

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Blida 1



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MASTER**

Option :

MICROBIOLOGIE/ BACTERIOLOGIE

THEME

**Isolement de souches d'Actinobactéries à partir de
Sebka de la région d'Adrar et criblage des activités
antagonistes**

Présentée par : M^{elle} BOUGRID Asma

Soutenu le : 2 Octobre 2014

Devant le jury composé de :

Mr GUEDIOURA A.	M.A.A. à l'université de Blida 1	Président
M ^{me} MEKLAT A.	M.C.A. à l'université de Blida 1	Examinatrice
M ^{me} MAKHLOUF	M.A.A. à l'université de Blida 1	Examinatrice
M ^{me} DEBIB A.	M.C.B. à l'université de Blida 1	Promotrice
Mr BOUMEHIRA A.	A.R. à C.R.A.P.C de Bou-Ismaïl	Co- promoteur

Promotion: 2013-2014

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je remercie ALLAH de m'avoir aidé à le réaliser.

Je tiens à exprimer en premier, ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Madame DEBIB A., Maitre de conférences à l'université de Blida 01 pour ses conseils, son aide et sa disponibilité qui ont permis à la concrétisation de ce travail.

Je remercie également Monsieur BOUMEHIRA A, attaché de recherche au Centre de Recherche Scientifique et Technique En Analyses Physico-chimiques (CRAPC) de Bou-Ismaïl d'avoir proposé et dirigé ce travail. Je lui atteste ma gratitude pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, ses orientations et sa patience.

Mes sincères remerciements aux membres du jury

Mr GUEADIOURA A. qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Mme MEKLAT A. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mme MAKHLOUF. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements à tous les Enseignants du département BPC ainsi que tous ceux qui m'ont aidé.

Dédicace

Je dédie ce mémoire ;

- *à mes grand-parents maternels et paternels ;*
- *à mes très chers parents qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage afin de terminer mes études ;*
- *à mes sœurs Amina et Khaoula ;*
- *à mes cousines et cousins ;*
- *à mes oncles et tantes paternels et maternels ;*
- *au reste de ma famille ;*
- *à mes enseignants qui m'ont éclairée la route du savoir ;*
- *à mes amies et mes collègues .*

Résumé

Les actinobactéries sont responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes extrêmes constituent un axe de recherche très intéressant. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à la recherche des antibiotiques élaborés par 18 souches d'actinobactéries isolées à partir de trois échantillons provenant de la Sebkha de Reggane située dans la région d'Adrar (sud de l'Algérie) où les conditions physicochimiques (aridité, salinité...) sont extrêmes. L'activité antimicrobienne a été recherchée vis-à-vis de cinq bactéries Gram positive, cinq bactéries Gram négative, deux levures et deux de champignons filamenteux. Elle a été réalisée par la technique des cylindres d'agar.

Parmi les 18 isolats, seulement trois souches ont montré une activité contre au moins une bactérie utilisée. Par contre aucune activité contre les levures et les champignons n'a été démontré.

Mots clés : Actinobactéries, Activité antimicrobienne, Antibiotique, Sebkha d'Adrar.

Abstract

Actinobacteria are responsible for producing most of bioactive molecules. The isolation of these microorganisms from extreme ecosystems isolation represents a very interesting axe of research. In this perspective, we are interested in the search for antibiotics produced by 18 strains of actinobacteria isolated from three samples coming from the Reggane Sebkha located in Adrar region (south of Algeria) when physicochemical conditions (aridity, salinity ...) are extreme. Antimicrobial activity was tested using the agar cylinder method against five Gram positive bacteria, five Gram negative bacteria, two yeasts and two filamentous fungi.

Among 18 isolated strains, three showed an activity against at least one of the tests-bacteria studied. On the contrary no antifungal activity has been demonstrated

Keywords: Actinobacteria, Antimicrobial activity, Antibiotic, Adrar Sebkha.

المخلص

البكتيريا الهيفية (Actinobacteria) هي المسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيا. عزل هذه الكائنات الدقيقة من النظم الإيكولوجية حادة الظروف يمثل مجال بحث مثير جدا للاهتمام. في هذا المنظور، تم عزل 18 سلالة بكتيرية من نوع الأكتينوبكتيريا انطلاقا من ثلاث عينات مأخوذة من سبخة أدرار (جنوب الجزائر) ذات ظروف الإيكولوجية الصعبة (الجفاف و الملوحة ...).

تم اختبار النشاط البكتيري باستخدام طرق الانتشار للمضادات الحيوية في البيئة المغذية, ضد خمسة سلالات بكتيريا ممرضة موجبة الغرام , خمسة سلالات بكتيرية ممرضة سالبة الغرام , نوعين من الخميرة و نوعين من الفطريات الخيطية.

من بين 18 سلالة معزولة ثلاث سلالات فقط أظهرت قدرتها على تثبيط نمو سلالة بكتيرية ممرضة واحدة على الأقل. على العكس من ذلك لم يثبت أي نشاط مضاد للفطريات .

الكلمات المفتاحية: اكتينوبكتيريا, النشاط البكتيري , الجزيئات النشطة بيولوجيا, مضادات حيوية, سبخة أدرار.

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique.

ARN_r 16S : acide ribonucléique ribosomal de la sous unité 16S du ribosome

ATCC: American Type Culture Collection.

G+C: le ratio guanine + cytosine.

GC%: coefficient de CHARGAFF

GAA: Glycérol-Arginine Agar

GN: gélose nutritive

MRSA: *Staphylococcus aureus* résistantes a la méthicilline

NaCl: Chlorure de sodium

SGA : Sabouraud 4% Glucose Agar

ISP : international Streptomyces project

VRE : *Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Principaux taxons de microorganismes du sol.....	3
Tableau 2 :	Exemples de quelques bactéries halophiles.....	4
Tableau 3 :	Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes.....	12
Tableau 4 :	Aspect macroscopique des souches isolé après un moi d'incubation sur le milieu ISP2	22
Tableau 5 :	Optimum de pH de la poussée des souches.....	24
Tableau 6 :	La croissance des souches à différents milieux de culture.....	25
Tableau 7:	Optimum de salinité des souches.....	26
Tableau 8:	Utilisation de différentes sources de carbone.....	27
Tableau 9 :	Détermination des profils de sensibilité actinobactéries aux antibiotiques.....	30
Tableau 10 :	Activités antagonistes des 12 souches d'Actinobactéries contre les souches cibles	32

INDEX DES FIGURES

Figure 1 :	Classification des actinobactéries basee sur l'analyse des sequences ARN 16S.....	7
Figure 2 :	Coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie	8
Figure 3 :	Aspect microscopique des actinobactéries.....	8
Figure 4 :	Exemples de forme de chaines de spores des actinomycètes.....	9
Figure 5 :	Aspect morphologique des actinomycètes isolés à partir du sol.....	10
Figure 6 :	Schéma de l'isolement de souches d'Actinobactéries à partir du sol de la Sebkha de reggane.....	15
Figure 7 :	Aspect macroscopique des actinobactéries isolés à partir du sol.....	23
Figure 8 :	Aspect macroscopique de certaines souches sur différents milieux de culture...	26
Figure 9 :	Utilisation de différentes sources de carbone.....	28
Figure 10 :	Production de pigment mélanoidé sur milieu ISP7.....	29
Figure 11 :	Antibiogramme des souches (C2, C6, C14).....	31
Figure 12 :	Activité antagoniste de la souche C18 contre <i>Enterococcus faecium</i> CIP 5855.	33
Figure 13 :	Activité antagoniste de la souche C18 contre <i>Micrococcus luteus</i>	33
Figure 14 :	Activité antagoniste de la souche C18 contre <i>Acinetobacter sp.</i>	33
Figure 15 :	Activité antagoniste de la souche C18 contre <i>Bacillus cereus</i>	33
Figure 16 :	Activité antagoniste de la souche C2 contre <i>Listeria innocua</i> ATCC33090.....	34
Figure 17 :	Activité antagoniste de la souche C2 contre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25 923)	34
Figure 18 :	Activité antagoniste de la souche C17 contre <i>Micrococcus luteus</i>	34

Introduction

Il ya quelques décennies, le monde croyait que la science avait triomphé les maladies infectieuses et que tout était sous contrôle. Les vaccins et les antibiotiques ont effectivement permis de vaincre ou contrôler certains fléaux comme la variole ou la tuberculose (**Kitouni, 2007 ; AARN, 2011**). Mais certains événements nous rappellent que nous devrions toujours faire face à de nouveaux défis infectieux : l'apparition de la résistance à tous les agents antimicrobiens connus comme *Staphylococcus aureus* résistantes a la méthicilline (MRSA), d'*Enterococcus faecium* résistantes a la vancomycine (VRE) ainsi que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (**Livermore, 2004 ; AARN, 2011**).

Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques reste absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules. Cependant, la solution à long terme pour contrôler les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (**Madigan et Martinko, 2007 ; Saisivam et al., 2008**).

Pour cela et en premier lieu, l'isolement des Actinobactéries à partir d'écosystèmes extrêmes (ou l'un ou plusieurs facteurs environnementaux sont extrêmes) comme la Sebkhha (lac très salé) permet éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé de molécules bioactives ou inexploité (**Groth et al., 1999 ; Kamil et al., 2014 ; Wu et al., 2014**). En plus, l'utilisation de bactéries résistantes aux antibiotiques comme germes tests peut conduire a la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles (**Oiwa, 1992 ; Rajan et Kannabiran, 2010 ; Sandeep et Menaka, 2014**).

En Algérie, il existe des écosystèmes extrêmes tels que les Sebkhhas, les sols désertiques et les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Récemment ces environnements commencent à être exploités pour la recherche de nouvelles souches productrices de biomolécules (**Bouanane-Darenfed et al., 2011**). Une nouvelle espèce a été décrite par **Zitouni et al., 2004**, *Sa algériensis* (Ecole National Supérieur de Kouba-Alger) ainsi, la découverte de plusieurs antibiotiques originaux (plus de 30 molécules d'antibiotiques) (**Bouras, 2005 ; Merrouche et al., 2010**)

A ce titre, l'objectif de notre travail était l'isolement de souches d'actinobactéries à partir d'une Sebkhha de la région d'Adrar au sud d'Algérie, ainsi que la mise en évidence des activités antibactériennes des souches isolées

1. Matériel

Notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire de Microbiologie au Centre de recherche d'Analyses Physico-chimiques (CRAPC) à BOUSMAIL, Wilaya de Tipaza durant du 23 Février 2014 au 26 Juin 2014

1.1. Matériel Biologique

- Trois échantillons du sol prélevés à partir de la Sebkha de Reggane.
- Les souches cibles utilisées dans l'activité antagoniste.

2. Méthodes

2.1 Prélèvements du Sol

Les échantillons du sol utilisé dans notre travail sont prélevés d'une Sebkha de la région de Reggane. Les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés. A l'aide d'une Spatule stérile 800 à 1000 g de sol sont recueillis dans des sachets Stomacher Stériles. Les échantillons sont transportés le plus rapidement possible au laboratoire et conservés à 4°C (Pochon et Tardieux, 1962).

2.2 Isolement des souches à partir du sol

a) Traitements du Sol

On mélange aseptiquement le contenu de trois échantillons du sol de Reggane, le mélange est soumis à un traitement thermique à 70°C dans une étuve pendant une heure, et un traitement avec des ultrason pendant 80 secondes.

Ce traitement a été réalisé pour éliminer d'autres microorganismes, qui gênent la croissance des actinobactéries

b) Préparation des dilutions

On prépare les dilutions suivantes : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . On prend 1g du sol et on le met dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile c'est la solution mère. Après homogénéisation de cette solution mère à l'aide d'un agitateur vortex, 1ml de la solution mère est transféré aseptiquement dans le premier tube (10^{-1}), ce dernier contient 9 ml d'eau distillée stérile. De la même manière les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ont été préparées.

c) Ensemencement des milieux

On prend **100 µl** de chaque dilution et on les étale sur les boîtes de Pétri contenant les milieux suivants en double : International Streptomyces Project Medium 2 (**ISP2**), (avec différentes concentrations en NaCl : **2%**, **15%** et **30%**), International Streptomyces Project Medium 4 (**ISP4**), Glycérol-Arginine-Agar (GAA), Sabouraud 4% Glucose-Agar (**SGA**), Gélose nutritive (**GN**).

d) Incubation :

Une série des boîtes sont incubées à **30°C** pour isoler les souches mésophiles et une autre à **55°C** pour isoler les souches thermophiles jusqu'à 8 semaines. Des boîtes témoins milieux et témoins diluant sont incubées simultanément.

L'approche utilisée dans notre étude pour l'isolement de souches bactériennes est représentée dans la **figure 6**.

2.3. Purification des souches isolées

Après **2 à 4** semaines d'incubation, on passe à l'étape de purification des souches. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre et l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé puis purifié par des repiquages successifs selon la méthode de stries.

2.4 Conservation des souches

La méthode utilisée dans cette étape est basée sur la conservation à courte durée. Les souches sont ensemencées sur le milieu **ISP2** coulé en pente dans des tubes.

