agar) recommandés à cet effet par **Shirling et Gottlieb (1966)** et sur milieux MPPM (**Marillize le Rose , 2015**).

IV.3. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu minéral de base ISP₉ (**Shirling et Gottlieb, 1966**) (voir annexe). Le test est considéré comme positif lorsque la croissance est supérieure à celle du témoin sans sucres.

Les glucides et dérivés testés comme seule source de carbone sont les suivants: arabinose, D-fructose, galactose, D-glucose, Inositol, mannitol, L-rhamnose, ribose, xylose, lactose.

IV.4. Utilisation des acides gras

Les tests réalisés consistent à noter la croissance en présence d'oxalate de sodium, acétate de sodium. Le milieu de base utilisé pour ces tests est le milieu ISP₉.

IV. 5. Utilisation des acides aminés

Le test consiste à observer la croissance des souches en présence de certains acides aminés comme seules sources d'azote. La méthode d'ensemencement des actinomycètes et la lecture des résultats sont les mêmes que pour l'utilisation des sucres.

Les acides aminés utilisés sont la proline, Glycine, L- leucine, Ils sont stérilisés comme pour les sucres, puis ajoutés séparément au milieu de base à raison de 1%. Un témoin sans acide aminé est aussi réalisé.

IV.6. Croissance en présence d'inhibiteurs

Les tests réalisés consistent à noter la croissance en présence de différentes concentrations de phénol (0,1% w/v), de pénicilline (10 µg/ml).

Le milieu de base utilisé pour ces tests est le milieu Bennett (**Aouiche, 2013**).

IV.7. Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 1 jour d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Kitouni, 2007**).

IV.8. Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont ensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% (P/V) de gélatine puis incubées 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

IV.9. Hydrolyse de tyrosine

La décomposition est réalisé selon la méthode de **Gordon (1968)**, 1 g de tyrosine est solubilisé dans 20 ml d'eau distillé puis stérilisé à l'autoclave. La suspension est ensuite complété à 200 ml avec l'agar nutritif stérile, refroidi à 45°C et distribuer dans des boites de Pétri stériles. Les boites ensemencées sont mise à incuber à 30°C pendant 20 jours. Les lectures consistent à observer les zones de dégradation (zones claire) de ces composés, autour des colonies des souches sélectionnés.

IV.10. Hydrolyse de caséine de lait

10 g de lait écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillé (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclaves. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boites de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique l'hydrolyse de la caséine (**Gordon et al., 1974**).

IV.11. Hydrolyse de Tween 80

10 gouttes de tween 80 (ou polyoxyéthylène sorbitanmonooléate) autoclave sont ajoutées à 25 ml de milieu composé de: peptone bactériologique: 10 g, chlorure de sodium: 5 g, chlorure de calcium: 0,1 g, agar : 25 g, eau distillé : 1000 ml. Il se forme un halo opaque, autour des colonies hydrolysant le tween 80, du à la précipitation des acides gras (**Marchal et Bourdon, 1973**).

IV.12. Recherche de Catalase

Deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes sont déposées sur une colonie d'actinomycète âgée d'une semaine et poussant sur l'agar nutritif, si la souche étudiée possède une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses (**Marchal et Bourdon, 1973**).

IV.13. Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Des tubes contenant du milieu TSI sont ensemences puis incubes pendant 14 jours a 30°C. La production de l'H₂S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu (**Guiraud, 1998**).

IV .14. Utilisation du citrate

Ce test détermine la capacité qu'a un organisme d'utiliser le citrate comme seule source de carbone. Des cultures de souches *Streptomyces* sur milieu citrate de Simmons incubées à 30°C sont observées quotidiennement jusqu'au 14 jours. La coloration du milieu en bleu traduit l'utilisation du citrate par les souches (**Guiraud, 1998**).

IV.15. Dégradation de l'urée

Ce test est préconisé pour la recherché des souches de *Streptomyces* possédant des uréases en utilisant le milieu urée-indole, après culture, ces milieux prennent une teinte rouge si l'urée est dégradée (Guiraud, 1998).

IV.16. Production d'indole

La recherche d'indole est réalisée sur des cultures jeunes de *Streptomyces* sur milieu urée-indole, en utilisant des gouttes du réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge en surface indique un test positif (Guiraud, 1998).

IV.17. Tests de sensibilité à divers agents physiques

Pour évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis de certains composés, à des concentrations définies, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinomycètes (Athalye et al., 1985) sont choisis à savoir :

IV.17.1. Croissance à différentes températures

Le milieu utilisé pour déterminer la température optimale de croissance est le milieu de ISP₂ (annexe 01). Les boîtesensemencées sont incubées à différentes températures: 5, 25, 30, 40 et 50°C pendant 2 semaines

IV.17.2. Croissance à différents pH

La même procédure que précédemment est suivie. Les valeurs de pH étudiées sont les suivantes : 3, 5, 7, 9, 11.

IV.17.3. Croissance à différentes concentration en NaCl

Ce test est réalisé sur le milieu ISP₂ liquide additionné de NaCl pour obtenir des concentration de (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10). Après encemencement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 7 jours.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sol étudiés proviennent de 06 régions (Hammam Dalaa , Mesif et Boussada de la Wilaya de Msila et Okhdeir de la Wilaya de Bechar, de Djelfa et de Constantine voir **tableau 5**.

Le prélèvement a été effectué durant le moi de Février 2017 et la description de ces échantillons est récapitulée dans le tableau suivant.

Tableau 5. Situation géographique des stations d'échantillonnage.

Code de l'échantillon	Région	Altitude (mètres)	Latitude (N)	Longitude (E)	Etage bioclimatique	Caractéristique de sol
Ech 1 (H1)	M'sila (Hammam Dhalaa)	772	35°55'41"	4°22'28"	Q2 Semi aride	L'eau de Hammam Dalaa Source Thermale
Ech2 (MS1)	M'sila (Msife)	477	35°42'20"	4°32'30"	Aride	Sableux limoneux
Ech 3 (D2)	Djelfa	1138	34°40'22"	3°15'46"	Semi-aride	Sableux limoneux
Ech 4 (O5)	Okhdeir (Béchar)	773	31°37'00"	2°13'00"	arides	sableux
Ech (C)	Constantine	574	36°21'54"	6°36'52"	Semi-aride	limoneux-calcaire
Ech 6 (10)	M'sila (Bou Saâda)	470	35°13'09"	4°10'54"	Semi arides	Sableux limoneux

I.2. Isolement des actinobactéries

Une variété de milieu sélectifs et de traitement ont été utilisés pour avoir un bon isolement d'actinobactérie des différent habitats (**Bouras et al., 2013**). Dans notre travail nous avons utilisé deux prétraitements, un traitement physique par séchage, et chimique par enrichissement de bicarbonate de calcium (CaCO_3). Le traitement avec le CaCO_3 a donné de bons résultats par rapport au traitement avec la chaleur, soit de point de vue nombre d'actinobactérie présents dans les boites mères qui étaient plus élevés pour les échantillons traités par les carbonate de calcium, soit qu'il y'avait moins de contamination par les moisissures. En revanche, Nous avons constaté que les échantillons qui n'ont pas étaient

traités du tout ont donnés moins d'actinobactérie que les échantillons traités par les deux types de traitements.

Ceci est similaire à des travaux antécédents (**Kitouni, 2007 ; Boudemagh, 2007**) qui avaient montré que le traitement des échantillons avec le CaCO_3 est le meilleur traitement pour l'isolement d'actinobactérie notamment les *Streptomyces*. Selon **EL-Nakeeb & Lechvalier (1963)**, l'ajout du CaCO_3 conduit à une augmentation du nombre d'actinobactérie dans les échantillons lors de l'isolement, et le traitement des échantillons d'eau par le phénol diminue le nombre des bactéries autres que les actinobactéries. **Jeffrey (2008)** a cité que le CaCO_3 réduit le nombre des bactéries à Gram négatif dans les échantillons, donc il ya plus de chance pour isoler les actinobactéries qui sont des bactéries à Gram positif et principalement le Genre Streptomycètes, de l'autre part le traitement par la chaleur favorise l'isolement des bactéries Rhizosphériques thermophile et principalement les actinomycètes par rapport aux autre bactéries présentant dans le sol.

Les colonies d'actinobactérie apparaissent après 14 à 21 jours d'incubation, sur les deux milieux d'isolements utilisés (Bennett et ISP_2). Les colonies obtenues ont des tailles différents (petite, moyenne, grande) de forme variable (lisse, bombé, aplatie....ect.) sont tous incrustées dans la gélose de couleurs différentes (jaune, blanche, marron...ect), parfois le mycélium aérien est absent. L'aspect macroscopique des isolats est différent. L'aspect microscopique, indique que tous les isolats ont un aspect filamenteux ramifié ou non, parfois il est fragmenté, ce qui les rapproche d'une façon certaine aux actinobactéries.



Figure 20. Photo d'un biote mère de l'isolement d'actinobactérie à partir d'un échantillon de sol de Mesif provenant de la wilaya de Msila (dilution 10^{-4}).

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinobactéries n'existe pas. Il faut toujours varier les méthodes et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**Boudemagh, 2007**). C'est la raison pour laquelle nous avons utilisés deux milieux de cultures aussi bien du traitement des échantillons différentes.

Le milieu Bennett a permis l'isolement d'un nombre élevé de colonies d'actinobactérie à partir du sol. Cette propriété peut être expliquée par la richesse de ce milieu par les substrats carbonés (le glucose) et azotés (extrait de levure et extrait de viande), ce qui stimule la croissance des actinobactéries et facilite leur isolement. Le milieu ISP₂, donne un faible rendement d'isolement d'actinobactérie par rapport au milieu Bennett. Il est important de noter cependant, que plusieurs auteurs emploient autres milieux d'isolement tel que le milieu Chitine vitamine B, caséin asparagien agar...ect, afin d'augmenter les chances d'obtenir une grande variété de microorganismes ou bien pour le but d'isoler des genres actinomycétales rares présentant des activités biologiques intéressantes (productions des nouvelles molécules bioactives).

La température convenable pour les actinobactéries est de 28 à 30°C permettant alors une meilleure croissance des actinobactéries cultivées. La durée d'incubation est aussi très importante car la synthèse des métabolites secondaires par les actinobactéries suit la phase croissance active qui dure 7 jours, il faut alors prolonger le temps d'incubation jusqu'aux 21 jours pour que les microorganismes puissent synthétiser les métabolites secondaires.

II. Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinobactéries

II .1. Méthode de stries croisées

Nous avons étudié l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries par la technique de stries croisées. Les résultats obtenus sont montrés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Résultats de l'activité antimicrobienne (mm) des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des souches testées par la méthode de stries croisées.

Souche référence	Zone d'inhibition en (mm)		
	Isolat D2	Isolat MS1	Isolat C
1. <i>S.aureus</i> ATCC43000;	12	0	0
2. <i>S.aureus</i> ATCC25923;	14	0	0
3. <i>E.coli</i> ATCC25922;	54	55	0
4. <i>P.aureus</i> ATCC27853;	0	13	0
5. <i>K. Pneumoniae</i> ATCC4352 ;	45	14	31
6. <i>E. faecalis</i> ATCC2035;	20	45	20
7. <i>B.sustilis</i> ATCC9372;	25	0	15
8. <i>B. sustilis</i> ATCC6633;	5	0	0
9. <i>B. Cereus</i> ATCC10876;	40	0	27
10. <i>C.albicans</i> ATCC10231;	29	0	45
11. <i>S.serviesiae</i> ATCC9763.	14	14	46

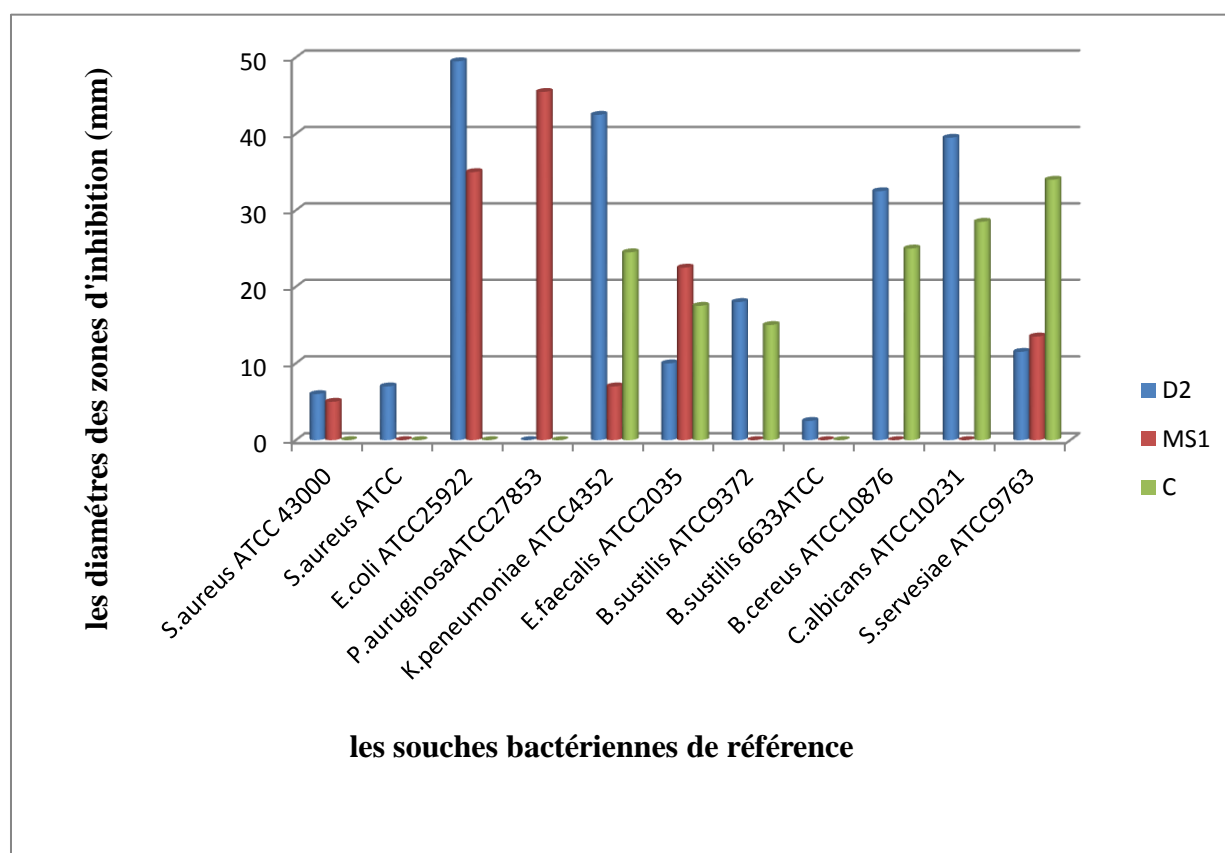


Figure 22 : Diamètre d'inhibition (mm) de la croissance des souches de références par les Isolats d'actinobactérie (D2, Ms1, C) par la méthode de strie croisée.

