

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de

Master

en Microbiologie Appliquée

Option :

Biotechnologie Microbienne

THEME

Isolément et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques « Essai d'identification phénotypique et chimiotaxonomique »

Présenté Par : **Mr ALLIK Mohamed Lamine**

Soutenu le 11/ 06 /2013 devant le jury composé de :

Mme *IDRES N.*

Présidente.

Mr *KECHA M.*

Promoteur.

Melle *DJINNI I.*

Examinatrice.

Mme *SOUAGUI –BOUDRIES S.*

Examinatrice.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

*Je tiens à remercier Monsieur **Kecha M.**, pour son encadrement, son appui scientifique et qui m'a fait l'honneur de diriger mon mémoire et m'a guidé tout au long de son élaboration, je lui suis très reconnaissant pour ses conseils, sa disponibilité. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.*

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à :

*Mme **IDRESS N.** pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Melle **SOUAGUI S.** qui a bien voulu examiner ce travail et participer au jury. Qu'elle trouve ici l'assurance de toute ma reconnaissance.*

*Melle **DJINNI I.** qui a bien voulu apporter une appréciation à ce travail et être parmi les membres de jury il m'est agréable de vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect.*

J'exprime toute ma sympathie à toute la promotion Biotechnologie microbienne et aux ingénieurs du laboratoire de biochimie microbienne pour l'excellente ambiance de travail.

*Je n'oublie pas de remercier Mr **Messis A.** pour tout ce qu'il a fait pour moi.*

Je finis par remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et que je n'ai pas citée.

A tous un grand merci...

Dédicaces

Au nom du tout puissant

Je dédie ce travail

A`

Mes parents

A`

Ma sœur et à mon frère

A`

C315

A`

Tous ceux qui me sont chers

Mohamed Lamine

Liste des abréviations

- ♣ **ATCC**: American Type Culture Collection;
- ♣ **AGS** : Arginine, Glycérol, Sels ;
- ♣ **ATF** : Antifongique ;
- ♣ **ATB** : Antibiotique ;
- ♣ **BTT** : Bennett ;
- ♣ **DAB** : Acide Diamino butirique;
- ♣ **DAP** : Acide Diamino pimelique;
- ♣ **DO** : Densité optique ;
- ♣ **GLM** : Milieu Glucose extrait de Malt et extrait de Levure ;
- ♣ **GYEA** : Milieu Glucose Yeast Extract Agar ;
- ♣ **G** : Grossissement ;
- ♣ **ISP**: International *Streptomyces* Project ;
- ♣ **m/v** : masse/volume ;
- ♣ **MA** : Mycélium Aérien ;
- ♣ **MS** : Mycélium de Substrat ;
- ♣ **tr/min** : Tours par minute ;
- ♣ **PC**: Phosphatidyl Choline ;
- ♣ **PE**: Phosphatidyl Ethanol amine ;
- ♣ **PG**: Phosphatidyl Glycerol ;
- ♣ **Rf**: Rapport frontal ;
- ♣ **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline ;
- ♣ **SCA** : milieu williams ;
- ♣ **V/V** :Volume /volume.