Après incubation à **30°C** pendant **1 à 2** semaines, les tubes sont conservés à **4°C**. Les repiquages se font toutes les trois ou quatre semaines

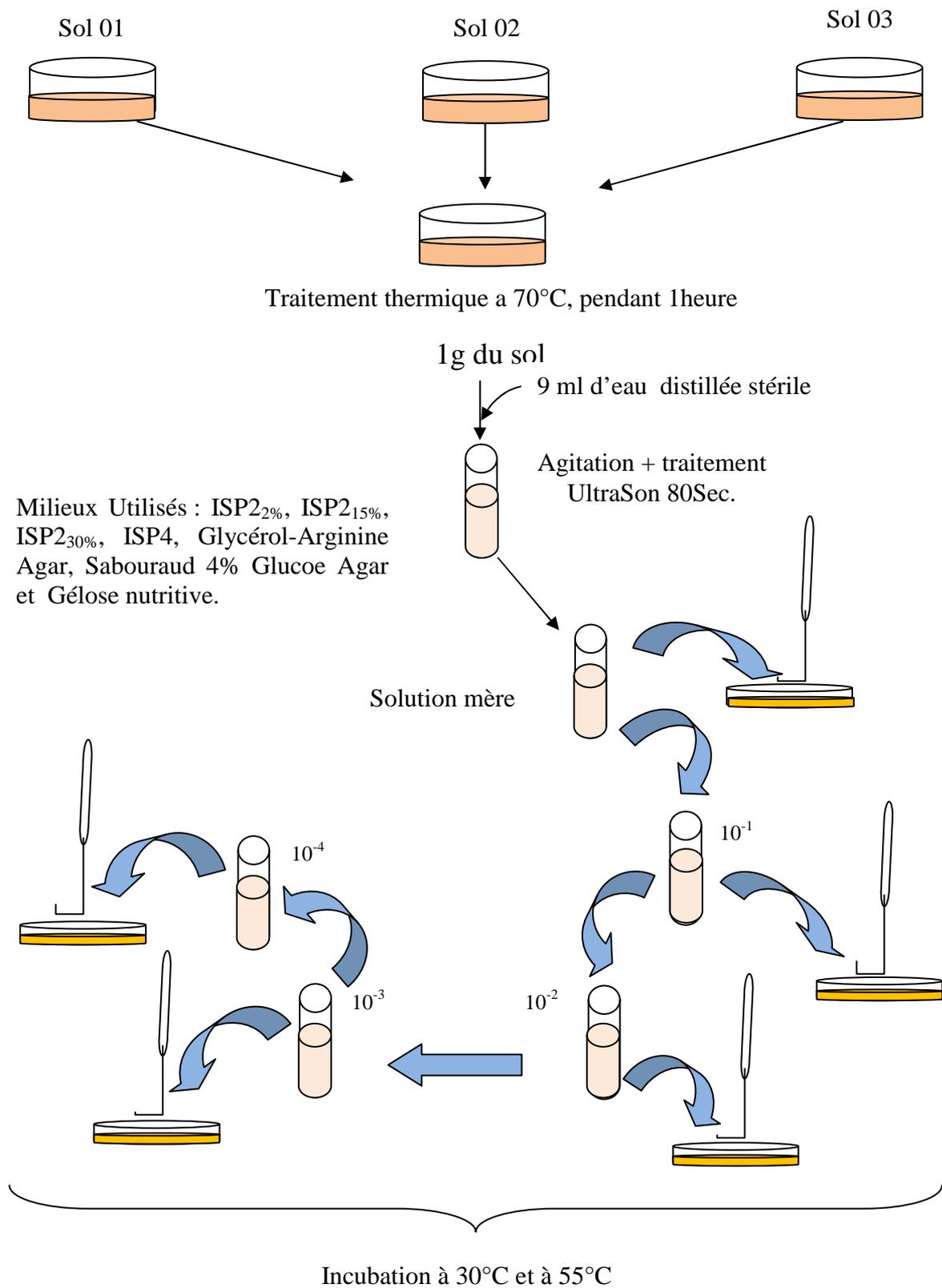


Figure 6 : Schéma de l'isolement de souches d'actinobactéries à partir du sol de la Sebkhya de Reggane.

2.5. Identification des souches purifiées

2.5.1. Etude morphologique

a) Caractérisation macroscopique

Après 4 semaines d'incubation, on note sur chaque milieu de culture utilisé la couleur de mycélium aérien et du substrat, et la détermination des pigments diffusables dans les milieux de cultures (Meklat, 2012)

b) caractérisation microscopique

A l'aide d'un microscope optique on utilisant les grossissements 10 x 10 et 10 x 40, on observe directement sur la boîte de Pétri (pour ne pas altérer les structures en place mycélia et fructification) la sporulation du mycélium aérien, la fragmentation ou non du mycélium de substrat, etc (Meklat, 2012)

2.5.2. Etude physiologique

Les tests physiologiques sont des outils indispensables pour l'identification et la classification des actinobactéries et permettent d'influer sur le taux de croissance de ces dernières (Usha *et al.*, 2012).

a) Etude de la Croissance à différents pH

Les souches sont ensemencées sur le milieu **ISP2** ajusté avec le Ph mètre à différents **pH (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12)**. La croissance des souches est évaluée visuellement **5 a 7** jours d'incubation a **30°C**. Trois niveaux d'appréciation sont retenus:

- Croissance faible ou absente (+/-) ;
- Croissance moyenne (+ ou ++)
- Bonne croissance (+++).

b) Détermination de la température optimale de croissance

Les souches d'actinomycètes isolées du sol de la Sebkha sont ensemencées sur le milieu solide, et incubées pendant **7** jours d'incubation à **30°C, 40°C et 55°C**.

- Croissance faible ou absente (+/-) ;
- Croissance moyenne (+ ou ++)
- Bonne croissance (+++).

c) Détermination de la croissance des souches à différents milieux de culture

Pour tester la croissance des souches sur différents milieux, nous avons cultivé les souches sur les milieux suivants (**GN, SAB, MH, ISP4, ISP5, ISP7**), pendant **14** jours à **30°C**.

d) Détermination de l'optimum de salinité

L'optimum de salinité est déterminé sur le milieu **ISP2** solide additionné de concentrations différentes en NaCl: **0%, 2%, 4%, 7%, 15%, 20%, 25%** et **30%**. Un témoin sans NaCl est également ensemencé.

e) Production de pigments mélanoides

La mise en évidence de la production de ces pigments mélanoides (pigments bruns diffusables) est réalisée par culture de la souche sur le milieu **ISP7**. Les résultats sont appréciés après **21** jours d'incubation à **30°C** par comparaison avec les milieux témoins non ensemencés, mais incubés dans les mêmes conditions. Les cultures qui présentent une coloration brune à brun foncé sont considérées comme produisant des mélanines (**Shirling et Gottlieb, 1964**).

f) Détermination des profils de sensibilité des actinobactéries aux antibiotiques

L'antibiogramme a été effectué dans le but de déterminer le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques. La gélose **ISP2** a été ensemencé par la souche à tester puis les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface de la gélose et incubés pendant une semaine. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle. Les résultats ont été exprimés comme sensibles (**S**), intermédiaires (**I**) et résistantes (**R**) selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007). Deux souches de référence de résistance aux antibiotiques connue, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, ont été incluses dans les essais (**Hadj-Rabia, 2008**).

g) Utilisation des sources de carbone

Ce test consiste à apprécier la croissance des isolats en présence de plusieurs glucides et dérivés comme seule source de carbone. L'étude est réalisée sur le milieu **ISP9** de base (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Les sources de carbone utilisées sont : glucose, mannitol, sucrose, lactose, mélibiose, fructose, sorbitol, rhamnose, mesoinositol et glycogène. Les sources de carbone sont stérilisées séparément par filtration (le diamètre de filtre est de 0,22mm) puis ajoutées au milieu à une concentration finale de **1%**.

h) Utilisation du citrate comme seul source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons a étéensemencée en surface par stries serrées et longitudinales à l'aide d'une pipette chargée de la souche étudiée puis incubée à **30°C** pendant **7** jours. Le virage de l'indicateur au bleu indique une alcalinisation du milieu donc la présence de l'enzyme (**Kitouni, 2007**)

i) Réduction des nitrates

Le bouillon nitraté a étéensemencé avec la souche à tester, puis incubé à **30°C** pendant **7** jours. Au moment de la lecture, quelques gouttes des réactifs de Griess **NRI** (acide sulfanilique) et **NRII** (α -naphthylamine) ont été ajoutés (**Gordon et Smith, 1953**).

La Nitrate Réductase catalyse la réaction de réduction des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) donnant une coloration rose. En absence de cette coloration, on ajoute une quantité en milligrammes de la poudre de zinc.

-) S'il y a apparition de la coloration rose : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
-) S'il y a absence de la couleur rose : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

j) dégradation de Mannitol

-) L'utilisation du mannitol qui est le produit du D-mannose : sa dégradation conduit à la formation de fructose lui-même dégradé directement en acides à chaînes courtes en acide acétique et acide formique.

Le milieu semi solide mannitol-mobilité a étéensemencé par piqure centrale à l'aide d'un fil bien droit chargé de germes à tester, puis incubé à **30°C** pendant **7** jours :

-) Le virage de la couleur rouge au jaune indique la fermentation du mannitol. (**Harley et Prescott, 2002**).

k) Production d'indole

Le test a été réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée, exempté d'indole, quelques gouttes de la suspension bactérienne. Les tubes sont ensuite incubés à **30°C** pendant **7** jours. Après incubation, quelques gouttes de réactif de Kowacs ont été ajoutées, une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface (**Kitouni, 2007**)

l) La production d'H₂S

La pente du milieu TSI a été ensemencée par stries et le culot par piqure centrale, puis incubée à **30°C** pendant **7** jours (**Hadj-Rabia, 2008**)

Lecture

- Fermentation du glucose seulement: culot jaune et pente rouge.
- Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose): culot et pente jaunes.
- Aucun sucre dégradé: pente rouge et culot rouge ou orange.
- Production de gaz: bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé.
- Production de H₂S: précipité noirâtre plus ou moins abondant.

m) Recherche de la catalase

Pour chaque souche une goutte d'eau oxygénée a été placée sur une lame stérile sur laquelle l'inoculum bactérien a été étalé à l'aide d'une pipette boutonnée. Le test est positif s'il ya un dégagement gazeux par formation des bulles d'air (**Hadj-Rabia, 2008**).

2.6. Etude de l'activité antagoniste

L'activité antagoniste a été testé par la méthode des cylindres d'Agar de Patel et Brawn (1969). Les souches d'actinobactéries sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon à la surface des boîtes de pétri. Après une incubation d'une semaine, les souches forment une nappe à la surface de la gélose. Ensuite, des cylindres d'Agar de **6 mm** de diamètre sont découpés de chaque boîte.

L'activité antibactérienne a été évaluée sur des boîtes de Muller Hinton inoculées avec la souche indicatrice et l'activité antifongique était évaluée sur gélose Sabouraud. Six disques

d'actinobactéries ont été utilisés par boîte. Une période de pré-incubation d'une nuit à 4°C, a été réalisée afin de permettre la diffusion des métabolites. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24H pour les souches indicatrices bactériennes et 30°C pendant 72H pour les souches indicatrices fongiques.

L'activité antagoniste se traduit par la formation d'une zone d'inhibition. Le diamètre de cette zone est estimé en mm à l'aide d'une règle.

Quatorze souches microbiennes ont été utilisées dans cette étude :

-) **Souches bactériennes** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, *Listeria innocua* ATCC33090, *Escherichia coli* ATCC 25925, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22, *Acinetobacter sp*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium* CIP 5855, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*.

-) **Levures** : *Saccharomyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae*,

-) **Souches fongiques** : *Aspergillus niger*, *Fusarium sps*

II. Discussion

L'isolement des actinobactéries productrices de substances bioactives à partir d'écosystème extrême nécessite une méthode performante pour leur sélection qui doit passer par l'élimination d'autres microorganismes, qui par leur facultés d'envahissement, gênent la croissance des actinobactéries. Le rapport actinobactéries/microorganismes d'un échantillon peut être amélioré :

- Par prétraitement chimique, à titre d'exemple le carbonate de calcium et le phénol (**Cavalla et Eberlin, 1994**) ou physique comme le traitement thermique des échantillons (**Nonomura et Ohara, 1969**) et l'utilisation d'ultrason (**Jaing et al., 2010**).
- Par l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (amidon, glycérol, asparagine) rendant les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres que les actinomycètes (**Cavalla et Eberlin, 1994**).
- Ou encore par l'emploi de substances antibiotiques qui permettent d'inhiber le développement des flores bactériennes, fongiques et antagonistes (**Larpen et Larpen Gourgaud, 1990 ; Alferova et al., 1989**)

Dans ce but nous avons isolé des actinobactéries à partir du mélange des trois échantillons du sol qui a subi un prétraitement thermique à **70°C** pendant une heure et un prétraitement avec des ultrasons pendant **80** secondes.

En effet, le traitement thermique permet d'éliminer toute la flore microbienne mésophile et ne laisse pousser que les actinobactéries qui peuvent s'adapter à cette température assez élevée grâce à leurs spores qui résistent mieux à la chaleur et à la dessiccation que beaucoup d'autres microorganismes (**Leveau et Bouix, 1993**), ces résultats corroborent à ceux de **Cherati et al., 2012** qui ont montré que le traitement thermique augmente considérablement le nombre total des actinomycètes. De même qu'il a été montré le traitement avec les ultrasons peut aussi augmenter le nombre total d'actinomycètes (**Jaing et al., 2010**).