Nous avons remarqué que L'isolat **D2** présente une activité antimicrobienne très intéressante par rapport aux autres isolats testés Ms1 et C, Le spectre d'action est plus large et s'étend sur tous les bactéries Gram+ et Gram- testées et les deux levures, une meilleure activité a été observée avec les souches suivantes : *E.coli*, *Kelebsiella pneumoniae* et *Bacillus cereus* avec une distance d'inhibition de 50 et 45 mm et une activité moyenne de (30 – 20 mm) sur les autres bactéries testées, une forte activité antilevurienne de 29 mm vis-à-vis *C. albicans* par rapport au *Sacharomyces Serviseae* ATCC 9763.

L'isolat **Ms1**, présente une activité antimicrobienne intéressante avec une distance d'inhibitions de 55 et 45 mm vis-à-vis de *E. coli* et *Enterococcus faecalis* respectivement, et une faible activité antimicrobiennes contre les autres bactéries. Cette dernière présente une activité antilevurienne est faible contre *Saccharomyces Serevisiae* et nulle pour *C. albicans*.

L'isolat **C** présente une moyenne à faible activité antimicrobiennes contre les deux bactéries Gram + et Gram- avec une distance d'inhibition compris entre 13 et 27 mm. Pour cet isolat, l'activité antilevurienne est bonne contre *Saccharomyces Serevisiae* et *C. albicans*.

2. Méthode de disque d'agar

Afin de confirmer l'activité antimicrobiennes de notre isolats, nous avons utilisé une autre technique plus précieuse celle de cylindre d'agar qui donne plus de précision sur l'activité antimicrobienne de notre isolats d'actinobactéries.

Tableau 7. Diamètre d'inhibition de la croissance des souches de références par les Isolats d'actinomycètes (**D2**, **Ms1**, **C**,).

Souche référence	Zone d'inhibition en (mm)		
	Souche Actinomycètes		
	Isolat D2	Isolat MS1	Isolat C
1. <i>S.aureus</i> ATCC43000;	0	11	10
2. <i>S.aureus</i> ATCC25923;	14	11	0
3. <i>E.coli</i> ATCC25922;	19	10	15
4. <i>P.aureus</i> ATCC27853;	0	0	0
5. <i>K. Pneumoniae</i> ATCC4352 ;	25	12	16
6. <i>E. faecalis</i> ATCC2035;	22	0	0
7. <i>B.sustilis</i> ATCC9372;	19	0	14
8. <i>B. sustilis</i> ATCC6633;	15	0	16
9. <i>B. Cereus</i> ATCC10876;	0	0	0
10. <i>C.albicans</i> ATCC10231;	11	0	13
11. <i>S.serviesiae</i> ATCC9763.	12	0	12

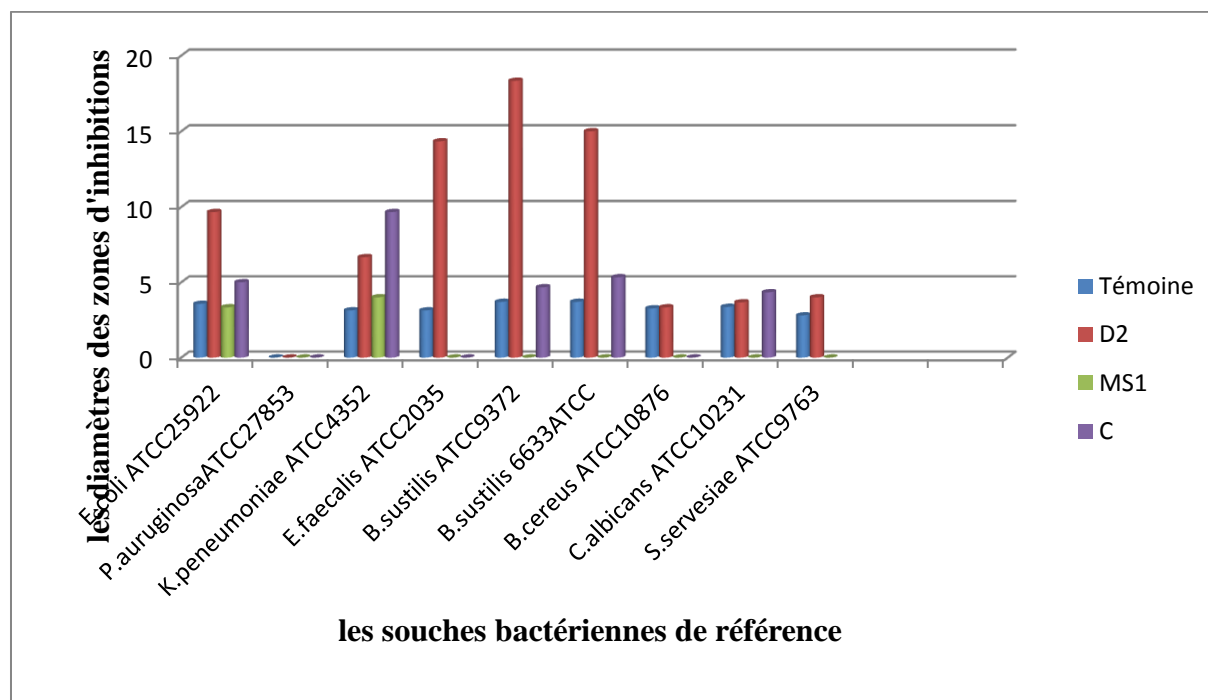


Figure 24 : Diamètre d'inhibition (mm) de la croissance des souches de références par les Isolats d'actinobactérie (**D2**, **Ms1**, **C**) par la méthode de cylindre d'agar.

L'isolat **D2** montrant une activité antibactérienne importante qui inhibe toutes les bactéries testées sauf *S. aureus* ATCC 43000, *P. aeruginosa* et *B. cereus* ATCC 27853 et donnant des zones d'inhibitions importantes (19-25 mm). La plus grande zone d'inhibition est obtenue par l'isolat D2 contre *K. Pneumoniae* et *E. faecalis*.

Concernent la souche **Ms1** aucune activité observé exceptionnellement *E.coli*, *S. aureus*, *K. Pneumoniae*, avec une plus petite zone d'inhibition à 1 mm (activité faible).

L'isolat **C** présent une moyenne activité antibactérienne avec une zone d'inhibition de 15-16 mm de diamètre généralement avec toutes souches de références misa part, les souches suivantes *S.aureus*, *.E. faecalis*, *B. Cereus*, *S. aureus* dont aucune activité n'a été remarqué.

Discussion

Nous remarquons que les activités antimicrobiennes des souches testées sont mieux exprimées par la méthode des cylindres d'agar que la technique de Strie croisée qui donne des résultats préliminaires disant approximative, Cette méthode permet une meilleure visualisation et observation des zones d'inhibitions, compte tenu du fait que c'est une méthode où l'inoculum des germes cible utilisé est bien précis (0.5 mac Farlan), ce qui n'est pas le cas pour la méthode des stries croisées dont les germes cibles sont ensemencés sous forme d'un trait perpendiculaire par rapport au trait de l'isolat d'actinomycète à testé

(concentration n'est pas précise) , On peut dire que cette technique de strié croisé est une technique préliminaire pour l'étude de l'activité antimicrobienne surtout lorsqu'il s'agit d'un panoplie des souches a testé , cette technique doit être compléter par d'autre technique tel que (cylindre d'agar, test de filtrat de culture, ect), on peut dire que cette technique donne une idée à titre qualitative (**voire annexe 2**).

III. Etude taxonomique des souches sélectionnées

Les isolats d'actinomycètes codés (Ms1, D2, C, H 1, 10, et O5) ont fait l'objet d'une étude taxonomique sur la base de leurs caractéristiques morphologiques (macromorphologiques et micro-morphologiques), physiologiques et biochimique.

III.1. Etude des caractères morphologiques (Aspect culturale).

III .1.1. Etude macroscopique

Les différentes observations concernant la croissance, le développement du mycélium Aérien et la pigmentation des isolats (D2, Ms1, C, O5, H1, 10), sont rassemblées dans le **tableau 8**.

La croissance d'isolat **D2** est abondante sur les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₅, ISP₇ gélosés, moyenne sur le milieu Bennett, faible sur milieu GLM, et aucune sporulation n'a été observée sur les milieux ISP₃ et Bennett à l'exception des milieux ISP₄ ISP₅ et GN qui présente une meilleur sporulation et une faible sporulation sur les milieux qui restes. La couleur du mycélium aérien et du substrat varie selon le milieu utilisé, du blanc au beige brun orange au marron. Sur chaque milieu la couleur du mycélium aérien et du substrat est différent. Aucun pigment diffusible n'est sécrété sur les milieux de cultures utilisés.

L'isolat **Ms1** présente une croissance et sporulation abondante sur les milieux ISP₄, ISP₇, GN, MPPM et Bennett, moyenne sur les milieux ISP₅, ISP₂, et GLM et relativement faible sur les milieux ISP₃. Une sporulation faible a été observée sur ISP₃, ISP₅, GLM, et moyen sur MPPM. La production du mycélium aérien (MA) et de substrat (MS) est observée sur tous les milieux. La production de pigment diffusible (brun) a été observée sur les milieux ISP₂ ISP₄, Bennett, GLM et MPPM et aucune pigment diffusible n'a été observée sur les milieux ISP₃, ISP₅, ISP₅ et ISP₇.

Concernant l'isolat **C**, nous avons observé que la croissance est bonne sur les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₇, GN, et GLM, relativement moyenne sur les milieux ISP₅ et ISP₇. Par contre

la croissance est faible sur les milieux ISP₃, MPPM et Bennett. Et on ce qui concerne la sporulation elle est vraiment faible à moyenne sur les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₅, ISP₇ et GLM, Cette isolat C ne présente aucune sporulation sur les milieux ISP₃, Bennett et MPPM et aucun pigments diffusibles n'a été observé sur les différentes milieux de cultures utilisés.

L'isolat **H1** présente une croissance abondante de mycélium de substrat (MS) aussi bien de mycélium aérien sur les milieux ISP₄,GLM, Bennett et GN ,moyenne à bonne sur ISP₂,ISP₃,ISP₄ et MPPM et aucune sporulation n'a été observée sur les milieux ISP₃,ISP₂ et MPPM à l'exception des milieux ISP₄ et Bennett qui présente une meilleur sporulation , une faible sporulation a été observé sur les milieux ISP₄ et Bennett et moyennement sur les milieux ISP₅,ISP₇ et GLM.

On ce qui concerne l'isolat **10**, une meilleure croissance a été observée sur les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₅, ISP₇, GN, GLM et MPPM et une bonne croissance sur ISP₃ et Bennett, et aucune sporulation sur les milieux Bennett et GLM et une sporulation abondante a été remarqués sur les milieux ISP₂,ISP₄, ISP₅, ISP₇, et très faible Sporulation sur ISP₃.

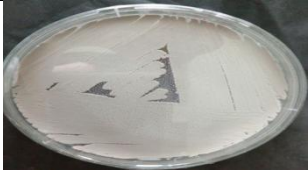

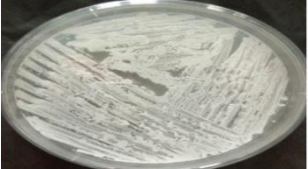



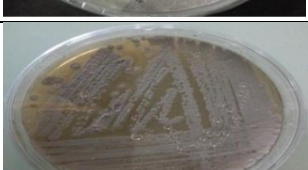



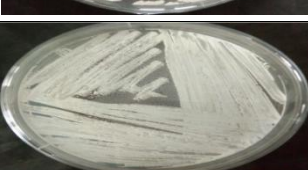





L'isolat **O5** présente une croissance abondante sur le milieu GN, moyenne à bonne sur les milieux ISP₂, ISP₃, ISP₄, ,ISP₇, Bennett, GLM et MPPM, et absence de sporulation sur les milieu ISP₇, et faible sur ISP₃, ISP₅,ISP₂, en revanche une bonne sporulation sur ISP₄ ,GN a été observé.

Tableau 8. Caractéristiques macromorphologiques des isolats **D2, Ms1, C, 10, H1, et O5** après 21 jours d'incubation sur différents Milieux de cultures.

	D₂	Ms₁	c	H₁	10	O5
Isp₂	C : +++ Sporulation : +++ MA : gris rougeâtre MS : marron foncé Ps : -	C : ++ Sporulation : +++ MA : blanc cassé MS : marron foncé Ps : +	C : +++ Sporulation ++ MA : rose grisâtre MS : orange jaune Ps : -	C : + Sporulation : - MA : blanc MS : rouge foncé orange Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : brun jaunâtre foncé Ps : +	C : ++ Sporulation + MA : blanc chater MS : marron foncé Ps : +
Isp₃	C : + Sporulation : - MA : - MS : beige pâle Ps : +	C : + Sporulation : + MA : blanc beige pâle MS : beige claire Ps : -	C : + Sporulation :- MA : - MS : beige pâle Ps : +	C : - Sporulation :- MA : - MS : - Ps : -	C : + Sporulation : + MA : brun claire jaunâtre MS : jaune brunâtre Ps : +	C : ++ Sporulation : + MA : samon rosâtre MS : jaune orange brillant Ps : -
Isp₄	C : +++ Sporulation : +++ MA : gris clair brunâtre MS : brun jaunâtre Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige foncé MS : gris foncé Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : gris claire brunâtre MS : rose brun Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige MS : brun jaunâtre foncé Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige foncé MS : marron claire Ps : +	C : ++ Sporulation : +++ MA : beige claire MS : brun jaunâtre foncé Ps : +
Isp₅	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : jaune orange claire Ps : -	C : ++ Sporulation : + MA : blanc MS : brun jaunâtre pâle Ps : -	C : ++ Sporulation : + MA : blanc MS : jaune pâle Ps : -	C : +++ Sporulation : ++ MA : blanc cassé MS : brun jaunâtre pâle Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : jaune pâle orange MS : orange jaune Ps : +	C : + Sporulation : + MA : jaune pâle MS : jaune brillant Ps : -
Isp₇	C : +++ Sporulation : + MA : gris clair MS : gris foncé Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc jaunâtre MS : orange modéré Ps : -	C : ++ Sporulation : + MA : gris jaunâtre MS : jaune grisâtre Ps : -	C : + Sporulation : + MA : jaune pâle orange MS : jaune pale orange Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : brun rougeâtre foncé Ps : -	C : + Sporulation : - MA : jaune pâle MS : marron foncé Ps : +
Bennett	C : + Sporulation : - MA : jaune modéré MS : jaune brillant Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : orange foncé Ps : +	C : + Sporulation : - MA : - MS : jaune orangé Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : orange foncé Ps : +	C : + Sporulation : - MA : blanc MS : orange jaune Ps : +	C : + Sporulation : - MA : jaune orange brillant MS : orange foncé jaune Ps : +
GN	C : +++ Sporulation : + MA : jaune pâle vert MS : jaune pâle Ps : -	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige MS : jaune orangé claire Ps : +	C : +++ Sporulation : ++ MA : gris MS : brun jaunâtre moyen Ps : -	C : +++ Sporulation : ++ MA : beige MS : orange Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : blanc MS : jaune claire Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige MS : orange foncé Ps : +
GLM	C : + Sporulation : + MA : blanc MS : jaune orange Ps : -	C : ++ Sporulation : + MA : beige MS : brunâtre orange Ps : +	C : +++ Sporulation : + MA : gris MS : jaune modéré Ps : +	C : +++ Sporulation : ++ MA : beige MS : marron clair Ps : +	C : +++ Sporulation : +++ MA : beige MS : marron modérer Ps : +	C : ++ Sporulation : ++ MA : blanc châtre MS : orange foncé Ps : +
MPPM	C : - Sporulation : N- MA : - MS : - Ps : -	C : +++ Sporulation : ++ MA : beige MS : marron jaunâtre foncé Ps : +	C : + Sporulation : - MA : gris MS : marron jaunâtre Ps : +	C : + Sporulation : - MA : gris MS : marron rougeâtre Ps : +	C : Sporulation : - MA : MS : Ps : +	C : ++ Sporulation : - MA : beige MS : marron rougeâtre foncé Ps : +

C: croissance. **MA:** mycélium aérien. **MS:** mycélium du substrat. **PS:** pigment soluble. +++: Abondant. ++: Modéré. +: faible. -: inexistant.