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Numéro de la page
01	Protocole d'isolement d'actinomycètes des sols sahariens	13
02	Protocole d'isolement d'actinomycètes des sols sahariens avec traitement au CaCO ₃	14
03	Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar.	16
04	Isolement d'actinomycètes à partir des échantillons du sol non traitées sur différents milieux de culture.	25
05	Isolement d'actinomycètes à partir des échantillons de sol traités au CaCO ₃ sur différents milieux de culture	27
06	Origine des échantillons de sol ayant permis l'obtention d'isolats d'actinomycètes.	27
07	Tests d'activité des souches d'actinomycètes obtenues à partir d'échantillons de sol non traités vis-à-vis des germes cibles.	28
08	Distribution des souches d'actinomycètes obtenues à partir des échantillons de sol non traité	29
09	Distribution des souches obtenues à partir du sol non traité en fonction des milieux d'isolement	29
10	Tests d'activités antibactériennes des souches d'actinomycètes obtenues à partir d'échantillons de sol traités au CaCO ₃ vis-à-vis des germes cibles.	30
11	Distribution des souches d'actinomycètes obtenues à partir des échantillons de sol traités au CaCO ₃	31
12	Distribution des souches obtenues à partir du sol traité au CaCO ₃ en fonction des milieux d'isolement	31
13	Activité antagoniste de la souche G3tc ₃ vis-à-vis des 3germes cibles	31
14	Activité antagoniste de la souche G26 vis-à-vis des 3germes cibles.	32
15	Macromorphologie des souches G26 et G3tc ₃ cultivés pendant 21 jours à 28°C, vue à la loupe binoculaire (CARL ZIESS 475002) a : Souche G26 sur milieu ISP3 (GX8) b : Souche G3tc ₃ sur milieu ISP2 (GX25) c : souche G26 sur milieu ISP7 (GX8)	33
16	Observation micromorphologiques de la souche G3tc ₃ cultivée sur milieu SCA pendant 2 jours à 28°C au grossissement G (10X40)	36
17	Observation micromorphologiques de la souche G3tc ₃ cultivée sur milieu SCA pendant 21 jours à 28°C au grossissement G (10X40)	36
18	Caractérisation des sucres pariétaux avec une Chromatographie ascendante sur gel silice (C.C.M) pour les souches G26 et G3tc ₃	37
19	Caractérisation des acides aminés pariétaux avec une Chromatographie ascendante sur gel silice (C.C.M) pour les souches G26 et G3tc ₃	37
20	Planches illustrant la dégradation de divers composés organiques par les souches d'actinomycètes sélectionnées	39
21	Planches illustrant la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques	Annexe

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de la page
I.	Critères chimiques d'identification des actinomycètes	7
II.	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	8
III.	Antibiotiques utilisés dans le test de sensibilité	21
IV.	L'isolement de souches actinomycètes à partir des échantillons de sol non traités	24-25
V.	L'isolement d'actinomycètes à partir des échantillons de sol traités au CaCO ₃ .	26
VI.	Caractéristiques macromorphologiques et culturales de la souche G26	34
VII.	Caractéristiques macromorphologiques et culturales de la souche G3tc₃	35
VIII.	Test de dégradation des sucres par les deux souches d'actinomycètes sélectionnées.	38
IX.	Croissances des souches G26 et G3tc ₃ à différentes températures pendant 21 jours	40
X.	Croissance des souches G26 et G3tc ₃ à différents pH	40
XI.	Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'actinomycètes	41
XII.	Traitements chimique et physique pour l'isolement sélectif des actinomycètes rares du sol	Annexe III
XIII.	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes	Annexe IV
XIV.	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes	Annexe V
XV.	Actinomycètes isolés de différents habitats	Annexe VI
XVI.	Taxonomie du phylum XXVI Actinobacteria	Annexe VII
XVII.	Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes basée sur les critères chimiques et morphologiques	Annexe VIII

- ♣ Liste des abréviations.
- ♣ Liste des figures.
- ♣ Liste des tableaux.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes

1. Généralités sur les actinomycètes	3
1.1. Définition	3
1.2. Ecologie	3
1.3. Importance des actinomycètes	3
2. Taxonomie des actinomycètes	4
2.1. Systématique des actinomycètes.....	4
2.2. Détermination des genres d'actinomycètes	5
2.2.1. Critères morphologiques	5
2.2.2. Critères chimiotaxonomiques.....	6
2.3. Critères d'identification des espèces.....	8
2.3.1. Critères physiologiques et taxonomie numérique	8
2.3.2. Critères moléculaires	9
3. Isolement sélectif des actinomycètes rares	9
3.1. Choix de l'écosystème pour l'échantillonnage.....	9
3.2. Traitements chimiques	10
3.3. Traitements physiques	10

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Isolement des actinomycètes.....	11
1.1. Origine et prélèvement des échantillons.....	11
1.2. Préparations	11
1.3. Ensemencement	11
1.4. Incubation	11

