

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Faculté des Sciences
Département de science de la nature et de la vie

Mémoire
Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Melle.cherifa Benmeddah & Soumia Bouzada

**Isolement et caractérisation des actinobactéries à partir d'un
source thermale (station Hammam Bouhadjar) et des deux
sols salins et aride d'Algérie.**

Encadrant :
M. Bellahcen miloude
Professeur à C.U.B.B.A.T.

Soutenu en 2018

Devant le jury composé de :

Président : Dr. Ziane. M
Examineurs : DR. BOUAMRA M
Encadrant : Pr. Bellahcen M

M.C.A
M.C.B
PROFESSEUR

C.U.B.B.A.T.
C.U.B.B.A.T.
C.U.B.B.A.T

Années Universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu qui m'a donné la force et la volonté pour réaliser ce mémoire. Je tiens d'abord à adresser toute ma gratitude au monsieur **Bellahcene M.** professeur à C.U.A.T sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir, Nous le remercions pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience. On lui adresse toutes nos reconnaissances pour sa patience, sa disponibilité et sa participation lors de la rédaction de mémoire. On le remercie pour ses conseils éclairés dans l'orientation de ce travail, ses nombreuses idées, ainsi que pour son soutien moral.

On remercie vivement Monsieur Ziane M M.C.A à C.U.A.T d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire ainsi que Monsieur Bouamra M, M.C.B à C.U.A.T, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

On remercie également l'équipe du laboratoire de Biotechnologie de l'Université d'Oran Es-Sénia. Nos remerciements vont tout particulièrement à Monsieur Dr. Harir Mohamed, qui a très généreusement accepté d'apporter son aide pour que ce travail puisse être achevé et soutenu dans les meilleures conditions.

On remercie également les techniciens ainsi que tout le personnel du laboratoire de Microbiologie du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Centre Universitaire Belhadj Bouchaib - Ain Témouchent.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui nous ont encouragés.

Dédicace

*Avant tous Je rends grâce à Dieu tout puissant pour sa miséricorde
sans lui rien n'aurait été possible*

*Quand il y a le souci de réaliser un dessein Tout devient facile pour
arriver à nos fins Malgré les obstacles qui s'opposent En dépit des
difficultés qui s'interposent Les études sont avant tout Notre unique et
seul atout*

*Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon très chère père, à qui
je dois tout, tant le souvenir de ses conseils, de son soutien dans les
moments importants de ma vie et de ses encouragements m'ont permis
d'aller de l'avant et d'atteindre mes objectifs. Aucun hommage ni
remerciement ne saurait être suffisant. Et à la personne la plus cher
au monde que je ne remercierai jamais assez ces encouragements,
Soutiens, sacrifices et ces patiences pendant toute ma vie ma chère
mère, Je remercie également toute ma famille*

*Mes chères sœurs; Kheira, hlima, zineb, fatima et spécialement Fatiha
et Nesrine , et à mes chères frères ; Ahmed, mohamed, abdrahman et
habib*

*Un remerciement particulier et sincère pour mon fiancé brahim qui
n'a pas cessé de m'encourager et De prier pour moi*

*Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères
amies et collègues, Imen, Fatima zahraa et Cherifa, avec qui j'ai
partagé des moments forts*

Dédicace

Avant tout, nos sincères remerciements reviennent à Allah le tout puissant pour ses dons.

Je dédie ce modeste mémoire qui est le fruit de longues années de travail

A Les deux personnes, les plus chers au monde que je ne remerciais jamais assez : leurs aides, L'encouragement, Soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie:

Mon très cher père qui m'a suivi le long de ce chemin, qui n'a jamais cessé de contribuer à ma réussite et mon bonheur et j'espère qu'il sera fier.

Mon adorable mère, qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon Bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. Que dieu LaProtège et lui donne bonne santé.

A mes cher frères : Mohamed, Ayoub, Hichame et à ma belle-sœur NourElhouda pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales et auxquels je souhaite Beaucoup de réussite.

Je remercie chaleureusement mes très chères amies et mes collègues, avec qui j'ai partagé des moments forts, pour l'ambiance cordiale et l'aide qu'elles m'ont apporté à tout moment.

Je leur souhaite, à toutes, bonne continuation et beaucoup de réussite.

A mon fiancé Mohamed d'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible.

A toute ma famille sans exception.

BENMEDDAH Cherifa

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Micromorphologies de deux genres d'actinobactéries halophiles (Observations au microscope électronique à balayage)	5
Figure 02	Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide	8
Figure 03	Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes	9
Figure 04	Origine des antibiotiques	13
Figure 05	les différentes applications biotechnologiques des actinobactéries	16
Figure 06	Place géographique de la station thermale de Hammam Bouhadjar (prise par satellite)	17
Figure 07	Localisation du lieu de prélèvement - Sebkhha d'Oran, prise par satellite	18
Figure 08	Vue générale de la zone de prélèvement Sebkhha d'Oran	18
Figure 09	les deux sources de prélèvement d'échantillon d'eau (A: source thermale n 1; B : source thermale n2)	19
Figure 10	Différents échantillons de sol de la sebkhha d'Oran. A :échantillon 1 ; B : échantillon 2 ; C : échantillon 3	20
Figure 11	Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide par la méthode des stries croisées	25
Figure 12	Deux boîtes de Pétri représentant un isolement d'actinobactéries à partir d'un échantillon de sol saharien de KNADESSA (A : dilution 10^{-4} , B : dilution 10^{-5}).	29
Figure 13	Histogramme représentant le nombre de colonie actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture.	30
Figure 14	Caractères cultureux des actinobactéries.	32
Figure 15	les caractères morphologique et microscopique des quatre isolats d'actinobactéries.	33

Figure 16	Conservation des isolats d'actinobactéries dans des tubes de milieu ISP2 gélosé incliné.	33
Figure 17	Croissance des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de différentes concentrations de Na Cl.	34
Figure 18	Les résultats de la croissance des actinobactéries dans différentes températures (5, 12, 20, 30 et 30°C).	35
Figure 19	Résultats de l'assimilation des sucres par les actinobactéries.	36
Figure 20	les résultats des interactions des actinobactéries avec des souches cibles.	38
Figure 21	Résultats de l'activité antifongique des isolats d'actinobactéries.	38
Figure 22	Résultats de l'antibiogramme sur le milieu Muller Hinton..	40
Figure 23	Résultats de l'hydrolyse de la caséine par les quatre isolats	41
Figure 24	Résultats de la dégradation de l'amidon par les quatre isolats.	41
Figure 25	Résultats de l'hydrolyse de la gélatine par les quatre isolats d'actinobactéries.	42
Figure 26	Résultats de test de l'effet hémolytique de quatre isolats	42

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Principaux caractères physiologiques des actinobactéries	6
Tableau 02	la classification des actinobactéries	7
Tableau 03	Distribution des actinobactéries dans la nature	10
Tableau 04	Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i> .	14
Tableau 05	Caractéristiques des bactéries indicatrices	24
Tableau 06	Les antibiotiques utilisés dans le test d'antibiogramme leur familles et leur mode d'action.	26
Tableau 07	Résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des différents échantillons de sol analysés dans les trois milieux de culture	30
Tableau 08	Les caractères Morphologie des d'actinobactéries	32
Tableau 09	Résultats de la tolérance à la salinité et aux différentes températures.	34
Tableau 10	Assimilation des composées glucidiques comme seules sources de carbone	36
Tableau 11	Résultats de l'interaction des actinobactéries avec les souches indicatrices.	37
Tableau 12	Résultats d'antibiogramme des quatre souches des actinobacteries.	39

Table des Abréviations

Abréviation	Signification
CAA	Milieu caséine amidon agar
CaCO₃	carbonate de calcium.
°C	degré Celsius.
Ech	Echantillon
g	Gramme
G	Grossissement
G +	Gram positif
G -	Gram négatif
G+C	Guanine +Cytosine
g/L	gramme sur litre
GLM	Gélose à l'extrait de Levure et l'extrait de Malt
GN	Gélose nutritive
H	Heur
HBH	Hammam Bouhadjar

Abréviation	Signification
ISP2	Milieu International <i>Streptomyces</i> Project
M.A	mycélium aérien
MH	Muller Hinton
MI	Millilitre.
M.S	mycélium du substrat
N°	Nombre
Nm	Nanomètre
O2	Oxygène
pH	Potentiel hydrogène
SARM	<i>Staphylococcus Aureus</i> Résistant à la Méthicilline
<i>sp</i>	Species (espèce).
µl	micro litre
U.V	ultra-violet.
V/V	Volume sur Volume
%	Pourcentage

Table de matière

Liste des Tableaux
Liste des Figures
Liste des abréviations
Table de matière
résumé

Introduction.....1

Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Actinobactéries : Historique, Taxonomie, Importance et Applications.....	3
1. Historique.....	3
2. Définition des actinobactéries.....	3
3. Propriétés des actinobactéries.....	4
4. Caractères généraux des actinobactéries	4
4.1. Les caractères macromorphologiques	4
4.2 Caractères micro morphologiques	5
5. Caractères physiologiques des actinobactéries.....	5
6. Position taxonomique des actinomycètes.....	6
7. Cycle de développement des actinobactéries (exemple: <i>Streptomyces spp</i>)	8
8. Formation des spores par les actinobactéries.....	9
9. Ecologie et distribution des actinobactéries dans la nature	10
10. Importance et application des actinobactéries	11
10.1. Lutte biologique.....	11
10.2 Production d'antibiotiques	12
10.2.1. Mode d'action des antibiotiques.....	13
10.2.2. Intérêts des antibiotiques	13
10.3. Les antifongiques.....	15
10.4. Production d'enzymes.....	15
10.5. Production de vitamines.....	15
10.6. Production de pigments	16

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Sites de prélèvement d'échantillons.....	17
1.1. Station thermale de la commune de HAMAM BOUHADJAR	17
1.2. Sebka d'Oran	17
1.3. Région de la wilaya de BECHAR (commune de KNADESSA et Gouray)	18
2. Echantillonnage	19
2.1. Echantillon d'eau.....	19
2.2. Echantillons de sols	19
2.2.1. Sol de sebka.....	19
2.2.2. Sol saharien.....	20
3. Isolement des actinobactéries	20
3.1. Prétraitement des échantillons	20
3.2. Enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO ₃).....	20
3.3. Les milieux de cultures utilisées.....	21
3.4. Ensemencement des échantillons (l'eau et le sol).....	21
4. Dénombrement des colonies	22
5. Observation microscopique.....	22
6. Purification des isolats bactériens.....	22
7. Coloration de Gram et observation microscopique	22
8. Conservation des isolats d'actinobactéries.....	23
9. Aspect macroscopique et caractères cultureux des isolats.....	23
10. Morphologie des mycéliums (aériens et de substrat).....	23
11. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	23
11.1 Souches de microorganismes cibles indicatrices.....	23
11.2 Technique des stries croisées.....	24
11.3. Test de sensibilité aux antibiotiques	25
12. Etude physiologique des isolats d'actinobactéries	26
12.1 Hydrolyse de la caséine	26

12.2 Dégradation de l'amidon	26
12.3 Dégradation de la gélatine	27
12.4 Pouvoir hémolytique	27
12.5. Utilisation des composées glucidiques comme seules sources de carbone	27
13. Croissance en présence d'inhibiteurs	28
13.1. Différentes concentration de Na Cl	28
13.2. Croissance à différentes températures.....	28
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS	
1. Isolement des actinobacteries	29
2. Caractères culturaux.....	31
3. Caractères morphologiques.....	32
4. Conservation des isolats	33
5. Tolérance aux différentes températures et salinité.....	34
6. Résultats d'études physiologiques et biochimiques.....	35
6.1 Assimilation des sucres.....	35
7. Activité antimicrobienne.....	36
8. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).....	39
9. Tests physiologiques des isolats d'actinobactéries	41
9.1. Hydrolyse de la caséine	41
9.2. Dégradation de l'amidon	41
9.3. Hydrolyse de la gélatine	42
9.4. Pouvoir hémolytique	42
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	46
Annexes	

Résumé

Après isolement, purification et dénombrement des actinobactéries, nous avons réalisé une pré-identification des bactéries, basée sur des caractères cultureux, morphologiques, physiologiques et biochimiques. Nous avons ensuite étudié l'activité antimicrobienne de ces isolats vis-à-vis de quatre germes pathogènes et une moisissure. Cette étude est complétée par des tests de tolérance aux différentes concentrations de Na Cl et aux différentes températures. Une étude sur la sensibilité des actinobactéries aux antibiotiques a également été entreprise.

Au total, 6 isolats d'actinobactéries ont été isolés. Au cours de la purification, deux isolats ont été contaminés, donc, uniquement quatre isolats ont été purifiés et ont fait l'objet de ce modeste travail. Les caractères phénotypiques des isolats nous ont conduit à les rattacher au genre *Streptomyces*. Les quatre isolats ont démontré des propriétés antibiotiques appréciables contre les bactéries pathogènes en particulier vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. La tolérance aux différentes concentrations de Na Cl a révélé que les quatre isolats tolèrent et croissent à ces différentes concentrations testées. Vis-à-vis de la température, les isolats ont montré une croissance positive à 15, 25 et 30 °C, par contre, ils se sont inhibés à 5 °C. La température 37 °C s'est montrée défavorable aux actinobactéries.

Les résultats de l'antibiogramme ont révélé que les isolats réagissent différemment vis-à-vis des antibiotiques testés, certains se sont montrés sensibles alors que d'autres se sont révélés résistants. Tous les isolats d'actinobactéries testés ont hydrolysé la gélatine, la caséine et l'amidon à l'exception du sang humain.

Mots clés : Actinobactéries, activité antibactérienne, *Streptomyces*, antibiogramme, germes pathogènes.

Abstract

After isolation, purification and enumeration of the actinobacteria, we carried out a pre-identification of the bacteria, based on cultural, morphological, physiological and biochemical characters. We then investigated the antimicrobial activity of these isolates against four pathogens and one mold. This study is completed by tolerance tests at different concentrations of NaCl and at different temperatures. A study on the sensitivity of actinobacteria to antibiotics was also undertaken.

In total, 6 isolates of actinobacteria were isolated. During the purification, two isolates were contaminated, so only four isolates were purified and subjected to this modest work. The phenotypic characteristics of the isolates led us to relate them to the genus *Streptomyces*. The four isolates demonstrated significant antibiotic properties against pathogenic bacteria especially against the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Tolerance to different concentrations of NaCl revealed that the four isolates tolerate and grow at these different concentrations tested. In terms of temperature, the isolates showed positive growth at 15, 25 and 30 ° C, but were inhibited at 5 ° C. The temperature 37 ° C was unfavorable to actinobacteria.

The results of the antibiogram showed that the isolates react differently to the antibiotics tested, some were sensitive while others proved to be resistant. All of the actinobacterial isolates tested hydrolyzed gelatin, casein and starch except for human blood.

Key words: Actinobacteria, antibacterial activity, *Streptomyces*, antibiogram, pathogenic germs.

ملخص

بعد عزل و تلقيح و احصاء البكتيريا الاكتينية, قمنا بإجراء تعريف اولي للبكتيريا مرتكزين على الصفات المورفولوجية و الفيزيولوجية و البيوكيميائية . ثم درسنا بعد ذلك نشاط هذه السلالات المعزولة المضاد لأربع انواع من البكتيريا الممرضة بالإضافة الى نوع من العفن . هذه الدراسة تمت تكملتها بتجارب تحملها للملوحة و الحرارة و ذلك من خلال تعريضها لتراكيز متفاوتة من كلور الصوديوم و كذا درجات حرارة مختلفة.تم اجراء كذلك دراسة حساسية البكتيريا الاكتينية لمختلف المضادات الحيوية.

في المجمل تم عزل ستة عزلات من البكتيريا الاكتينية , أثنان منها تعرضا للتلوث, لهذا تم تنقيح اربع منها فقط و بها تم اتمام هذا العمل المتواضع.. اثناء التنقيح خصائص النمط الظاهري للعزلات المتحصل عليها قادنا للبحث عن. أظهرت خصائص مضادة حيوية معتبرة ضد البكتيريا *pseudomonasaeroginosa* السربتومييسات.العزلات الاربعة . الممرضة خاصة

اختبار تحمل درجات ملوحة متفاوتة اوضحت ان كلالعزلات استطاعت النمو في كل الاوساط المالحة. أما اختبار درجات فإنها بينت نمو جيدا في درجات حرارة 15,25 30 لكن تم تثبيطها في 5 الا ان درجة 37 كانت غير مثالية °C الحرارة لنمو البكتيريا حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية, اظهرت ان البعض منها مقاوم بينما البعض الآخر حساس. كما اظهرت اختبارات اخرى ان كل عزلات البكتيريا استطاعت اماهة الجيلاتين , الكازيين و النشاء. الا انها لم تستطع اماهة الدم البشري.