Tableau 9. Caractérisation des isolats d'actinobactéries par l'observation de mycélium de substrat et aérien dans différents milieu de cultures après 7 jours d'incubation.

La Souche	Milieu de culture	Aspect macroscopique du mycélium Aérien	Aspect macroscopique du mycélium de substrat
D2	ISP ₄		
	ISP ₅		
	ISP ₇		
	GN		
Ms1	ISP ₄		
	ISP ₅		
	ISP ₇		
	GN		

III .1.2. Etude microscopique

Les isolats **D2**, **C**, **Ms1**, **10**, **H1**, et **O5** sont ensemencés sur le milieu (ISP₄) dont la croissance est abondante, sont directement observées sous microscope optique (Optika) au grossissement (x 100, x 400) après 14 jours d'incubation à 30°C. Les observations microscopiques des 06 isolats sont représentées dans les **figures (25, 26, 27, 28, 29,30)**.

Les 6 isolats produisent un mycélium du substrat non fragmenté et un mycélium aérien constitué de filaments ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores portés par des sporophores de différentes formes.

La morphologie des chaînes est plus ou moins variable selon l'isolat. Ces chaînes sont spiralées (hélice) pour les isolats D2 et C comme *Streptomyces hygroscopicus*, droites à flexueuses (type RF) comme *Streptomyces griseus*, pour les isolats Ms1, 10, H1 et O5 caractéristique de genre *Streptomyces* (**Bergey Manuel, 2012**).

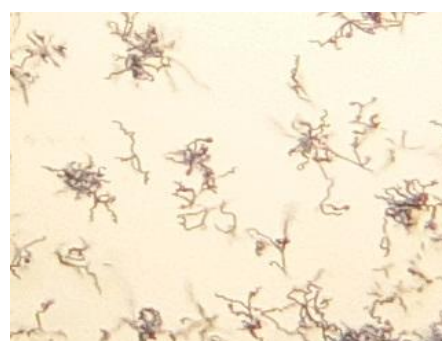
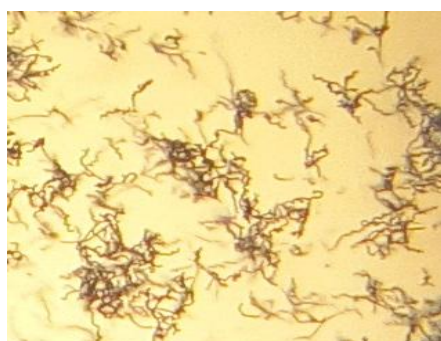


Figure 25. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **D2** sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).



Figure 26. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **Ms1** sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).

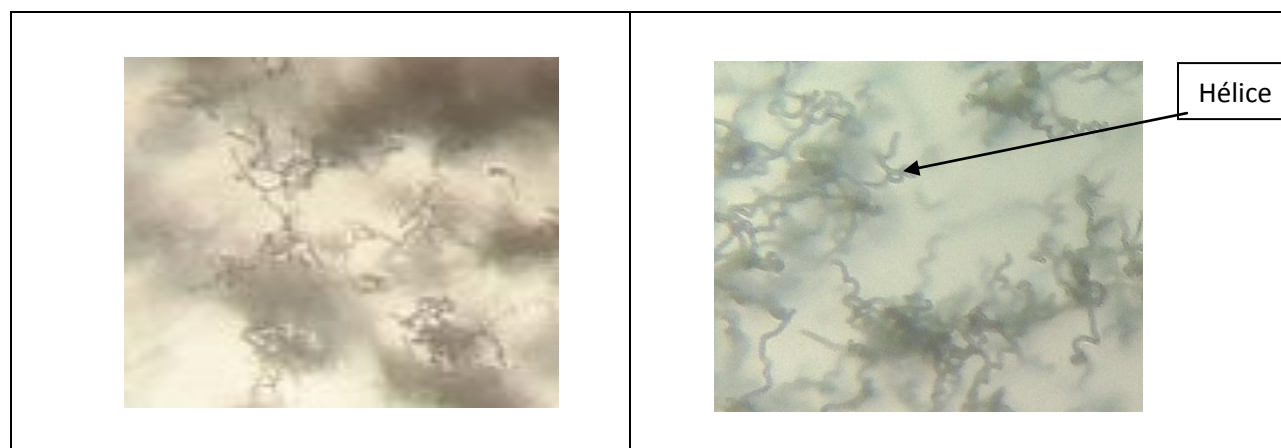


Figure 27. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **C** poussant sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) G (x400) (à droite).

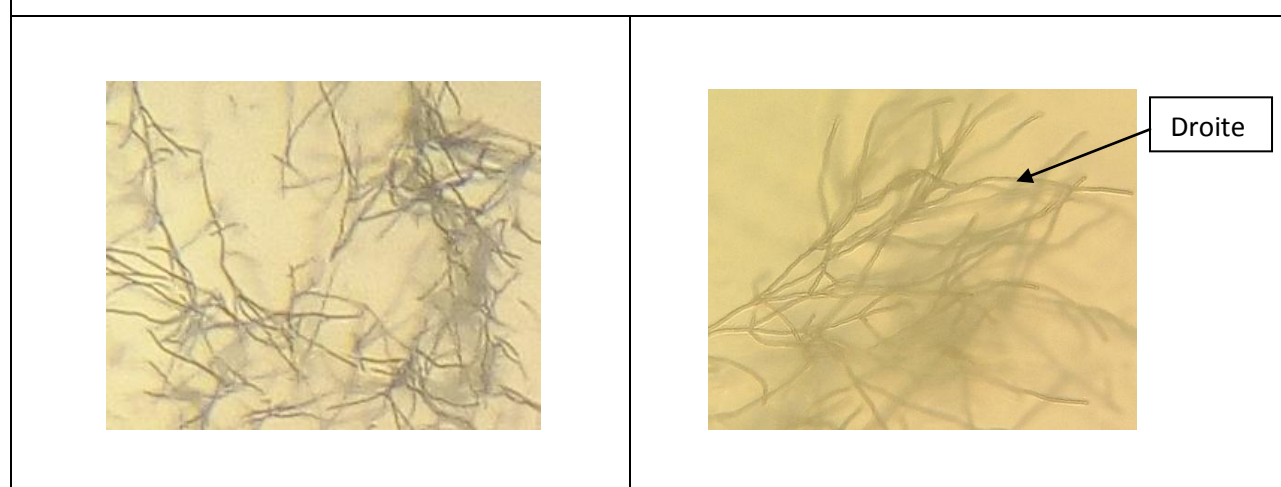


Figure 28. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **O5** poussant sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) G (x400) (à droite).

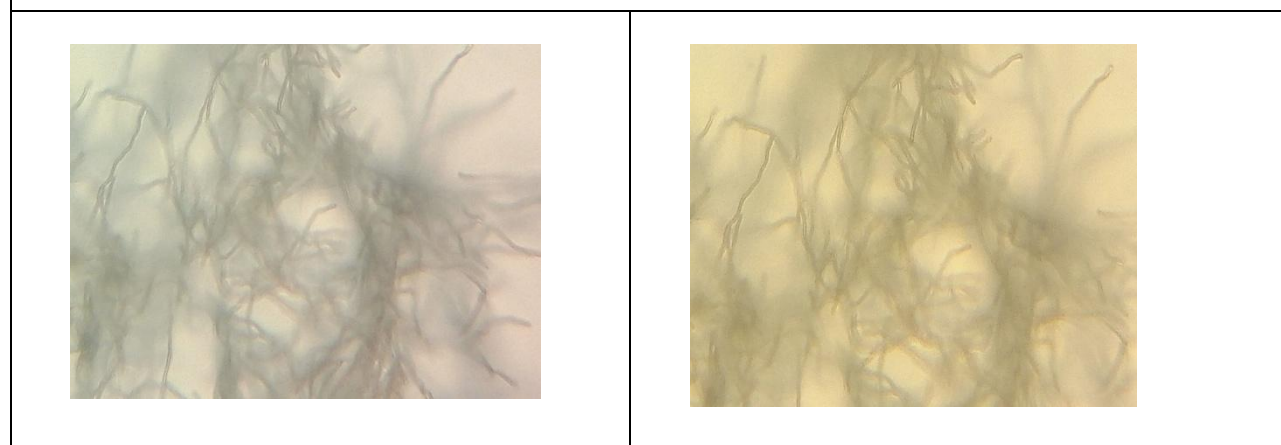


Figure 29. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **H1** sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).

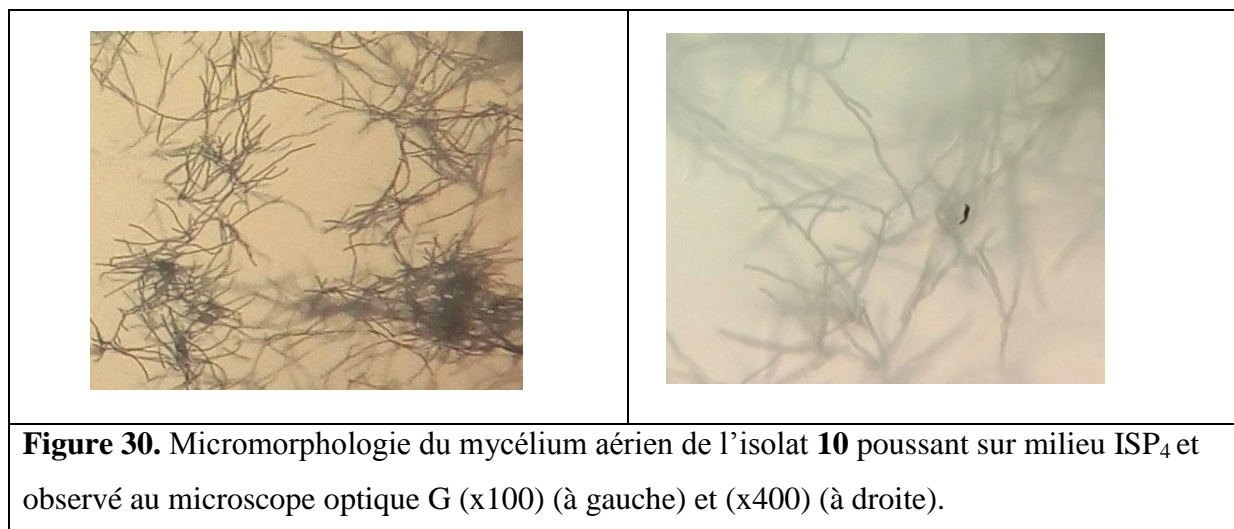


Figure 30. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **10** poussant sur milieu ISP₄ et observé au microscope optique G (x100) (à gauche) et (x400) (à droite).

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques, des souches d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. Selon **Shirling et Gottlieb (1976)** l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *micromonospora*, *microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinoimadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**) car ces genres d'actinomycètes présentant une micromorphologie caractéristiques par rapport aux autres genres appartenant aux actinobactéries (**voir Bergey Manuel , 2012**).

Sur la base des observations macroscopiques (croissance, aspect et coloration) et microscopiques, les 6 isolats montrent les traits typiques liés aux *Streptomyces* qui est le genre le plus abondant dans le sol, ce qui laisse supposer leur appartenance à ce genre actinomycétale. En effet D'après **Locci et al., (1989)** cités par **Thakur et al., (2007)**, les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique des Streptomycètes. L'étude macro et micromorphologique réalisée pour les 06 souches est suffisante pour confirmer l'appartenance de ces souches au genre *Streptomyces*. La morphologie de ce genre est particulière avec des colonies irrégulières de surface pulvérulente grandes et colorées. Les mycéliums aérien et du substrat sont très évoluées, complexes et persistants. Les hyphes du mycélium aérien sont constitués par de longues chaînes de spores (3 à 50) droites ou flexueuses. Le mycélium du substrat est stérile et ne se fragmente pas (**Bergey Manuel, 2012**).

Les travaux menés par **Muiru et ses collaborateurs en 2008**, stipulent que les milieux de culture utilisés pour l'identification des actinobactéries n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoides et cela très est claire sur les deux milieux MPPM et ISP₇ (Tyrosine agar) qui sont des milieux destinés à la production de l'enzyme tyrosinase responsable à la production des pigments mélanoides.

Toutes ces spécificités culturelles citées plus haut renvoient au genre *Streptomyces*, tel qu'il est rapporté dans le *Bergey's* ainsi que dans les travaux de **Anderson et Wellington, (2001)**.

En plus des caractères morphologiques, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinomycètes.

III .1.3. Coloration de Gram

Les frottis bactériennes des différentes isolats sont colorées par la coloration de Gram puis observé au microscope optique à l'objectif (GX100) en utilisant l'huile d' immersion la coloration des Gram des souches isolées montré qu'elles sont toutes des bactéries filamenteuse à coloration de Gram positif aussi qu'elles représentent la même forme des actinobacteries.