1. 5. Isolement des actinomycètes	12
❖ Isolement selectif par traitement aux CaCO ₃ des échantillons de sol	12
1.6. Conservation des souches	12
2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des actinomycètes	15
2.1. Les souches cibles	15
2.2. La standardisation de l'inoculum	15
2. 3. Les tests d'activité	15
3. Etude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées.....	16
3. 1. Sélection des souches d'actinomycètes	16
3. 2. Etude des caractères morphologiques.....	17
3. 2.1. Macromorphologie	17
3. 2.2. Micromorphologie.....	17
3. 3. Etude chimiotaxonomique	17
3.3.1. Obtention de la biomasse.....	18
3.3.2. Préparation des cellules	18
3.3.3. Détermination des acides aminés pariétaux	18
3.3.4. Détermination des sucres cellulaires	19
3. 4. Etude des caractères physiologiques et biochimiques	20
3. 4.1. Dégradation de divers composés organiques	20
3. 4.2. Tests de sensibilité aux antibiotiques	21
3. 4.3. Croissances à différents pH.....	22
3. 4.4. Croissances à différentes températures.....	22
3. 4.5. Production de la nitrate réductase.....	22

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Isolement des actinomycètes	23
2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes	28
3. Etude taxonomique des souches sélectionnées	32
3.1. Etude morphologique	32
3.1.1. Macromorphologie	32
3.1.2. Micromorphologie	36
3.2. Etude chimiotaxonomique	37

3.3. Etude physiologique	38
3.3.1. Dégradation des composés organiques.....	38
3.3.2. Croissance à différentes températures	40
3.3.3. Croissance à différents pH.....	40
3.3.4. Tests de sensibilité aux antibiotiques	40
4. Discussion générale.....	42
Conclusion générale	46
Références bibliographiques	48

♠ Annexes

Introduction

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes et la fréquence des infections et mycoses causées par les champignons, ont poussé à intensifier les recherches pour découvrir de nouvelles molécules bioactives (**Boubetra et al., 2013**).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses particulièrement intéressantes pour leur grande capacité à produire des métabolites secondaires avec diverses structures chimiques (**Valan et al., 2008**).

Les sols de palmeraies d'Algérie, qui constituent un écosystème assez particulier, ont montré une biodiversité surprenante en actinomycètes rares (**Sabaou et al., 1998**).

Les actinomycètes rares constituent une source attractive de nouvelles molécules bioactives, la recherche de ces dernières peut être concentrée sur des isolements sélectifs d'actinomycètes en excluant les *Streptomyces*, ce fait est démontré par la production de plusieurs antibiotiques très intéressants par : *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Actinoplane*, *Saccharopolyspora* et *Streptosporangium* (**Boubetra et al., 2013**).

Toutefois, les espèces appartenant au genre *Streptomyces* représentent 80% de la population totale des actinomycètes du sol, plus 75-80% des antibiotiques commercialisés et utilisés en médecine sont produits par ce genre. L'isolement de nouvelles espèces de *Streptomyces* est très fortement recommandé pour la production de nouvelles molécules biologiquement actives et leur importance clinique (**Smaoui et al., 2012**).

Ce modeste travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche dirigé par le Pr. KECHA M. au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Bejaia sur la production de métabolites bioactives par des actinomycètes.

L'objectif consiste en étude de souches d'actinomycètes isolées à partir d'échantillons de sol du Sahara algérien (Ghardaïa, Timimoune et El Golea), connus pour leurs conditions climatiques arides et hostiles, dans le but de produire des molécules antibiotiques. Après l'obtention de souches pures, des tests d'activité sont effectués pour en sélectionner les plus performantes vis-à-vis des bactéries cibles à Gram positif et à Gram négatif connues pour leurs pathogénicités. Des isolats sélectionnés, pour leur activité antagoniste importante, ont fait l'objet d'une étude taxonomique dans le but d'identifier le genre.

Ce document est structuré comme suit, une synthèse bibliographique sur les actinomycètes est présentée en chapitre I : isolement sélectif, écologie, taxonomie, importance ainsi qu'un aperçu sur l'importance des nouvelles molécules bioactives produites par de nouveaux genres ou espèces d'actinomycètes.

Une deuxième partie (expérimentale) qui comprend :

- L'isolement des actinomycètes à partir d'échantillons de sols sahariens ;
- Des tests d'activité des souches isolées et purifiées vis-à-vis des germes cibles de référence ;
- L'étude taxonomique (morphologique, chimique et physiologique) des isolats sélectionnés.

Enfin, le chapitre III inclut la partie résultats et discussion, suivie par une conclusion et perspectives.

Chapitre I
Généralité sur
les
actinomycètes

1. Généralités sur les actinomycètes

1.1. Définition

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positif avec une proportion de G+C élevée (>55 %) (Nanjwad *et al.*, 2010). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (Larpent et Sanglier, 1989).