Le milieu qui favorise l'isolement d'un nombre important d'actinobactéries est l'**ISP2** qui a été préconisé pour l'isolement des actinobactéries (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Ce milieu est composé de glucose comme source de carbone. Cependant sa composition diffère des autres

milieux par la présence de différentes sources d'azotes organiques tels que les extraits de malt et de levure.

Dans notre travail, nos résultats ont montré un nombre important de souches isolées sur le milieu ISP2. De même qu'on a obtenu un nombre moyen de souches avec l'utilisation de l'ISP4. D'autre part, avec l'utilisation des deux autres milieux GN et Sabouraud on a obtenu un nombre de souches moins important que l'ISP2 et l'ISP4.

Lors de l'isolement on a remarqué un développement des bactéries à coloration Gram positive comme les bactéries de genre *Bacillus*. Ces bactéries dont la croissance est envahissante forment des plages rendant toute observation et purification difficile voire, même impossible. De plus les espèces de ce genre sont connues par leur capacité de formation des endospores hautement résistants à la chaleur (**Boudemagh, 2007 ; Kitouni, 2007**).

Dans les travaux antérieurs plusieurs méthodes ont été utilisées pour la conservation des souches actinobactériennes.

Dans notre travail nous avons utilisés des tubes à essai contenant le milieu **ISP2** solide inclinée, ensemencées par nos souches et conservés à **4°C**. Cette méthode nous a donné une bonne conservation à courte durée.

En effet, l'étude macroscopique des souches sur le milieu **ISP2** montre que les colonies des actinobactéries sont bien développées et bien isolées, sèches ou muqueuses de **2 à 5 mm** de diamètre, elles se développent avec un mycélium de substrat surmonté d'un mycélium aérien. La totalité des souches actinobactériennes présente un mycélium aérien d'une couleur variée entre le marron et le beige. L'observation microscopique de nos souches après la caractérisation microscopique montre que le mycélium végétatif de la majorité des souches ne présente aucune fragmentation en forme cocoïdes ou en éléments bacillaires sauf certaines souches. Ce mycélium est formé d'un ensemble d'hyphes ramifiés (**Oskay et al. 2004**). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par de (**Cheraiti et al, 2012**).

L'identification des actinobactéries nécessite, en plus des caractères morphologiques et microscopiques, des caractères physiologiques (température, **pH** optimaux et utilisation des sources carbonées et azotées...) et biochimiques (dégradation de certains substrats comme la pectine, l'amidon, la caséine, les nitrates, les lipases...) (**Kitouni., Boudmogh, 2007**)

Par manque de moyens en techniques moléculaires nous étions obligés d'utiliser la caractérisation physiologique. Nos résultats ont montré que la totalité des souches poussent bien au **pH (5-12)**, sauf certaines souches (**C1, C8**) qui se développent cependant mal en **pH** acide (**5**) et en **pH** très alcalin (**12**). Nos résultats rejoignent les résultats de (**Boudmogh, 2007**), qui a montré que les actinomycètes se développent mal en **pH** acide et alcalin.

Des travaux antérieurs ont montré que les souches utilisées croient à une température de **28°C** et tolèrent une concentration de **7%** en NaCl (**Bougachiche , 2012**).

En effet, nous avons constaté malgré que la température optimale de croissance de nos isolats est de **30°C**, ces derniers poussent aussi à une température de **45°C**. Par contre la température de **55°C** inhibe leur croissance. De même, nos résultats ont montré que la majorité des isolats poussent à des concentrations élevées en NaCl dépassant les **8 %** alors que d'autres ont une bonne croissance à des concentrations plus faibles de **0%, 2% et 4%**. De ce fait cette différence de température et de concentration en NaCl observées est probablement due aux conditions dans lesquelles nous avons réalisé notre expérimentation.

En outre, s'agissant de la dégradation des carbohydrates sur le milieu **ISP9**, nous avons remarqué que l'utilisation de ces sources de carbone diffère d'une souche à une autre pour le même composé fournisseur de carbone.

Selon les résultats que nous avons obtenus, la plupart des souches se développent très bien sur le milieu **ISP4**. Ceci peut s'expliquer par la présence dans ce milieu de l'amidon et des sels minéraux, qui stimulent la croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries (**Williams et Cross 1971**).

Concernant la sensibilité aux antibiotiques, l'antibiogramme a été effectué dans le but de déterminer le profile de résistance des souches aux antibiotiques. Nos résultats montrent que les souches qui ont été testé sont sensibles à certains antibiotique et résistent à d'autres, ces résultats sont similaires à ceux de (**Hadj-Rabai, 2008**).

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antifongique des **12** souches d'actinomycètes isolées est une méthode de diffusion en milieu gélosé (le milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu sabouraud pour les souches fongiques).

Parmi les **12** souches d'actinobactéries qui ont subis ce test, seulement **03** souches (**25%**) sont bio-actives contre au moins une bactérie indicatrice.

En effet, la souche **C2** est active contre les bactéries à Gram positive : *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, *Listeria innocua* ATCC 33090. De même que la souche **C18** est active contre les bactéries à Gram positive : *Bcillus cereus*, *Micrococcus luteus*, et contre une bactérie à Gram négative : *Acenitobacter sp.* D'autre part on a constaté que la souche **C17** est également active contre une bactérie a Gram positive : *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*. Par ailleurs, nous avons constaté ces **03** souches n'ont montré aucune activité contre les levures et les champignons. Nos résultats nous permettent de conclure que, d'une part, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie à l'autre, et d'autre part, pour la même souche

d'actinobactéries et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie testée à l'autre.

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

Des études ont démontré que le taux d'isolement d'actinomycètes productrices d'antibiotiques est supérieure à **40%** (**Lemriss et al., 2003**) par contre des travaux antérieures ont montré une production moins de **10%** (**Jiang et XU, 1996**). Dans notre étude, le taux d'isolement des actinomycètes à activité antibactérienne était de **25%**.

I. Résultats

A. Isolement des actinobactéries à partir du sol

Au bout de **14** jours d'incubation, les souches d'actinobactérie apparaissent et sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique. Elles sont purifiées afin d'obtenir des cultures pures pour la conservation. La totalité de nos souches avec aspect d'actinobactéries ont poussés à la température de **30°C**. Ce constat nous laisse suggérer que les souches que nous avons isolées sont des mésophiles.

Il apparait aussi, que le milieu de culture **ISP2** contenant **2%** (w/v) de **NaCl** permet l'isolement d'un nombre considérable d'actinobactéries (16 souches) par rapport aux autres milieux.

18 souches ont été repiquées et purifiées sur le même milieu qui a été utilisé pour leur isolement. La conservation a été faite sur le milieu **ISP2** contenant **2%** (w/v) de **NaCl** coulé en gélose inclinée à **4°C**.

B. Identification des souches purifiées

1. Caractérisation des isolats

a) Etude macroscopique

Les caractères macromorphologiques des colonies bactériennes sont représentés dans le **Tableau 4. 18** souches présentent la forme macroscopique des actinobactéries. Il s'agit de colonies bien isolées, sèches, creusées et bombées de **1 à 4 mm** de diamètre qui se sont développées avec un mycélium de substrat surmonté d'un mycélium aérien (**Fig. 7**).

b) Etude microscopique

L'observation microscopique à l'objectif X10 et à l'objectif X40 montre que le mycélium aérien de certaines souches est formé de chaînes courtes de spores ovales. D'autres souches présente un mycélium aérien forme des chaînes régulières et courtes de spores cocoïdes.

Le mycélium végétatif de la majorité des souches ne présente aucune fragmentation en forme cocoïdes ou en éléments bacillaires sauf certaines souches. Ce mycélium est formé d'un ensemble d'hyphes ramifiés.

Tableau 4 : Aspect macroscopique des souches isolé après un moi d'incubation sur le milieu ISP2

souches	Couleur de mycélium aérien	Couleur de mycélium dusubstrat	Pigment diffusable
C1	Jaune claire	Marron	/
C2	Beige	Marron	Marron clair
C3	Noir	Violet noir	Noir
C4	Marron	Marron	/
C5	Beige	vert	/
C6	Beige	Marron	/
C7	Beige	Marron	/
C8	Blanche	Marron clair	/
C9	Beige	Marron	/
C10	Beige	Marron	/
C11	Beige	Marron foncé	/
C12	Marron	Marron foncé	/
C13	Beige	Vert	/
C14	Beige	Marron	/
C15	Beige	Marron	/
C16	Beige	Vert	/
C17	Beige	Marron	/
C18	Blanche	jaune	/

/) Absence de pigment diffusable

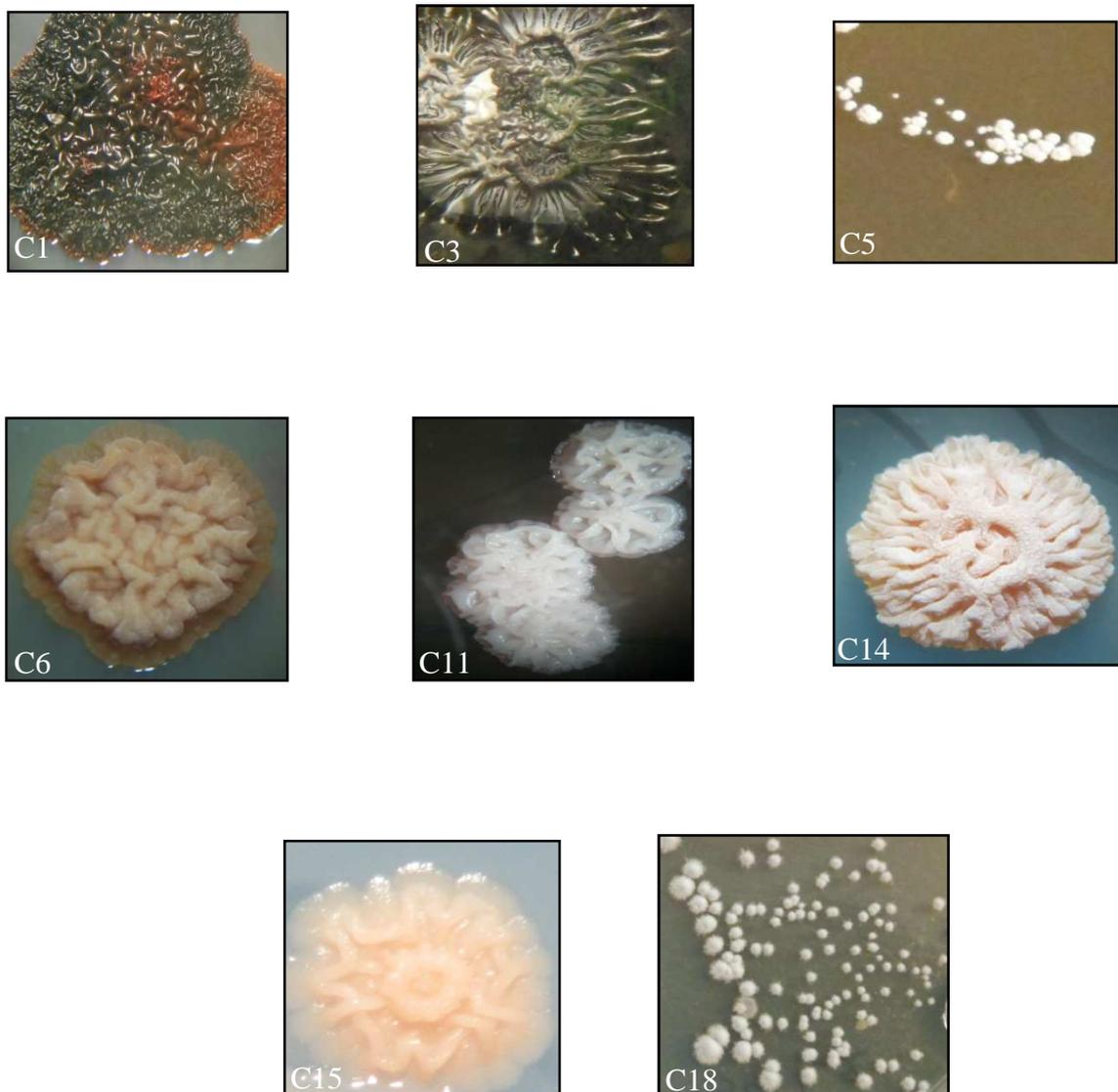


Figure 7 : Aspect macroscopique des actinobactéries isolées à partir du sol

2. Etude physiologique

a) Détermination de la température optimale de croissance

Pour déterminer les différents caractères physiologiques et biochimiques, plusieurs tests ont été effectués. Chaque souche a été cultivée sur le milieu qui a été utilisé pour son isolement puis incubée à différentes températures afin de déterminer la température optimale de croissance. D'après nos résultats toutes les souches poussent à 30°C et à 45°C bien que la croissance était meilleure à 30°C. Cependant, les souches ne poussent pas à 55°C

b) Détermination de l'optimum de pH

L'optimum de pH a été déterminé en cultivant les souches sur milieu **ISP2 2%** solide ajusté à différents **pH** allant de **5** à **12** (**Tableau 7**), toutes les souches ont été incubées à **30°C**. La plupart des souches poussent d'une manière optimale à tous les **pH** sauf certaines souches qui ne tolèrent pas les conditions d'alcalinité élevées

Tableau 5 : Optimum de pH de la croissance des souches

Souches	Ph							
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11	pH12
C1	-	++	++	++	++	-	-	-
C2	++	++	+++	+++	+++	+	+	+
C3	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
C4	++	++	++	+++	+++	-	+	+
C5	-	+	+	+	-	-	-	-
C6	-	++	+	++	+	-	-	-
C7	-	++	++	++	-	-	-	-
C8	-	+	+	+	-	-	-	-
C9	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C10	-	+	+	+	-	-	-	-
C11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Croissance faible ou absente (+/-) ; Croissance moyenne (+ ou ++)

Bonne croissance (+++).

c) Détermination de la croissance des souches à différents milieux de culture

Pour tester la croissance des souches sur différents milieux, nous avons cultivé les souches sur les milieux suivants (GN, SAB, MH, ISP4, ISP5, ISP7), pendant 14 jours à 30°C. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 8**.