الكلمات المفتاحية. البكتيريا الاكتينية, النشاط المضاد للبكتيريا السربتومييسات , اختبار المضادات الحيوية , البكتيريا الممرضة.

Introduction

Introduction

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique très important. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes filamenteux. C'est en 1949, après la découverte de l'actinomycine, que ces bactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches et elles sont extrêmement exploitées durant les années 80, en conséquence, de nouvelles structures et surtout celles des antibiotiques sont continuellement isolées à partir de ce groupe de bactérie. Ainsi, ces bactéries sont devenues les premiers fournisseurs de ces métabolites secondaires d'intérêt (**Donadio et al., 2002**). Les actinomycètes filamenteux sont à l'origine d'environ 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde. Cependant, le taux de nouvelles découvertes à partir des cultures d'Actinomycetales isolées des sols des régions méditerranéennes (sols arides et semi-arides) et des régions tempérées est en diminution remarquable.

D'un autre côté, la résistance bactérienne aux antibiotiques est en augmentation inquiétante et depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les bactéries n'ont pas cessé de s'adapter à l'environnement imposé par l'utilisation massive et une mauvaise utilisation de ces substances qui aurait pour fâcheuse conséquence de sélectionner les souches les plus résistantes (**Decre et Courvalin, 1981 ; Desnottes, 1995**). A titre d'exemple, on peut citer le genre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). La résistance à la méthicilline est probablement conférée au *S. aureus* par un élément génétique mobile, appelé « staphylococcal cassette chromosome », qui contient le gène de résistance à la méthicilline. Au problème de la résistance bactérienne, il faut ajouter l'incidence des infections nosocomiales reconnues comme des problèmes majeurs de santé publique de par leur fréquence, leur coût et leur gravité. La recrudescence des maladies anciennes et l'apparition de nouveaux pathogènes.

L'obtention de nouveaux antibiotiques (antibactériens et antifongiques) est devenue donc une nécessité. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches microbiennes productrices. L'exploitation des écosystèmes où un ou plus des facteurs environnementaux sont extrêmes (température, pH, aération, stress osmotique,...) favorise la détection d'Actinomycetales, pouvant éventuellement avoir un potentiel d'activité antibactérien et ou/ antifongique important.

Dans ce présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs principaux, l'isolement et la purification d'Actinomycetales à partir des eaux thermales, des sols salins et arides. Ensuite de mettre en évidence l'activité antibactérienne et antifongique des souches obtenues et enfin procéder à une étude taxonomique des isolats bactériens basée sur la recherche de certains caractères physiologiques et biochimiques.

Revue bibliographique

I. Les Actinobactéries : Historique, Taxonomie, Importance et Applications

1. Historique

Depuis que Cohn en 1875 a découvert le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foeresteri*, d'autres travaux se sont suivis durant la première époque qui a commencé de 1874 à 1900. Au cours de cette période, **Harz en 1877**, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*.

Durant la seconde période, allant de **1900-1919**, **Orla Yensen (1909)** créa la famille des Actinomycétacées qui comprend un seul genre *Actinomyces*. Ce même auteur rapporte que de nombreuses études se sont orientées à la recherche des Actinomycètes du sol. Par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrites. **Buchanan (1917)** créa l'ordre des Actinomycétales. A cette époque, les espèces composant le genre *Actinomyces* étaient très différentes et certains auteurs ont commencé par scinder ce genre en plusieurs autres genres. Vient ensuite la troisième période de (1919-1940) de l'histoire des actinomycètes et cela grâce aux travaux de recherches de **Orskov (1923)** qui créa le Genre *Micromonospora*, à cette époque une meilleure connaissance des germes d'actinomycètes a été acquise. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisaient pas de mycélium aérien. La quatrième et dernière période, qui a commencé en 1940 et qui correspondait à l'époque des antibiotiques produits par les actinomycètes, regroupait les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores (**Waksman et Henrici, 1943**). Enfin, en 1958, Ettl et *al.*, ont introduit un critère important dans la différenciation des espèces d'actinomycètes, la production des pigments mélanoides.

2. Définition des actinobactéries

L'ancien nom des actinobactéries était actinomycètes. Le terme «actinomycètes» provient du Grec « aktino - mycètes » ou «champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants » (**Gottlieb, 1973**). Les actinomycètes sont des bactéries à coloration Gram-positif. Ils se caractérisent par la formation d'hyphes filamenteux qui ne subissent généralement pas de fragmentation et qui produisent des spores asexuées.

Par leur morphologie générale, ils ressemblent fortement aux mycètes. Cette ressemblance résulte en partie d'une adaptation aux mêmes habitats (**Zouaghi, 2007**). Les cellules d'Actinomycétales sont allongées tendent à se ramifier en formant un mycélium plus ou

moins différencié. La plupart des espèces vivent dans le sol ou moins fréquemment dans les eaux douces. Un petit nombre est pathogène. Plusieurs produisent des antibiotiques. Les actinobactéries ont été considérées comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons. Actuellement, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes. Pourtant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec des bactéries et avec les champignons (**Andriambololona, 2010**). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires et à une morphologie complexe (**Colombie, 2005**). Elles sont constituées d'hyphes c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour de germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973**). Selon le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 2012, la définition des actinobactéries est restée la même (bactéries à coloration Gram positif ayant un % G+C supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique (**Harir, 2018**).

3. Propriétés des actinomycètes

Les actinomycètes sont filamenteux, à coloration Gram positif. Comme les champignons, les actinomycètes possèdent des hyphes à ramifications vraies et des spores de dissémination non comparables aux endospores. La morphogénèse peut-être complexe (corémie, zonation). Les propriétés bactériennes des actinomycètes sont les suivantes : la cytologie est procaryotique, physiologiquement, elles sont en général, des bactéries aérobies mais certaines formes sont aérobies facultatives ou même anaérobies. Elles sont sensibles aux phages et aux antibiotiques antibactériens (**Lechevalier, 1988**).

4. Caractères généraux des actinobactéries

D'après **Noureddine, (2006)** et **Boudjella, (2007)**, les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi les caractères culturels importants :

4.1. Les caractères macromorphologiques : Ces caractères reposent sur une observation à l'œil nu. Il s'agit de noter :

- La présence ou l'absence du mycélium aérien (MA).
- La couleur de MA et du mycélium du substrat (MS) (**Harire, 2018**).
- Présence ou absence des pigments diffusibles dans le milieu de culture (**Saker, 2015**).

2. Caractères micro morphologiques

La micromorphologie des actinobactéries est réalisée par observation au microscope optique et parfois électronique des colonies poussant sur milieux gélosés (Saker, 2015). Il s'agit de noter : - La fragmentation ou non du mycélium de substrat ; - la formation des spores exogènes sur le MA et/ou le MS, leur forme ; leur taille et leur agencement (isolées ou en chaînes). - 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 (Harir, 2018).

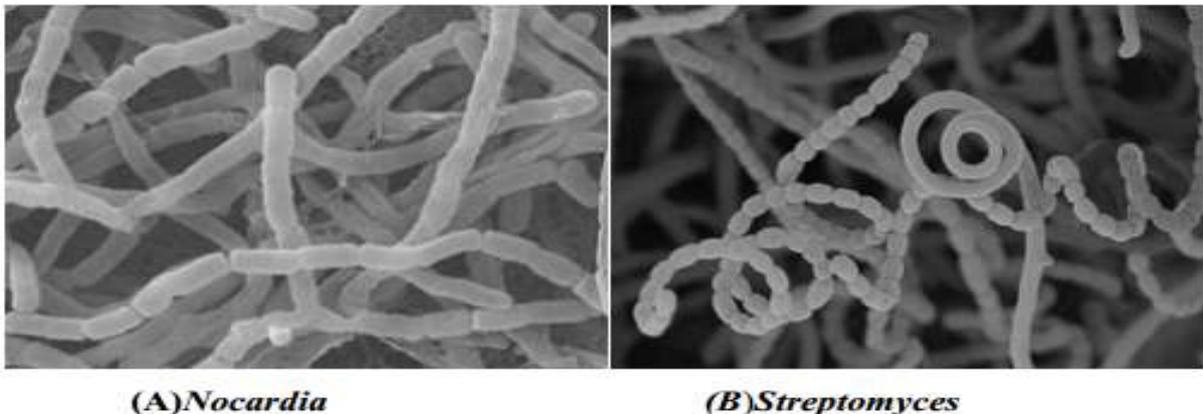


Figure 01 : Micromorphologies de deux genres d'actinobactéries halophiles (Observations au microscope électronique à balayage) (Belyagoubi, 2014).

5. Caractères physiologiques des actinobactéries

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité) (Djinni, 2009). Le Tableau 01 présente les caractères physiologiques des actinomycètes.

Tableau 01 : Principaux caractères physiologiques des actinobactéries (DJABALLAH, 2010).

Caractères physiologiques	Caractéristiques
Taux d'humidité	Faible à modérés (Oskay <i>et al.</i> , 2004 ; Prescott <i>et al.</i> , 2010)
Température	Mésophile à thermophile 50 °C- 60 °C(Holt <i>et al.</i> , 1994)
pH	Neutrophile : 5 - 9 (Lee et Hwang, 2002)
O ₂	1-Aérobie (sol) 2- Fermentatif (cavité naturel homme animale) <ul style="list-style-type: none"> • anaérobie facultatif. • anaérobie.(Silini, 2012)

6. Position taxonomique des actinomycètes

Les différentes éditions du Manuel de Bergey ont apporté des définitions actualisées des actinobactéries avec des données fournies par des travaux récents par rapport à l'époque de chaque édition. En se basant sur le système de classification de Murray (Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology), ont classés les actinomycètes dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), classe des Thallobacteria (bactéries Gram-positives ramifiées), (Ouhdouch, 2003). Les actinobactéries sont classées dans le Domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (Euzéby, 2015). Le phylum des actinobactéries comprend maintenant cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles (Tableau 02). Les genres sont caractérisés par une diversité morphologique importante, allant de la simple cocci (ex: *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées ou non. Ainsi, la position taxonomique des actinobactéries, en prenant comme exemple l'espèce *Actinopolyspora algeriensis* décrite par Meklat *et al.*, (2012a), s'établit comme suit:

Classe : *Actinobacteria*

Ordre: *Pseudonocardiales*

Sous-Ordre: *Actinopolysporineae*

Famille: *Actinopolysporaceae*

Genre: *Actinopolyspora*

Espèce: *Actinopolyspora algeriensis*

Tableau 02 : Classification des actinobactéries (Goodfellow et al., 2012).

Classe	Ordres	Familles
Actinobactéria	Actinomycetales	Actinomycetaceae
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae
	Bifidobactériales	Actinopolysporaceae
	Catenulisporales	Catenulisporaceae, actinospicaceae
	Corynebactériales	Corynebactériaceae, dietziaceae, mycobacteraceae, nocardiceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae
	Frankiales	Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae
	Glyconycetales	Glyconycetaceae
	Jiangellales	Jiangellaceae
	Kineosporales	Kineosporaceae
	Micrococcales	Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabactériaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Instrosporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae.
	Micromonosporales	Micromonosporaceae
	Propionibactériales	Propionibacteriaceae, Nocardidoidaceae
	Pseudonocardiales	Pseudonocardiceae
	Streptomycetales	Streptomycetaceae
Streptosporangiales	Streptosporangiaceae, Nocardioopcoceae, Thermomonosporaceae	

7. Cycle de développement des actinobactéries (exemple: *Streptomyces spp*)

Le cycle de vie de nombreuses actinobactéries commence par la germination des spores (Messoudi, 2013). Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (O'Gara *et al.* 2008). Un mycélium aérien vient ensuite de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet, ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment que les composés d'intérêt thérapeutique (médicaments utiles) sont synthétisés. Ces composés appartiennent aux métabolites secondaires (Smaoui, 2010) (Figure 02).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores. Ces spores naissent par fragmentation du mycélium primaire en réponse à un stress environnemental tel que le manque d'éléments nutritifs (Prescott *et al.*, 2010).

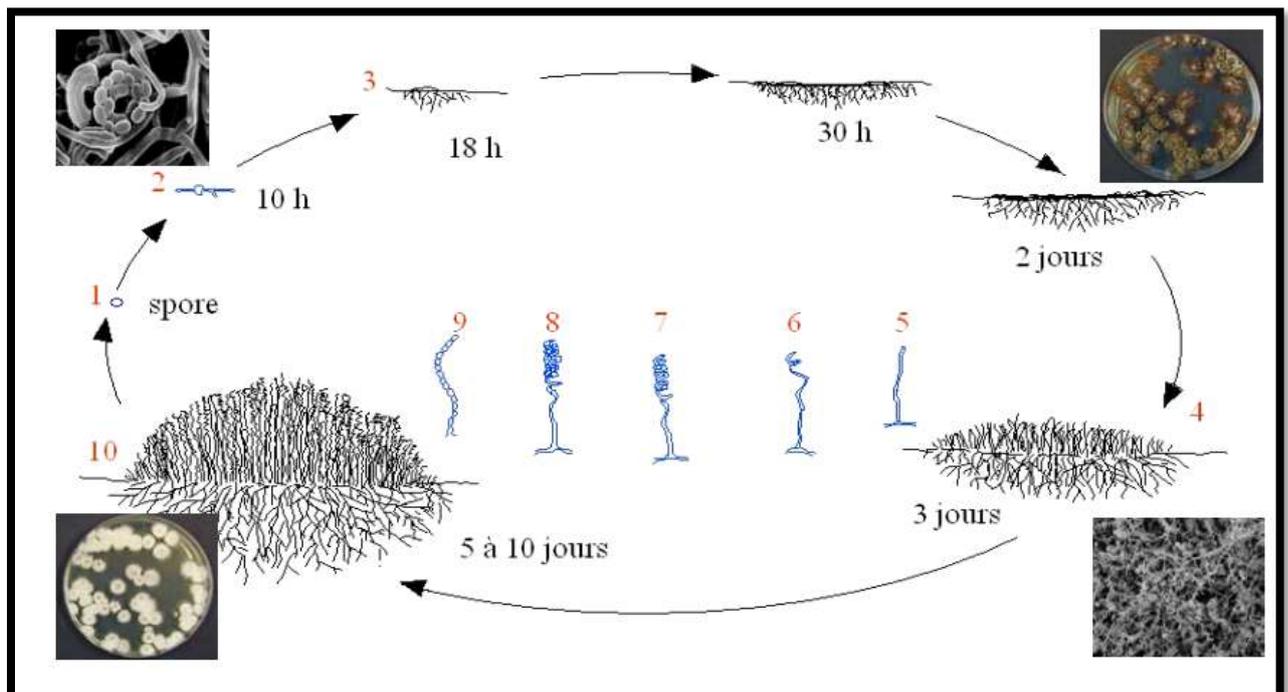


Figure02 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton *et al.*, 1989).

8. Formation des spores par les actinobactéries

Les divers types de spores des actinobactéries peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exo-spores et endospores (**Theilleux, 1993**). Les exo-spores sont le type le plus fréquent et les moins résistants aux conditions hostiles que les hyphes, alors que les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités (**Kitouni, 2007**). La figure 03, présente la micromorphologie des principaux genres d'Actinobactéries.