Les actinomycètes sont hétérotrophes et/ou chimiotrophes pour certains (Williams *et al.*, 1984). Ils sont capables de dégrader certains résidus des matières organiques, tels que les lignocelluloses, la chitine...etc, et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Dommergues et Mangenot, 1970).

1.2. Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires, que l'on rencontre presque sur tous les substrats naturels courants. Leurs nombres dépendent de nombreux facteurs, dont la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (Loucif, 2011).

Dans le sol, les actinomycètes représentent 80% de la population microbienne totale, par ailleurs, dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60% de la microflore tellurique. Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à un climat aride, se sont révélés riches en actinomycètes parfois réputés "rares" de par le monde, on les trouve non seulement dans les horizons de surface, mais aussi à plus de 2 mètres de profondeur et en quantité appréciable (Sabaou *et al.*, 1998).

1.3. Importance des actinomycètes

Ce sont les microorganismes les plus utilisés en biotechnologie (Berdy, 2005).

Ils produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées (Thomson *et al.*, 2004). Voir tableau (XV) Annexe (IV). En effet, ils sont à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine (Sujatha *et al.*, 2005).

Leur importance majeure s'exprime dans les domaines pharmaceutique, médicale et vétérinaire, aussi une analyse réalisée sur un nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse, a indiqué que plus de 60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart a été extraite à partir d'actinomycètes, tels que l'actinomycine D (**Demain et Lancini, 2006**), on note aussi l'arsenal enzymatique telles que des cellulases et des xylanases utilisés dans le traitement des effluents (**Oskay et al., 2004**).

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux (**Khachatourians, 1998**). Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux, mais aussi dans l'alimentation pour accroître les rendements zootechniques (**Schwarz et al., 2001**).

2. Taxonomie des actinomycètes

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

2.1. Systématique des actinomycètes

Depuis plusieurs années, la taxonomie des actinomycètes a connu une évolution importante en fonction du développement des connaissances. Ce groupe de microorganismes procaryotes appartient à l'ordre des Actinomycétales créé par Buchanan en 1917 (in Bergy's, 1989).

Actuellement, les actinomycètes appartiennent au phylum XXVI Actinobacteria **Goodfellow (2012)** qui comprend 5 classes, 19 ordres, 50 familles et 221 genres. Cette nouvelle classification est basée exclusivement sur les séquences de gène codant pour ARNr 16S. Voir tableaux (XVIII) annexe (VII).

2.2. Détermination des genres d'actinomycètes

L'identification des genres d'actinomycètes est basée sur les critères morphologiques et chimiques. Les caractères morphologiques sont suffisants pour la détermination de certains genres tels que: *Streptosporangium*, *Planobispora*, *Micromonospora*,...etc. (**Ouhdouch, 2003**).

2.2.1. Les critères morphologiques

➤ Les critères macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois à différencier les genres d'actinomycètes entre eux (**Boudjella, 2007**). Les caractères importants sont la présence et la couleur du mycélium aérien (MA) et/ou du substrat (MS) ainsi que la production de pigments diffusibles dans le milieu de culture (**Badji, 2006**).

➤ Les critères micromorphologiques

Parfois il est possible de classer une souche dans un genre donné en se basant sur les critères micromorphologiques tout à fait évidents et particuliers comme par exemple pour les genres: *Micromonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. Les caractéristiques micromorphologiques englobent la production de spores, leurs formes, leurs mobilités, aspect de leurs surfaces, leur disposition sur les hyphes et leurs nombres etc. (**Ouhdouch, 2003**).

2.2.2. Les critères chimiotaxonomiques

Les méthodes chimiotaxonomiques ont un grand impact sur la classification des actinomycètes et furent d'un apport essentiel pour distinguer de nombreux genres entre eux (**Rong et al., 2009**).

La chimiotaxonomie est l'étude des variations chimiques dans les organismes et l'utilisation de caractères chimiques pour la classification et l'identification. Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura* et *Nocardia*) nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (**Boudjella, 2007**).

➤ Composition pariétale en acides aminés

Le peptidoglycane des bactéries Gram positif est l'un des indicateurs les plus importants de la classification. Spécialement, le DAP (Acide diaminopimelique) ou sous ses formes : lysine, glycine, ornithine ou DAB (Acide 2,4-diaminobutyrique), connu comme la clef de l'analyse chimiotaxonomique (**Yuriko et al., 2007**).