On remarque aussi que la pigmentation de certaines souches varie selon le milieu de culture utilisé :

- La souche **C8** change sa pigmentation du noir en milieu **GN**, à l'orange en milieu **ISP4**.
- La souche **C2** change sa pigmentation du violet en milieu **GN**, au beige en milieux Glycérol et **ISP4**.
- La souche **C3** change sa pigmentation du blanc en milieu **GN**, au rose en milieu Glycérol et au grenat en milieu **ISP4**.
- La souche **C4** change sa pigmentation du beige en milieu Glycérol au vert et blanc en milieu **ISP4** (**Fig. 13**)

Tableau 6: la Croissance des souches à différents milieux de culture

Souches	Différents milieux de culture						
	GN	Sabouraud	Glycérol	MH	ISP5	ISP4	ISP7
C1	++	-	+++	+++	-	+++	+++
C2	++	++	+++	+++	-	+++	+++
C3	++	+++	+++	+++	-	+++	+++
C4	++	+++	++	+++	-	+++	++
C5	-	-	+	-	-	-	-
C6	++	-	-	+++	-	+++	-
C7	++	-	++	+++	-	+++	++
C8	-	-	-	-	-	-	+
C9	++	+	-	+	++	-	+++
C10	-	-	-	-	-	+++	-
C11	+++	-	++	+++	+++	+++	+++
C12	-	-	-	++	+++	+++	-
C13	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
C14	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
C15	++	-	-	++	-	+++	-
C16	+++	++	-	+++	+++	+++	-
C17	++	-	-	++	++	+++	+++
C18	+++	++	++	++	++	+++	++

Croissance faible ou absente (+/-) ; Croissance moyenne (+ ou ++)

Bonne croissance (+++) ; MH : Mueller-Hinton

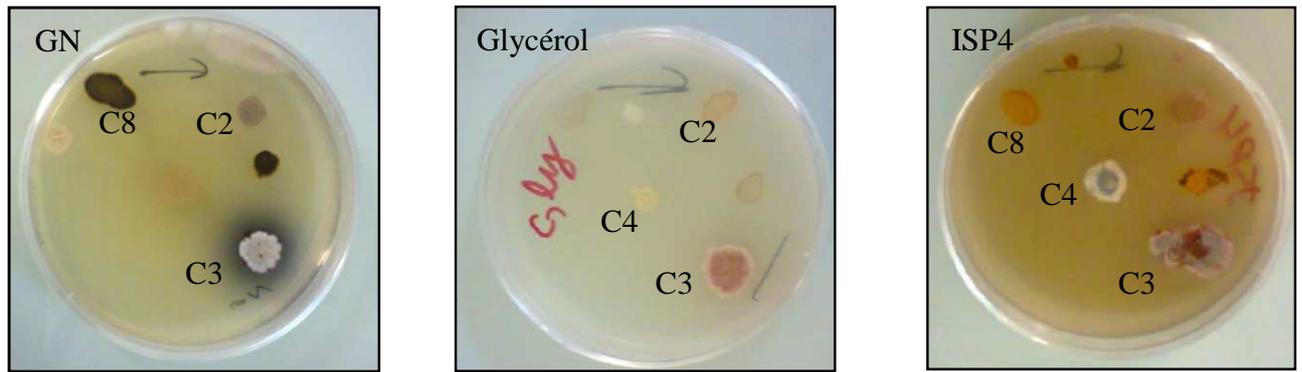


Figure 8 : Aspect macroscopiques de certaines souches sur différents milieux de culture.

d) Détermination de l'optimum de salinité

Afin de déterminer l'optimum de salinité des souches, leur croissance a été testée sur le milieu **ISP2** solide additionné de différentes concentrations en **NaCl** et l'incubation a eu lieu à **30°C** pendant **14** jours. La majorité des souches ont été isolé sur le milieu ISP2 a la concentration de sel est **2%**.

On remarque que la croissance de certaines souches diminue avec l'augmentation de la concentration en **NaCl** alors que d'autres souches ne tolèrent pas la salinité

Tableau 7 : Optimum de salinité des souches

Souches	NaCl %							
	0%	2%	4%	7%	15%	20%	25%	30%
C1	+++	+++	-	-	-	-	-	-
C2	-	+++	+	++	-	-	-	-
C3	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
C4	++	++	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	-	+	-	-	-	-
C6	+++	+++	-	-	-	-	-	-
C7	+++	+++	-	-	-	-	-	-
C8	++	-	++	++	++	-	-	-
C9	-	+	+++	+++	+++	++	-	-
C10	-	-	-	+	+++	-	-	-
C11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
C12	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
C13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
C14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
C15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
C16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
C17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
C18	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-

Croissance faible ou absente (+/-) ; Croissance moyenne (+ ou ++) ; Bonne croissance (+++).

e) Utilisation des différents substrats carbonés

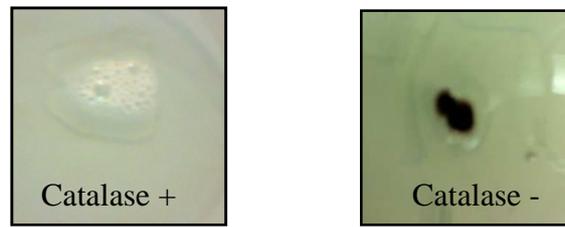
Pour déterminer les sources de carbones utilisables par nos souches nous avons cultivé ces dernières sur le milieu **ISP9** additionné de différentes sources de carbone (**Tableau 8**). L'incubation a été faite à **30°C** pendant **14** jours. On remarque que nos souches utilisent au moins une source de carbone et parfois plus d'une (**Fig. 9**)

Tableau 8 : Utilisation de différentes sources de carbone.

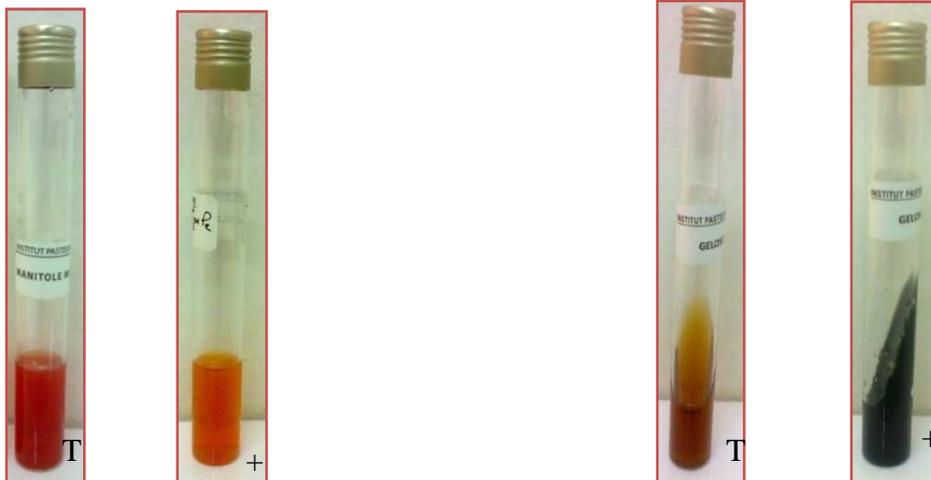
Souches	Sources de carbones									
	Manitol	Glucose	Sucrose	Mélibiose	Lactose	Méso- inositol	Glycogène	Rhamnose	Fructose	Sorbitol
C1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
C11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
C15	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
C16	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
C17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caractéristiques	Souches									
	C2	C3	C6	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
Réduction des nitrates	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Dégradation de citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Réaction de Voges-Prokauer	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dégradation de manitol	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Production d'H ₂ S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+/Utilisation

-/Non utilisation



Test de la catalase



Dégradation de Manitol

Production de H₂S

Figure 9 : Utilisation de différentes sources de carbone: **T**) témoin, **+**) test positive

f) Détermination de la production de pigment mélanoidé

Parmi nos souches, uniquement deux souches C2 et C3 qui produisent des pigments diffusables d'un brun foncé sur le milieu ISP7 (**Fig. 11**).

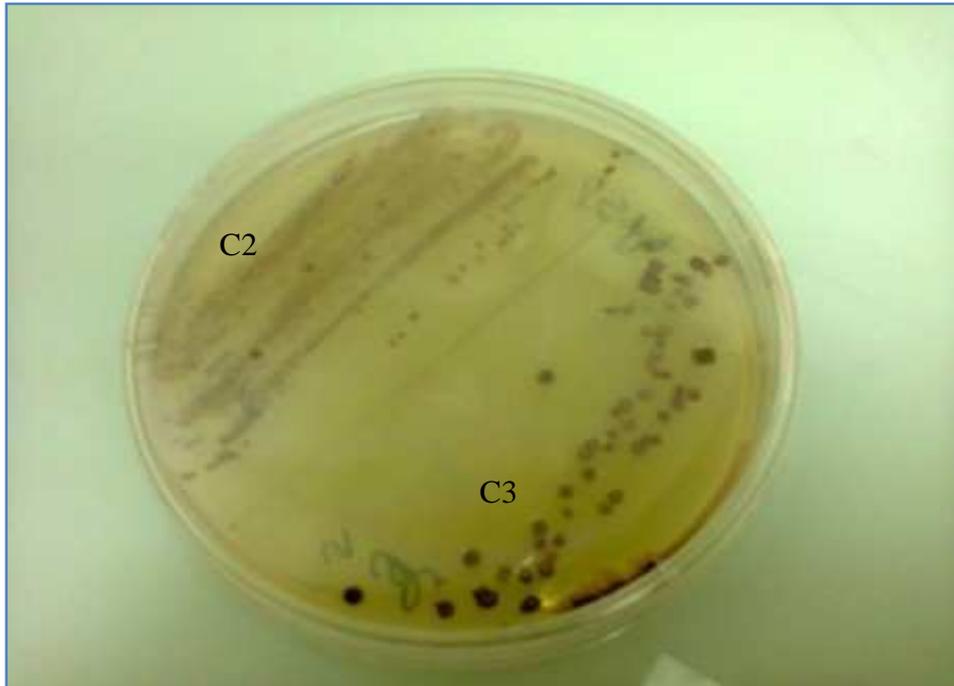


Figure 10 : Production de pigments mélanoidé sur milieu ISP7

g) Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des actinobactéries

En se basant sur les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2007) qui définit qu'une bactérie est résistante (**R**), sensible (**S**) ou intermédiaire (**I**), nos résultats (**Fig. 12a, b et c**) et (**Tableau 9**) montrent que nos souches réagissent différemment aux antibiotiques d'où on constate que :

Les deux souches (**C6**) et (**C12**) sont résistantes à tous les antibiotiques utilisés dans ce test, les autres souches sont sensibles à certains antibiotiques et résistent à d'autres

Tableau 9 : Détermination des profils de sensibilité aux antibiotiques des Actinobactéries

Antibiotiques	Charge du Disque	Souches testées				
		C2	C6	C12	C14	C17
PENICILLINES						
Penicilline	6 µg / 10 IU	R	R	R	S	S
Amoxicilline + Acide Clavulanique	20 µg + 10 µg	S	R	R	S	R
CEPHALOSPORINES						
Ceftazidime	30 µg	R	R	R	R	R
AMINOSIDES						
Amikacine	30 µg	S	R	R	R	R
TETRACYCLINES						
Tetracycline	30 µg	R	R	R	S	R
MACROLIDES						
Erythromycine	15 µg	R	R	R	I	R
GLYCOPEPTIDES						
Vancomycine	30 µg	S	R	R	I	R
POLYPEPTIDES						
Bacitracine	0,02 à 0,04 UI	R	R	R	R	R
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME						
Trimethoprim-Sulfaméthoxazole	1.25 µg + 23.75 µg	R	R	R	R	R
NITROFURANES						
Nitrofurantoïne	300µg	R	R	R	S	S
QUINOLONES						
Acide Nalidixique	30 µg	R	R	R	S	R
FLUOROQUINOLONES						
Ciprofloxacine	5 µg	R	R	R	S	R
DIVERS						
Acide Fusidique	10 µg	R	R	R	I	R

R : souche résistante

S : souche sensible

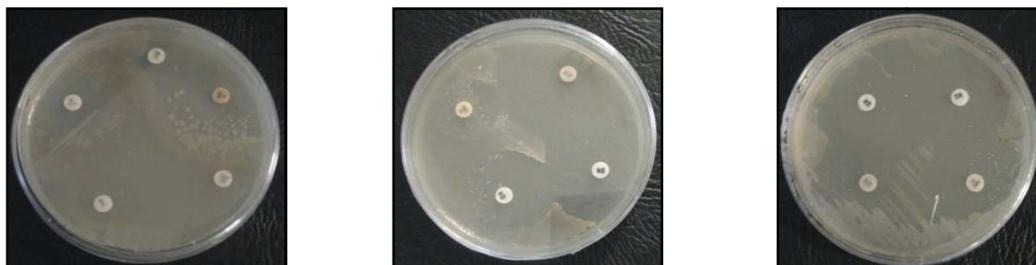


Figure 11a. Antibiogramme de la souche C2



Figure 11b. Antibiogramme de la souche C6



Figure 11c. Antibiogramme de la souche C14

C) Etude de l'activité antagoniste

Les résultats des tests d'interactions des souches d'actinobactéries avec les souches indicatrices sont présentés dans le **Tableau 11**. Par la mesure du diamètre d'inhibition, les résultats sont exprimés en **mm**. Les souches présentant une zone d'inhibition claire sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes (**Fleming et al., 1975**). Nos résultats sont montrés dans les (**Fig. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20**).