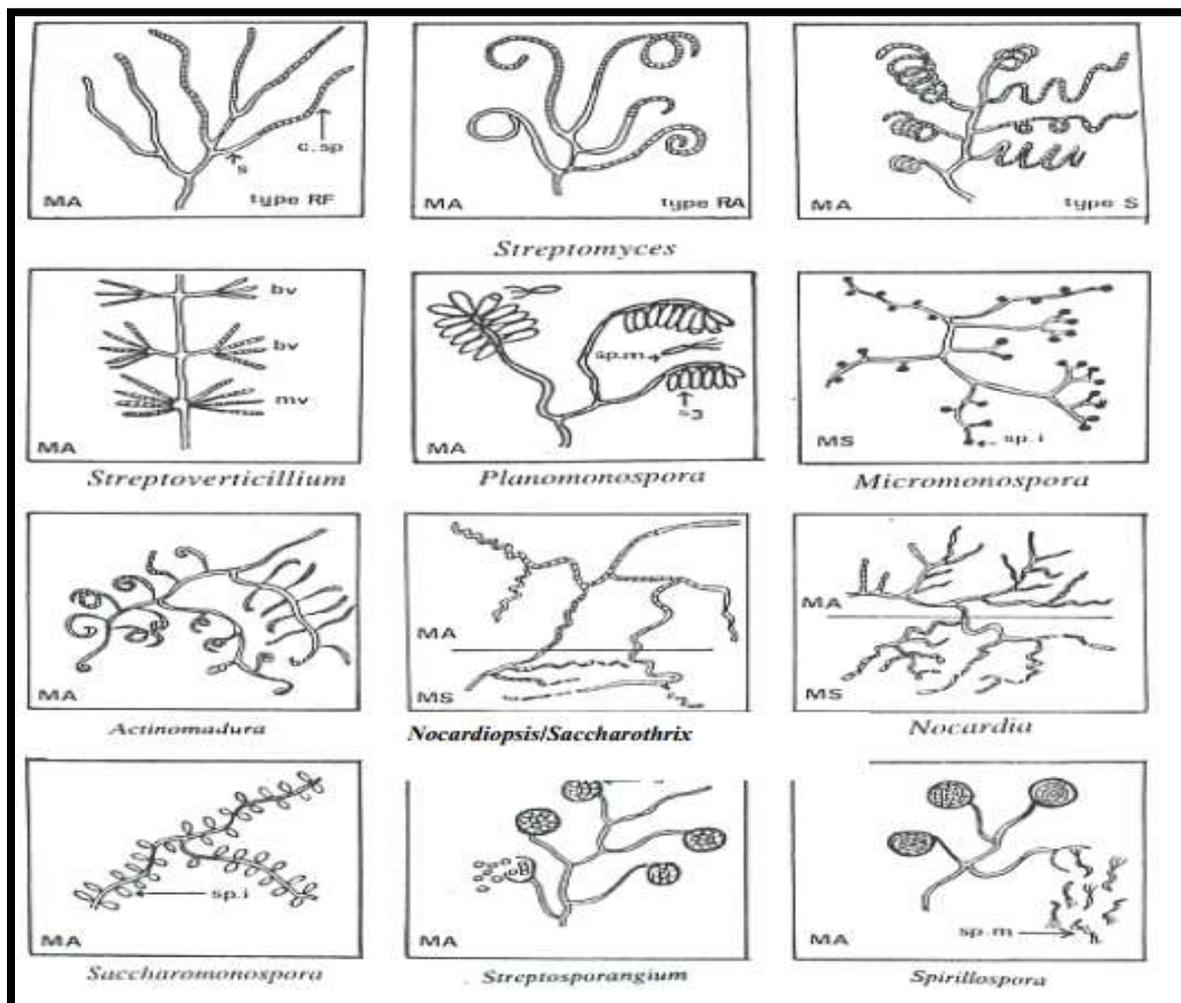


Figure 03 : Micromorphologie des principaux genres d'Actinobactéries (**Zitouni, 2005**). M.A mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, *Spira* (chaînes spiralées); s : sporophore; c. sp.; chaînes de spores; sp. i.; spores isolées; sp. m. ; spores mobiles ;sg. Sporangies.

9. Ecologie et distribution des actinobactéries dans la nature

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires. La grande diversité métabolique leur permet d'avoir une importance écologique majeure dans l'environnement (**Hasley et Leclerc, 1993**). Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (**Goodfellow et Williams, 1983**). On les retrouve dans le sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, le pollen, les abeilles, les plantes (endophytes), les lichens et dans d'autres substrats (**Promnuan et al., 2011**). Toutefois, la majorité des actinobactéries est d'origine tellurique. Ces bactéries ont également la faculté de coloniser d'autres biotopes tels que les déserts chauds, les glaciers, les sites pollués par des hydrocarbures ou par des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et certains milieux très salés (**Santhanam et al., 2012**).

Tableau 03: Distribution des actinobactéries dans la nature (**Larpent, 1989**).

Genres	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, laitière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol,Eau
<i>Nocardia</i>	Sol,Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol,Eau, Laitière, Fumier
<i>Sacharomonospora</i>	Matière de décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol,Eau,laitière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>thermomonospora</i>	Matière de décomposition et fermentation

10. Importance et application des actinobactéries

Les actinobactéries représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactifs entre autre les antibiotiques et des enzymes extracellulaires (**Loucif, 2011**).

En biotechnologie microbienne, les actinobactéries jouent un rôle primordial dans les domaines, agronomique, alimentaire et environnemental (**Nouioui, 2014**), ainsi que le domaine pharmacologique (**Ortiz- Ortiz et al., 1984**). La recherche de nouveaux actinomycètes constitue une composante essentielle à la découverte de médicaments à base de produits naturels et à large spectre d'activité biologique, tels que les antibiotiques antibactériens et antifongiques et les substances toxiques, cytotoxiques, neurotoxiques, antimitotiques, antivirales et anticancéreuses (**Newman et Cragg, 2007; Williams, 2009; Chen et al., 2010b**). Récemment, de nouveaux objectifs ont été ajoutés au dépistage général : la recherche de nouvelles molécules actives contre le sida, l'immunosuppression, la maladie d'Alzheimer, le processus de vieillissement et certaines maladies tropicales ; ces objectifs visent à la découverte de nouveaux médicaments (**Parthasarathi et al., 2011**).

10.1 Lutte biologique

La fonction écologique principale des actinobactéries au sein des écosystèmes est la décomposition des matières organiques complexes (**Prescott et al., 2010**). Cette activité est due à la présence d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques, comme les protéases, les nucléases, les lipases, ... (**Prakash et al., 2012**), ainsi que les enzymes d'hydrolyse des sucres complexes, tel que la cellulose et l'hémicellulose. De même, certaines espèces d'actinobactéries attaquent la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (**Maier et al., 2009**). Au niveau de la rhizosphère, les actinomycètes forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes en contribuant à la promotion de leur croissance par des effets directs et indirects (**Barreto et al., 2008**). Parmi les effets directs, la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote, et la production de phytohormones, (**El-Mehalawy et al., 2004**). Tandis que les effets indirects, ils peuvent être dus au contrôle des agents phytopathogènes par la production de métabolites secondaires, tels que les antibiotiques (**Barreto et al., 2008**), ou par la compétition nutritionnelle vis-à-vis des agents pathogènes (**Getha et al., 2005**).

10.2. Production d'antibiotiques

Par leur diversité écologique, leur hétérogénéité biochimique et leur capacité exceptionnelle à produire des métabolites secondaires, les actinobactéries sont considérées comme des candidats potentiels pour la recherche de divers composés intéressants en industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, agricole et autres. Cependant, le plus grand intérêt des actinobactéries reste leur grande capacité à produire des antibiotiques qui peuvent potentiellement détruire ou inhiber divers microorganismes. D'ailleurs, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinobactéries et plus précisément du genre *Streptomyces* (Sibanda *et al.*, 2010). Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques, on peut citer, les aminoglycosides, les anthracyclines, les glycopeptides, les bêta-lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les nucléosides,... (Messoudi, 2013). La Figure 04, illustre les origines des antibiotiques. Parmi les premières découvertes d'antibiotiques synthétisés par les Actinobactéries, - la streptomycine, isolée en 1944 d'une actinobactérie du sol, *Streptomyces* ou *Actinomyces griseus*. La streptomycine a l'avantage d'être active contre le Bacille de Koch. Elle a été utilisée avec succès dans la tuberculose (pulmonaire, méningite, rénale). - la chloromycétine, extraite en 1947 des cultures du *Streptomyces venezuelae*. La chloromycétine est à la fois bactériostatique et bactériolytique, d'où la nécessité de l'employer avec précaution dans les maladies à germes riches en endotoxines comme le Bacille de la typhoïde (la lyse brutale d'une grande quantité de bactéries libère une dose d'entoxines qui peut être mortelle). Bien maniée en capsules ou comprimés, elle fait merveille dans des maladies qui échappent à la pénicilline et aux sulfamides, en particulier dans la fièvre typhoïde, le choléra,... Sa composition chimique est connue : chloramphénicol. - l'auréomycine, qui doit son nom à sa couleur. Elle a été découverte en 1948 à partir du *Streptomyces aureofaciens*. C'est un bactériostatique peu toxique qui triomphe dans le typhus, la fièvre de Malte, la psittacose, maladie des perroquets (*Psittacus*) transmissible à l'homme. - la Terramycine, extraite en 1950 des cultures de *Streptomyces rimosus*, elle se présente en poudre jaune. Son action est voisine de celle de l'auréomycine. Elle est utilisée par la bouche en capsules glutinisées (Bycroft, 1988).

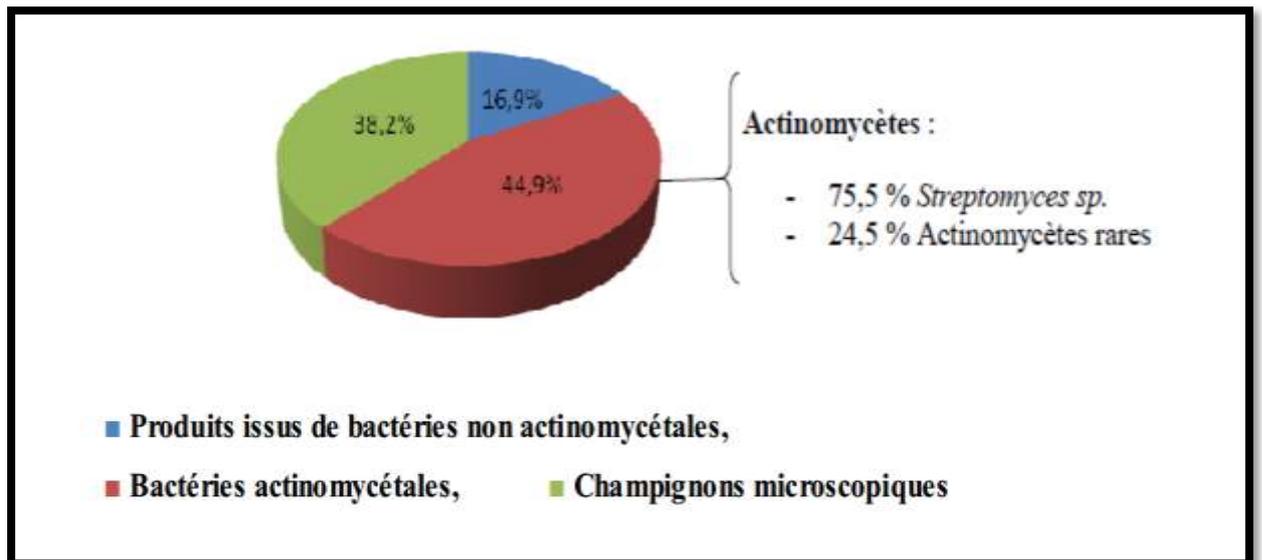


Figure 04: Origine des antibiotiques (Berdy, 2005)

10.2.1. Mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est encore mal connu. Les antibiotiques paraissent freiner quelques-unes des réactions importantes du métabolisme cellulaire. En leur présence, les germes sensibles ne peuvent plus capter et utiliser les éléments nutritifs indispensables du milieu (acides aminés ou sucres...). On considère donc les antibiotiques comme des inhibiteurs enzymatiques. Les bactéries non sensibles, tout comme nos propres cellules accomplissent normalement leur métabolisme, présentant une chaîne de réactions catalytiques différentes qui ne donne pas prise à l'antibiotique. De même, les bactéries devenues résistantes auraient trouvé la parade en changeant de comportement enzymatique. Leur nouvelle modalité métabolique est un caractère héréditaire qui persiste même en l'absence de l'antibiotique. Il y aurait en quelque sorte création d'une nouvelle race biologique (Lacey, 1997).

10.2.2. Intérêts des antibiotiques

Les actinomycètes possèdent une importance économique majeure (Djini, 2009). D'après Anibou *et al.* (2008), une analyse a été réalisée sur le nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse indique que plus de 60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart ont été extraits à partir d'actinomycètes, tels que l'actinomycine D et la mitomycine (Demain et Lancini, 2006), et enzymes telles que des cellulases et des xylanases utilisés dans le traitement des effluents (Basilio *et al.*, 2003 et Oskay *et al.*, 2004).

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives (Vijayakumar *et al.*, 2007). Le Tableau 04, résume les principaux intérêts.

Tableau 04 : Importance thérapeutique de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Chater, 2006).

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

Par ailleurs, l'introduction d'une nouvelle substance antimicrobienne dans l'arsenal thérapeutique demande toute une série d'études et d'épreuves préalables comportant en particulier :

- Recherche de l'action antimicrobienne spécifique étudiée *in vitro* sur les diverses espèces.
- Essai de la substance sur divers animaux pour connaître à la fois sa toxicité, son efficacité *in vivo*, son élimination, les taux de concentration sanguine favorable, les meilleurs modes d'administration.
- Application chez l'homme du produit purifié reconnu actif contre le germe et inoffensif pour l'hôte à la dose curative. Ne sont utilisables en effet, que les substances dont la dose toxique pour l'homme est très supérieure à la dose curative.

Ces diverses épreuves éliminent successivement un grand nombre de substances mises à l'essai. C'est ainsi que sur des dizaines de milliers d'antibiotiques isolés ces dernières années, quelques centaines seulement ont été retenues pour des applications thérapeutiques (Miller, 1982).

Le métabolisme bactérien produit d'autres composés aux propriétés très variées. Ces composés sont classés en différentes familles en fonction de leur rôle. Ainsi, les actinobactéries peuvent synthétiser des antifongiques, des enzymes, des vitamines, des pigments, des bio herbicides, des anti tumoraux, des inhibiteurs d'enzymes (Solecka *et al.*, 2012).

10.3. Les antifongiques

Parmi les molécules élaborées par les actinomycètes, seulement 20% représentent les antifongiques (Sanglier *et al.*, 1993). Les antifongiques s'avèrent avoir un rôle important, dans la lutte contre les maladies mycosiques et le contrôle biologique des champignons en agriculture (Thakur *et al.*, 2007).

10.4. Production d'enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (Theilleux, 1993). Cependant, les actinobactéries sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que, les protéases et les chitinases (Tanaka *et Amura*, 1990), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lypases (Parket *al.* 2002). Parmi les espèces productrices, le *Streptomyces coelicolor* sécrète de nombreuses hydrolases incluant : 60 peptidases/hydrolases, 13 chitinases/chitosanases, 8 cellulases/endoglucanases, 3 amylases et 02 pectates lyases (Bentley *et al.*, 2002).

10.5 Production de vitamines

La vitamine B 12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des actinobactéries. L'isolement de la vitamine B 12 à partir de fermentations d'actinobactéries a suscité un intérêt considérable (Rickes *et al.*, 1948 ; Lichtmen *et al.*, 1949). Plusieurs études ont suggéré que certaines actinobactéries qui ne produisent pas d'antibiotiques, synthétisent plus de vitamines. Il a été également démontré que les actinobactéries produisaient d'autres vitamines hydrosolubles, telles que, la thiamine et le dérivé d'acide pteroylglutamique qui favorisent la croissance de certaines souches de *leuconostoc citrovorum* et de la coenzyme A.

10.6. Production de pigments

Les pigments mélanoïdes sont des produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine responsable de la couleur. La production des pigments est l'un des caractéristiques des actinobactéries. Les pigments des *Streptomyces* peuvent être soit des endopigments, soit des exopigments. Cette production est contrôlée par différents paramètres : pH du milieu, l'aération, température de croissance, les sources de carbone et d'azote ainsi que les mécanismes respiratoires. Les pigments possèdent des propriétés radioprotectrices et antioxydants. Ils peuvent protéger le microorganisme vivant des rayons ultraviolets. Ces actinobactéries ont également la capacité à synthétiser et à produire des pigments noir (mélanines ou mélanoïdes). Ces derniers sont considérés comme un critère utile pour les études taxonomiques. D'ailleurs, l'industrie textile produit et utilise environ 1.3 million de tonnes de colorants, de pigments et de précurseur de colorants. (Harir, 2018). La Figure 05, résume les différentes applications biotechnologiques des actinobactéries.



Figure 05 : Différentes applications biotechnologiques des actinobactéries.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Sites de prélèvement d'échantillons

1.1. Station thermale de la commune de Hammam BOUHADJAR

Les prélèvements ont été effectués dans la station thermale de Hammam Bou Hadjar. Cette dernière est fondée en 1974 dans la commune de Hammam Bou Hadjar, dans la wilaya d'Ain Témouchent(Figure 06).

❖ Caractéristiques de la source thermale

Température de l'eau : entre 57 à 72°C(https://fr.wikipedia.org/wiki/Source_thermale)

Place géographique de la station thermale HBH :



▽ Point de prélèvement

Figure 06 : Place géographique de la station thermale de Hammam Bouhadjar (prise par satellite).

1.2. Sebka d'Oran

La Sebka d'Oran est un lac situé à 15 km au sud de la ville d'Oran dans la commune de Misserghin. Elle est distante d'environ 12 km de la mer Méditerranéenne. La sebka occupe une longueur d'orientation approximative sud-ouest/nord-est de 40 km et d'une largeur de 6 à 13 km (**Ben Abdellah, 2014**). La figure 07, illustre la position géographique de la Sebka d'Oran.



◇ Point de prélèvement

Figure 07 : Localisation du lieu de prélèvement - Sebka d'Oran, prise par satellite 2018.