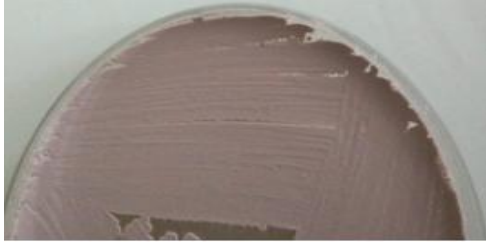
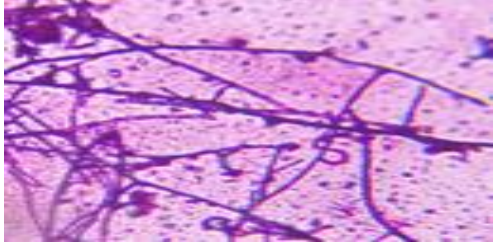

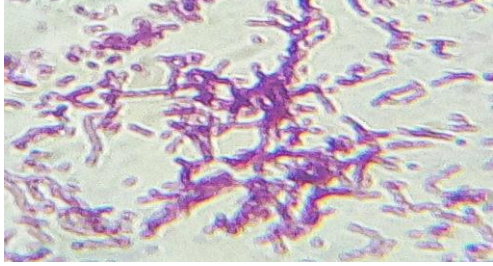
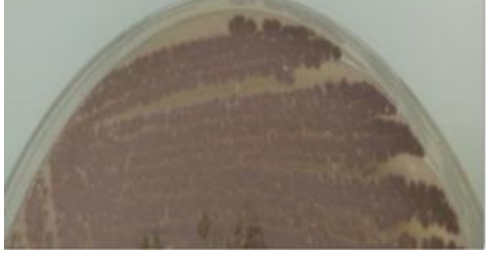
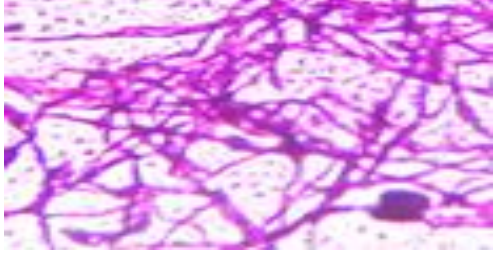

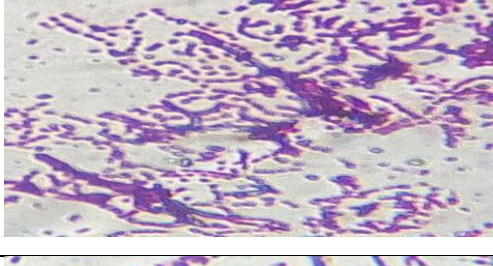

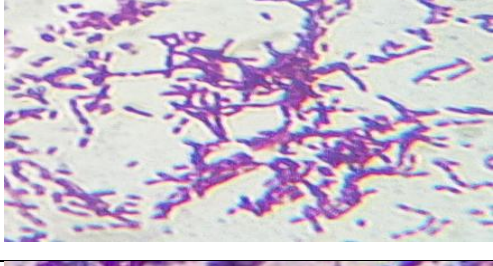

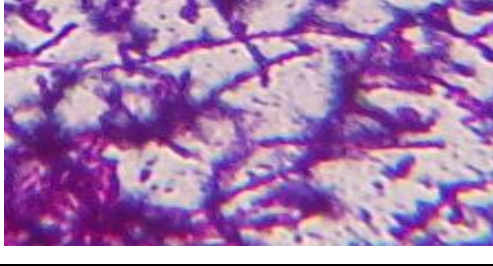
Souches	Aspect macroscopique	Coloration de Gram
D2		
MS1		
C		
H1		
O5		
10		

Figure 31. Coloration de Gram des souches D2, Ms1, C, H1, 10, O5.

IV.1. Etude physiologique

IV .1.1. Test de sensibilité aux antibiotiques

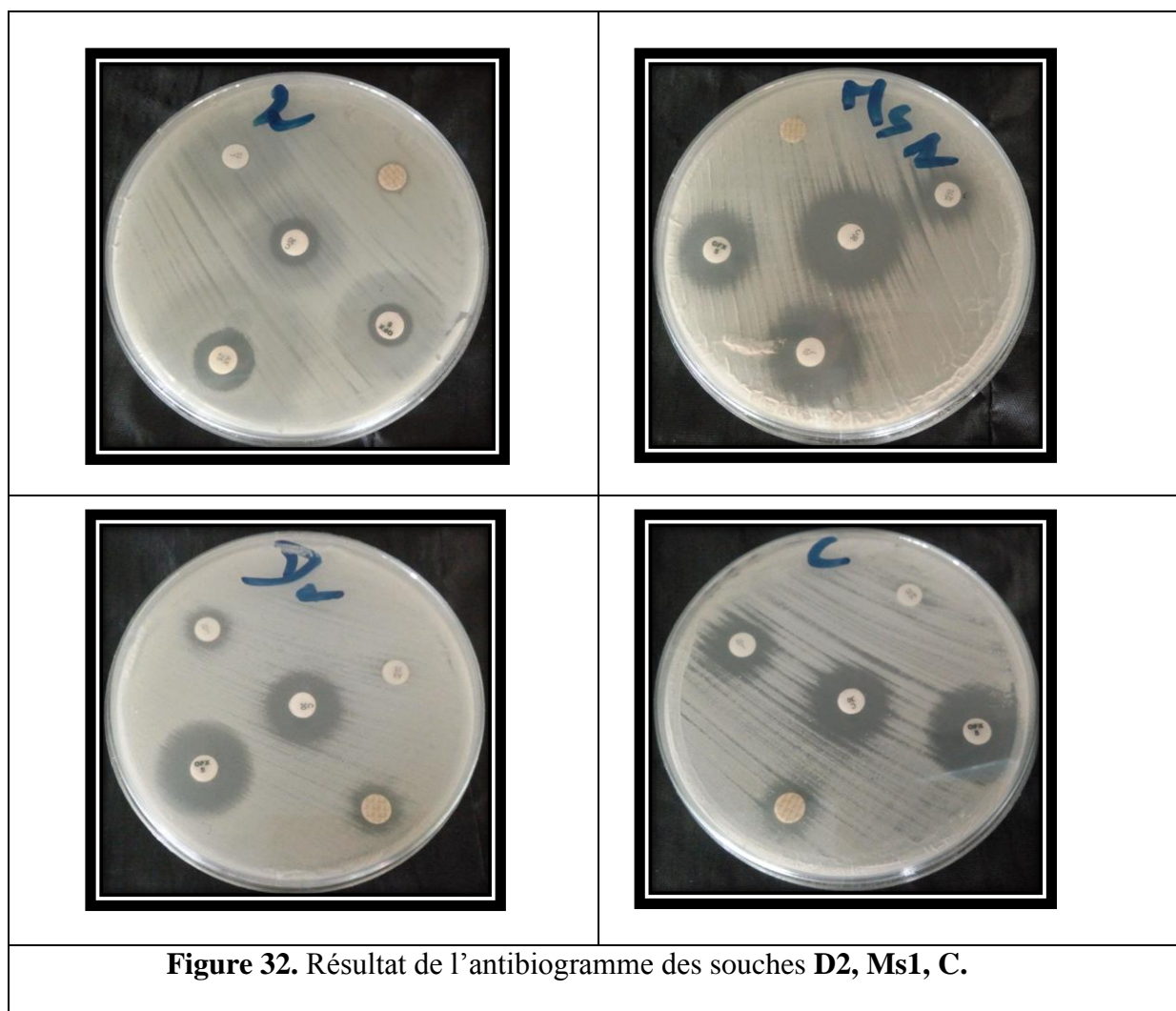
Le tableau illustre les résultats des tests physiologiques réalisés sur les différents isolats **D2, Ms1, C**.

Tableau 10. Sensibilité des isolats d'actinobactérie aux différents antibiotiques.

Antibiotique	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			
	Souches			
	S. aureus ATCC10876	D2	MS1	C
Chloramphénicol	12	17	23	20
Ofloxacin	10	23	23	25
Linocomycin	23	11	20	19
Amoxicilline	14	0	12	0
Nitrofirantoin	0	12	0	0

D'après les résultats de **tableau 10** Nous avons déduire que notre souche est sensible lorsque le diamètre de zone d'inhibition supérieur 15 mm et d'autre part ils sont résistant à inférieur 15 mm.

D'après les résultats de tableaux, La souche **D2** est sensible au Chloramphénicole (C) et Ofloxacin (Ofx) avec une zone d'inhibition de 17, 23 mm respectivement et résistant aux Linocomycin (L) et Nitrofirantoin (N) et sensible pour l'Amoxicilline (AX). La souche **Ms1** est sensible aux Cloromaphénicole (C), Ofloxacin (ofx) et Linocomycin (L) avec une zone d'inhibition de 23, 23, 20 mm respectivement et résistante au Nitrofirantoin (N), d'autre part la souche **C** est sensible aux Chloromaphénicole (C), Ofloxacin (Ofx) et linocomycin (L) avec une zone d'inhibition de 20, 25, 19 mm respectivement et résistante au Amoxicilline et Nitrofirantoin (N).les résultats de l'antibiogramme des isolats d'actinobactérie sont représentés dans les **figure 32**.



IV .1.2. Production de pigments mélanoides

Les pigments mélanoides produits par le isolat Ms1 et ne sont pas produits par les isolats D2 et C sur ISP₇ et MPPM, cette production de mélanine est due à la présence de Tyrosinase.

La production des pigments dépend généralement de la composition du milieu et des conditions de culture (**Kampfer, 2006**). La production des pigments est l'un des caractères des streptomycètes, la coloration des mycéliums du substrat et celui de l'aérien est due à des pigments mais qui ne sont pas diffusibles (Intracellulaire). La mélanine est un substrat commun produit par les animaux, les plantes et les microorganismes, elle a un poids moléculaire très formée par la polymérisation oxydative des produits phénoliques ou indoliques (**Vasanthabharthi et al, 2011**) on peut la voir la couleur gris foncée chez les isolat MS1 sur MPPM et orangé modéré sur ISP₇.



Figure 33. Production de pigment mélanoïde sur milieu MPPM et ISP7 chez Ms1.

1.3. Teste croissance en présence d'inhibiteur

Nous remarquons d'après ces résultats que les isolats D2, Ms1, C, n'a pas pu pousser dans le milieu Bennett qui contient les inhibiteurs (phénol, pénicilline, Amoxiciline) les trois dernières ne permettent pas le développement du mycélium aérienne et du mycélium de substrat chez les trois souches et on peut dire tout les souches sont sensible à tous les antibiotiques testés.

1.4. Hydrolyse d'amidon

Toutes les trois souches dégradent l'amidon, cette dégradation est révélée par la présence de coloration autour des colonies. Nous avons observé que les trois souches D2, C et Ms1 dégradent l'amidon, et cela est due à la présence alpha Amylase chez les Streptomycètes selon le (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.*, 1993).

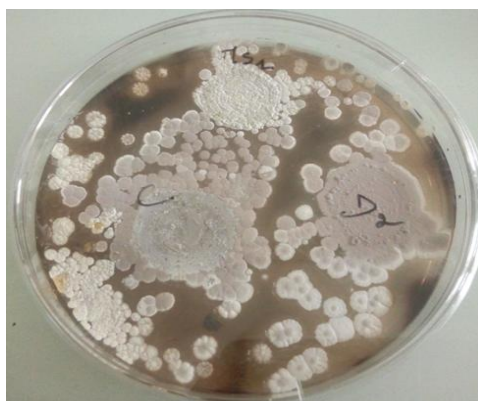


Figure 34. Hydrolyse d'amidon

1.5. Hydrolyse de gélatine

Toutes les trois souches dégradent la gélatine, les résultats sont positifs c'est-à-dire présence des zones claires correspondant aux zones d'hydrolyse de la gélatine, cette dégradation est due à la présence de l'enzyme gélatinase chez les Streptomycètes selon le (Bergey Manuel ; 2012)

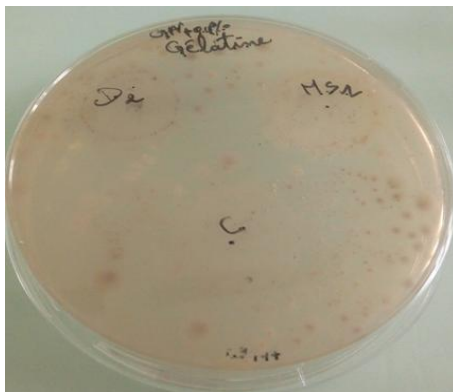
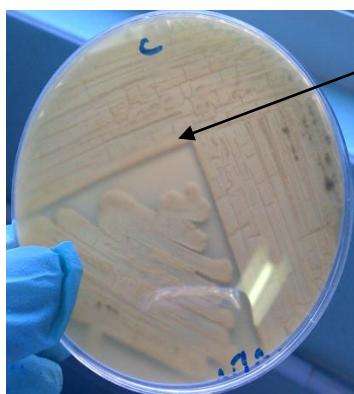


Figure 35. Hydrolyse de la gélatine

1.6. Hydrolyse de la caséine de lait

Après l'incubation des souches pendant 14 jours sur la caséine de lait les résultats sont positifs pour toutes les trois souches. Cette dégradation de caséine est due à la présence de Caséinase chez les 3 souches de Streptomycètes respectivement Ms1, D2 et C. (Bergey Manuel ; 2012).



Halot claire de
dégradation de
caséine

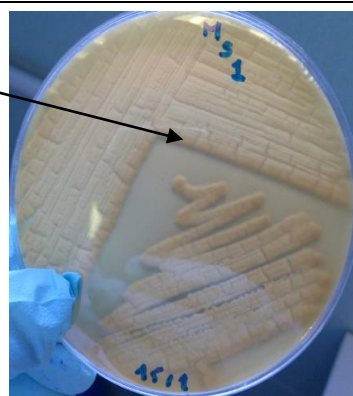


Figure 36. Dégradation de la caséine de lait

1.7. Hydrolyse de Tyrosine

Les isolats Ms1 dégradent la tyrosine, par contre les souches D2 et C ne dégradent pas la tyrosine. Cette dégradation de tyrosine est révélée par l'apparition d'une coloration brun due à la production de la mélanine, la souche MS1 a produit une enzyme appelé tyrosinase qui a converti la tyrosine en L Dopa en présence de l'Oxygène, ce dernier qui va être transformé en mélanine par une série de réaction de polymérisation non enzymatique. (Marillise le rose ; 2015).