Tableau 10 : Activités antagonistes des 12 souches d'Actinobactéries contre les souches cibles

Souches indicatrices	C2	C3,C6,C8,C9,C11, C12,C13,C14,C16,	C17	C18
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	+ 8mm	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25 923	+ 12mm	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	+ 6mm
<i>Enterococcus faecium</i> CIP 5855	-	-	-	+ 6mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25925	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	+10mm	+ 8mm
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-		+ 12mm
<i>Saccharomyces boulardi</i>	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>	-	-	-	-

+/Inhibition positive

-/Pas d'inhibition

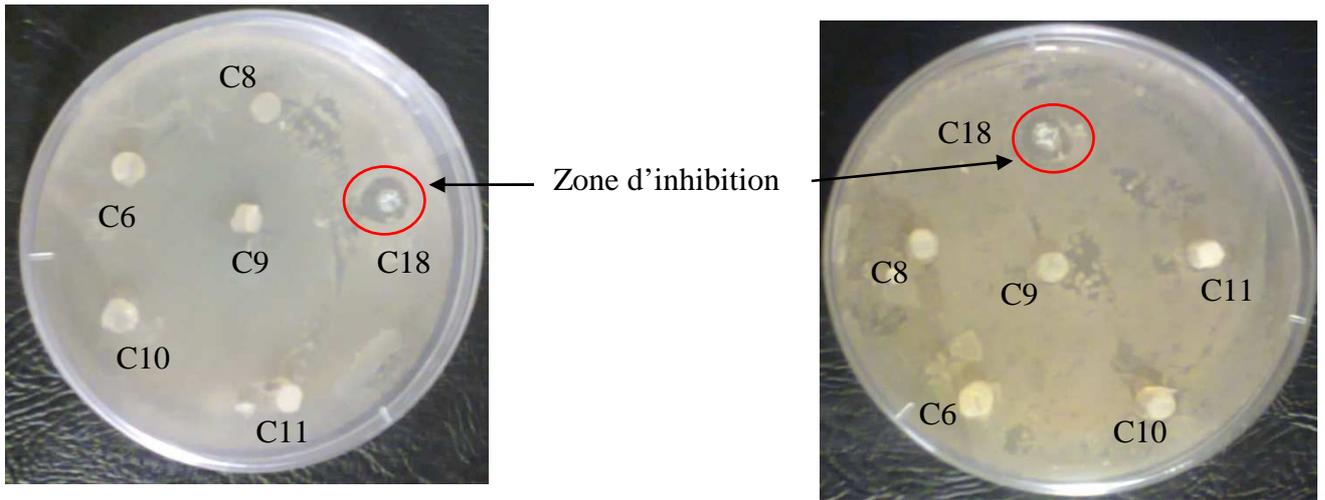


Figure 12: Activité antagoniste de la souche C18 contre *Enterococcus faecium* CIP 5855

Figure 13: Activité antagoniste de la souche C18 contre *Micrococcus luteus*

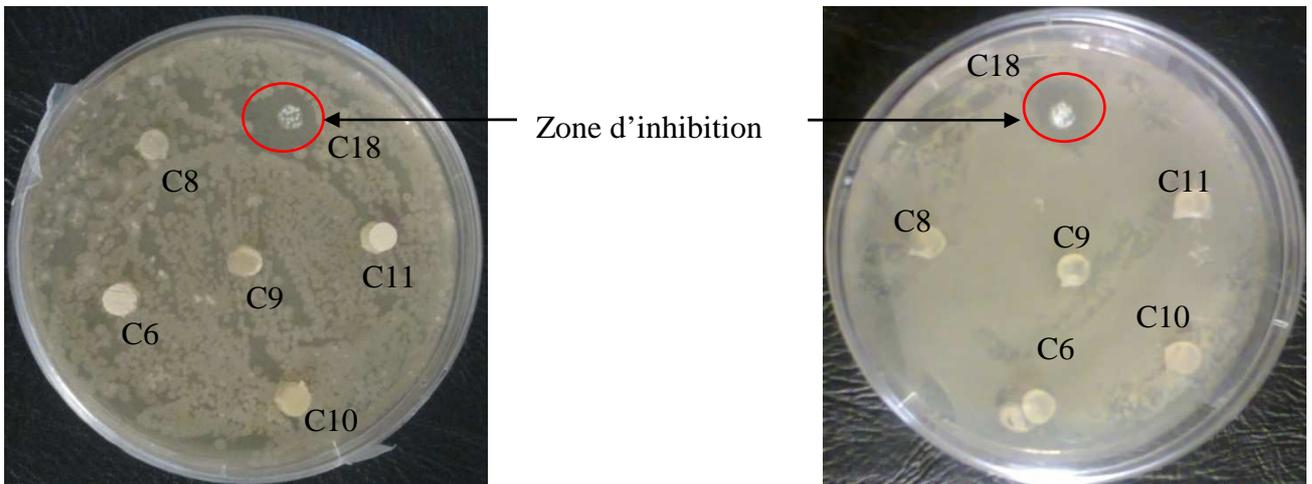


Figure 14 : Activité antagoniste de la souche C18 contre *Acinetobacter sp*

Figure 15 : Activité antagoniste de la souche C18 contre *Bacillus cereus*

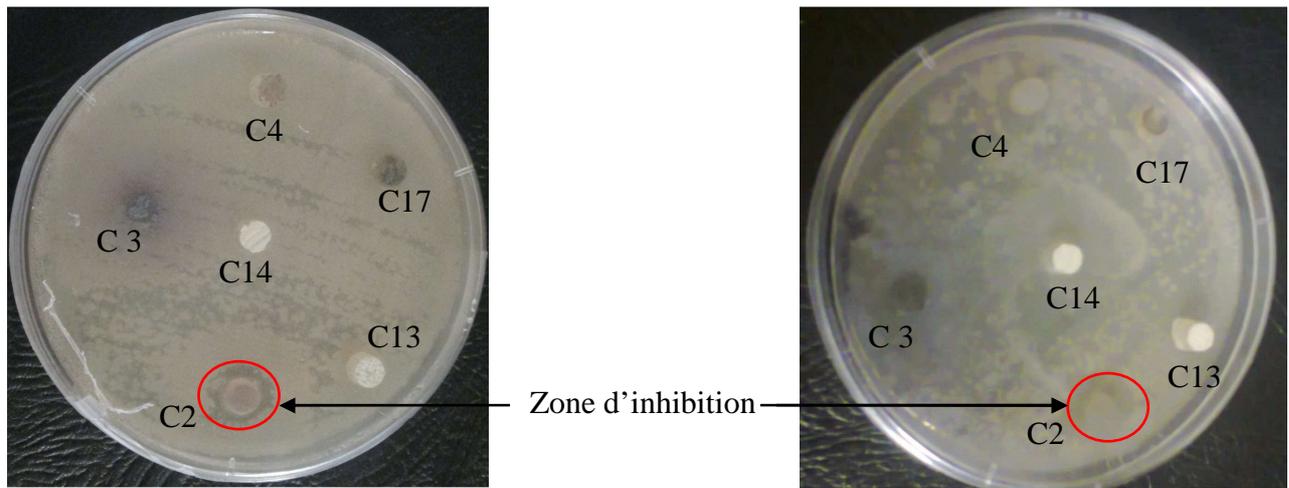


Figure 16 : Activité antagoniste de la souche **C2** contre *Listeria innocua*

Figure 17 : Activité antagoniste de la souche **C2** contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923)

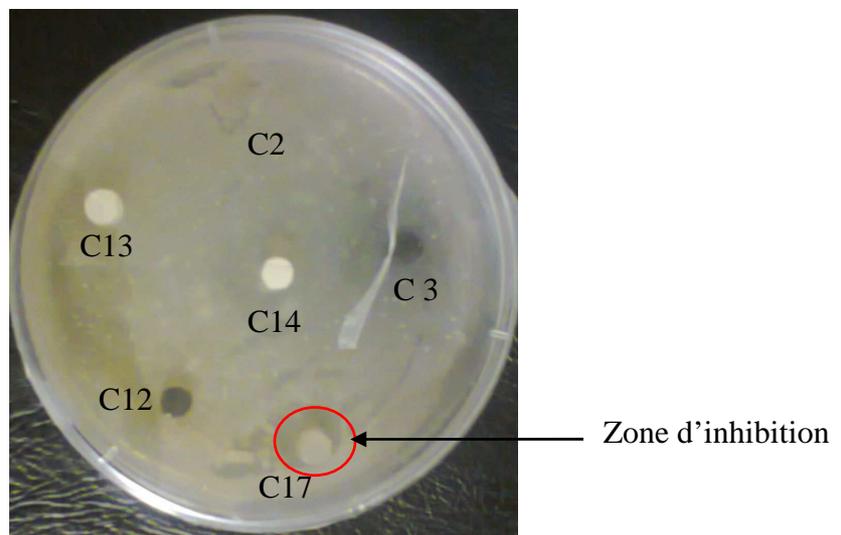


Figure 18 : Activité antagoniste de la souche **C17** contre *Micrococcus luteus*

Conclusion

Dans le présent travail, notre objectif principal était de pouvoir isoler des souches d'actinobactéries productrices de substances bioactives à partir d'écosystème extrême (Sebkha de Reggane). En effet, ce travail nous a permis d'isoler **18** souches d'actinobactéries et cela sur la base de leurs aspects macroscopiques et microscopiques.

Les souches isolées ont fait l'objet d'un screening de production des molécules bioactive et cela en recherchant l'activité antibactérienne ; trois (**03**) souches parmi les **12** isolées et testées, produisent des substances antibactérienne contre au moins une souche indicatrice.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser les points suivants :

1. Identification complète des souches d'actinomycètes sélectionnées par études chimio-taxonomiques et moléculaire.
2. La réalisation d'autres isolements en analysant d'autres échantillons et en utilisant d'autres milieux d'isolements afin d'augmenter la chance d'isoler de nouvelles espèces appartenant a la classe des Actinobacteries .
3. Une approche complémentaire se concentre sur l'évaluation de l'activité antifongique des souches actinomycétales.
4. Une piste très intéressante à suivre serait, l'optimisation des paramètres cultureux afin d'améliorer la production de substances antibactériennes produites par les souches isolées.
5. Isolement et purification des molécules bioactives par des méthodes plus développées.

1. Zone d'étude :

Elle est localisée dans la wilaya d'Adrar qui présente une région désertique du sud de l'Algérie.

2. Le Sol

2.1. Généralités

Le sol est la couche externe de la croûte terrestre caractérisée par la présence de nombreux êtres vivants. Il est le siège d'un échange intense de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, en tant que partie de l'écosystème terrestre, occupe une position clé dans les cycles globaux des matières (**Gobat et al., 2003**).

Le sol se forme par des processus très lents. Les roches s'altèrent sous l'action du climat et des êtres vivants. Les constituants minéraux sont modifiés, en partie mélangés à des substances organiques et forment de nouveaux composants. Soumis à l'action de l'eau, travaillés par les plantes, les animaux et les micro-organismes, les sols acquièrent progressivement des structures qui leur sont propres. Le sol comporte 3 phases: une phase solide (minérale et organique), une phase liquide (solution du sol) et une phase gazeuse (air, CO₂, CH₄). On appelle texture la résultante du mélange de terres fines et grossières dont les pourcentages varient d'un sol à l'autre (**Société Suisse de Pédologie, 1998**).

2.2. Sebkha

Une sebkha est une dépression temporairement occupée par un lac, en général salé et où se déposent des évaporites, que l'on trouve généralement en pays désertique. D'après le dictionnaire de géologie (**Encyclopédie théologique**), les eaux proviennent de ruissellements, mais aussi de nappes phréatiques (**Foucault et Raoult, 2001**).