Figure08 : Vue générale de la zone de prélèvement Sebka d'Oran prise par BOUZADA.S

1.3. Région de la wilaya de BECHAR (commune de KNADESSA et Gouray)

La wilaya de Béchar se situe dans le sud-ouest d'Algérie. Elle se caractérise par un climat aride. Le sol de la région se caractérise par un faible taux d'humidité, avec un pourcentage non négligeable en matière organique (Messaoudi, 2013)

2. Echantillonnage

2.1. Echantillon d'eau

L'isolement des actinobactéries a été réalisé à partir de deux échantillons d'eau prélevés de deux différentes sources thermales situées dans la daïra de HAMAM BOUHADJAR, Wilaya de Ain Témouchent. Les prélèvements d'eau ont été réalisés dans des flacons stériles de 250 ml, conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. La figure 09 présente les sources thermales.



Figure 09: les deux sources de prélèvement d'échantillon d'eau (A: source thermal n 1; B : source thermal n2)

Une eau d'une source thermique est généralement, chaude, naturellement enrichie en minéraux par une activité volcanique ou géothermique.

2.2. Echantillons de sols

2.2.1. Sol de sebkha

Des prélèvements de sol ont été effectués au niveau de la Sebkha d'Oran à partir de 3 endroits éloignés. Environ 250 g de sol ont été prélevés de chaque endroit puis introduits dans des sachets stériles. Les échantillons sont ensuite mélangés afin d'obtenir un échantillon homogénéisé et représentative du site de prélèvement. Il est à noter que chaque échantillon représente 3 points séparés du même site de prélèvement. La même technique a été entreprise pour les deux autres points de prélèvement. La Figure 10, montre les points de prélèvement.



Figure 10 : Différents échantillons de sol de la sebka d'Oran. A : échantillon 1 ; B : échantillon 2 ; C : échantillon 3

2.2.2. Sol saharien

Les deux échantillons de sol aride nous ont été aimablement fournis par un membre de la famille résidant dans la wilaya de Béchar.

Des prélèvements de sol saharien ont été effectués au niveau de deux communes situés dans la wilaya de Béchar. Le premier échantillon a été prélevé dans la commune de KNEDESSA - BECHAR tandis que le second échantillon provient de la commune GOURAY - BECHAR. Environ 250 g de sol saharien ont été prélevés de chaque endroit puis introduits dans des flacons stériles.

3. Isolement des actinobactéries

Les échantillons de sol ont été tout d'abord séchés puis broyés afin de faciliter l'isolement des actinobactéries.

3.1. Prétraitement des échantillons

Afin d'augmenter le nombre des actinobactéries du sol au cours des isollements, les échantillons de sol ont subi un prétraitement par un séchage à la température ambiante pendant une durée de 3 à 5 jours.

3.2. Enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO_3)

Cette méthode consiste à mélanger 10g d'échantillon de sol avec 1g de CaCO_3 . Le mélange est incubé dans une étuve à 40°C pendant 7 à 9 jours dans une atmosphère saturée d'humidité. Ce prétraitement a pour avantage, la réduction de la flore fongique ainsi que l'augmentation du nombre d'actinobactéries (**Harir, 2018**).

3.3. Les milieux de culture utilisés

Parmi les milieux de culture sélectifs des actinobactéries, trois milieux sont utilisés pour l'isolement de ces microorganismes. La composition de ces milieux de culture est présentée en Annexe 01.

- **Milieu GLM** (gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt)(**Kitouni *et al.* 2005**).
- **Milieu ISP2** (International *Streptomyces*Project) (**Ara *et al.*, 2012**).
- **Milieu CAA** (gélose caséine amidon agar) (**Sharma *et al.*, 2011**).

3.4 . Ensemencement des échantillons

➤ L'eau

Cette étape est de telle importance que de sa qualité dépend la représentativité des résultats. De ce fait, toutes les étapes ont été réalisées dans des conditions stériles. L'isolement des souches a été effectué sur les trois milieux précédemment cités (milieu ISP 2 ; milieu GLM ; milieu caséine amidon agar). Les échantillons d'eau sont tout d'abord homogénéisés à l'aide d'un vortex, 0,1 ml de chaque échantillon est ensuiteensemencé dans des boîtes de Pétri contenant l'un des trois milieux de culture. Les échantillons sont ensuite étalés à l'aide d'un râteau stérile puis incubés à 28 °C pendant 21 jours.

➤ Le sol

Pour isoler et dénombrer les espèces d'actinobactéries présentes dans nos échantillons de sol, nous avons utilisé la méthode de suspensions dilutions (**Badji *et al.*, 2005**). Cette technique consiste à prélever 10 g de sol et les introduire dans 100 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette suspension, des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) sont réalisées. Un volume de 0,1 ml correspondant à 100 µl des deux dernières dilutions (10^{-4} et 10^{-5}) sont étalés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 21 jours. La lecture est faite quotidiennement à partir du 3^{ème} jour d'incubation (**Djinni, 2009**).

4. Dénombrement des colonies

Le dénombrement des colonies d'actinobactéries est effectué après 21 jours d'incubation. Seules les colonies présentant les caractéristiques macroscopiques des bactéries d'Actinomycetales sont dénombrées.

5. Observation microscopique

Toutes les colonies bactériennes qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques aux actinobactéries : colonies dures et incrustées dans la gélose et présence de mycélium aérien, sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple au bleu de méthylène ainsi que la coloration de Gram. L'observation au microscope optique est effectuée avec les différents grossissements (**Kalyaniet al., 2012**). L'ensemble des isolats obtenus des différents échantillons de sols (salin et aride) sont repiqués sur le même milieu qui a servi à l'isolement.

6. Purification des isolats bactériens

Les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques et microscopiques sont purifiées afin d'obtenir des cultures pures. À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un inoculum à partir des colonies de milieu d'isolement, qui sera ensuite ensemencé par épuisement sur le même milieu que celui d'isolement sous forme des stries. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures. La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs après chaque repiquage (**Boussaber et al., 2012**).

7. Coloration de Gram et observation microscopique

Elles sont effectuées selon les méthodes classiques. Les isolats à coloration Gram positif et présentant un aspect filamenteux sont conservés sur gélose inclinée à 4 °C, avec un repiquage tous les 4 semaines.

8. Conservation des isolats d'actinobactéries

Seules les colonies à coloration Gram positif présentant les aspects caractéristiques des actinobactéries sont conservés sur milieu ISP2 à 4°C. Les isolats purifiés sont conservés afin de les utiliser pour des tests ultérieurs. Les isolats sont repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP 2. Ils sont ensuite incubés à 28 °C pendant 7 jours, puis conservés à 4°C. (**Oskay et al., 2004**). Pour l'identification de nos isolats, nous nous sommes basés sur des observations macroscopiques, microscopiques et des caractères physiologiques et biochimiques.

9. Aspect macroscopique et caractères culturels des isolats

L'aspect phénotypique et les caractères culturels représentent une grande importance en taxonomie bactérienne. Ils sont déterminés sur le ou les milieux de culture suivants : ISP2, GLM, CAA. L'importance de la croissance, le développement du mycélium aérien sur chaque

milieu, la pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence ou absence de pigments diffusibles dans la gélose sont observés et notés.

10. Morphologie des mycéliums (aériens et de substrat)

La morphologie des mycéliums est observée par la technique de culture sur lame. L'observation microscopique a été effectuée au grossissement (x 40).

11. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

11.1. Souches de microorganismes cibles indicatrices

Les microorganismes cibles proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie de l'Université d'Oran Ahmed Ben Bella, déposé dans la banque de donnée de la collection mondiale (ATCC). Les souches bactériennes ont toutes été vérifiées au laboratoire afin de nous assurer qu'il s'agissait bien d'espèces bactériennes en culture pure. Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques des bactéries indicatrices.

Tableau05 : Caractéristiques des bactéries indicatrices.

Microorganismes	Coloration de Gram	Code d'accésion
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC6633
<i>Pseudomonas auroginosa</i>	Gram -	ATCC 9027
<i>Sallmonella enterica</i>		ATCC1402
<i>Echerichia coli</i>		ATCC8737
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231
<i>Aspergillus.niger</i>	Champignon	INPV

ATCC: American Type Culture Collection. **INPV** : Institut Nationale de Protection des Végétaux.

11.2. Technique des stries croisées

L'activité antimicrobienne des isolats est évaluée par la méthode des stries croisées sur milieu ISP 2. Celle-ci consiste à ensemercer les isolats d'actinobactéries à tester en un seul trait à la surface du milieu solide en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 10

jours à 28°C. Les souches cibles sont ensemencées perpendiculairement à la strie longitudinale de l'actinomycète (Figure 11). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et 25 °C pendant 5 jours pour la levure et la moisissure.

La lecture des résultats s'effectue par la mesure de la distance d'inhibition entre les bordures de la souche cible et l'isolat d'actinobactéries testé.

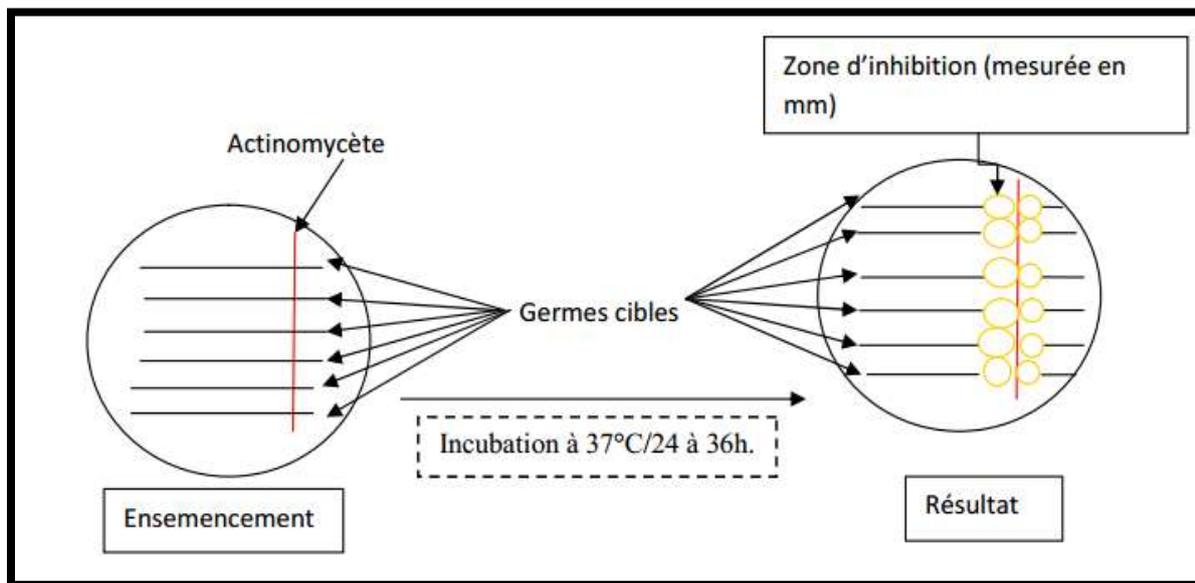


Figure 11: Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide par la méthode des stries croisées (Rothrock et Gottlieb, 1981).

11.3. Test de sensibilité aux antibiotiques

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions accompagnée d'une mesure de la densité optique à différentes longueurs d'onde suivant le germe étudié, ($DO = 0,08-0,1$) de la solution mère sur un spectrophotomètre ou la longueur d'onde est 625 nm. La charge de l'inoculum utilisée est de 10^8 UFC/ml pour les bactéries (Billerbeck *et al.*, 2002). Les disques d'antibiotiques sont déposés aseptiquement à environ 10mm de la périphérie de la boîte de Pétri coulé précédemment par milieu Muller Hinton (Annexe 01), à l'aide d'une pince stérilisée par flambage, en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Les boîtes sont placées dans un réfrigérateur à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2h puis mises à incuber à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré après 72 h d'incubation (Chun *et al.*, 1998 ; Monciardini *et al.*, 2003). lorsque le diamètre de zone d'inhibition est supérieur ou égal à 15 mm l'isolat est sensible, l'absence de zone l'isolat est résistante (R).

Tableau06 : Les antibiotiques utilisés dans le test d'antibiogramme leur familles et leur mode d'action.

Antibiotiques	Charge (µg/disque)	La famille	Mode d'action
Ciprofloxacin (CIP ⁵)	5	fluoroquinolones	bactéricide
Doxycycline HCl (DO ³⁰)	30	tétracyclines	bactériostatique
Gentamicine (GEN ¹⁰)	10	aminosides	bactéricide
Amoxiclav (AMC ³⁰)	30	Aminopénicillines	bactéricide
Cefixime (CFM ⁵)	5	Bêta-lactamines	bactéricide
Cefotaxime (CTX ³⁰)	30	bêta-lactamines	Bactéricide
Amikacine (AK ³⁰)	30	aminosides	Bactéricide
Erythromycine (E ¹⁵)	15	macrolides	bactériostatique

12. Etude physiologique des isolats d'actinobactéries

Des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques ont été effectués :

12.1. Hydrolyse de la caséine

La caséine, protéine de lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes. Chaque isolat bactérien testé est ensemencé sur milieu gélosé en boîte de Pétri additionné de 5% de lait stérile. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. L'observation des zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies témoigne l'hydrolyse de la caséine (caséine+) (Staneck et Roberts, 1974 ; Géraldine *et al.*, 1981). (Annexe 01)

12.2. Dégradation de l'amidon

La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1% d'amidon, elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide. Les souches d'actinobactéries sont ensemencées sur gélose à l'amidon. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par

l'absence de coloration autour des colonies. Les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu (**Marchal et Bourdon, 1973**). (Annexe 01)

12.3. Dégradation de la gélatine

Les isolats d'actinobactéries sont cultivés sur milieu gélose nutritif contenant 4% (v/v) de gélatine puis incubés à 30 °C pendant 21 jours. Après incubation, les zones où la gélatine est hydrolysée, la gélose devient moue correspondant ainsi aux zones d'hydrolyse (**Marchal et Bourdon, 1973, modifié**). (Annexe 01)

12.4. Pouvoir hémolytique

Ce test consiste à ajouter dans un flacon contenant 200 ml de gélose nutritive stérile en état de surfusion (45°C), une quantité de sang humain avoisinant un pourcentage de 5%. Le flacon est ensuite homogénéisé délicatement pour ne pas éclater les cellules sanguines. Après homogénéisation, le contenu du flacon est coulé dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement du milieu, les actinobactéries sont ensemencées sous forme d'un trait au centre de chaque boîte de Pétri. Les zones claires au tour de la colonie représentent la zone d'hémolyse.

12.5. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone

Les glucides (oses, diholosides, polyholosides,...) peuvent être dégradés par de nombreuses bactéries suivant deux grandes voies : l'oxydation(en aérobiose) et la fermentation(en anaérobiose). Ce test consiste à apprécier la croissance des actinobactéries en présence de composés glucidiques à raison de 10g/l comme seule source de carbone, additionnés au milieu ISP2. Les isolats d'actinobactéries sont ensemencées en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu gélosé en boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 21 jours. Lorsque la croissance est meilleure et nettement supérieure à celle du témoin sans sucre dans ce cas le test est considéré comme positif (**Harir, 2018**). Les composés glucidiques et les dérivés testés sont les suivants : lévulose, raffinose, rhamnose, maltose, lactose, D.fructose, D.glucose, Sucrose, D.galactose, Xylose.

13. Croissance en présence d'inhibiteurs

13.1. Différentes concentration de Na Cl

Le milieu ISP2 contenant des concentrations croissantes en Na Cl (3,5, 7, 9 et 10 %) estensemencé par les spores prélevées d'une culture de 14 jours de l'isolat d'actinobactéries identifié. L'incubation est réalisée à la température de 28 °C pendant 21 jours. La croissance est ensuite notée selon une échelle : (faible, moyenne, bonne croissance).