➤ Les sucres cellulaires et pariétaux

D'après **Lechevalier et Lechevalier, 1970**, les sucres sont présents sous forme de couple: arabinose–galactose, arabinose–xylose, rhamnose–galactose, et le madurose ainsi sur la base des acides aminés et la composition en sucres, plusieurs chimiotypes sont définis dans le tableau I ci-après.

➤ Les lipides membranaires et pariétaux

L'analyse des lipides est largement utilisée dans la systématique bactérienne et l'identification des actinomycètes (**Cross et Goodfellow, 1973**). L'étude concerne l'analyse des acides gras à longue chaîne, les ménaquinones et les phospholipides.

Tableaux I: Critères chimiques d'identification des Actinomycètes (Larpent, 2000).

Type	Genres
Type I: LL-DAP, Glycine	<i>Streptomyces, Streptoverticillium, Nocardioides,</i> <i>Intrasporangium, Kineosporia,</i>
Type II: mésoDAP, Glycine, arabinos	<i>Micromonospora, Glycomyces,</i> <i>Actinoplanètes, Dactylosporangium, Pilimelia</i>
Type III: méso DAP, Galactose	<i>Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces,</i> <i>Nocardiosis, Streptosporangium, Geodermatophilus,</i> <i>Microtetraspora, Brevibacterium, Dermatophilus, Frankia,</i> <i>Maduromycètes</i>
Type IV: méso DAP, Arabinose, Galactose	<i>Kibdelosporangium, Actinopolyspora, Amycolata,</i> <i>Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Kibdelosporangium,</i> <i>Pseudonocardia, Saccharomonospora</i>
Type V: Lysine, Ornithine	<i>Actinomycesisraelii</i>
Type VI: Lysine, Acide aspartique	<i>Actinomycesbovis, Microbacterium,</i> <i>Oerskovia, Promicromonospora, Arcanobacterium</i>
Type VII: DAB Glycine, Lysine (+/-)	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
Type VIII: Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

Toutes les parois contiennent les molécules suivantes: glucosamine, acide muramique, alanine, acide glutamique.

DAP: acide diaminopimélique. DAB: acide diaminobutyrique

➤ Les phospholipides

La diversité des phospholipides a permis à **Lechevalier et al., (1977)** de distinguer cinq profils phospholipidiques caractéristiques des actinomycètes qui sont présentés dans le tableauII:

Tableau II: Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes
(Lechevalier *et al.*, 1977).

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PhosphatidylGlycérol	Genres
PI	-	-	-	V	<i>Actinmadura</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiosis</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Streptosporangium</i>
PV	-	-	+	+	<i>Cellulomonas</i>

Tous les actinomycètes possèdent le Phosphatidyinositol.

(+): présent, (-): absent, (V): variable suivant les espèces d'un même genre. PC: Phosphatidyl Choline; PE:

Phosphatidyl Ethanolamine; PG: Phosphatidyl Glycérol.

➤ Les ménaquinones

Les quinones sont reconnus comme étant les plus importants marqueurs dans la chimiotaxonomie microbienne (Gao *et al.*, 2003).

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires; leur classification s'effectue en fonction du nombre d'unités isoprènes et du nombre de doubles liaisons (O'Donnell *et al.*, 1982).

La clé d'identification des principaux genres est résumée dans le tableau(XIX), annexe VIII.

2.3. Critères d'identification des espèces

2.3.1. Les critères physiologiques et taxonomie numérique

Les caractères physiologiques discriminants permettent de différencier les espèces appartenant à un même genre. Ils font recours à des tests de dégradation de

différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, etc.), de résistance aux agents antimicrobiens et à divers agents physico-chimiques (pH, température, salinité, etc.), et à plusieurs tests enzymatiques (**Lamari, 2006**).

2.3. 2. Les critères moléculaires

Les études moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces (**Lamari, 2006**). Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes on cite:

- Hybridation ADN-ADN;
- Séquençage de l'ADN ribosomique 16S;
- Détermination du coefficient de Chargaff (G+C%).

3. Isolement sélectif des actinomycètes rares

Il est difficile d'isoler de nouveaux genres d'actinomycètes rares avec les méthodes conventionnelles, pour le faire il faut tenir compte de plusieurs facteurs durant la procédure d'isolement telle que le choix de l'habitat écologique pour l'échantillonnage, les traitements physiques et chimiques ainsi que l'utilisation de milieux d'isollements sélectifs. Voir tableau (XIV) Annexe III. (**Monisha, 2011**).