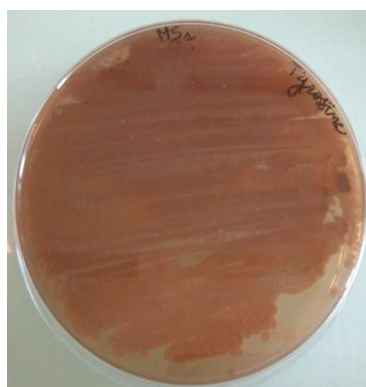


Figure 37. Dégradation de tyrosine

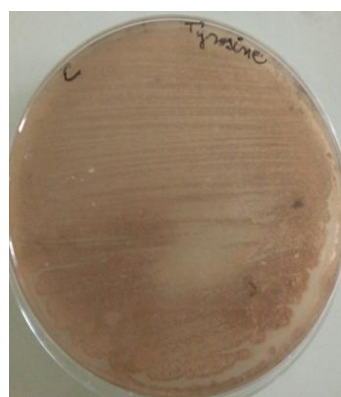
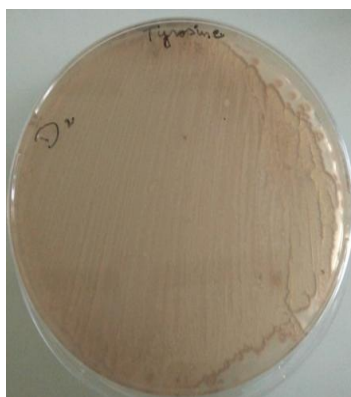


Figure 38. Inaptitude de dégradation de tyrosine

1.8. Hydrolyse de tween 80

Les isolats D2, Ms1 et C ne dégradent pas le tween 80. Car le tween 80 c'est un inhibiteur de croissance chez les bactéries. Le tween 80 affecte la croissance bactérienne en affectant directement la viabilité et les taux de croissance.

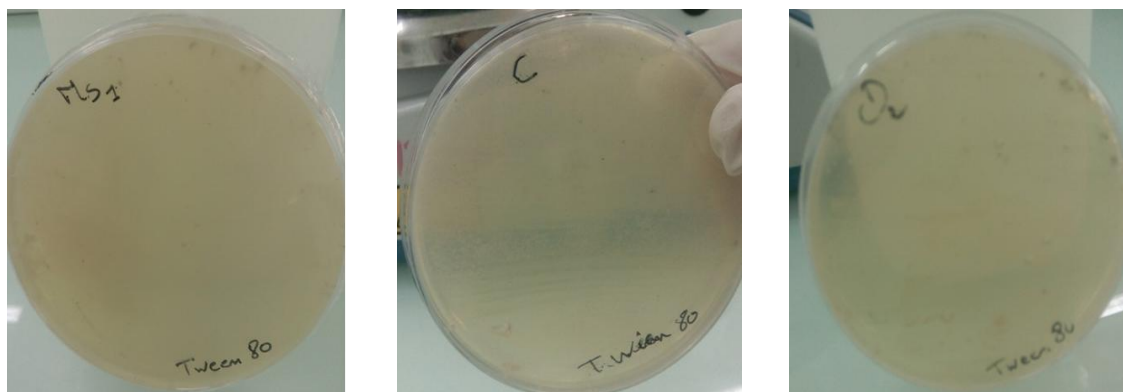


Figure 39. Inaptitude de dégradation de Tween par les trois souches.

1.9. Recherche de catalase

L'examen de la recherche de la catalase, montre que les isolats Ms1, C, sont catalase positive (apparition de bulles d'air), car le catalase c'est une oxydoréductase hémique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène, par contre la souche D2 ne produit pas de catalase (absence de bulle d'air) (Tortora *et al.*, 2003).

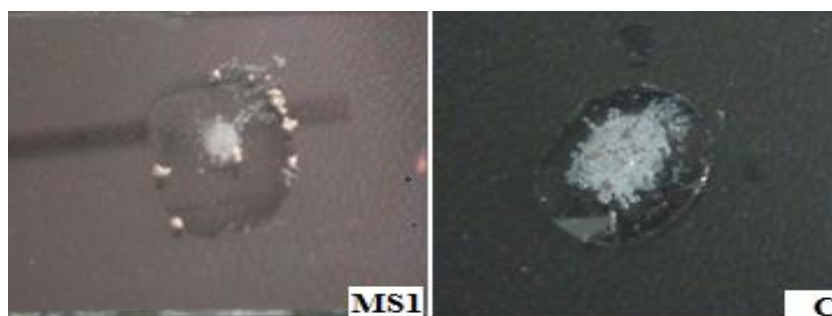
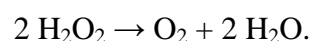


Figure 40. Production de catalase

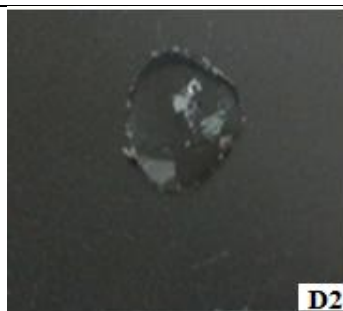
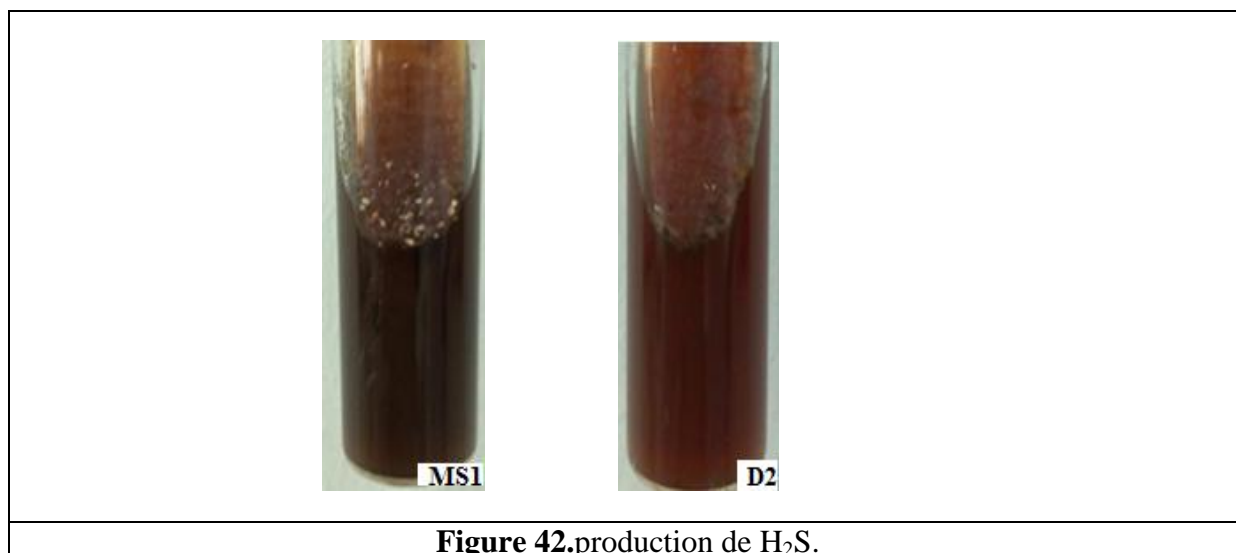


Figure 41. Absence de catalase

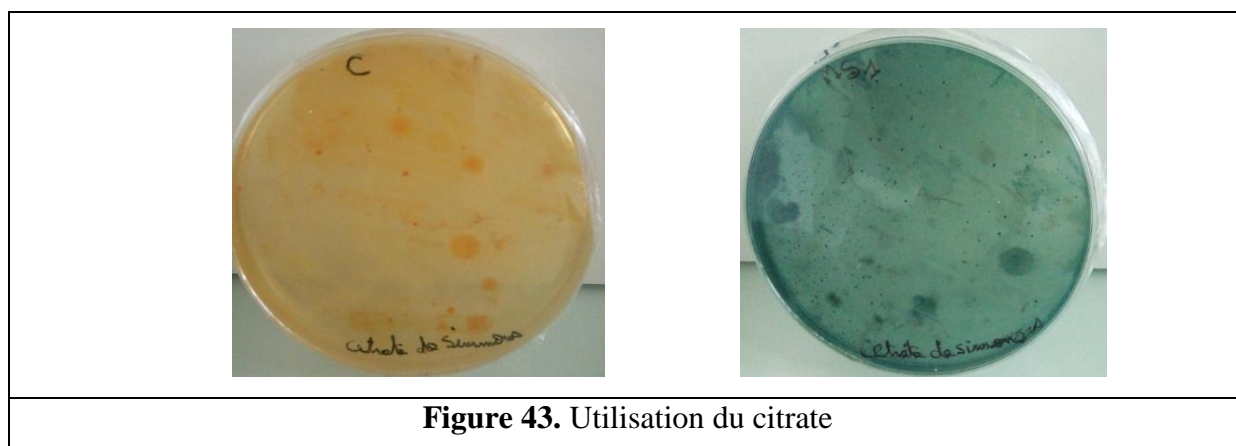
1.10. Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Après l'incubation des souches pendant 14 jours sur le milieu TSI, la souche Ms1 produit de l'H₂S c'est-à-dire l'apparition d'une coloration noire dans le milieu, par contre la souche D2 ne produit pas H₂S. Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions fer III (Fe³⁺) du citrate de fer pour former un précipité de sulfure de fer noir.



1.11. Utilisation du citrate

Les souches Ms1, D2, C, n'utilise pas le citrate de Simmons comme une source de carbone, pas de virage (citrate-) les bactéries n'utilisant pas ne se cultivent pas. Toutefois, des bactéries peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone sans bleuir comme les (Enterococcus). La souche MS1 changé sa couleur des qu'on mettre le citrate de Simmons dans le milieu ISP9 se dernier pourrait être due à des réactions chimique.



1.12. Dégradation de l'urée

La souche D2, C possédant des uréases ont dégradé l'urée, il y a production de dioxyde de carbone et d'ammoniac, ce dernier alcalinise le milieu, cette alcalinisation du milieu est mise en évidence par le virage du milieu prenant une teinte rouge (milieu basique) par contre la souche Ms1 ne dégrade pas l'urée.

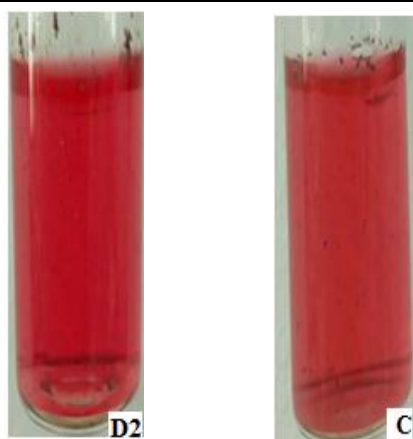


Figure 44. Présence de l'uréase chez D2, C



Figure 45. Absence de l'uréase chez Ms1

1.13. Production d'indole

Après l'utilisation des gouttes du réactif de Kovacs sur milieu urée-indole, l'absence d'anneau rouge en surface indique l'absence d'indole (test négatif) pour les trois souches. Car ne s'effectue pas la réaction d'hydrolyse de tryptophane, catalysée par la tryptophanase, produit d'indole.

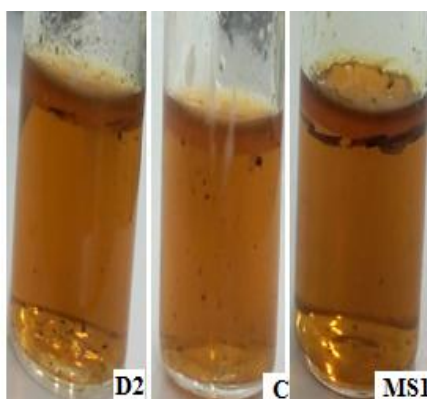


Figure 46. Absence d'indole chez D2, Ms1, C.

V.2. Testes biochimiques

2.1. Utilisation de composé glucidique comme seules sources de carbone

Du point de vue utilisation de source de carbone, les souches D, C, et Ms1 ont utilisé le D.glucose, le D.fructose, le galactose, le mannitol, le ribose, le l. rhamnose, le xylose, inositol, ainsi que l'oxalate de sodium et le acétate de sodium comme source de carbone.

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants de la bactérie. Le plus simple des composés est l'anhydride carbonique ou CO₂. Celui-ci peut être utilisé par la bactérie pour la synthèse de certains métabolites essentiels qui ferait intervenir une réaction de carboxylation.

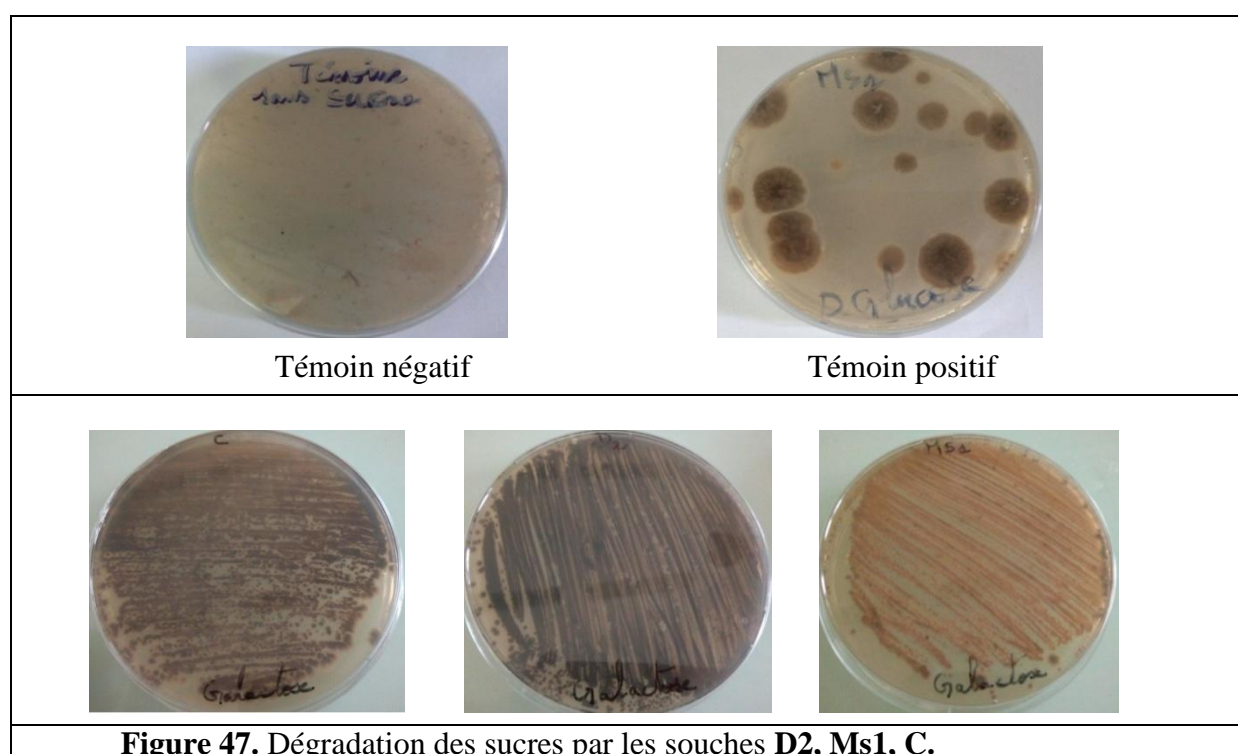


Figure 47. Dégradation des sucres par les souches D2, Ms1, C.