13.2. Croissance à différentes températures

Chaque bactérie a une température pour laquelle sa croissance est optimale, ainsi que des températures extrêmes au-dessus des quelles elle ne se développe pas. Ce test consiste à évaluer la croissance des souches à différentes températures sur le milieu ISP2. La croissance des souches d'actinobactéries a été testée à différentes températures (5, 15, 20, 28et 37°C) pendant 21jours (**Meklat, 2012**).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Isolement des actinobactéries

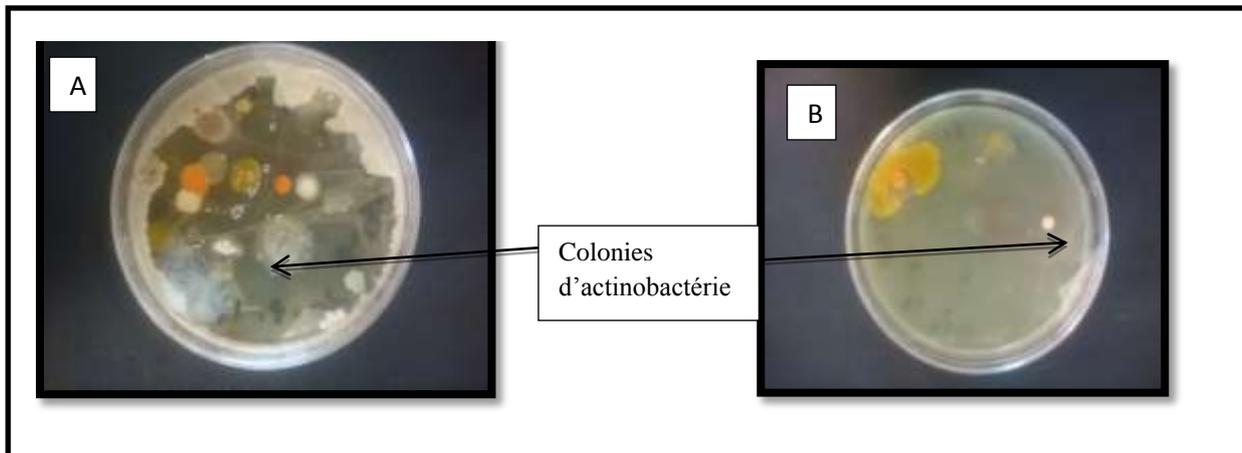


Figure 12 : Deux boîtes de Pétri représentant un isolement d'actinobactéries à partir d'un échantillon de sol saharien de KNADESSA (A : dilution 10^{-4} ; B : dilution 10^{-5}).

Après incubation durant 14 à 21 jours, des colonies présentant des caractéristiques d'actinobactéries apparaissent sur les 3 milieux d'isolement (ISP2, GLM, CAA) ajusté à un pH 7 additionnée à un antibiotique (ampicilline 0.2%) et un antifongique (fungisone 0.1%). Ces colonies sont reconnues par leurs aspects macroscopiques. Ce sont des colonies dures incrustés dans la gélose. Microscopiquement, elles présentent des hyphes filamenteux ramifiés. Au total, 6 isolats d'actinobactéries sont isolés. Au cours de la purification, 2 isolats été contaminé (provenant de l'échantillon d'eau de la station thermale) donc, il nous a été impossible de le récupérer malgré les nombreux repiquages successifs. Le Tableau 07 représente les résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des différents échantillons analysés. Les résultats indiquent que le nombre des colonies d'actinobactéries sont faiblement présent dans les échantillons A2, A3 et B1 (01 colonie/échantillon), alors que l'échantillon B2 a permis l'obtention de 2 colonies. Ce résultat peut être expliqué par sa richesse en matière organique par rapport aux autres échantillons. Plusieurs travaux affirment que le nombre des actinobactéries est en corrélation positive avec le pourcentage de la matière organique (**Hayakawa *et al.*, 1988 ; George *et al.*, 2010**). Nos résultats illustrés par la Figure 13, montrent que le milieu ISP2 s'est révélé le meilleur milieu pour l'isolement d'actinobactéries par rapport aux autres milieux. Cette propriété peut être due d'une part aux substances antibactérienne et antifongique et d'autre part, à sa richesse en substrat carboné et azoté.

Tableau 07 : Résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des différents échantillons analysés dans les trois milieux de culture.

Milieux de culture	Eau de la station		Sols de sebkha			Sols sahariens	
	Ech ₁	Ech ₂	Ech1	Ech ₂	Ech ₃	Ech ₁	Ech ₂
CAA	0	0	0	0	0	0	1
GLM	0	0	0	1	0	0	0
ISP ₂	0	1	0	0	1	0	2

B1 : l'isolat isolé de sol saharien sur milieu ISP2. A2 : l'isolat isolé de sol de sebkha sur le milieu GLM.

B3 : l'isolat isolé de sol saharien sur milieu ISP2. B4 : l'isolat isolé de sol de sebkha sur le milieu ISP2.

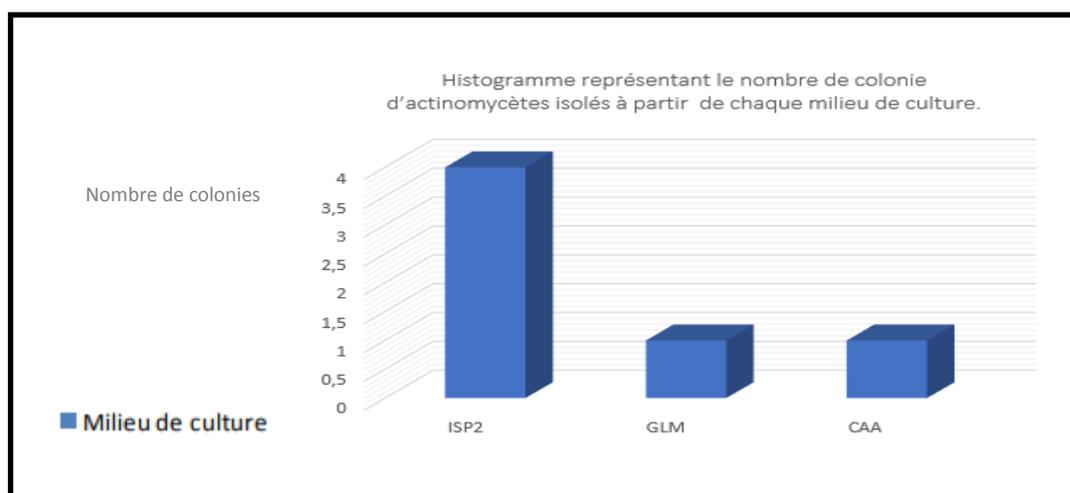


Figure 13 : Histogramme représentant le nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture.

➤ Discussion

D'après (Boughachiche *et al.*, 2012 ; Reghioua *et al.*, 2008), les travaux d'isolements des actinobactéries à partir des milieux extrêmes sahariens et le sol salin sont relativement rares en Algérie.

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinobactéries n'existe pas, de ce fait il est recommandé de varier les méthodes et les milieux d'isolement dans un objectif de réussir à un isolement important de la flore Actinomycetales (Boudemagh, 2007). Plusieurs auteurs considèrent que la combinaison d'un prétraitement chimique ou physique des échantillons avec l'addition des antibiotiques est une précaution essentielle dans l'isolement des actinobactéries.

Au cours de notre travail nous avons utilisé deux techniques de prétraitement des échantillons du sol, l'une physique c'est le séchage des échantillons du sol à l'air libre pendant sept jours. Elle a pour but de réduire la flore bactérienne indésirable. D'après **Fan et al., (2010)**, le séchage des échantillons du sol pendant 7 à 21 jours, réduit considérablement le nombre des champignons ainsi que les bactéries. L'autre technique est chimique, c'est l'enrichissement par le bicarbonate de calcium (CaCO_3), pour faciliter l'isolement sélectif des actinobactéries, ayant une croissance lente, par rapport aux bactéries et aux champignons. L'enrichissement des échantillons du sol par le bicarbonate de calcium est une technique décrite par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**. Cette technique permet non seulement une augmentation du nombre de colonies des actinobactéries, mais aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne (**Gurung et al., 2009**).

Le nombre faible d'actinobactéries isolés à partir des échantillons de sols peut-être expliqué par la période d'échantillonnage réalisé pendant la saison hivernale (mois de Février), ainsi que par les facteurs physico-chimiques (le pH, la matière organique et le taux d'humidité), qui influencent considérablement sur le nombre ainsi que le genre d'actinobactéries qui abrite le sol. Selon les travaux de Hiltner et Stromer (**In Loqman, 2009**), les actinobactéries représentent 20% de la flore microbienne du sol au printemps, alors qu'en automne la densité des actinomycètes dépasse les 30%. Cet accroissement est probablement lié à la disponibilité des éléments nutritifs et aux conditions physico-chimiques (**Hop et al., 2012 ; Adegboye et al., 2012 ; Lee et Hwang, 2002**).

2. Caractères culturels

Après 7 à 10 jours d'incubation, des colonies jeunes sont apparues, de forme irrégulière, sèches, de couleur beige à crème correspondant au mycélium de substrat. Celui-ci est formé dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement dans le milieu de culture. Ce mycélium peut être aussi observé sur le dos de la colonie lorsque le milieu est totalement transparent.

Sur les milieux ISP2, GLM, CAA, un aspect poudreux de couleur blanche à crème est observé dès le début de la deuxième semaine, c'est le mycélium aérien. Ce dernier a continué à se développer durant toute la deuxième semaine. Dès le début de la troisième semaine jusqu'au 21^{ème} jour, le mycélium aérien a pris progressivement une couleur beige foncé à marron clair. Ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens. La figure 14 illustre les caractères culturels des actinobactéries.



Figure 14 : Caractères cultureux des actinobactéries.

3.Caractères morphologiques

Les caractères phénotypiques des isolats purifiés, observés sous microscope optique (grossissement x40), sont présentés par la Figure15. Les isolats présentent un mycélium de substrat formé de longs hyphes fins, ramifiés et ne portant pas de spores. A partir de ces hyphes, les isolats ont développé un autre mycélium aérien, moins ramifié que celui du substrat et se différencie aux extrémités des hyphes en longues chaînes de spores. Les spores ont une forme cylindrique, non mobiles. Il est à noter aussi qu'aucune autre structure n'est observée comme les sporanges ou les sclérotés. La coloration de Gram a permis de mettre en évidence que les quatre isolats d'actinobactéries sont des bactéries à coloration Gram positif. le Tableau 08 et la Figure 15montrent les caractères morphologiques des actinobactéries.

Tableau 08 : Caractères morphologiques des actinobactéries.

Isolats	Macro morphologie	Micro morphologie	Forme d'hyphe	Diamètre des colonies (mm)
B1	Colonies blanchâtre à contour irrégulier sous forme de chou-fleur	Coccien chaînette	Droite	(2-7)
A2	Blanc cassé, gris, jaune Orangé.colonies grises foncées, adhérent entre elles, poudreuses	Bacilles en chainettes	Droite	(1-3)
B3	Blanc cassé, gris, jaune Orangé.Colonies de grande taille avec un contour arrondi, aplatis, poudreuses	Bâtonnets longs, isolés	Droite flexueuse	(2-4)
B4	Colonies grise, blanc cassé, gris.colonies grises foncées, adhérent entre elles, poudreuses	bacille en chaînette	Flexueuse	(2-5)

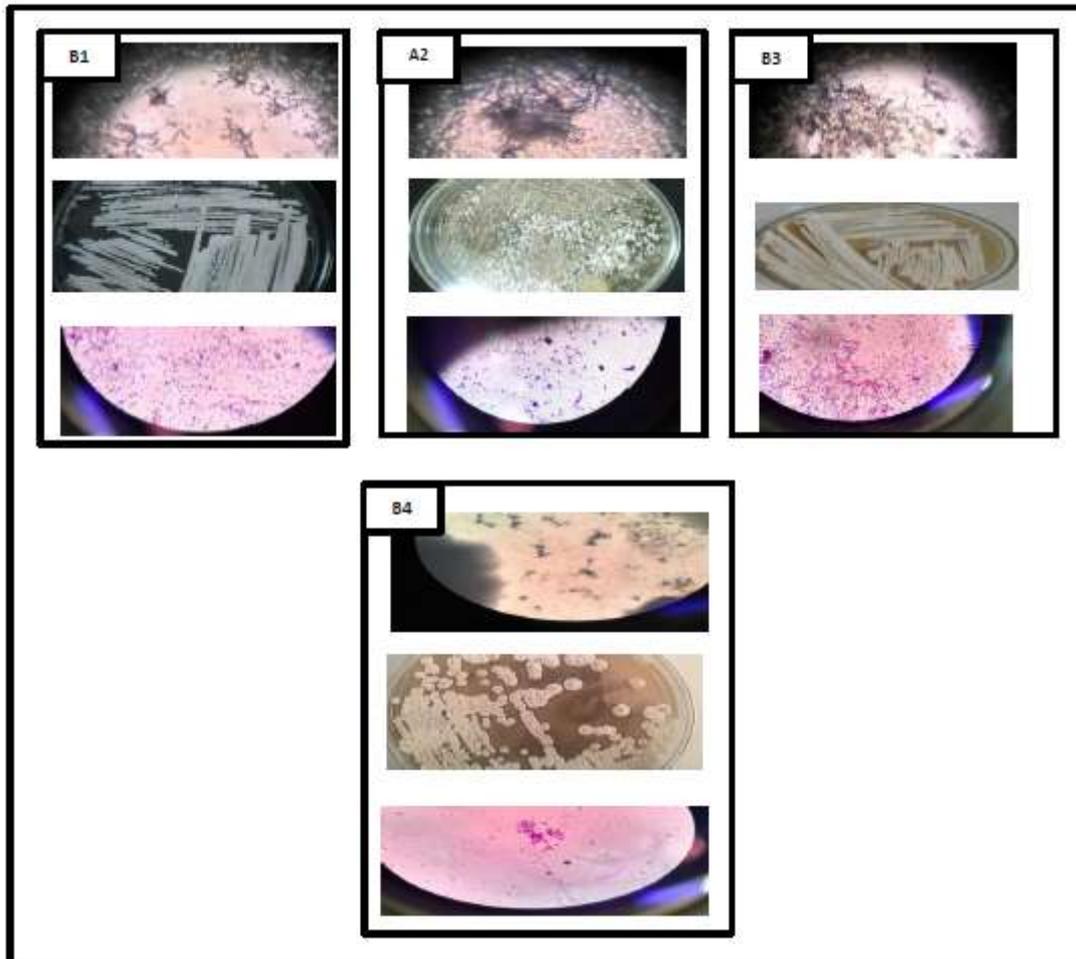


Figure 15 : Caractères morphologique et microscopique des quatre isolats d'actinobactéries.

4. Conservation des isolats

La figure 16 montre la conservation des isolats d'actinobactéries dans des tubes contenant le milieu ISP2 gélosé incliné après 14 jours d'incubation.



Figure 16: Conservation d'isolats d'actinobactéries dans des tubes contenant le milieu ISP2 gélosé incliné.

5. Tolérance aux différentes températures et salinité

Les résultats illustrés par le Tableau 09 et la Figure 17 montrent que tous les isolats sont capables de croître dans un intervalle de salinité allant de 3 à 10%. (Annexe 02)

D'autre part, les actinobactéries testées sont capables de croître dans une gamme de température allant de 15 à 30°C, avec un optimum de croissance entre 20 et 30°C. En revanche, aucune croissance n'a été obtenue à la température 5°C, alors qu'une très faible croissance a été observée à la température 37°C. Le Tableau 09 présente les résultats de la tolérance à la salinité et aux différentes températures.

Tableau 09 : Résultats de la tolérance à la salinité et aux différentes températures.

Actinobactéries	Croissance à différentes températures (°C)					Croissance à différentes concentrations de NaCl (%)				
	5	15	20	30	37	3	5	7	9	10
B1	-	+	+	+	-/+	+	+	+	-/+	+
A2	-	-/+	+	+	-/+	+	+	+	+	+
B3	-	-/+	+	+	-/+	+	+	+	+	+
B4	-	+	+	+	-/+	+	+	+	+	+

(+) : positif ; (-/+) : plus ou moins, (°C) : croissance à différentes températures. % : concentration de NaCl.

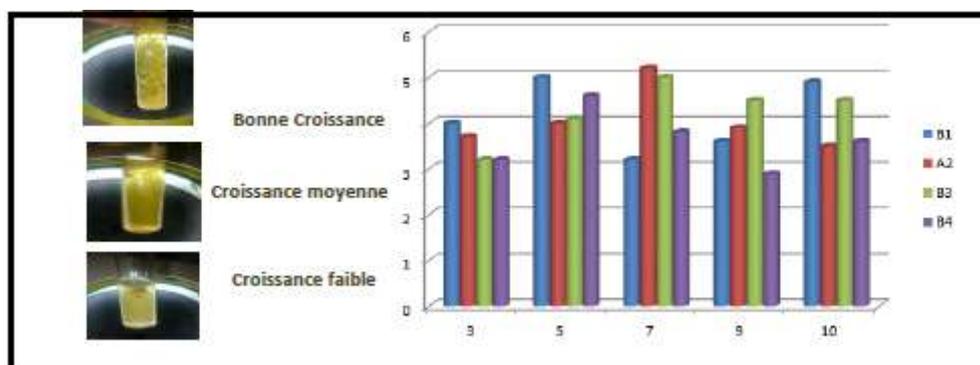


Figure 17: Croissance des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de différentes concentrations de NaCl.

Les isolats bactériens ont montré une bonne tolérance aux différentes concentrations de NaCl testées et avaient la capacité de croître même dans un milieu hypersalé (10 % de NaCl). Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Gochnauer et al., 1975** et **Zenova et al. 2011**).