3.1. Choix de l'écosystème pour l'échantillonnage

Le choix de nouvelles niches écologiques non explorées auparavant est un facteur essentiel dans la démarche d'isolement.

- Les fonds marins: à potentiel intéressant restent très largement inexplorés;
- Les soles alcalines et acides: potentielle de production enzymatique et d'antibiotiques ;
- Les déserts et décharges industrielles;
- Les glaciers (pôle nord et sud): isolement d'actinomycètes psychrophile. (**Zhang et al., 2007**).

3.2. Traitement chimique

On cite plusieurs méthodes de prétraitement chimique du sol pour faciliter l'isolement
Voir tableau (XIV) Annexe III:

- Agent germicide: les spores de *Streptosporangium* et *Microbispora* résiste au phénol (**Hong, et al., 2009**);
- Addition du carbonate de calcium;
- Les antibiotiques et les antifongiques: sont ajoutés au milieu d'isolement ex: Gentamicine, kanamycine, acide nalidixique, etc. (**Zhang, 2011**);
- Chimiotaxie: traitement avec xylose, chlorure, γ -collidine, bromure et vanilline qui facilitent l'accumulation des spores des genres suivants : *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* et *Catenuloplanes* (**Hayakawa, 2008**);
- Traitement au chloramine: en l'additionnant au milieu d'isolement (l'acide humique - vitamine) la croissance d'actinomycètes rare est favorisée (**Hong et al., 2009**).

3.3. Traitements physiques

- Traitement à la chaleur: Traitement du sol à 100°C pendant 15 minutes afin de sélectionner le genre *Actinomadura* (**Suzuki et al., 1994**);
- Centrifugation sur gradient de sucrose: l'utilisation de ce gradient a permis l'isolement sélectif de *Nocardia sp.* (**Yamamura et al., 2005**);
- Centrifugation différentielle: pour séparer les zoospores mobile et élimine les non mobiles (**Hayakawa, 2008**);
- La radiation: traitement des échantillons du sol aux UV.

Chapitre II
Matériel
et
Méthodes

Les réactifs et les matériels utilisés sont cités en annexe (IX).

1. Isolement des actinomycètes

1.1. Origine et prélèvement des échantillons

Des échantillons de sol du Sahara Algérien ont été prélevés par un membre de l'équipe de recherche dirigé par Pr.Kecha M. à partir de trois régions du sud du pays : Ghardaïa, El Golea le 28/12/2012 et Timimoune le 30/12/2012. Le sol est prélevé avec une spatule stérile après avoir écarté les 5 premiers centimètres de la couche superficielle du sol, le prélèvement est introduit dans des flacons stériles selon la méthode de Ponchon et Tardieux, (1962) cité par **Boudemagh** (2007).

1.2. Préparations

Un gramme de sol est introduit dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile (9g NaCl /1L d'eau distillée) puis bien agité au Vortex. Des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) ont été effectuées à partir de la solution mère préalablement obtenue.

1.3. Ensemencement

100µL de chaque dilution sont étalés sur la surface des boîtes de Petri contenant chacune un milieu de culture (1boîte par milieu et par dilution). (**Boudjellaa et al., 2006**).

Les neuf (09) milieux utilisés sont les suivants : milieu Glucose extrait de Malt et extrait de Levure (GLM), Pridham, International *Streptomyces* Project (ISP2), Glucose-asparagine, milieu WILLIAMS (SCA), Bennett, Chitine, Arginine Glycérol Sels (AGS), milieu Glucose Extrait de Levure Agar (YEGA), leurs compositions sont données en annexe(I).

NB : Les milieux d'isolement utilisés ne sont pas additionnés d'antifongique et d'antibactérien.

1.4. Incubation

Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant une durée pouvant atteindre 21 jours. La lecture est faite quotidiennement à partir du 2^{ème} jour. Voir Figure (1).

Les actinomycètes sont reconnus par leur aspect caractéristique (colonies ancrées dans la gélose, présence d'un aspect poudreux à la surface). Une étape de purification de ces souches est alors entamée, tous les repiquages sont effectués sur milieu SCA.