Ces dépressions fermées, excepté les cuvettes karstiques du type doline, telles les dayas des hamadas nord-africaines, constituent un des traits majeurs et des plus austères des paysages arides. Leur origine est essentiellement tectonique, mais leur évolution ultérieure est d'ordre climatique. Leur nom diffère selon les régions: **Sebkha** et **Garâa** en Afrique du Nord, **Kewir** en Iran, **Playa** dans l'Ouest des états unis, **Salar** ou **Salina** dans les déserts sud-américains, **Takyr** dans ceux de l'Asie centrale, le **Chott** (mot arabe) représente, en pays désertique ou subdésertique, une terre salée ou parfois pâturage qui entoure une dépression

fermée à lac temporaire, en Europe il y a également des endroits équivalents aux sebkhas (Kacem , 2006).

3. Les microorganismes du sol

3.1. Généralités

Les microorganismes du sol (**Tableau 1**) sont représentés par quelques métazoaires, des protozoaires, des algues microscopiques, des champignons, des bactéries dont des actinomycètes, des cyanobactéries et des virus (Wild, 1993 ; Maier *et al.*, 2000).

Tableau 1. Principaux taxons de microorganismes du sol (Roger *et al.*, 2001).

Grands groupes	Taxons considérés comme important dans le sol
Procaryotes photosynthétiques	Cyanobactéries, Bactéries pourpres et vertes.
Bactéries	Pseudomonales chimio-autotrophes, Pseudomonales chimio-hétérotrophes, Mycobacteraiceae, Actinomycetaceae (ou proactinomycètes), Streptomycétaceae, Actinoplanaceae.
Champignons	Moisissures à plasmodium, Champignons à flagelle, Zygomycètes, Champignons supérieures, Champignons imparfaits.
Algues	Algues vertes, Eugléiniens, Algues jaunes, Diatomées.
Protozoaires	Amibes, Testacés, Flagellés, Ciliés.

3.2. Les microorganismes des zones extrêmes : cas de l'halophilie

L'extrémophilie désigne l'aptitude d'un organisme à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants. Parmi les domaines les plus étudiés de l'extrémophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie) mais aussi les fortes salinités (halophilie).

En effet, le terme halophile désigne les microorganismes nécessitant la présence de sel (**NaCl**) dans le milieu pour leur croissance. En revanche le terme halotolérant signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de **1%** de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles.

En **1962**, **Larsen** a défini 3 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sel qui amène à une croissance optimale des microorganismes. Cette concentration peut varier de **1%** à **6%** pour les bactéries faiblement halophiles, de **3%** à **15%** pour les bactéries halophiles modérées et de **15%** à **30%** pour les bactéries halophiles extrêmes. Par ailleurs, les bactéries halotolérantes tolèrent des concentrations modérées de sel, mais non obligatoire pour leur croissance (**Pedros-Alio, 2004**). Un aperçu sur quelques bactéries considérées comme halophiles est résumé comme suit (**Tableau 2**) (**Hadj-rabia, 2008**).

Tableau 2. Exemples de quelques bactéries halophiles (**Hadj-rabia, 2008**)

Phylum	Environnements
<i>Actinobacteria</i>	Environnement marin, Sol salin, Marais salant
<i>Cyanobacteria</i>	Lacs alcalins, Marais salant, Sédiments hypersalins
<i>Spirochaetes</i>	Lacs alcalins, Marais salant, Environnement marin
<i>Chloroflexi</i>	Environnement marin, Tapis microbiens hypersalins
<i>Firmicutes</i>	Marais salins, Lac alcalin, Environnement marin, Mer morte

4. Les Actinobactéries

4.1. Généralités

La classe des actinobactéries est considérée comme le principal groupe de bactéries à Gram positif, elle est composée de cinq sous-classes et neuf ordres (**Goodfellow et Feler, 2010**). La relation entre les différentes lignées des actinobactéries a fait l'objet d'un grand débat et plusieurs théories existent sur l'histoire de l'évolution du phylum (**Stackebrandt et Schumann, 2006 ; Chater et Chandra, 2006 ; Ventura et al., 2007**). **Prauser et al., (1970)** a été le premier à proposer une évolution monophylétique des *Actinobactéries* de *Corynéformes* (forme de bâtonnets pléomorphe) au *Nocardioformes* qui ont évolués par la suite a des *Actinobactéries* sporulées. Une deuxième hypothèse est à l'origine polyphylétique où les champignons, *Actinobactéries* et *Mycobactéries* partagent un ancêtre commun qui s'est transformé plus tard en Bactéries Lactiques et Bifidobactéries (**Embley et Stackebrandt, 1994**).

Indépendamment de leur origine, certains des caractères associés à l'embranchement sont largement différents dans les différentes lignées des actinobactéries. Les *Actinobactéries* peuvent être divisées en quatre sous-classes, les *Acidimicrobidae*, les *Coriobacteridae*, les *Rubroacteridae* et les *Actinobacteridae*. Les deux premières ne contiennent qu'un seul ordre, bien que les deux dernières chacune contiennent trois ordres. La plupart de ce qui est publié sont de l'ordre des *Actinomycetales* (Ventura et al., 2007; Stackebrandt et Schumann, 2006).

La production d'antibiotiques et les caractéristiques de la paroi cellulaire (ménaquinones, acides mycoliques et peptidoglycanes) ont été utilisées pour distinguer les différents sous-ordres. Cependant, un caractère phénotypique n'est pas suffisant pour pouvoir classer une souche. Avec l'émergence de la biologie moléculaire l'analyse de la séquence d'ARNr 16S a remplacé la caractérisation phénotypique, le seuil des espèces actuelles utilisé par les taxonomistes est qu'une séquence d'ARNr 16S de 97% à 98,2% de similitude dénote les différentes espèces (Whalen & Sampedro, 2010).

4.2. Définition

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, filamenteuses, septées, ramifiées et possédant un coefficient de chargaff (G+C%) compris entre 60% et 70% (Larpent, 1989). La plupart sont toujours immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines et sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, la synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines et les stéroïdes (Le Minor, 1989).

Les actinobactéries se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (Le Minor, 1989).

4.2.1. Taxonomie

La classification des actinobactéries en **1948** dans le **Bergy's manual** donne trois familles (*Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae* et *Streptomycetaceae*) avec **126** espèces décrites dans la classe des *Shizomycetes* et l'ordre des *Actinomycetales*. Dix années plus tard les actinobactériess ont été divisés en quatre grandes familles : la famille des *Actinoplanaceae* avec toutes ses espèces a sporange, la famille des *Mycobacteriaceae* avec ses bactéries « vraies », la famille des *Actinomycetaceae* formée de la plupart des espèces pathogènes, anaérobies et capables de se fragmenter et enfin la famille des *Streptomycetaceae* regroupant les espèces filamenteuses produisant des spores libres. Cette classification traditionnelle remaniée avec l'apparition de la chimiotaxonomie au cours des années **70 (Lechevalier et Lechevalier ,1977)**

En **1989** le **Bergy's manual** pour la bactériologie systématique a consacré tout le volume **4** aux *Actinomycetes*, ainsi ces bactéries sont rattachées au règne des procaryotes à la division des Firmicutes et à la classe des *Thalobacteria* contenant l'ordre des *Actinomycetales*. L'introduction de l'analyse des séquences **16S ARNr/ADN** a permis d'établir un groupement phylogénétique des organismes *Actinomycétales*. Avec ces méthodes les bactéries du genre *Streptovercillium* ont été transférées vers le genre de *Streptomyces* (**Witt et Stackbrandt, 1990**), et certaines bactéries du genre *Nocardiopsis* ont été transférées vers un nouveau genre *Sacharothrix* (**Labeda et al., 1984**).

Pour toutes ces considérations **Stackebrandt et Schumann en 2006** ont proposé une nouvelle hiérarchie de classification de la classe des *Actinobacteria* basée uniquement sur l'analyse de la séquence **16S ARNr (Fig. 1)**

En **2012**, dans la **2^{ème} édition de bergy's manuel** l'ordre des *Actinomycetales* regroupe 48 familles contenant 291 genres (**Zhi et al., 2009**)

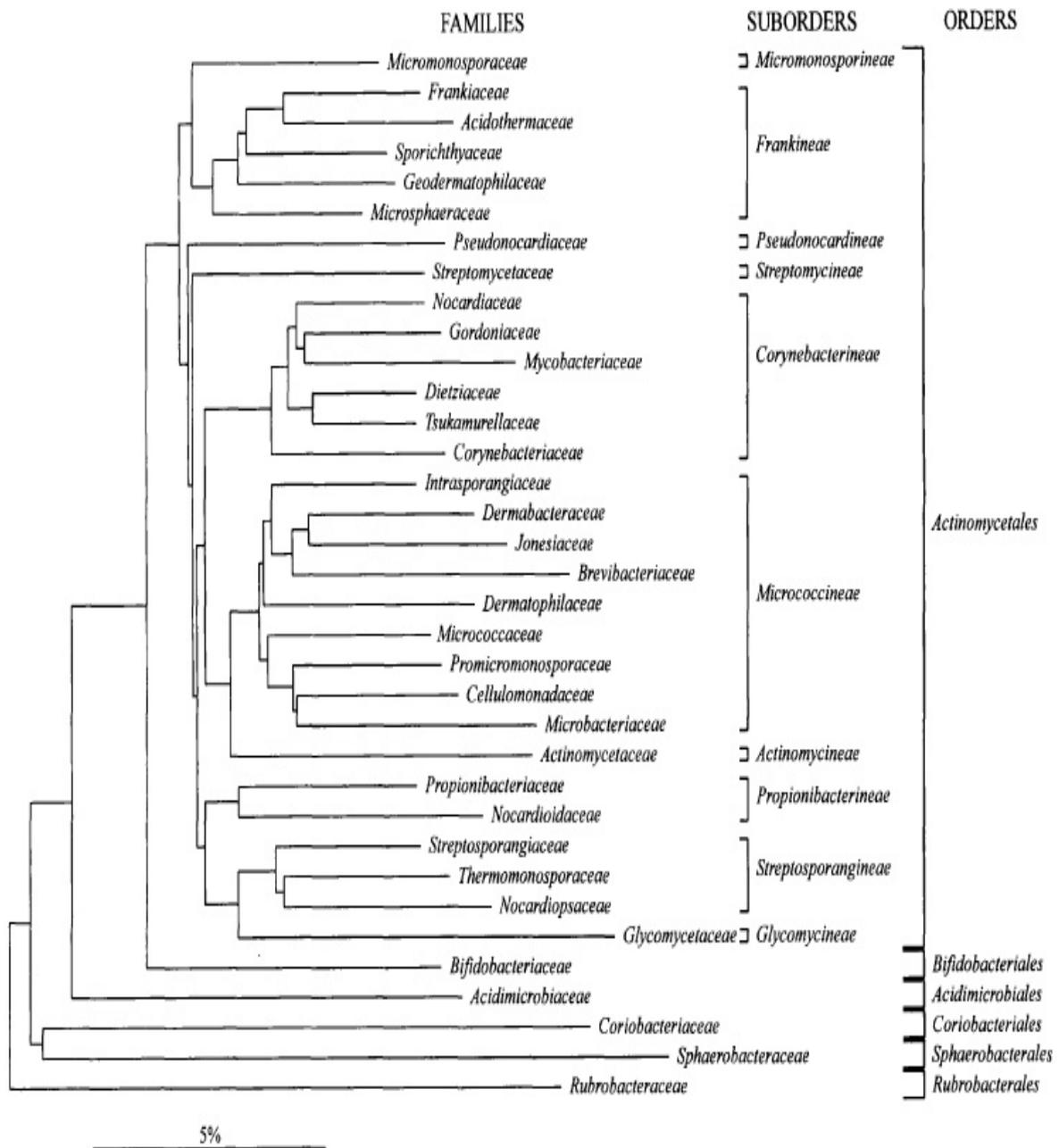


Figure 1: Classification des actinomycetes basee sur l'analyse des sequences ARN 16S (classification de **Stackebrandt et al., 1997**, modifiee avec permission) (**Stackebrandt et Schumann, 2006**).

4.2.2. Morphologie

La morphologie des différents groupes des actinobactéries est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien) (**Fig. 2**).

Un aspect microscopique de quelques actinomycètes est représenté par la **Figure 3**.

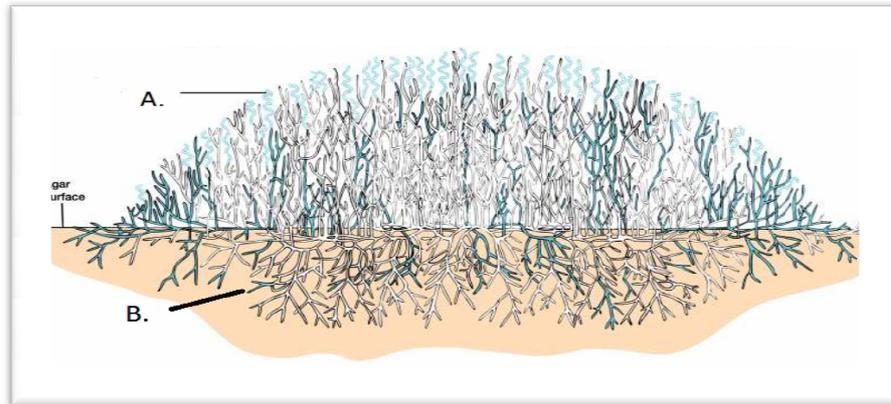


Figure 2 : Coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie avec le mycélium aérien et le mycélium végétatif (**Prescott *et al.*, 2010**).