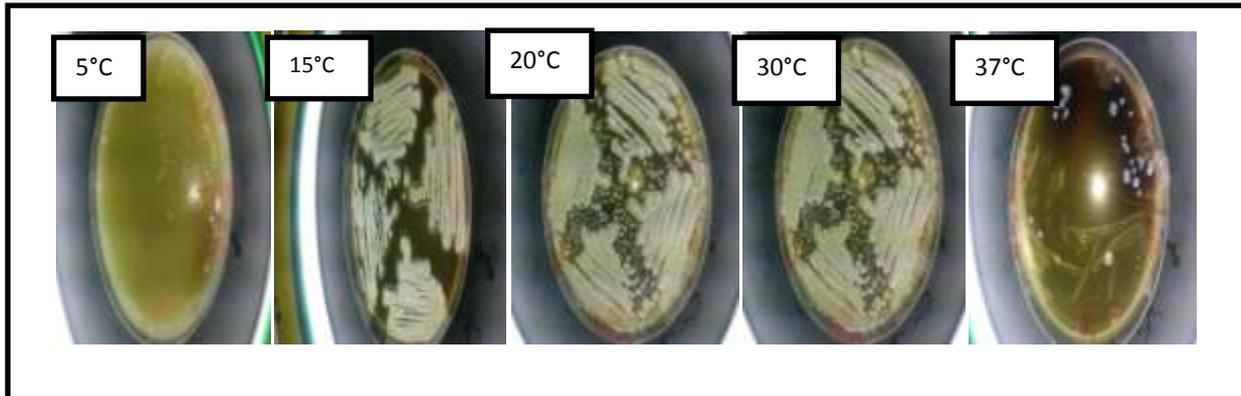


Figure 18: Résultats de la croissance des actinobactéries dans différentes températures (5, 12, 20, 30 et 37°C).

➤ Discussion

La température de croissance des quatre isolats se situe entre 15 et 30°C, avec un optimum d'environ 28 °C. Ces isolats sont inhibés à 5°C et ont présenté une très légère croissance à 37°C. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec (**Kroppenstedt et Evtushenko, 2006**) et (**Zhe Lang et al., 2017**). Par ailleurs d'autres études ont signalé que certaines espèces d'actinobactéries ont la capacité de croître même à une température de 40 °C (**petrosyan et al., 2003**).

6. Résultats d'études physiologiques et biochimiques

6.1 Assimilation des sucres

Les résultats de l'assimilation des sucres sont présentés dans le Tableau 10 et la Figure 19. Pour l'utilisation des sucres, nous constatons tout d'abord que les quatre isolats ont bien assimilé le maltose, le glucose, le lactose, le raffinose, le galactose et le saccharose. Nous avons constaté aussi que l'isolat A2 a assimilé la majorité des sucres testés à l'exception de lévulose et xylose. En revanche, aucun isolat n'a pu assimiler la xylose. Ce test révèle également que les quatre isolats d'actinobactéries assimilent différemment le reste des sucres (fructose, lévulose et rhamnose).



Figure 19 : Résultats de l'assimilation des sucres par les actinobactéries.

Tableau 10 : Assimilation des composées glucidiques comme seules sources de carbone

<i>Actinobactérie</i>	Mal	Fru	Lév	Glu	Lac	Rham	Raf	Gal	Sac	Xyl
B1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
A2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
B3	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
B4	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-

(+): positive; (-): négative. **Glu** : glucose, **Mal** : Maltose, **Fru** : Fructose, **Lév** :Lévulose, **Glu** : glucose, **Lac** : Lactose, **Rham** : Rhamnose , **Raf** : Raffinose, **Gal** : Galactose, **Sac** : Sacarose, **Xyl** : Xylose.

7. Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne des actinobactéries sont illustrés dans le Tableau 11 et les Figures 20 et 21. D'après ces résultats, certains sont fortement ou moyennement actifs, alors que d'autres le sont faiblement. Nous avons constaté que trois isolats d'actinobactéries (A2, B3 et B4) ont montré une activité antibactérienne et antifongique non négligeables vis-à-vis des microorganismes testés. Nous avons constaté aussi que tous les isolats se sont révélés actives au moins vis-à-vis d'une ou de deux bactéries indicatrices. L'isolat B 3 a présenté la zone d'inhibition la plus importante avec une distance d'environ 25 mm contre *Pseudomonas aeruginosa*, en revanche, l'isolat B4 s'est révélé le moins actif avec des diamètres d'inhibition ne dépassant pas 7 et 11 mm respectivement contre *Pseudomonas aérogenosa* et *Salmonella enterica*. L'activité antagoniste la plus importante est obtenue par les isolats (B3, B1 et A2). Ces isolats possèdent un pouvoir antagoniste vis-à-vis de la plupart des souches testés. Les autres isolats se sont révélés peu efficaces (Tableau 11). Les isolats A2 et B1 ont montré une importante action contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 20 et 22 mm respectivement. Les autres isolats testés se révèlent peu ou pas sensibles. L'isolat B1 est le seul ayant montré une activité vis-à-vis de l'espèce *Candida albicans* avec une distance d'environ 13 mm. Par contre les isolats B1, B3 et B4 ont montré une activité vis-à-vis la moisissure *Aspergillus niger*.

Tableau 11: Résultats de l'interaction des actinobactéries avec les souches indicatrices.

Isolats d'actinobactéries	Activité vis-à-vis (mm)				
	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus Aeureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Aspergillus niger</i>
B1	-	22	13	18	Sensible
A2	12	20	-	20	Résistant
B3	25	6	-	5	Sensible
B4	7	-	-	11	Sensible

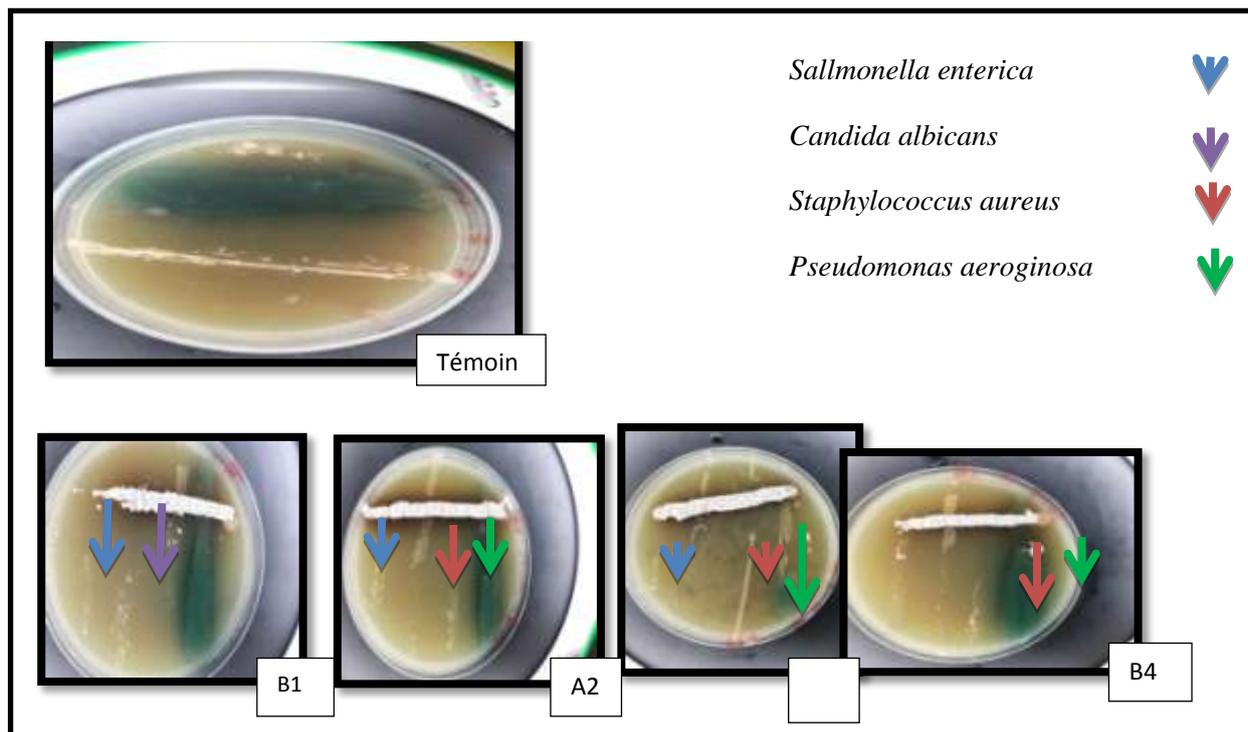


Figure 20: Résultats des interactions des actinobactéries avec des souches cibles.

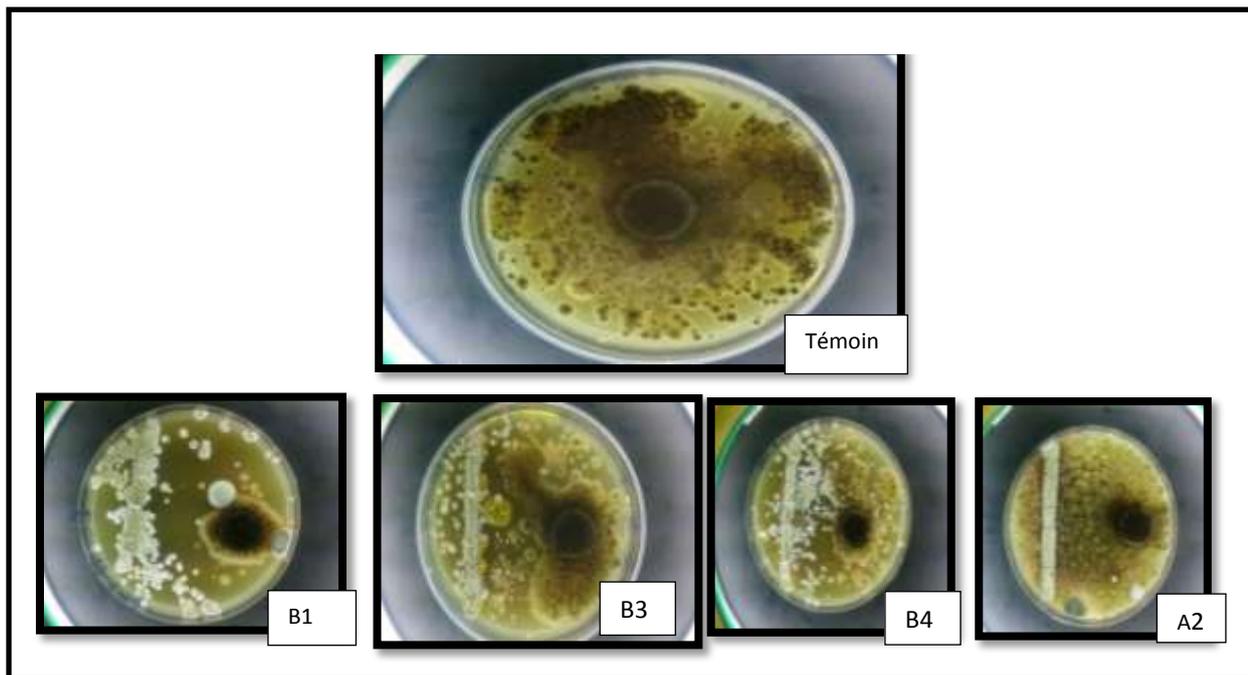


Figure21: Résultats de l'activité antifongique des isolats d'actinobactéries.

➤ Discussion

D'ailleurs, l'activité antifongique est assez répandue chez les actinobactéries, elle a été déjà montrée vis-à-vis de *Verticillium dahliae* (Harir *et al.*, 2018) et *Phytophthora sp.* (Xiao *et al.*, 2002). La variation des résultats peut être expliquée en partie par le fait qu'une espèce d'actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (Boughachiche *et al.*, 2005). Il est à signaler également que certains champignons possèdent la capacité de synthétiser des enzymes, qui inactivent l'antibiotique de l'actinobactérie en modifiant sa structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973).

8. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

Les résultats de la sensibilité des actinobactéries aux antibiotiques sont présentés par le tableau 12 et les figures 22. Les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques apparaissent très claires avec des bordures distinctes. L'inhibition est notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15 mm. Les résultats de l'antibiogramme en milieu solide des quatre isolats, montrent que certains isolats sont sensibles, d'autres résistants ou intermédiaires aux antibiotiques testés. Les quatre isolats se sont révélés insensibles et représentent ainsi une résistante à l'antibiotique amoxyclav(AMC), céfixime(CFM) et doxycyline(DO). Ces mêmes isolats se sont montrés sensibles à ciprofloxacine(CIP) et gentamycine avec des diamètres d'inhibition variant de 20 à 50 mm. L'isolat B1 s'est montré sensible à la moitié des antibiotiques testés, suivi par l'isolat B3. Les deux autres isolats se sont révélés sensibles uniquement à deux antibiotiques. A travers ces résultats, nous pouvons conclure que l'antibiotique ciprofloxacine (CIP) présente un spectre d'activité assez important. D'après **Aharonowitz et Demain (1978)** ; **Omura et Tanaka (1986)** ; **Cheng *et al.*;(1995)** ; **Sanchez et Demain (2002)**, la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la capacité et la quantité de métabolites secondaires produits par le microorganisme producteur.

Tableau 12 : Résultats d'antibiogramme des actinobactéries.

Les actinobactéries	Les zones d'inhibition (mm)							
	CIP	AK	DO	AMC	GEN	E	CTX	CFM
B1	50	26	R	R	34	30	10	R
A2	20	10	R	R	50	10	05	R
B3	46	10	R	R	49	20	R	R
B4	51	R	10	R	10	R	30	R

(R) : résistant

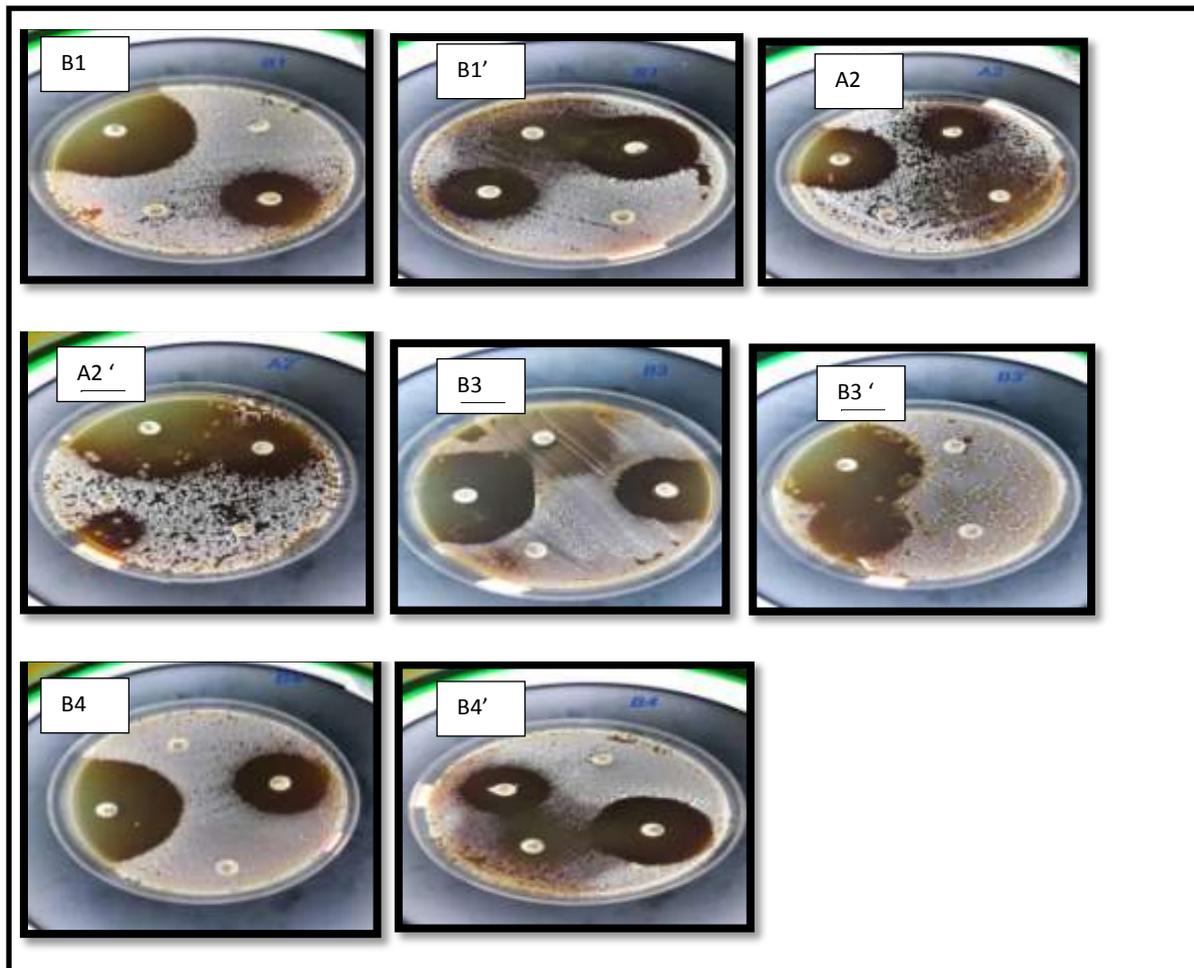


Figure 22 : Résultats de l'antibiogramme sur le milieu Muller Hinton.