2.2. Utilisation des acides aminés

Du point de vue utilisation des acides aminés, les souches D2, Ms1 et C sont capables d'utiliser les acides aminés (proline, L-leucine) comme seule source d'azote. Par contre ces souches n'utilisent pas la Glycine. La provenance de cet azote peut se faire par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination).

Tableau 11. caractéristiques physiologiques et biochimique des isolats D2, Ms1, C.

Propriétés	D2	Ms1	C
Production de pigments mélanoides	-	+	-
Utilisation des sucres:			
Témoin négative	-	-	-
D- glucose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
L- rhamnose	+	+	+
D- fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Utilisation des acides gras:			
Acétate de sodium	+absence de	+	+
Oxalate de sodium	mycélium aérien	+	+
Croissance en présence des inhibiteurs			
Phénol	-	-	-
Pénicilline	-	-	-
Amoxiciline	-	-	-
Hydrolyse d'Amidon	-	-	-
Hydrolyse de Gélatine	+	+	+
Hydrolyse de Tyrosine	-	+	-
Hydrolyse de Tween 80	-	-	-
Hydrolyse de la Caséine de lait	+	+	+
Dégradation de L'urée	+	-	+
Production d'indole	-	-	-
Production catalase	-	+	+
Production de H₂S	-	+	nd
Test du citrate	+	+	+
Utilisation des acides aminés:			
Proline	+	+	+
l- leucine	+	+	+
Glycine	-	-	-

Note: +: positif ; - : négatif

Nd: non déterminé

V.3. Etude physique

3.1. Croissance à différents valeurs de températures

Tableau 12.croissance des isolats d'actinobactérie à différents valeurs de températures

Souches	5°C	25°C	30°C	40°C	50°C
D2	-	+	+++	-	-
Ms1	-	++	+++	+	-
C	-	+	+++	+	-
H1	-	+	+++	-	-
10	-	+++	+++	-	-
O5	-	+	+++	-	-

Note:

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

Les examens physiologiques nous indiquent que nos isolats sont capables pousser dans un intervalle de température (25 à 40°C), (**Bergey Manuel, 2012**) et On a observé que les isolats D2, C, 10, Ms1, O5 et H1 n'a pas pu pousser à 5°C et 50°C. On a constaté ainsi la capacité des souches D2, C, 10, Ms1, O5 et H1 à croitre à 30C° (mésophiles).

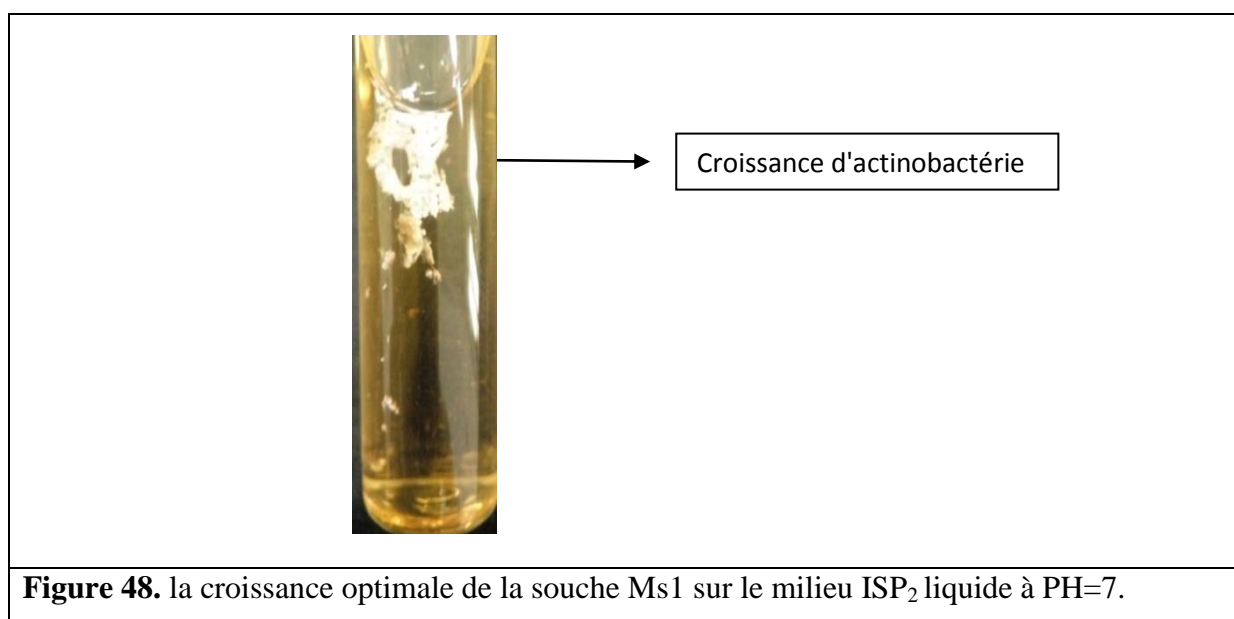
3.2. Croissance à différents valeurs de PH

Tableau 13. Test de croissance des souches actinobactéries à différents de PH

Souches	PH 3	PH 5	PH 7	PH 9	PH 11
D2	-	+++	++	++	-
Ms1	-	++	+++	+++	++
C	-	-	++	++	++
H1	-	-	++	++	+
10	-	+	+++	+++	++
O5	-	++	+	++	-

Note: (-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

Concerne le pH, nous avons constaté que les souches D2, Ms1, et C sont capables de se développer à différentes valeurs de pH (3, 5, 7, 9 et 11) donc les 3 isolats tolèrent les pH acide, neutre et basique.



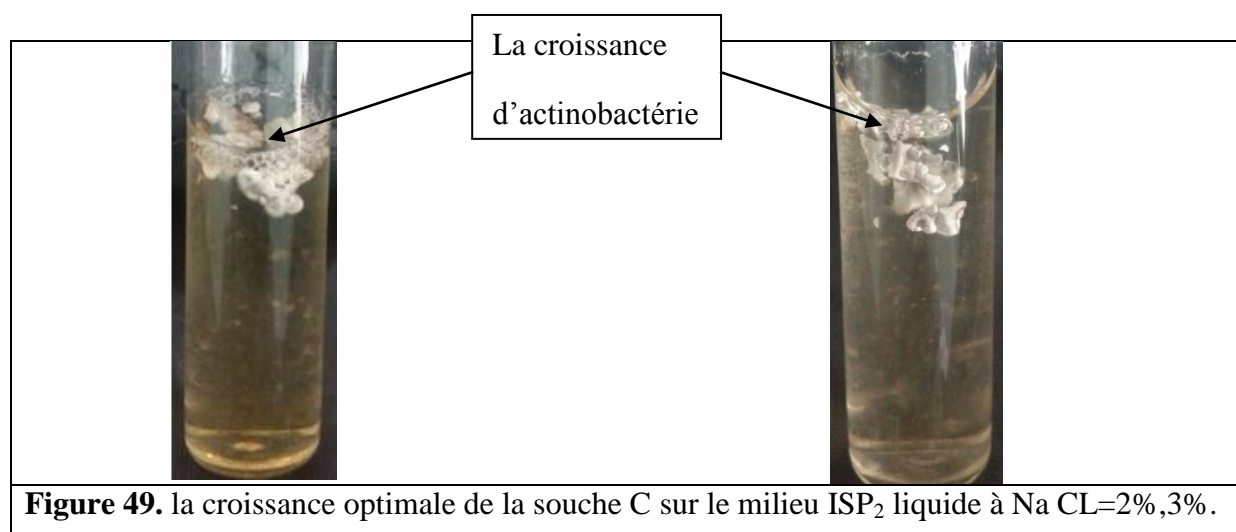
3.3. Tolérance au chlorure de sodium

Tableau 14. Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP₂ et à différentes concentration de NaCl.

Souches	Concentration de NaCl									
	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
D2	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+
Ms1	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++
C	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++	-

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

D'après l'étude physiologique indiquent que nos isolats sont capables de se développer à des différentes concentrations testées en NaCl (1%, 2%, 3%,4%,5%,6% et 7%) sauf la souche **C** ne se développe pas en 6%,10% et une croissance modéré dans la concentration 8%,9%,10%, La croissance optimale a été enregistrée à 1% ,2% à 3% concernent les trois souches **Ms1**, **D2**et **C**.

**Figure 49.** la croissance optimale de la souche C sur le milieu ISP₂ liquide à Na CL=2%,3%.

Conclusion et perspectives

Conclusion Générale et perspectives

Le présent travail portant sur l'identification phénotypique de quelques isolats d'actinobactérie présentant une activité antagoniste vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes .ces dernières ont été isolées à partir d'échantillons de sol prélevés de la région Hammam Dalaa , Mesif et Boussada de la Wilya de Msila et Okhdeir de la Wilya Bechar, de Djelfa et de Constantine.

Le présent mémoire s'inscrit dans un contexte général et a pour objectif d'isoler à partir des sols et l'eau de différentes régions algériens et les étudier du point du vue taxonomique.

L'isolement des actinobactéries sur milieu ISP2 et milieu Bennett a permis d'obtenir 31 l'isolat d'actinobactéries. Ces isolats ont subi un screening préliminaire sur milieu solide ISP2 afin d'évaluer leur pouvoir antimicrobienne contre 11 germes cible en utilisant deux méthodes, l'une est la méthode de striés croisées et l'autre est la méthode de cylindre d'agar. Ainsi, 06 isolats ont présenté une activité antimicrobienne notable contre plusieurs germes-cibles. Parmi ces isolats actifs, trois, notés D2, MS1 et C, ont montré les plus fortes activités antimicrobienne vis-à-vis des bactéries Gram+, bactéries Gram- et des levures.

Les isolats sélectionnés ont fait l'objet d'une étude taxonomique, nous avons réalisé plusieurs analyses qui sont:

-Des tests morphologiques (macromorphologie et micromorphologie) en utilisant les milieux de cultures solides. Nous avons constaté que les isolats H1, MS1, 10, O5, D2, et C présentaient une morphologie propre au genre *Streptomyces*. Ces résultats laissent fortement supposer que les 06 souches étudiées sont des actinobactéries du genre *Streptomyces*.

-Des études physiologiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à dégrader les sucres, des acides aminés, des acides gras, l'amidon, gélatine, caséine de lait, la tyrosine et le Tween 80, l'urée , à produire des pigments mélanoides, catalase, sulfure d'hydrogène, indole , Croissance en présence d'inhibiteurs, à tolérer différentes températures, différents pH et différents NaCl. Les résultats de l'étude physiologique effectuée sur les trois souches, fournissent des informations sur leurs préférences nutritionnelles.

Au bilan, les résultats des tests morphologiques,biochimiques et physiologiques des isolats D2, MS1, et C permet de rattacher ces trois isolats au genre *Streptomyces*. Sachant que nos trois souches n'ont fait l'objet que d'une étude morphologique, chimique et physiologique limitées. Sans l'étude moléculaire, il est impossible d'affirmer avec certitude l'espèce de

chaque souche. Donc Il est évident que ces résultats doivent être complétés par des tests indispensables.

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels. Nos résultats sont encourageants mais cette étude est loin d'être finie.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent:

- L'isolement et purification des actinobactéries rares à partir des différentes régions d'Algérie.
- Des études physiologiques tels que : la capacité des isolats à dégrader les surfactants tel que pétrole, à réduire les nitrates, l'azide de sodium et le Crystal violet.
- Des études chimio-taxonomiques plus approfondies tels que l'analyse des acides aminés, des sucres et les phospholipides éléments discriminants dans l'identification.
- Des études moléculaires des souches D2, MS1 et C par PCR des gènes 16S ribosomal, outil nécessaire pour la détermination précise de l'appartenance des espèces aussi aller plus loin de faire le séquençage de génome totale de ces isolats .
- L'élargissement des études des activités des actinobactéries sur d'autres microorganismes pathogènes .
- Extraction et purifications des molécules bioactives produites par ces actinobactéries suivit d'une caractérisation de la structure chimique de ces molécules bioactives.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbas I.H. (2006). A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. **J. Appl. Scien. Resea**, **2 (10)**, 809-815.

Abraham T. A., Herr L. J. (1964). Activity of actinomycetes from rhizosphere and non-rhizosphere soils of corn and soybean in four physiological tests. *Can. J. Microbiol.* **10**, 281-285.

Andriambololona T. (2010). Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. P5-10.

Aouiche A. (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de streptomyces et de Saccharothrix des soles de Ghardaia actives contre des microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'Homme. Thèse de doctorat en science biologiques, spécialité: Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de kouba, Alger, Pp. 39-41.

Aouiche A., Bijani C., Zitouni A., Mathieu F., Sabaou N. (2014). Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* sp. PAL114 isolated from Saharan soil. *J Myc Med.*, 24:17–24..

Aouiche A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015) *Actinokineospora mزابensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:291–296.

Ara I., Bukhari N.A., Wijayanti D.R. , Bakir M.A., (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(16): 3849-3857.

Archad I.U.M., Chuadhry M. J.I., Noureen U., Jadoon W.A., et Jadoon M.A., (2012). Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec. Zool. Surv*, 21: 10-13.

ArasuValan M., Duraipandiyan V., Agastian P., Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of streptomyces ssp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India), *Journal de Mycologie Médicale* 19:P 22-28.

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J., White R. P., (1985). Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. Journal. System. Bacteriol*, 35 (1), 86-98.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Awad M., Hassan., Kamel Y.I., EL-Shaedet ABD EL-Monaem M., EL-Nakkadi. (2009), Isolation, Screening and Identification of Newly Isolated Soil Streptomyces (*Streptomyces* sp. NCR-35) for β -Lactamase Inhibitor Production, *World Applied Science Journal* 7(5): p637-646. Egypt.

B

Badji B., Mostafaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J Ind Microbiol.*, 34:403–412.

Balasubramanim V., Ganesh S., Karunanithi V., Perumal P. (2011). Improved Culturing, Screening and Fermentation of Soil Actinomycetes for Antimicrobial Agents, *Int. J. Pharm& Ind. Res* Vol (01) Issue (02): P 153-159.

Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M., Duménil G. (1986). - Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. Journal*, 2, 453-466

Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., Lechevalier H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12, 421-423.

Bergey's Manuel. (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae.* Coyright, Michigan State University Board of Trustees.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.

Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A., Mathieu F. (2013c). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res.*, 103:771–776.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013a). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:549–553

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013b).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3744–3749.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioia S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Myc Med.*, 15:39–44
- Boudemagh A. (2007).** Isolement, à partir des sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives, thèse de Doctorat d'Etat: P 1-132, Université Mentouri Constantine, Algerie.
- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C, Sabaou N., Lebrihi A. (2010).** Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J Antibiotics.*, 63:709–711.
- 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).pp 177.
- Boughachiche F., Reghioia S., Oulmi L., Erizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2008).** isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Ain Mlila, Sciences & Technologie C- N°23: P5-10.
- Boughachiche F., Reghioia S., Zerizer H., Boulahrouf A. (2012).** Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Ann Biol Clin.*, 70:169–74.
- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2008).** Precursor directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry.*, 43:1244–1252.
- Bouras N., Meklat ., Toumatia O., Mokrane S., Holtz D M., Strelkov E. Stephen ., Sabaou N. (2013),** Bioactive potential of a new strain of *streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil, *African Journal of Microbiology Research*, Vol 7 (25): P 3199-3208.
- Boussaber E., MeftahIssam K., HilaliL A., Hilali A. (2012).** Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieu variés, Science Lib Editions Mersenne: Volum 4, N° 121203: P 01-21.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Ceylan O., Gulten O., Aysel U. (2008). Isolation of soil *streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria, Eur Asia J BioSci 2: P 73-82.

Chater K. E., D.A. Hopwood (1973). Differentiation in actinomycetes. In: J. M. Ashworth and J. E. Smith (Eds.) Microbial Differentiation. *Cambridge University Press*. London: P 143-160.

Choulet F. (2006). Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210.

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.

Chaphalkar S.R., Dey S. (1996) Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actinomycete*. 7(2): 47-54.

Chronakova A., Kristufek V., Tichky M., Dana E. (2010), Biodiversity of streptomycetes isolated from a succession sequence at apost-mining site and their evidence in Miocene lacustrine sediment, *Microbiological Research* 165: P 594-608.

Chun,J., S., C.N., Lee K. J., Kang S.A., Goodfellow M., Hah V.C. (1998). *Nocardia Flavorosea* sp. Nov. *Inter J Syst Bacteriol*, 48(3): 901-905.

Cundell D.R., Piechoski M. P. Potentially novel Actinobacteria derived antibiotic from unique microenvironments. In: *Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds*. (Dhanasekaran et al., Eds), 2016, pp: 83-98, CRC Press, New York.

D

Dancer S.J. (2004). How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis*. 4(10):611-619.

Danilenko V.N., Mironov V.A., Elizarov S.M. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 319–329.

Dejong PJ. (1972) .L-asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl Microbiol*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

23(6):1163-1164.

Delauny S., Rondags E., Germain P. (2003). Production d'antibiotiques par biotechnologies, techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique J6 008 : P 1-1

Demain A. L., Dykhuizen L. (2006). Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology* .(9): 237-239.

Demain. A L. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:486–495

Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. **Pp: 157.**

Dhanasekaran D., Ambika K., Thajuddin N., Panneerselvam A. Allelopathic effect of Actinobacterial isolates against selected weeds. *Arch Phytopathol Plant Protect.* 2012; 45(5):505-521.

Dhanasekaran D., Thajuddin N., Panneerselvam A. (2010) .Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. *Nat Prod Res.* 24(6):521-529.

Driche EH., Belghit S., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Mathieu F., Badji B. (2015). A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Microbiol.*, 65:1341–1350.^

E

El-Nakeeb M., Lechevalier H. (1963). Sélective Isolation of Aérobie Actinomycète .*Appl Microbiol*, vol 11, n° 2.Pp. 75-77.

Ensign J. C., Normand P., Burden J. P., Yallop C. A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**, 657-660.

Eunice J. A., Prosser J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of genetic microbiology* (**129**): 2029-2036.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

F

Flatt P.M., Wu X., Perry S., Mahmud T. (2013). Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *J Nat Prod* 76:939–946.

G

Geraldine M., Schofield M., Schaal K.P. (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol.* 127: 237-259.

Gobat J.M., Aragno M., Matthey W. et Sarma V.A.K. (2004). The Living Soil: Fundamentals Of Soil Science and Soil Biology. Science Pub Inc.

Gordon R.E., Smith M. M. (1953). Rapidly growing acid fast bacteria: species description of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* 66, 41-48.

Gordon. R.E., Barnett D.A. Handarhan. J.E; and Hor-Nay-Pang. C. (1974). - *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 54-63.

Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the Actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Sk

Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp. 1–28.

Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp. 1455–1616.

Goodfellow M., Kämpfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Suzuki, K., Ludwig W., Withman WB. (2012). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria (2èmeEds)* vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083 p.

Goodfellow M., Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annuals Review of Microbiology* (37):189-216.

George M., Anjumol A., George G., Mohamed Hatha A.A. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res.*, 6:2265– 2271

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 38:375–389.

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2010). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* DOI10.1007/s10295-010-0882-7

Grund E., Kroppenstedt R.M. (1990). – Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.

Guiraud J.P. (1998). Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie alimentaire. *Dunod Paris*: 171-334.

H

Hassan A.A., El-Barawy A. M., El Mokhtar., M. N. (2011). Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *J Am Sci.* 7(4):752-760.

Hinsinger P., Bengough A.G., Vetterlein D., Young I.M. (2009). Rhizosphere :biophyscs, biogeochemistry and ecological relevance.*Plant and soil*, **321** :117-152.

Hodgson D. A. (992). Differentiation in actinomycetes. In: Prokaryotic Structure and Function, Cambridge University Press, Cambridge.

Holt J. G., Kreig N. R., Sneath P H A., Staley J. T., Williams S. T. (1994). In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. (2001). Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* (67): 3739-3745.

Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., Goodfellow M., Liu Z. (2004). *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek* , (86): 159-165.

Huttner A., Harbarth S., Carlet J., Cosgrove S., Goossens H., Holmes A., Jarlier V., Voss A., Pittet D. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Res Infect Control.*, 2:1 13.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

J

- Jeffrey LS H. (2008).** Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak, African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20): P3697-3702.
- Jensen P.R., Dwight R.Y., Fenical W. (1991).** Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl Environ Microbiol. 57(4):1102-1108.
- Johnsen A.R. (2002).** Winding A, Karlson U, Roslev P. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids. Appl Environ Microbiol. 68(12):6106-6113.
- Jose P.A., Santhi V.S., Jebakumar., S.R.D. (2011).** Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *J Basic Microbiol* 51:348–356.
- Jossi M. (2008).** Rhizosphere bacterial communities associated with *lolium perenne* structuration and plant –mediated influences. These d'état de la faculté de Neuchatel de suisse.

K

- Kampfer P. (2006).** The Family streptomycetaceae, Part I: Taxonomy, Prokaryotes 3: P 538-604.
- Kim B.; Al-Tai A. M.; Kim S. B.; Somasundaram P.; Michael Goodfellow M.(2000).** *Streptomyces thermocophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanaseproducing streptomycete. Int. J. Sys. Ev. Microbiol., (50): 505-509.
- Kim S. B.; Seong C. N.; Jeon S. J.; Bae K. S.; Goodfellow M. (2004).** Taxonomic Study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 211-214.
- Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées.p15-17
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005).** Isolation of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Myc Med.*, 15:45–51.

L

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Larpent J.P.; Sanglier J.J. (1989). Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, p. 481.

Latha S, Dhanasekaran D. Antibacterial and extracellular enzyme activities of gut Actinobacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* and *Capra hircus*. *J Chem Pharma Res.* 2013; 5(11):379-385.

Lee, E.J., Hwang., K.Y., Lee, H.S., Chung N. (2011). Characterization of a New *Streptomyces* sp. A1022 as Potential Biocontrol Agent. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, 54 (3): 488-493.

Lechevalier. M.P., De Bievre. C., Lechevalier., H.A. (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. ***Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.**

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

Locci R. (1994). Actinomycetes as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol.*, 100:179–200.

M

Marchal N., Bourdon., JL . (1973) . Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Collection Biologie Appliquée. Doin, Paris, 179 p.

Manteca A., Sanchez J. (2009). Streptomyces Development in Colonies and Soils, Applied and Environmental Microbiology, Vol 75, N° 9: P 2920-2924.

Mazodier J. (1974). Sociétés industrielles et déchets solides. *Sciences et Vie.* (106): 109-115.

Meklat, A. (2012). *Taxonomie et potential antagoniste des actinomycètes halophiles des soles sahariens et mise en evidence de nouvelles espèces d'actinopolyspora.* Thèse de doctorat en sciences biologiques, spécialité: Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Pp.40-48.

McCormick J. R., Flärdh K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McKinney R. E. (2004). Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448.

McNeil M.M., Brown J.M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.*, 7:357–417.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje MC., Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Products.*, 73:1164–1166.

Messaoudi O. (2012). Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar).

Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M. et Donadio, S. (2003). *Conexibacter Woesei* gen sp. a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *Inter J Syst Evol Microbiol*, 53(2): 3-10.

McCauley A., Jones C. et Jacobsen J. (2005). Basic Soil Properties. *Soil & Water Management*, 4481-1

Minnikin. D.E; Patel. P.V; Alshamaony. L; and Goodfellow. M. (1977). - Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 104-117.

M. Le Rose-Hill, Z. Palmer, J. Rohland, B.M. Kirby, S.G. Burton, Partial purification and characterization of two actinomycete tyrosinases and their application in cross-linking reactions, *J.Mol. cat. B-Enzym* 122 (2015) 353-364.

Mordarska H., Mordarski M., Goodfellow M. (1972). – Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 71, 77-86.

Manteca A., Sanchez J . (2009). Streptomyces Development in Colonies and Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 75, N° 9: P 2920-2924.

Mazodier J., 1974. Sociétés industrielles et déchets solides. *Sciences et Vie.* (106): 109-115.

N

Nakae K., Kurata I., Kojima F., Igarashi M., Hatano M., Sawa R. (2013) .Sacchathridine, A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J Nat Prod* 76:720–722.

Narayana K.J., Kumar K.G., Vijayalakshmi M.L. (2008). asparaginase production by *Streptomyces Albido. flavus*. *Indian J Microbiol.* 48(3):331-336.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Nithya K., Muthukumar C., Duraipandiyar V., Dhanasekaran D., Thajuddin N. (2015). Diversity and antimicrobial potential of culturable Actinobacteria from desert soils of Saudi Arabia. *J Pharm Sci Res.* 7(3):117-122.

Nouasri. A. (1996). Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Thèse de Magister. pp 130.

Nouredine. L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.

O

O'Gara F., Dowling D. N., Boesten B. (2008). Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs. John Wiley & Sons: Weinheim. Pp: 192.

Olmos. E., Mehmood N., Haj Husein L., Goergen J.L., Fick M., Delaunay S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of streptomyces, *Bioprocess BiosystEng* 36: P 259-272.

OskayMustafa. (2009). Comparaison of Streptomyces diversity between agricultural and non-agricultural soils by using various culture media, *Scientific Research and Essay Vol. 4 (10):* P 997-1005.

Ou X., Zhang B., Zhang L., Dong K., Liu C., Zhao G., Ding X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochim. Biophys Sin*, 40 (10), 877-882.

P

Pandey A., Nigam P., Soccol CR., Soccol VT., Singh D., Mohan R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* .31: 135-152.

Perry J. J.; Staley J. T.; Lory S. (2004). Microbiologie. Dunod, Paris. 497–498.

Pierret A., Doussan C., Capowiez Y., Bastardie F., Pagés L. (2007). Root functional architecture : a framework for modeling the interplay between roots and soil. *Vadose Zone J*, 6:269-281.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pillmoor J.B. (1998).** Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. *Pestic Sci.* 52(1):75-80.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2010).** *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition. Pp : 1088.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D. (2015).** Diversity of soil allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. *J Saud Soci Agri Sci.* 14(1):54-60.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D., Kanimozhi B. (2013).** Isolation, structural identification and herbicidal activity of N-phenylpropanamide from *Streptomyces* sp. KA1-3. *Arch Phytopathol Plant Protect.* 46(3):364-373.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D., Kanimozhi B.(2013).** Isolation and structural characterization of N-(naphthalene-1-yl) Propanamide, a herbicidal compound from *Streptomyces* sp. KA1-3. In: *Microbiological Research in Agroecosystem Management* (Rajesh Kannan Eds), pp. 187-195. Springer, India. Properties, second ed. American . Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp. 969–987.

R

- Rahman, M.A., Islam, M.Z. et Islam, M.A. (2011).** Actinobacterial activities of Actinomycetes Isolates Collected From Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnologie Reaserch Internationl*, 2011: 1-6.
- Rangaswami G., Bagyaraj D. J., Bagyaraj D. G. (2004).** *Agricultural Microbiology*. PHI: New Delhi. Pp: 440.
- Richardon A.E., Barea J-M., McNeill A.M. , Prigent. C. (2009).** Acquisition Of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganism. *Plant Soil*, 321:305-339.
- Rickes E.L, Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R., Folkers K. (1948).** Crystalline vitamin B12. *Sci.*1948; 107(2781):396-397.

S

- Sabaou N. (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Saffroy S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. **150 p.**
- Sanglier J.J., Wellington E.M.H., Kamoun A., Kelly C., Mercer D.K., Prinzis S., Trigo C. (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**,661-663.
- Saha S., Dhanasekaran D., Shanmugapriya S., Latha S. Nocardiosis sp. (2013).** SD5: a potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu, India. *J Basic Microbiol.* 53(7):608-616.
- Sanscartier D., Zeeb B., Koch I., Reimer K. (2009).** Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Reg Sci Technol.* 55(1):167-173.
- Scherr Nicole & Nguyen Liem. (2009).** Mycobacterium versus Streptomyces—we are different, we are the same, *Current Opinion in Microbiology* 12: P 699-707.
- Schneider K., Nicholson G., Strobele M., Baur S., Niehaus J., Fiedler H.P., Sussmuth R.D. (2006).** The structures of fluostatins C, D and E, novel members of the fluostatin family. *JAntibiot.* 59(2):105.
- Schmid R.D., Verger R. (1998).** Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie* .37(12):1608-1633.
- Sharmin S., Towhid Hossain MD., Anwar MN. (2005).** Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amonvivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production. *J Biol Sci.* 5(3):358-362
- Shirling E.B., Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 13:313–340.
- Shirling E.B., Gottlieb D. (1976).** Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomy criteria, in: *Actinomycetes the boundary microorganisms*. Ed : Arai T. Tokyo. 9- 42.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, 7:373–390.
- Song J., Weon H. Y., Yoon S. H., Parrk D. S., Go S. G., Suh J. W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinimycetes isolated from mush room composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 97-102.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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.**

Srivibool R., Kurakami K., Sukchotiratana M., and Tokuyama S. (2004). Coastal Soil Actinomycetes: Thermotolerant Strains Producing *N*-Acylamino Acid Racemase. *Science. Asia.*, **30**, 123-126.

Staneck. J.L; and. Roberts. G.D. (1974). - Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Environ. Microbiol*, **28** (2), 226-231.

Sykes G.; Skinner F. A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.