A) Mycélium aérien, B) Mycélium végétatif.

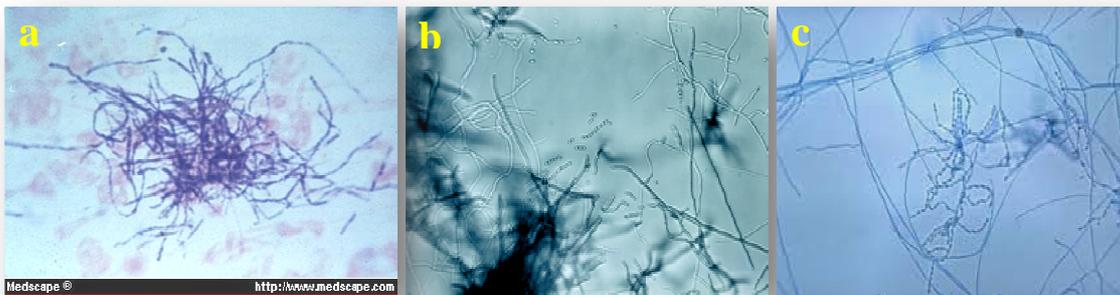


Figure 3 : Aspect microscopique des actinobactéries : a) *Micromonospora*, b) *Streptomyces*, c) *Nocardia*, (<http://www.terpconnect.umd.edu/asmith/~natjov/result.html>)

Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporangium ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses et ridés.

Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires. L'observation des actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes : les hyphes dispersées et les hyphes en pellets. Dans les hyphes dispersées, la forme "Freely dispersed" et les "mycelial clumps" sont rencontrés. La première forme c'est des hyphes indépendantes dispersées, la seconde est une masse ou agrégats de mycélium.

Les colonies formées par les actinomycètes sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiées et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de **1 à 15 mm**. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisses ou échancrés. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. (**Perry et al., 2004**). En outre, plusieurs exemples sur les formes de chaînes de spores des actinomycètes ont été donnés (**Fig. 4**) (**Joachin, 2002**).

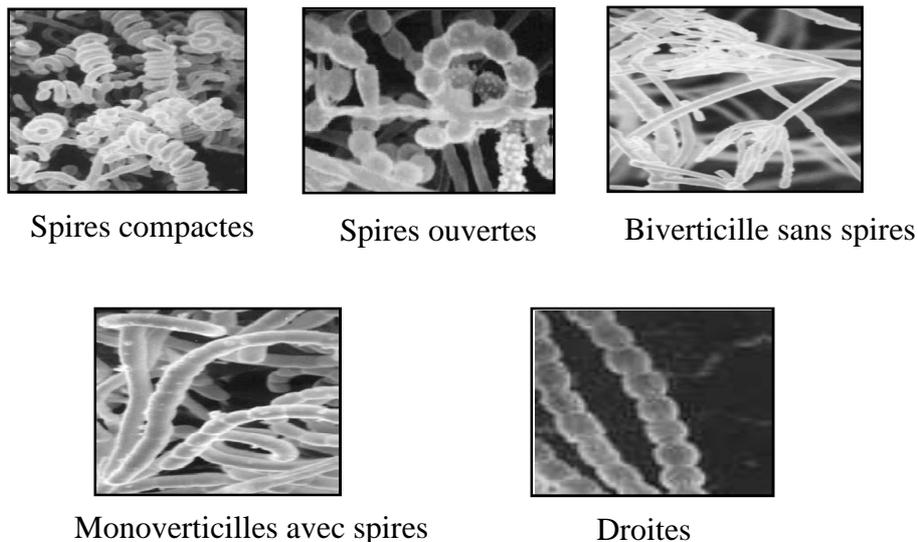


Figure 4 : Exemples de formes de chaînes de spores des actinomycètes.

(Atlas des actinomycètes ; **Joachin, 2002**).

Lors de fermentations, les actinomycètes donnant des hyphes en pellets, posent des problèmes de limitation de diffusion de l'oxygène et des nutriments à travers l'hyphe, ce qui engendre une diminution de la croissance et peut conduire à une autolyse.

Par ailleurs, ce point doit être pris en considération, pour éviter ce type de problèmes lors des fermentations industrielles. En effet, pour plusieurs souches productrices de métabolites

secondaires, la forme "Clumps" ou masse est la prédominante dans les fermenteurs (**90%** des cas) (**Perry et al., 2004**).

4.2.3. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures. Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de **2** mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint généralement les **10⁶** germes par gramme de sol séché (**Goodfellow et Williams, 1983**)

D'après **Waksman, (1967)**, le rapport microorganismes totaux / actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins **80%** de bactéries *Actinomycétales*, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de **80** centimètres ne contient que **40%** ou beaucoup moins jusqu'à seulement **16%**. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries (**Boudmagh, 2007**). L'aspect morphologique de quelques actinomycètes isolés à partir du sol est représenté dans la **Figure 5**.



Figure 5 : Aspect morphologique des actinobactéries isolés à partir du sol a) *Micromonospora sp.*, b) *Streptomyces sp.*, c) *Nocardia sp.* (www.britanica.com, www.microbiologybytes.com)

5. Molécules bioactives

Les actinomycètes sont la source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycinene, danomycine), insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (rapamycine) **(Sanglier et Trujillo, 1997)**. Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, ils inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes.

Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de **1%** sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structuralement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques **(Madigan et Martinko, 2007)**.

Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de **50%** des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques **(Madigan et Martinko, 2007)**. Il apparaît clairement que les actinomycètes synthétisent les deux tiers des antibiotiques microbiens dont environ **80%** sont isolés du genre *Streptomyces* **(Tableau 3)**. Même si on inclut les autres métabolites secondaires, les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs avec environ **60%** (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec **80%**).

Plus de **60** substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie **(Madigan et Martinko, 2007)**. L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparue suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* **(Bentley et al., 2002)**. Les enzymes sont les plus importants produits des *Streptomyces* après les antibiotiques **(Nascimento et al., 2002)**, comme les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases et les xylanases **(Vonothini et al., 2008 ; Syed et al., 2009)**.

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développés des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens.

Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques des maladies infectieuses apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leurs sont résistantes, il existe pour l'instant quelques exceptions comme l'absence de souche de *Streptococcus piogenes* résistante à la pénicilline **G**. Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que soit par :

- l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées;
- la réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structures connues ou la synthèse de nouveaux dérivés et l'analyse des produits de fermentation de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques isolées des écosystèmes peu ou pas explorés (**Kitouni, 2007**).

Tableau 3. Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes (**Kieser et al., 2000**)

Source	Métabolite bioactifs		Total
	Antibiotiques	Autres	
Non Actinomycètes	1400 (12%)	240 (9%)	1640 (11%)
Actinomycètes	7900* (66%)	1220* (40%)	9120* (61%)
Champignons	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)
Total (microorganismes)	11900 (100%)	3000 (100%)	14900 (100%)
Lichen	150	200-500	
Algue	700	800-900	
Plantes supérieures	5000	25000-35000	
Animaux terrestres	500	10000- 15000	
Animaux marins	1200	1500-2000	
Total (organismes supérieures)	750	35000-50000	

* environ **80%** sont isolés de *Streptomyces* dans chaque catégorie.

Références Bibliographiques

- **ANDI. (2013)** Agence Nationale de Développement de l'Investissement <http://www.andi.dz/index.php/fr/> (consulté le 01/09/2014).
- **AARN. (2011)** Algerian Antimicrobial Resistance Network, 13ème rapport de la surveillance des bactéries aux antibiotiques, ministère de la santé. [www.sante.dz/aarn/index.htm (consulté le 01/09/2014).
- **Bano N. and Hollibaugh J.T., (2002)** Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (2): 505-518.
- **Benloch S., Lopez Lopez A., Casamayor E.O., Ovreas L., Goddard V., Daae F.L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedros Alio C., Rodrigue Valera, F., (2002)** Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal saltern. *Environmental Microbiology*, **4** (6): 349-360.
- **Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.I., Thomson N.R., James K.d., Harris D.E. Quail MA, Kieser H, Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Parkhill J., Hopwood D.A., (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417** (6885): 141–147.
- **Bergy's manual of Systematic Bacteriology. Volume 4 P 2340-2343**
- **Bergy's manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition. Volume 5 (2012). 1750 p**
- **Bouanane-Darenfed A., Faedeau M.L., Grégoire P., Joseph M., Kebbouche-Gana S., Benayad T., Hacene H., Cayol J.L. and Olivier B., (2011)** *Caldicoprobacter algeriensis* sp.nov. A thermophilic anaerobic, xylalonytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Current Microbiol*, **62** (3) : 826-832.
- **Boudemagh A., (2007)** Isolement à partir des sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrices des molécules antifongiques. Identification moléculaire de souches actives. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine **23 P**.
- **Boughachiche F., (2012)** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh. Thèse de doctorat d'état .SNV. Université Mentouri Constantine, **14 P**
- **Bouras N (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrice algereinsis* NRRL B-24137. Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse France. 121 p.

- **Bowman J.P., Rea S.M., McCammon S.A., McMeekin T.A., (2000)** Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, East Antarctica. *Environmental Microbiology*, **2** (2) : 227-237.
- **Cavala M., Eberlin T., (1994)** Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron*. **4**: 13-7.
- **Chater K.F. and Chandra G., (2006)** The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol. Rev*, **30** : 651-672.
- **Cheraiti, N. et Gacemikirane D., 2010.** Isolement des souches d'actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* **6** (1) : 18-34.
- **Du Plessis G., 2011.** Actinobacterial diversity of the Ethiopian rift valley lakes. Memoir Magister, department de Biotechnologies .*Université Cap-Occidental*, pp : 12-13.
- **El-Nakeeb M. A. and Lechevalier H.A., (1963)** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**: 75-77.
- **Embley T.M. and Stackebrandt, E., (1994)** The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48** (1): 257-289.
- **Foucault A. and Raoult J.F., (2001)** Dictionnaire de géologie 7^{ème} édition, 150 P.
- **Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. 2004.** Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York., May 2004: 1-399.
- **Gobat J.M., Aragno M., MATTHEY W., (2003)** Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols. *Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed)*, **528p**
- **Goodfellow M. and Williams S.T., (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
- **Goodfellow M., Jones A.L., Maldonado L.A., Salanitro J., (2004).** *Rhodococcus aethrivorans* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether degrading actinomycetes. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 61-5.
- **Goodfellow M. and Fiedler H.P., (2010)** A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Anton. Leeuw. J. Int. G*, **98** (2): 119-42.
- **Gottlieb D., (1973)** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York. **101P**.

- **Gottlieb D., (1974)** Actinomycetales. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds:R.E. Buchanan et N.E. Gibbons, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 657-881.
- **Groth J., Vettermann R., Schutze B., Shumann P. and Saiz-Jimenz C., (1999)** Actinomycete in Karstic caves of northern Spain. *J. Microbiol. method.* **36**: 115- 122.
- **Hadj-rabia Y., (2008)** Etude de molécules bioactives produites par de nouvelles souches de Nocardiosis et de Saccharomonospora isolées du chott Melghir (Biskra). Mémoire Magister. SNV/ USTHB, 14P
- **Harley J.P., and Prescott L.M., (2002)** Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Ed, france. 449 P
- **Hilali L., Khattabi A., Nssarllah N., Malki N. and Finance C., (2002)** Isolement de nouvelles souches d'actinomycetes productrices de substances antifongiques à partir de milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.* **2**: 49-53.
- **I.N.S.I.D. (2012)** Institut Supérieur de l'Irrigation et du Drainage. Titre de l'article. <http://www.insid.dz/> (consulté le 19/08/2014)
- **Jiang C. and Xu L., (1996)** Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1): 249-253.
- **Jiang Y., Cao Y., Zhao L., Wang Q., Jin R., He W., and Xue Q., (2010)** Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation.Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education of China, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming **650091**, China.
- **Joachin W., (2002)** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In: the pharmaceutical industry. *Electronic Manual.* <https://rucore.libraries.rutgers.edu> (consulté le 01/08/2014).
- **Kacem M., (2006)** Étude d'une sebkha la Sebkha d'Oran (Ouest algérien). Thèse de doctorat d'état. FSTGAT. Université d'Oran 1 P
- **Kamil Is., Talha G., Fadime Özdemir- K., and Elif C., (2014)** Molecular identification of different actinomycetes isolated from East Black Sea region plateau soil by 16S rDNA gene sequencing , *African Journal of Microbiology Research*, **8** (9): 878-887.
- **Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. and Hopwood D. A., 2000.** Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, UK* : 613.