9. Tests physiologiques des isolats d'actinobactéries

9.1. Hydrolyse de la caséine

La caséine, protéine du lait, peut-être hydrolysée par certaines espèces bactériennes. La Figure 23, présente les résultats de l'hydrolyse de la caséine. D'après ces résultats nous ne constatons que les quatre isolats d'actinobactéries onhydrolyséla caséine. Ce résultat positif s'est traduit par l'apparition d'une zone claire au tour des colonies testées. La dégradation de la caséine est due à l'enzyme caséinase.

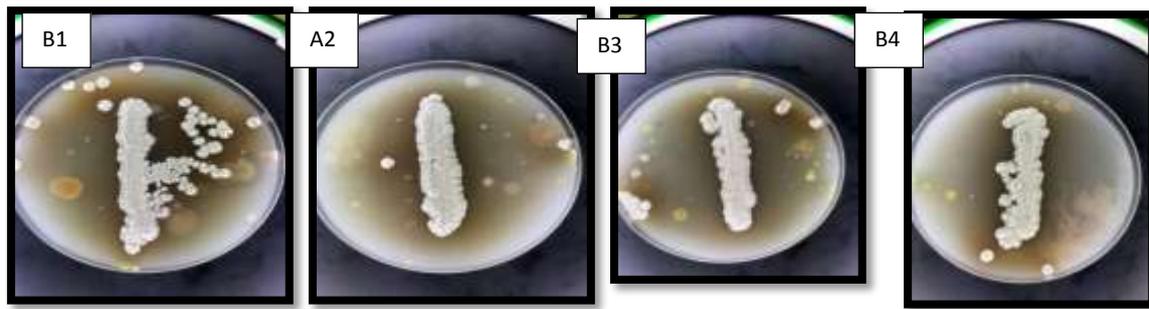


Figure 23 : Résultats de l'hydrolyse de la caséine par les quatre isolats.

9.2. Dégradation de l'amidon

L'amidon, macromolécule formulée de n unités glucose enchaînés, est hydrolysé par l'exoamylase dans le milieu extracellulaire en n molécules de glucoses. Puis le glucose (molécule de petite taille) pénètre dans la cellule grâce à glucose perméase. La Figure 24 présente le résultat de la dégradation de l'amidon. Selon les résultats, les quatre isolats d'actinobactéries hydrolysent l'amidon en glucose. La présence d'une zone jaunâtre témoigne de la dégradation de cette macromolécule.



Figure 24: Résultats de la dégradation de l'amidon par les quatre isolats.

9.3. Hydrolyse de la gélatine

Les résultats de l'hydrolyse de la gélatine sont présentés par la Figure 25. Ces résultats montrent que les quatre isolats utilisent la gélatine comme source de carbone. Ces résultats témoignent de la présence de l'enzyme gélatinase chez l'ensemble des actinobactéries testés.

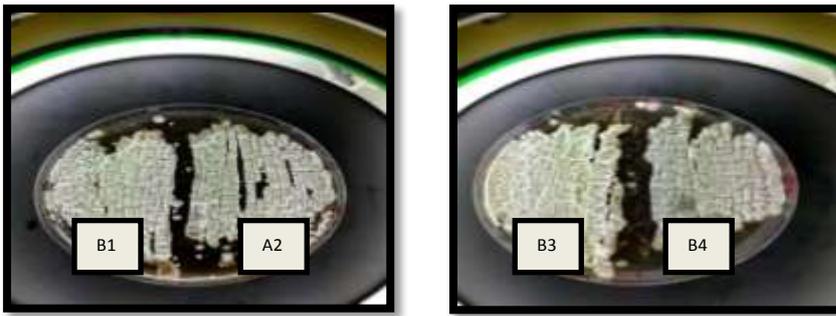


Figure 25: Résultats de l'hydrolyse de la gélatine par les quatre isolats.

9.4. Pouvoir hémolytique

Les résultats de l'effet hémolytique sont présentés par la Figure 26. Selon les résultats, le test s'est révélé négatif et aucun isolat n'a montré un effet hémolytique (absence de zone claire autour des colonies).

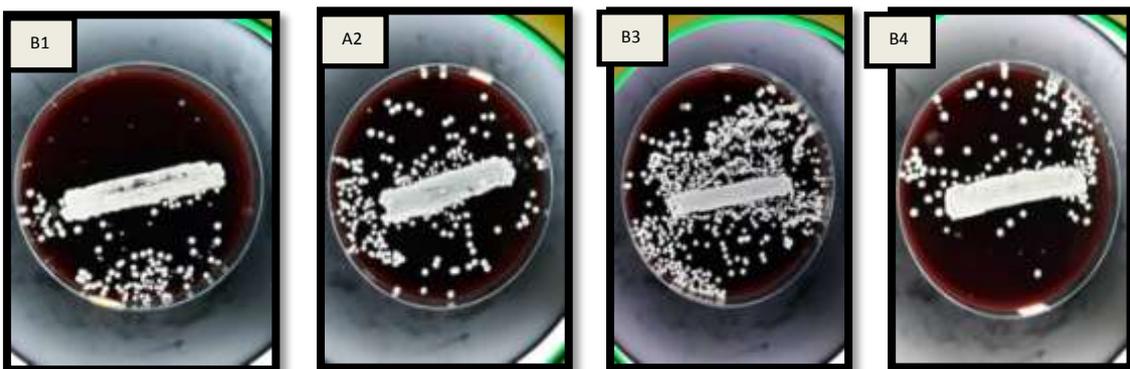


Figure 26: Résultats de test du pouvoir hémolytique de quatre isolats.

➤ **Discussion générale**

Les Actinobactéries sont omniprésentes dans la nature, et sont utilisées dans différents domaines. Elles ont un rôle important dans le secteur pharmaceutique, agro-alimentaire, industriel, agricole et autre. Elles contribuent également à la dégradation de la matière complexe. Elles produisent des substances antimicrobiennes qui exercent une activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes et/ ou d'altérations.

Les antibiotiques synthétisés par les actinobactéries ont suscité beaucoup d'intérêt dans les industries pharmaceutiques pour leur valeur thérapeutiques. En effet, la majorité de ces bactéries sont considérées comme des germes inoffensifs pour l'hôte. Elles sont considérées comme des microorganismes à potentiels thérapeutiques très intéressants. La connaissance de ce groupe de bactéries pourrait nous permettre de les utiliser dans les différents domaines précédemment cités. En raison de leur présence dans des écosystèmes souvent hostiles et complexes, nous nous sommes proposé d'isoler cette population à partir de deux biotopes (sol salin et sol aride). Cette étude est basée sur des observations macroscopiques et microscopiques et des tests physiologiques et biochimiques. Elle est ensuite complétée par des tests d'activité antimicrobienne vis-à-vis des germes pathogènes afin d'évaluer leur pouvoir antimicrobien ainsi que leur capacité à se développer à différentes concentrations de Na Cl et à différentes températures. Une étude sur la sensibilité des isolats d'actinobactéries aux antibiotiques a été également effectuée.

Après purification, isolement et dénombrement de nos isolats, les cultures sont conservées sur gélose inclinée à 4°C.

L'étude macroscopique nous a permis de déterminer les caractères cultureux de nos isolats (aspect, couleur, forme et contour). Quant à l'étude microscopique, elle nous a permis de différencier les isolats selon la coloration de Gram.

Ensuite, les tests biochimiques et physiologiques réalisés sur nos isolats, consistent en la recherche de l'hydrolyse de la gélatine, de l'amidon, de la caséine et leur effet hémolytique. Nous avons ensuite évalué par des tests leur capacité de croissance à différentes températures (5°C, 15°C, 20°C, 28°C et 37°C), à différentes concentrations de Na Cl (3%, 5%, 7%, 9% et 10 %), et enfin, leur activité antimicrobienne vis-à-vis de certains germes pathogènes ainsi que le test de sensibilité aux antibiotiques.

La caractérisation phénotypique montre que les isolats bactériens, appartiennent au groupe des Actinobactéries et que l'ensemble de ces isolats se rattache à un seul et unique genre, le genre *Streptomyces*. Ce genre semble le plus dominant dans les échantillons de sol

analysés. Les isolats d'actinobactéries assimilent différemment les sources carbonées. Dans ce contexte, l'isolat A2 se distingue seul des 3 autres en possédant un spectre important d'assimilation des sucres. Par ailleurs, les tests d'activité antimicrobienne effectués ont permis d'évaluer l'action des isolats sur quelques espèces bactériennes et sur un mycète. Les isolats étudiés présentent *in vitro* une activité antibactérienne intéressante, néanmoins, d'autres études portant sur ce phénomène doivent être entreprises. Les résultats traduisent un important potentiel antagoniste en présence de l'isolat B3, en revanche, en présence de l'isolat B4, on a enregistré les diamètres les plus bas (7 et 11 mm). En effet plusieurs travaux ont démontré un pouvoir antibactérien remarquable de ces actinobactéries vis-à-vis de nombreux germes pathogènes (McKenzie *et al.*, 2010 ; Mythili et Ayyappa, 2011 ; Ng et Amsaveni, 2012).

L'ensemble des résultats des caractères cultureux, phénotypiques et biochimiques des quatre isolats a permis de les rapprocher au genre *Streptomyces*. Plusieurs travaux ont signalé que le genre *Streptomyces* est le germe le plus dominant dans les sols arides et semi-arides d'Algérie (Sabaou *et al.*, 2018), Néanmoins, ces résultats préliminaires ne permettent pas de rattacher ces isolats à des espèces proposées dans la littérature, en raison du faible nombre de tests réalisés, comparés à ceux rapportés dans le manuel de Bergey's (1989) ou bien à ceux effectués par Badji *et al.*, (2006).

Bien que la détermination phénotypique et biochimique des bactéries constitue une partie indispensable et essentielle à l'identification des actinobactéries, elle est cependant imprécise et limitée. Afin d'affiner nos résultats, une caractérisation moléculaire est nécessaire.

Conclusion

Conclusion

Ce stage a été pour nous un apprentissage du travail de recherche en laboratoire. Il nous a permis de comprendre et d'apprendre l'utilisation de quelques techniques fondamentales de la microbiologie. Nous avons pu nous familiariser à manipuler dans des conditions stériles et à utiliser les outils de base en microbiologie. Mais surtout, ce stage nous a octroyé l'opportunité de rencontrer de près mes enseignants et de profiter de leur connaissance dans le monde de la recherche. Ce stage a été pour nous un exercice pour améliorer nos connaissances dans le monde microbien.

- La température de croissance des quatre isolats se situe entre 15 et 30°C, avec un optimum d'environ 28 °C.
- Elles sont capables de croître dans un intervalle de salinité allant de 3 à 10%.
- les quatre isolats d'actinobactéries sont capables d'hydrolyser la caséine, l'amidon et la gélatine.
- L'isolat B3 a montré une zone d'inhibition importante vis-à-vis de *Pseudomonas Aeruginosa*.
- Les isolats B1 et A2 ont donné des zones d'inhibition varie entre 18 à 22 sur *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica*
- En revanche les quatre bactéries se sont révélée plus ou moins résistantes à isolat B4. Les quatre isolats sont résistant à les 3 antibiotiques (doxycycline, amoxiclav, cefixime).

Pour mieux valoriser les isolats d'actinobactéries. il est souhaitable :

- d'étaler les sites de prélèvement d'échantillons afin de diversifier l'origine des isolats.
- constituer une collection réellement représentative de la population d'actinobactéries.
- Réaliser de nouveaux des tests *in vitro* et *in vivo*
- Et enfin, Il conviendrait également d'étendre ce travail par d'autres techniques pour mieux identifier les isolats bactériens, et affiner cette taxonomie par des techniques de biologie moléculaire.

Références Bibliographique

Références bibliographiques

Adegboye. M. F et **Babalola. O. O.** 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. African Journal of Agricultural Research. Vol 7. N° 15. Pp: 2255-2261.

Aharonowitz Y., **Demain A.L.** (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin

Algeria. **Journal de Mycologie. Médicale**, **15**, 45–51.

andphosphate. In: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G. Regulation

Andriambololona T. 2010. Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas du foret d’anaphore. Thèse de doctorat, Université D’ANTANANAREVO. 5 – 10p.

Anibou. M; **Chait. A;** **Zyad. A;** **Taourirt.M;** **Ouhdouch.Y;** and **Benherref.A.** (2008). - Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. World. J. Microbiol. Biotechnol, 24, 2019–2025p.

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

Asselineau J. et **Zalta J.P.** (1973). - Les antibiotiques. Structures et exemples de mode d’action. Herman Ed., Paris.

Badji. B , **Riba. A** , **Mathieu. F** , **Lebrihi. A** , **Sabaou. N.** 2005. Activité antifongique d’une souche d’*Actinomadura* d’origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale. Vol 15. 211–219p.

Barreto, T, R. et al.2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of theobroma cacao. Brazilian Journal of Microbiology. Vol: 39.N: °3. 464-465.

Basilio.A; Gonzalez.I; Vicente.M.F; Gorrochategui.J; Cabello.A; Gonzalez.A; and Genilloud.O. (2003). - Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol*, 95, 814–823p.

Belyagoubi Larbi, 2014. Antibiotiques produits par des bactéries actinomycètes et bactéries lactiques issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Abou Bakr Belkaïd - Tlemcen, 143p.

Benabdellah A.M, 2014. Screening de deux souches extrêmophile halophile du genre *Bacillus* de la sebkha d'Oran (caractérisation phénotypique) 24.06.2014.

Bentley S.D; chater k.f; cerdeno-tarraga.a.-m; challis. g.l; thomson. n.r; james.k.d; harris.d.e; quail.m.a; kieser. h; harper. d; bateman.a; brown.s; chandra.g; chen.c.w; collins. m; cronin.a; fraser.a; goble. A; J. Hidalgo; T. Hornsby; S. Howarth; C.- H. Huang; T. Kieser; L. Larke; L. Murphy; Oliver. K; O'Neil.S; Rabbinowitsch. E; Rajandream. M.-A; Rutherford.K; Rutter.S; Seeger.K; Saunders.D; Sharp. S; Squares. R; Squares.S; Taylor. K; Warren.T; Wietzorrek.A; Woodward.J; Barrell. B.G; Parkhill.J; and Hopwood.D.A. (2002). – Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.

Berdy, J. 2005. Bioactive microbialmetabolites. *J Antibiot (Tokyo)*58. 1-26. 22 p.

Billerbeck. V.G ; Roques. C ; Vanière. P ; and Marquier. P. (2002). - Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle., *Hyg. Rev*, N°3.

Boudemagh. A. 2007. Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse doc en microbiologie appliqué: Université Mentouri Constantine. 144p.

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.

Boughachiche. F, Reghioua. S, Oulmi. I, Zerizer. H, Kitouni. M, Boudemagh. A, Boulahrouf. A. 2005. Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Ain Mlila. Sciences & Technologie. N : 23. 5-10p.

Boughachiches,F,Reghioua,S.,Ierizer,H.,et Boulahrouf,A.(2012,March).Antibacterial activity of rare Streptomyces species against clinical resistant bacteria. In Annales de biologie Clinique Vol.70, No.2.169-174p.

Boussaber. E, Kadmiri. I. M, Hilali. L, Hilali. A. 2012. Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. ScienceLib Editions Mersenne. Vol 4. N ° 121203. Pp : 1-21

Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. 1989. Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In "Biotechnologie des Antibiotiques". Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson : Paris. 33-70p.

Bycroft B.W.1988.Dictionnary of antibiotics and related substances.London : Chapman and Hall,944p.

Chater.K.F. 2006.*Streptomyces* inside out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Phil. Trans. R. Soc. B, 361, 761–768p.

Chen L., Wang G., Bu T., Zhang.Y., Wang Y., Liu M. and Lin.X. (2010b). - Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World J. Microbiol.Biotechnol.*,**26**, 879-888p.

Cheng J. R., Fang A., Demain A. L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 1096-1098p.

Chun G., seang C.M., Lee K.G., Kang S .A., Good fellow M. et Hah V.C. (1998). *Nocardiaflavorosea* sp. *Nov international journal of systymatic bacteriology*, 48(3), 901-905p.

Colombie V.2005. Description de la production de spiramycines par *Streptomycesambofaciens*. Modélisation métabolique, stimulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat. Institut nationale des sciences appliqué, Université de Toulouse, 174p.