T

Tan H, Deng Z, Cao L. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Lett Appl Microbiol.* **49**(2):248-253.

Thakur D, Yadav A, Gogoi B.K, Bora T.C. (2007). Isolation and screening of streptomycetes in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites, *Journal de Mycologie Médicale* **17**: P 242-249.

Theilleux J. (1993). - les actinomycètes in *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Paris, V 612p, pp 425.

Tortora G .J., Funke B.R. et Case C. L. (2003). Introduction à la microbiologie. *Ed. De Nouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A. (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J Basic Microbiol.*, **54**:1–8.

V

Valanarasu M., Kannan P., Ezhilvendan S., Ganesan G., Ignacimuthu S., Agastian P. (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *streptomyces* ssp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu, *Journal de Mycologie Médicale* **20**: P290-297.

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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71** (3), 495–548.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

W

Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M., Rodriguez C. (2006). *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. J. Sys. Ev. Microbiol. Vol 56. Pp: 1257-1261.

Watson E.T., Williams S.T. (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 43-52.

Williams S. T., Wellington E. M. H., (1984). Ecology of Actinomycetes. In : Goodfellow, M., (Eds.), The biologie of the Actinomycetes. London, Pp.481-528.

Williams S. T., Wellington E. M. H. (1982a). Actinomycetes. In: Eds. Page A.L., Miller R.H., Keency O.R.: Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties, second ed. American . Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp. 969–987.

Williams S.T., Wellington E.M.H. (1982). Actinomycetes. *In: Methods of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties, second ed.* Page A.L., Miller R.H. and Keency O.R. (Eds). American society of agronomy/Soil science society of America, Madison. 967-987.

X

Xiliang J. (1994). The mechanism of agricultural antibiotic. *Biol Control Aviso.* **10** (2), 76–81.

Xu L. H., Li Q. R., Jiang C. L., (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan. China Applied in Environmental and Microbiology., **(62)**:244-248.

Y

Yamaguchi T. (1965). Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, **89** (2), 444–453.

Yan Chu S. (1993). New developments of agricultural antibiotic pesticide. *Trans. (China).* **15** (6):5-12.

YeKKour A., MeKKlat A., Bjani C., toumatia O., Errakhi R., lebrihi A., Mathiou F., Zitouni A., Sabou M. (2015). A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. *Lett Microbiol.*, **60**:589–596.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Young I.M., Ritz K. (2000). Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil tillage Research* ,**53** :201-213.

Z

Zermane F. (2007). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse.p33-38.

Zitouni. A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix sp SA 103*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (Algérie). pp 230.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda DP. (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., a new species isolated from a Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54:1377–1381.

Annexe

ANNEXE

Annexe 01

Composition de milieu de culture

Milieu ISP2

Extrait de malt	10g
Extrait de levure	4g
Glucose.....	4g
Agar.....	20g
Eau distillée	Qsp1000ml
Ph	7.2

Milieu ISP3

Farine d'avoine :	20 g.
Solution saline standard :	10 ml.
Agar:.....	20 g.
Eau distillée.....	Q.s.p. 1000 ml.
PH.....	7,2.

Solution saline standard

FeSO ₄ , 7H ₂ O:.....	0,1g.
MnCl ₂ , 4H ₂ O:.....	0,1g.
ZnSO ₄ , 7H ₂ O:.....	0.1 g.
Eaudistillée.....	Q.s.p100 ml.

Milieu ISP4

Amidon.....	10 g.
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1 g.
NaCl.....	1 g.

ANNEXE

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.
CaCO ₃	2 g.
Agar :	20 g.
Eau distillée.....	Q.s.p. 1000 ml
PH	7,2.

Milieu ISP4

Asparagine	1 g
Glycérol	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution d'oligo-éléments.....	1ml
Agar.....	20 g
Eau distillée	Q.s.p.1000 ml.
PH =.....	7,4

Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glycérol:	15 g
L-tyrosine:	0,5 g
L-asparagine:.....	1 g
K ₂ HPO ₄ :.....	0,5 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O:.....	0,5 g
NaCl:.....	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O:.....	0,01 g
Solution saline standard (voir ISP3):	1 ml
Agar:	20 g
Eaudistillée	Q.s.p1000 mL
PH.....	7,2.

ANNEXE

Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH ₄) ₂ SO ₄ :	2,64g
KH ₂ PO ₄ :	2,38g
K ₂ HPO ₄ :	5,65g
MgSO ₄ , 7H ₂ O:	1g
Solution saline* :	1 ml
Eau distillée :	1000 ml
Agar:	20g
PH:	6,8-7

Solution saline:

CuSO ₄ , 5H ₂ O:	0,64g
FeSO ₄ , 7H ₂ O:	0,11 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O:	0,79 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O:	0.15 g
Eau distillée :	1000 ml

Bouillon nutritif

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
NaCl.....	5g
Eau distillée.....	Qsp1000ml
Ph	7.2

Milieu GLM

Extrait de levure	3g
Extrait de malte	3g
Peptone	5g
Glucose Agar	20g

ANNEXE

Eau
distillée.....Qsp1000ml

Ph7.2

Milieu Bennett

Extrait de levure1g

Extrait de viande.....1g

Peptone.....2g

Glucose10g

Agar.....20g

Eau distilléeQsp1000ml

Ph.....7.2

Milieu Muller-Hinton

Infusion de viande.....300g

Hydrolysate de caséine 17.5g

Amidon1.5g

Agar.....17g

Eau
distillée.....Qsp1000ml

Ph.....5.6

Eau physiologique 9%

Chlorure de sodium9g

Eau distillée.....Qsp1000ml

ANNEXE

Annexe 02

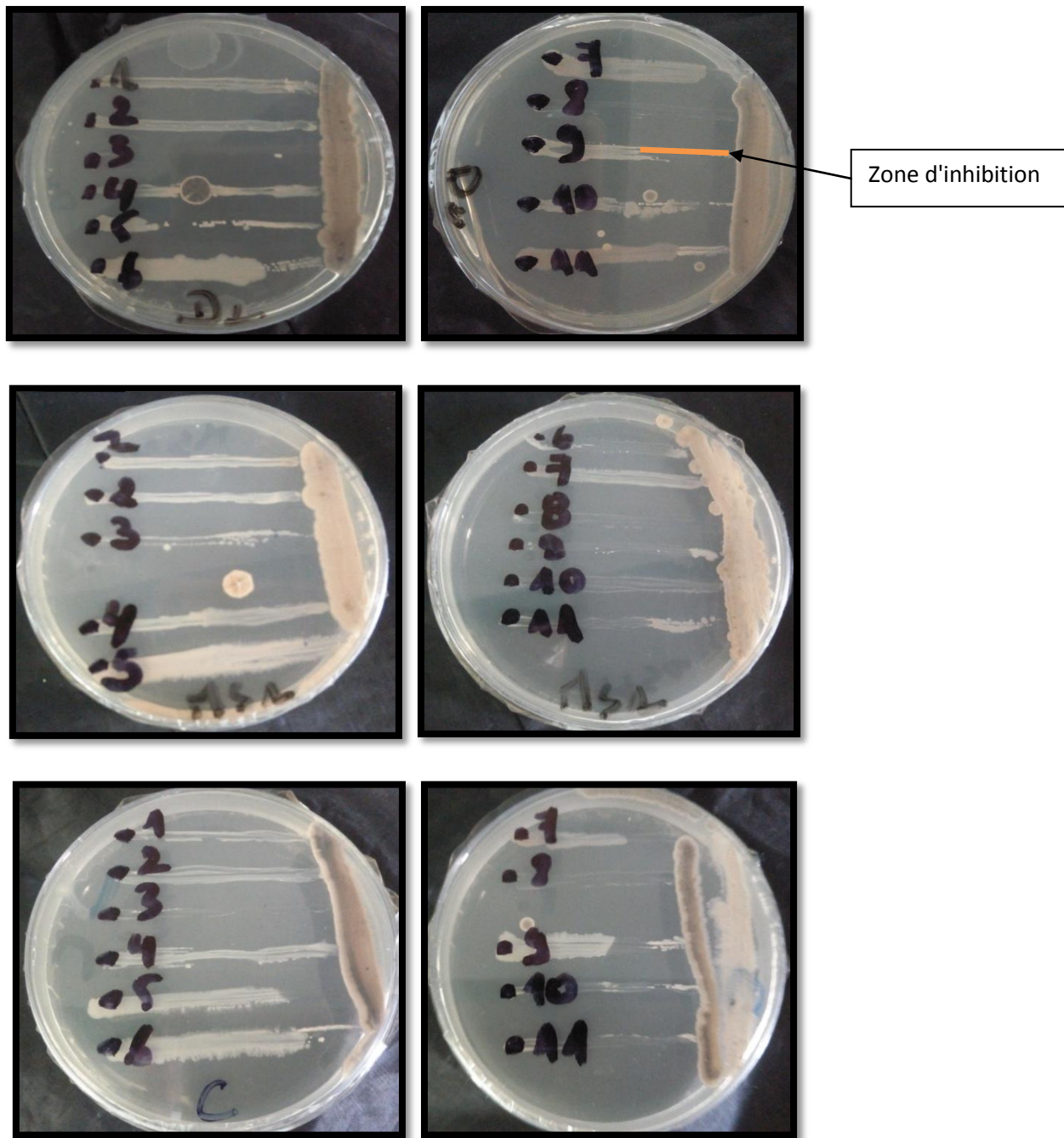


Figure 21. Activité antimicrobienne des Isolats d' Actinomycètes (D2, MS₁, C) vis-à-vis des souches de références (méthode des stries croisée).

ANNEXE



Figure 23. Activité antimicrobienne des 03 isolats d'Actinomycètes (D2, Ms1 et C) vis-à-vis des souches de références par la méthode des cylindres d'agar.

Résumé

Dans ce présent travail nous avons essayé d'identifier phénotypiquement quelques isolats d'actinobactéries présentant une activité antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries pathogènes, les potentialités antagonistes de ces dernières ont été étudiées sur six souches d'actinomycètes codées H1, Ms1, D2, O5, 10, C provenant des échantillons des sols et une échantillon de l'eau de différentes régions d'Algérie.

Au total, de 31 isolats d'actinobactéries ont été isolées en utilisant le milieu ISP2, seules 06 isolats ont été retenus pour l'étude de leur activité antimicrobienne en se basant sur leur caractéristiques morphologiques différentes.

Les tests d'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries par diverses méthodes, nous ont permis de sélectionner 03 isolats, nommées D2, Ms1 et C présentant une activité non négligeable antagoniste vis-à-vis de quatre bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 2035), trois bactéries Gram- (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922) et deux levures (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 10231 et *Candida albicans* ATCC 10231).

L'étude morphologiques, macroscopiques et microscopiques, montrent que les trois isolats présentent les traits typique des Streptomycètes.

L'étude physiologique des souches D2, MS1, et C a permis de déterminer certaines caractéristiques physiologiques importantes de ces souches, tels que la croissance à différentes températures, à différente pH, à différentes concentrations en NaCl, ainsi qu'on utilisant différents sucres comme source de carbone et différents acides aminés comme sources d'azote, ainsi que l'hydrolyse de plusieurs composés tel que la caséine, tween 80, de l'amidon...etc.

L'étude taxonomique a été réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats ont permis de rattacher les trois isolats sélectionnés aux genres *Streptomyces*.

Mots clés: Actinobactéries, activité antimicrobienne, étude taxonomique, *Streptomyces*.

Abstract

In the present work, we have tried to identify phenotypically some of actinobacteria isolates presenting antimicrobial activity against pathogenic bacteria, the antagonistic potentialities of these actinobacteria have been studied on six isolates of actinomycetes coded H1, MS1, D2, O5, 10, C from soils samples and one water sample collected from different regions in Algeria.

A total of 31 actinobacteria isolates were isolated using ISP2 medium, only 06 Isolates were selected for the study of their antimicrobial activity based on their different morphological characteristics.

Tests of antagonist activity of actinobacteria strains by different methods allowed us to select three isolates, named D2, MS1 and C, with a significant antagonistic activity against the four Gram + bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*), three Gram- bacteria (*Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and two yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*).

The morphological, macroscopic and microscopic study show that the four isolates have the typical characteristics of the *Streptomyces*.

The physiological study of the strains D2 MS1 and C has identified some important physiological characteristics of these strains, such as growth at different temperatures, different pH, different concentrations of NaCl, as is using different sugars as carbon source and different amino acids as nitrogen sources, as well as the hydrolysis of several compounds such as casein, tween 80, starch ... etc.

The taxonomic study was conducted on the basis of morphological, physiological and biochemical. The results were used to link the three strains selected for *Streptomyces* Genus.

Key words: actinobacteria, Antimicrobial activity, taxonomic study, *Streptomyces*.

الملخص

في هذا العمل لقد قمنا بمحاولة التعرف ء اعتمادا على المظهر الخارجي لبعض عزلات من البكتيرية الخيطية التي اظهرت خاصية تضاد اتجاه البكتريا الممرضة, البحث عن أنواع جديدة و احتمالية تشخيص البكتيرية الهيفية انطلاقا من 06 عينات من التربة الجافة وشبه الجافة وعينة ماء من مختلف مناطق الجزائر .

عزلت 31 عزلات بكتيرية هيفية باستخدام الوسط ISP2 ' تم اختيار 6 0 عزلة منها فقط على الأساس المورفولوجي ، لاختبارات النشاط.

اختبارات النشاط التشخيصي المطبقة بطرق مختلفة على عزلات البكتيرية الهيفية سمحت لنا بانتقاء ثلاث عزلات نشيطة و التي سميت ب: MS1, C و D2 و التي تتميز بنشاط كبير ضد اربعة لأنواع من البكتيرية ايجابية Gram (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) وثلاثة سلبية (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*) و نوعان من الخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*).

تبين الدراسة المورفولوجية ماكرو و ميكرو أن العينات الاربعة لها الخصائص النموذجية لـ *Streptomyces*.

الدراسة الفسيولوجية للسلاطات D2,MS1,C حددت بعض الخصائص الفسيولوجية الهامة لهذه السلاطات، مثل النمو في درجات حرارة مختلفة ، ودرجة الحموضة المختلفة، وتركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم، وكذلك استخدام السكريات المختلفة كمصدر

الكربون والأحماض الأمينية المختلفة كمصادر النيتروجين ، فضلا عن التحليل لعدة مركبات مثل الكازين، توين 80 ، النشا ... الخ وقد أجريت الدراسة التصنيفية على أساس الصفات المورفولوجية والفسيولوجية و البيوكيميائية حيث سمحت لنا النتائج

المتحصل عليها بوصل العزلات الثلاثة المدروسة بالنوع *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية : البكتيرية الهيفية, اختبارات النشاط التظا د , الدراسة التصنيفية, *Streptomyces*.