- **Kitouni M., A. Boudemagh L. Oulmi S. Reghioua F. Boughachiche H. Zerizer H. Hamdiken A. Couble D. Mouniee A. Boulahrouf and Boiron P., (2005)** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree barksamples of the north–east of Algeria. *J. Mycol. Médi.* **15**: 45–51.
- **Kitouni M., (2007)** Isolement de bactéries Actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état. SNV/ Université Mentouri Constantine, pp : 29-30.
- **Labeda D. P., Testa R. T., Lechevalier M.P. and Lechevalier A., (1984)** Saccharothrix, a new genus of the Actinomycetales related to Nocardiosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 426-431
- **Lammi S., (2011)** Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. Mémoire Magister ; SNV/ Université Mentouri de Constantine. Pp : 20-25.
- **Larpent J.P. and Sanglier J.J., (1989)** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, 481 P.
- **Le minor L. and Veron M., (1989)** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. pp 335-349.
- **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Cosoli E., Lancelin J.M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A. and Boiron., (2003)** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* **49**: 669-74.
- **Livermore D.M., (2004).** The need for new antibiotics. *Clinical Microbiol. Infect.* **10** (4): 1-9.
- **Madigan M. T and Martinko J.M., (2007)** Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11^e édition pp: 331-423, 686-718.
- **Marchal N., Bourdaon J.L. and Richard C.I., (1987)** The culture media for isolation and biochemical identification of bacteria. Doin, Paris.
- **Maier R. M., Pepper I. L. and Gerba C. P., (2000)** Environmental microbiology, p. 79-82. Microorganisms in surface soils. *In*. Academic press. A Harcourt science technology company. Canada.
- **Merrouche R., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihili A.(2010).** Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrice algereinsis*. *J.Nat. products.*,73:1164-1166

- **Meklat A. (2012).**, Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophile des sols saharien et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*, Thèse de doctorat d'état SN/Ecole Normal Supérieure De Kouba.
- **Nascimento R.P., Coelho R.R. R., Marques S., Alves L., Girio F.M., Bon E.P.S. and Amaral-Collaco M.T., (2002)** Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from brazilian cerrado soil. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 549-555.
- **Oiwa R., (1992)** Antibacterial agents, In: Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer-Verlag, New York, NY.
- **Oskay M., Usame T.A and Azeri C., (2004)** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology.* *AJB* **3**: 441-6.
- **Patel JJ. and Brown M. E., (1969)** Interactions of Azofobacter with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant. Soil.* **31**: 273-281.
- **Pedros-Alio C., (2004)** Trophic ecology of solar salterns. In : *Halophilic Microorganisms.* A.V.ed., Springer, Berlin, pp. 33-48
- **Perry J.J., Staley J.T. and Lory S., (2004)** Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod Paris. Pp: 497-850.
- **Pochon J. and Tardieux P., (1962).** Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé, Pp : 50-56.
- **Prauser, H., (1970)** The Actinomycetes. Prauser, H., (e.d.), *The Actinomycetales.* G. Fischer: 13-19.
- **Prescott H., Klien W. and Sherwood W., (2010)** Microbiologie. boeck;3 Ed. Paris: 589-604
- **Rajan B. M. and Kannabiran K., (2010)** Antimicrobial activity of *Streptomyces albobacillus* sp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. *Pharmacologyonline* **1**: 124-132.
- **Roberts, M. F., (2005)** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *BioMed.* **1**: 5-30.
- **Roger P. and Garcia J. L., (2001)** Introduction à la microbiologie du sol. *Acad. Press Inc.* 15- 32.

- **Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J. and Kishan V., (2008)** Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*. An Indian soil isolate. *Indian J. Biotechnol.* **7**: 349-355.
- **Sandeep R. and Menaka D. S., (2014)** Antimicrobial Potential of Actinomycetes Isolated from Soil Samples of Punjab, India, *Journal of Microbiology & Experimentation*, **1** (2): 01-06
- **Sanglier J.J. and Trujill M., (1997)** Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12** (3), 269-276.
- **Société Suisse de Pédologie., (1998)** définition du sol, bulletin d'octobre 1998. http://www.soil.ch/doku/boden_definition98f%20.pdf (consulté le 02/09/2014)
- **Stackebrandt E. and Schumann, P., (2006)** Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. *Prokaryotes* 3:297-321.
- **Syed D.G., Dayanand A. and Pandey A., (2009)** Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 189-194.
- **Usha R., Hema S. and Kachana Devi D., (2012)** Antagonistic activity of actinomycetes isolates against human pathogen. *Journal of Microbiology research.* **1** (2):74-79.
- **Van Sinderen, D., (2007)** Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3):495-548.
- **Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F. and Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K. and Sudha S., (2008)** Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr. J. Biotechnol.* **7** (18): 3225-3230.
- **Waksman S.A., (1967)** **Distribution, isolation and methods of study.** In: **The actinomycetes- a summary of current knowledge.** The ronald Press Company. New york. pp: 9-21
- **Whalen, J.K. & Sampedro, L. (2010).** **Soil ecology and management.** Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A., (e.d.), *Microbial methods for assessing soil quality.* CABI: 27-50.
- **Wild A., (1993)** Soils and environment. An introduction, pp. 281. In. Campridge price editions. Campridge University press, Campridge.
- **Williams S.T. and Cross.T., (1971)** Actinomycetes. In C. Booth, ED, *Méthods in Microbiology*, chapitre XI. Academic press, London, Newyork. Vol: **4**. pp: 295-334.

- **Witt D., and Stackebrandt E., (1990)** Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943,339 AL. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 361-371
- **Wu ZY, Fang W, Shi LQ, Wan ZY, Min Y, et al., (2014)** New cytotoxic alkylated anthraquinone analogues from a soil actinomycete *Streptomyces* sp. WS-13394. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **62** (1): 118
- **Zermane F., (2008)** Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organique de synthèse. Mémoire de Magistère en Microbiologie Appliqué. SNV/Université Mentouri Constantine. 27,44 P
- **Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D. P. (2004).** *Saccharothrice algereinsis* sp.nov., isolated from a saharan soil. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, **54**: 1377-1381

Annexe

Tableau14 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des Actinomycètes						
Antibiotiques	Charge du disque	Diamètre de la zone d'inhibition des souches testées (mm)				
		C2	C9	C15	C17	C26
PENICILLINES						
Penicilline	6 µg / 10 IU	/	/	/	35	/
Amoxicilline + Acide Clavulanique	20 µg + 10 µg	30	/	/	30	/
CEPHALOSPORINES						
Ceftazidime	30 µg	/	/	/	/	/
AMINOSIDES						
Amikacine	30 µg	60	/	/	35	/
TETRACYCLINES						
Tetracycline	30 µg	10	/	/	40	/
MACROLIDES						
Erythromycine	15 µg	/	/	/	20	/
GLYCOPEPTIDES						
Vancomycine	30 µg	40	/	/	20	/
POLYPEPTIDES						
Bacitracine	0,02 à 0,04 UI	/	/	/	/	/
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME						
Triméthoprime-Sulfaméthoxazole	1.25 µg + 23.75 µg	/	/	/	/	/
NITROFURANES						
Nitrofurantoïne	300µg	/	/	/	35	35
QUINOLONES						
Acide Nalidixique	30 µg	/	/	/	10	/
FLUOROQUINOLONES						
Ciprofloxacine	5 µg	/	/	/	30	35
DIVERS						
Acide Fusidique	10 µg	/	/	/	20	/

/absence de la zone d'inhibition.

Milieux de culture utilisés :

1-Préparation des Milieux de cultures

Les différentes étapes de la préparation consistent en :

- la pesée
- la dissolution des ingrédients
- la mesure du PH
- la répartition du milieu
- la stérilisation : Autoclavage 121°C, 15 minutes.

2- Composition chimique des milieux de culture utilisés dans la présente étude :

a) International Streptomyces Project Medium 2 (ISP2):

Extrait de malt	10g
Extrait de levure	4g
Glucose	4g
Agar	20g
pH 7,4	

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

b) International Streptomyces Project Medium 4 (ISP4):

Amidon soluble	10g
K ₂ HPO ₄	1g
NaCl	1g
NH ₄ SO ₄	2g
CaCo ₃	2g
Solution saline	1ml
Agar	20g

pH = 7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

c) International Streptomyces Project Medium 9 (ISP9):

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64g
K ₂ HPO ₄	5,65g
KH ₂ PO ₄	2,38g
MgSO ₄	1g
NaCl	100g
Solution saline	1ml
Agar	20g

pH = 7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

d) Glycerol-Arginine-Agar (El-Nakeeb. M. A., and H.A. Lechevalier. 1963)

Glycerol	12,5g
Argentine	1g
NaCl	1g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄	0,5g
Solution saline	1ml
Agar	20g

pH = 7.4

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

e) Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar-agar	17g
pH=7.4	
Autoclavage 121°C, 15 minutes.	

f) Bouillon nutritif

Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
NaCl	5g
pH = 7.4	
Autoclavage 121°C, 15 minutes.	

g) Gélose nutritive

Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
NaCl	5g
Agar	15 g
pH = 7.4	
Autoclavage 121°C, 15 minutes.	

Equipements

Microscope optique (Leica), Stériomicroscope (Leica), Autoclave, Agitateur vortex (Stuart), Agitateur Magnétique (Prolabo), Poste de sécurité microbiologique Catégorie 2 (Steril-Antares), Bec bunsen, Micropipette.

Verrerie

Tubes à essai, Flacons autoclavable (250, 500 et 1000 ml), Pipettes pasteur, Erlenmeyers, Fioles jaugées, Béchers, Eprouvettes, Pipettes graduées, Entonnoirs.

Produits Chimiques

Glucose (Fluka), Agar (institut pasteur), Extrait de malt (Conda), Chlorure de sodium (Fluka), Extrait de levure (Biochem), Glycérol (Sigma) , Amidon soluble (Ruedel-de Haen), Argénine, Mueller Hinton Agar (70191, Fluka BioChemika), Sabouraud 4% Glucose-Agar (84088 ; Fluka Analytical).

Photos de quelques équipements utilisés :



Figure 1 : Agitateur vortex



Figure 2: Etuve bactériologique



Figure 3: Microscope optique

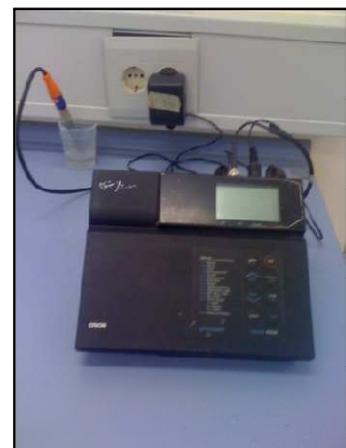


Figure 4 : PH mettre



Figure 5 : Stériomicroscope (loupe)



Figure 6 : Autoclave



Figure 7 : Ultrasons



Figure 8 : La balance



Figure 9 : Agitateur magnétique

Sommaire

Introduction	1
 Chapitre I : Rappels bibliographiques	
1. Zone d'étude	2
2. Le sol	2
2.1. Généralités	2
2.2. Sebka	2
3. Les microorganismes du sol	3
3.1. Généralités.....	3
3.2. les microorganismes des zones extrêmes.....	3
4. Les Actinobactéries	4
4.1. Généralités.....	4
4.2. Définition.....	5
4.2.1. Taxonomie.....	6
4.2.2. Morphologie.....	8
4.2.3. Ecologie et distribution dans la nature.....	10
5. Les molécules bioactives	11
 Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Matériel	13
1.1. Matériel biologique.....	13
2. Méthodes	13
2.1. Prélèvement du sol.....	13
2.2. Isolement des souches à partir du sol.....	13
a) Traitements du sol.....	13
b) Préparation des dilutions.....	13
c) Ensemencement des milieux.....	14
d) Incubation.....	14
2.3. Purification des souches isolées.....	14
2.4. Conservation des souches.....	14
2.5. Identification des souches purifiées.....	16
2.5.1. Etude morphologique.....	16

a) Caractérisation macroscopique.....	16
b) Caractérisation microscopique.....	16
2.5.2. Etude physiologique.....	16
a) Etude de la croissance à différents pH.....	16
b) Détermination de la température optimale de croissance	16
c) Détermination de la croissance des souches à différents Milieux de culture.....	17
d) Détermination de l'optimum de salinité	17
e) Production de pigments mélanoides.....	17
f) Détermination des profils de sensibilité des actinobactéries aux antibiotiques	17
g) Utilisation du citrate comme seul source de carbone	18
h) Utilisation des sources de carbone	18
i) Réduction des nitrates.....	18
g) Dégradation de Mannitol.....	18
k) Production d'indole.....	19
l) La production d'H ₂ S.....	19
m) Recherche de la catalase.....	19
2.6. Etude de l'activité antibactérienne.....	19

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats

A. Isolement des actinobactéries à partir du sol.....	21
B. Identification des souches purifiées.....	21
1. Caractérisation des isolats.....	21
a) Etude macroscopique.....	21
b) Etude microscopique.....	21
2. Etude physiologique	24
a) Détermination de la température optimale de croissance.....	24
b) Détermination de l'optimum de pH.....	24
c) Détermination de la croissance des souches à différents milieux de culture.....	25
d) Détermination de l'optimum de salinité.....	26
e) Utilisation des différents substrats carbonés.....	27
f) Détermination de la production de pigment mélanoïde	29
g) Détermination des profils de sensibilité des actinobactéries aux antibiotiques	29

C. Etude de l'activité antagoniste.....	32
2. Discussion.....	35
Conclusion	39
Annexes	