Decre D., Courvalin P. 1981. De l'intérêt d'antibiotiques nouveaux. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, 12(2), 160 – 175p.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle.

Demain. A.L; and Lancini.G. (2006). - Bacterial Pharmaceutical Products in *Procaryotes*, 1, 812–833p.

Desnottes J.F. 1995. Recherche de nouveaux antibiotiques, évolution des méthodes d'évolution microbiologiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*.

Djaballah C., 2010. Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés se la sebkha de Ain M'Lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri - Constantine : 102p.

Djinni I, 2009 Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A. Mira de Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie.

Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Massa P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M., Puglia A.M. 2002. Microbiol technologies for the discovery of novel bioactive metabolite. *J. Biotechnol*, 99, 187 – 198p.

El-Mehalawy, A. et al. 2004. Influence of Maize Root Colonization by the Rhizosphere Actinomycetes and Yeast Fungi on Plant Growth and on the Biological Control of Late Wilt Disease. *International journal of agriculture and biology*. Vol 6. N°:4. 599–605p.

El-Nakeeb, M., Lechevalier, H. 1963. Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol*. Vol: 11. N°: 2..75-77p.

Euzeby JP. (2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.

Fan. L, Zheng J, Yang. X. 2010. The effect of natural air-dry time on actinomycetes Isolation from sample soil. *Journal of Hainan Medical University*.

George. M, George. G and Hatha. M. A. A. 2010. Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. Vol: 28.: 52-57p.

Geraldine, M., Schofield, M., Schaal, K. P. (1981). A numerical taxonomic study of members.

Getha K., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A., Goodfellow M. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. Vol: 32. 24-32p.

Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. Vol: 37. : 189-216p.

Goodfellow M. (2012). Phylum XXXI. 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. 1-28p.

Gottlieb D. 1973. General consideration and implication of actinomycétales. in actinomycétales characteristics and practical importance. edited by G syks and F.A skinner. academic press, London newyork.

Gurung. T. D. Sherpa. C. Agrawal. V. P. &Lekhak.. B. 2009. Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region.Nepal Journal of Science and Technology.Vol10.:173-182p.

Harir. M, Bellahcen Miloud, Baratto MariaCamilla, Pollini Simona, Rossolini Gian Maria, Trabalzini Lorenza, Fatarella Enrico, Pogni Rebecca. Isolationand characterization of a novel tyrosinase produced by sahara soil actinobacteriaand immobilization on nylon nanofiber membranes. Journal of Biotechnol.2018 jan 10;265:54-64.

Harir. M, 2018. Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi-arides d'Algérie. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1 - Ahmed Ben Bella – Oran.

Hasley C., Leclerc H, 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Editions Lavoisier TEC&DOC.France.

Hayakawa, M., Ishizawa, K., and Nonomura, H. 1988.Distribution of rare actinomycetes in Japanesesoils.J. Ferment. Technol. Vol: 66.: 367–373p.

Holt. JG., Krieg NR., Sheath P.H.A., Staly J.T., Williams S.T., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. William and wikins.

Hop. D. V, Sakiyama. Y, Binh. C. T. T, Otoguro. M, Hang. D. T. Miyadoh. S, Luong. D. T & Ando. K. 2012. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. The Journal of Antibiotics. Vol: 64.: 599–606p.

Kalyani. A.L.T. RamyaSravani K. M. Annapurna J. B. 2012. isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from marine soil samples. International Journal of Current Pharmaceutical Research.Vol: 4. N°: 2. 109-112p.

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation.

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 actinomycetes

Lacey J.,1997.Actinomycetes in composts. Annals of Agricultural and Environnementale medicine,4,113-121 p.

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

Lechevalier M.P. 1988. Actinomycètes in agriculture and forestry. In : Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow, M.G., Williams, S.T. and Modarski, M. Ed., Academic Press London, New-York, 327 – 358.pp

Lee. J. Y., Hwang. B. K., 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea.Canadien Journal of Microbiology,48: 407 – 417p.

Lichtmen H., Watson J ., Ginsberg V ., Pierce J.v ., StokstadE.I., Jukes T.H.(1949). Vitamin B12 B some properties and its therapeutic use.Experimental Biology and Medcine., 72(3),643-645 p.

Loqman. S. 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie.: 253p.

LOUCIF K. ,2011. Recherche des substances antibactériennes à partir d'une collection des souches d'actinomycetes .caractérisation préliminaires de molécules bioactives. Mémoire de magister de microbiologie, Université Mentouri – Constantine, 21p.

Maier.R. M., Pepper. I. L., Gerba. C. P. 2009. Environmentalmicrobiology. AcademicPress: London. 598p.

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

McKenzie. N. L ;Thaker. M; Koteva.K; Hughes.D.W; Wright. G. D; and Nodwell.J. N. 2010. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene absA.The Journal of Antibiotics. Pp: 1– 6

Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

Meklat A ;Bouras N ; i Zitouni A; Mathieu F ; Lebrihi A ; Schumann P ;Spro'ier C ; Klenk H ; Sabaou N (.2012). Actinopolyspora algeriensis sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil.773p.

Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie. 162 p.

Mesoudi O, 2013. Contributions à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices des métabolites antibactériens isolées de la sebkha de knadessa (BECHAR), Université Abou BakrBelkaid, Tlemcen. 84 p.

Miller D.B.1982. Neurotoxicity of the pesticidalcarbanates. Neurobehavioral Toxicology and Tetratology,4,779-787p.

Monciardini P., Cavaletti L., Schumann P .,Rohde M., Et Donadio S.(2003).ConexibacterWoeseigensp. A novel representative of a deep evolutionary line of descentwithin the claddActinobacteria.International journal of Systimatic Evolutionary Microbiology, 53(2), 3-10p.

Mythili.B and Ayyappa Das. M. A. 2011. Studies on Antimicrobial Activity of Streptomyces spp. Isolates from Tea Plantation Soil.Research Journal of Agricultural Sciences.Vol: 2. N°: 1. 104-106p.

Newman D.J. and Cragg M.G (2007). - Natural products as sources of new drugs over the last 25years. *J. Nat. Prod.*, **70**, 461-477p.

Ng. Z. Y and Amsaveni. S. 2012. Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai RamalLuar, Malaysia.Journal of Advanced Biomedical & Pathobiology Vol: 2 N°: 3. 96-107 p

Nouioui , I.,2014 phylogénie et évolution de genre *frankia* diplôme de doctorat université CLOUDE BERNARD LYON .

Nouredine. L. 2006. Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat - Université de TiziOuzou -Algérie. 186p.

Of the Actinomycetaceae and related taxa.Journal of General Microbiogyl,127(2),237-259.

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

Omura S., and TANAKA y. (1990). Metabolism and products of Actinomycetes an introduction. *Actinomycetologica*, 4(1), 13-14.

Ortiz-Ortiz, BOJAALIIF.YAKOLEFFV. 1984. Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. Academic press, Inc, New York.

Oskay M., TAMER A. U., AZERIC. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *African journal of biotechnology*, Vol.3 (9), 441 – 446p.

Ouhdouch. Y. 2003. Aperçu bibliographique sur la taxonomie des actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC. 18-70p.

Parthasarathi S., Kim C.J., Lee J.C., Sathya S., Manikandan M., Manikandan T. and Balakrishnan, K. (2011). - Taxonomic characterization and UV/VIS analysis of antagonistic marine actinomycete isolated from South Pacific Coast of Philippines. *Int. J. Med. Res.*, **1**, 99-105p.

Petrosyan P, Garcia-Varela M, Luz-Madrigal A, Huitron C, Flores ME. (2003 Jan). *Streptomyces* mexican sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 53(pt1):269_73.

Prakash. A .Satyanarayana. T, ,Johri. B. N. 2012. Microorganisms in Environmental Management. Springer. 819p.

Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2010. Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition 1088p.

Promnuan Y., Kudo T., Ohkuma M. and Chantawannakul P. (2011). *Actinomadura apis* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*). hive, and the reclassification of *Actinomadura cremea* subsp. *rifamycinii*

Reghioua. S. Boughachiche . F. Oulmi. L. Zerizer. H. Kitouni. M. Boudemagh. A. Boulahfrouf. A. 2008. Separation et caracterisationpreliminaire d'antibiotiques produits par une souche representative d'actinomycetes isoles de sol aride de la region de Biskra. Sciences &Technologie. N°28..59-64p..

Rickes E.L., BRINK N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R., WOOD T.R., FOLKers K. (1948). Crystalline vitamin B12.Science. 107(2781),396-397p.

Rothrock.C; and Gottlieb.D. (1981). - Importance of antibiotic production in antagonism of selected Streptomyces species to two soil-borne plant pathogens. **The Journal of Antibiotics, 34 (7), 830-835p.**

Saker R. 2015.Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes .por obtention de diplôme doctorat. UniversitéFerhat Abbas.

Sanchez S.,Demain A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. Enzymes

Sanglier J.J, Haag T.A., Huck T.A. and Fehr T. (1993).Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs, 5,* 207-223p.**Santhanam R.,** Okoro C.K., Rong X., Huang Y., Bull A.T., Andrews, B.A., Asenjo, J.A., Weon, H.Y. and Goodfellow, M. (2012). *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek,* 101, 575–581p.

Sharma. D, Kaur. T, Chadha. BS & Manhas. R. K. 2011. Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant Staphylococcus aureus, E. coli and Various Other Pathogens. Tropical Journal of Pharmaceutical Research December. Vol 10. N°: 6. 801-808p.

Sibanda.T, Leonard. V. Mabinya. L. V, Mazomba. N, Akinpelu. D. A, Bernard. K, Olaniran. A. O, and Okoh. A. I. 2010. Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci.* Vol : 11. N° 7. 2612–2623p.

Silini S, (2012). Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyl éthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'ElAtmania. Thèse de Magister en écologie option : Gestion des déchets : évaluation et solution environnementales. Université Mentouri - Constantine. 101p.

Smaoui. S. 2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat : Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). 207p.

Solecka J.,Zajko J., postek M.and Rajnisz A.(2012).Biologically active secondary metabolites fromactinomycetes.Central Eaurpean Journalof biology 7.373-390p.

StaneckJ.L.,and roberts G.D.(1974).simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thinlayerchromatography.journal of applied microbiology,28,226-231p.

Tanaka A, Y., OMURA.S. 1990. Metabolism and products of actinomycetes-an introduction.actinomycetologica, 4(1), 13, 14p.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K, and Bora T.S. (2007).Isolation and screening *Streptomyces* in soil from *areas* from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Med Microbiol.*, **17**, 242-249p.

Theilleuxj.O, 1993. Les actinomycètes *in* microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau.J.Y et MOUIX M. Lavoisier Tech et doc, Apria,V 612, 425p.

Vijayakumar.R; Muthukumar.C; Thajuddin.N; Panneerselvam.A; and Saravanamuthu.R. (2007).- Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India.*Actinomycetologica*, **21 (2)**, 59-65p.

Williams P.G. (2009). - Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics.*TrendsBiotechnol.*,**27**, 45-52p.

Xiao K., Kinkel L.L., and samac D.A.(2002). Biological control of phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. *Biological Control*, 23(3), 285-295p.

Zenova G. M., Manucharova N. A. and Zvyagintsev D. G. (2011). - Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Soil. Biol.*, 44: 417-436p.

Zhe Lang, 2018 Dan Qi, Jianjiang Dong, LiweiRen, Qifa Zhu, Weiwei Huang, Yongmin Liu, Diannan Lu, Isolation and characterization of a quinclorac-degrading Actinobacteria Streptomyces sp. strain AH-B and its implication on microecology in contaminated soil journal NCBI.

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

Zouaghi A., 2007-Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par Streptomyces rimosus. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage : 12p.

Sites web

https://fr.wikipedia.org/wiki/Source_thermale) 2018.

Annexes

Annexe 01

- **Le milieu GLM** : Extrait de levure 3g, extrait de malt 3g, Peptone 5g, Glucose 10g, Agar 15g, Eau distillée 1000ml, pH=7.3.
- **Le milieu ISP2** :ISP 2 Extrait de levure 4 g, Extrait de malt 10 g, Glucose 4 g, Agar 20 g, Eau distillée 1000 ml, ampicilline 2ml, Fungisone 1ml, pH = 7,3.
- **Le milieu CAA** : Amidon10g, caseine0.3g, KNO₃ 2g, K₂HPO₄ 2g, NaCl 2g, MgSO₄.7H₂O 0.05 g, CaCO₃ 0.02g, FeSO₄. 7H₂0.01g, Agar 18g, eau distillée 1000 ml, pH =7.3.
- **Milieu gélose nutritive (GN)**

Peptone : 5g ; Extrait de levure : 2g ; Extrait de viande : 1g ; NaCl : 5g ; Agar : 15g ; Eau Distillée q.s.p 1000ml ; .pH 7,5

- **Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf 2 g ; Amidon 15 g ; Hydrolysate de caséine 17,5g ; Agar 17 g ; Eau distillée 1000 ml ; pH 7,3.

- **Dégradation de l'amidon** (Marchal et Bourdon, 1987)
10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive. Une solution de Lugol permet de mettre en évidence la dégradation de l'amidon.
- **Dégradation de la gélatine** (Marchal et Bourdon, 1987)(modifiée)
4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.
- **Dégradation de la caséine du lait** (Gordon *et al.*, 1974)
10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine

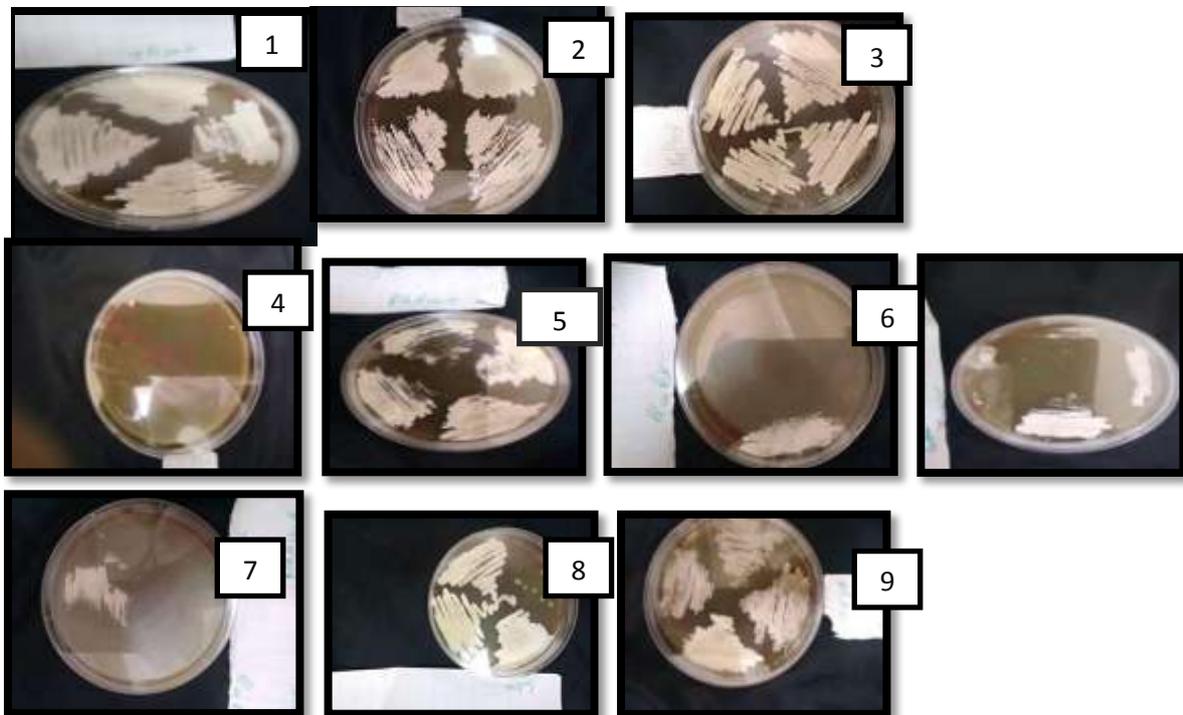
- **Coloration de Gram**

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 15 à 30 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau distillée. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 10 à 30 secondes à la *fushine* (ou *safranine*) pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen et on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

Annexe 02



Témoïn



1 : milieu de culture + maltose. 2 : milieu de culture + sucrose 3 : milieu de culture + maltose. 4 : milieu de culture + lévulose. 5 : milieu de culture + rhamnose . 6 : milieu de culture + xylose . 7 : milieu de culture + rhafrinose . 8 : milieu de culture + fructose. 9 : milieu de culture + lactose. 10 : milieu + galactose.

Figure : Résultats de l'assimilation des sucres

Les souches	Les différentes concentrations en Na Cl					
	3	5	7	9	10	Témoin
B1						
A2						
B3						
B4						

Figure: Croissance des isolats d'actinobactéries vis-à-vis de différentes concentrations de Na Cl.