❖ **Isolement sélectif par traitement au CaCO₃ des échantillons de sol**

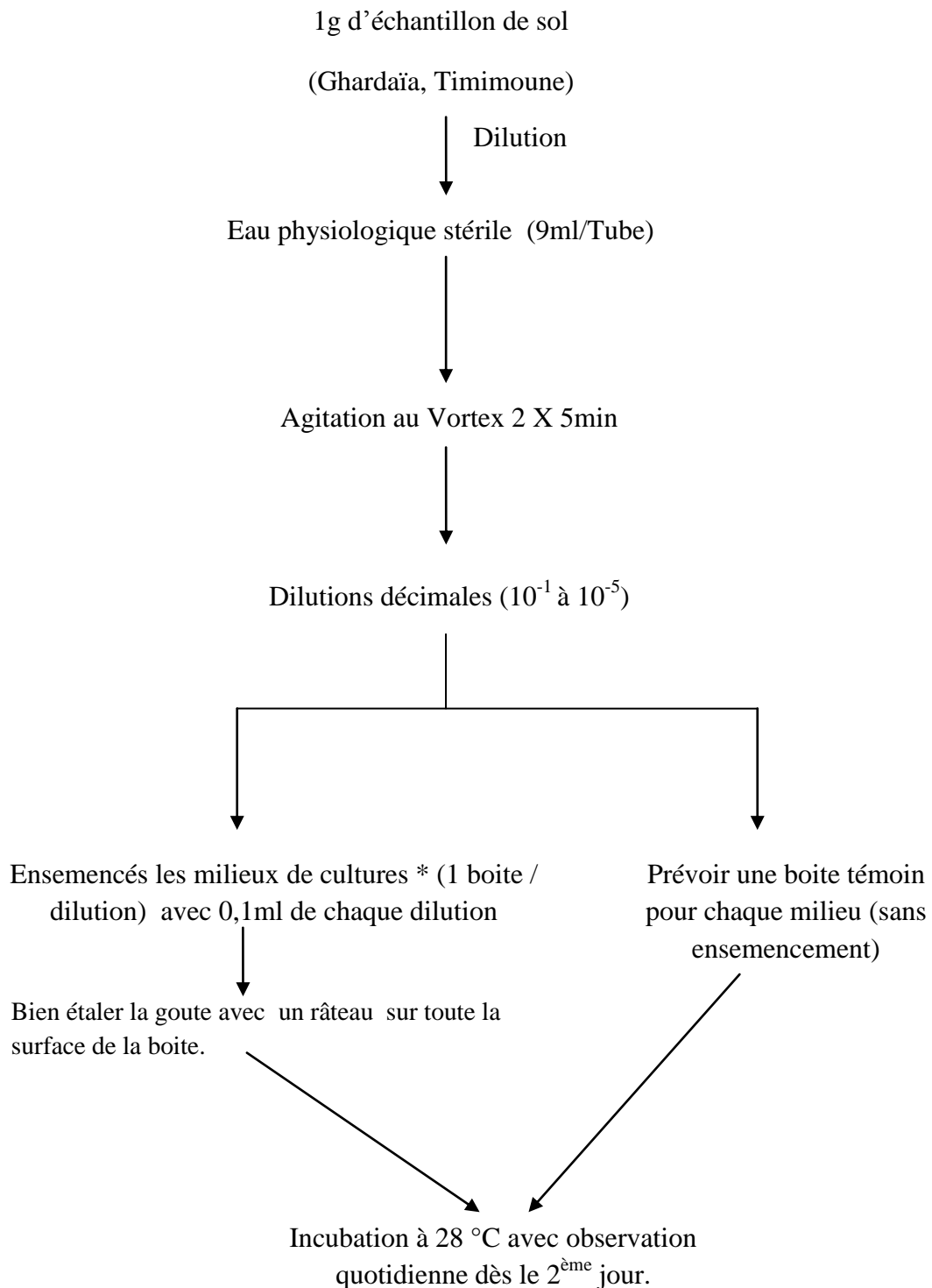
Le traitement du sol par le Carbonate de Calcium augmente la croissance des actinomycètes et diminue celle des champignons (**Monisha et al., 2011**).

0.1 gramme de CaCO₃ ont été additionnés à un gramme de chaque échantillon de sol sec provenant de (Ghardaïa, El-Goléa, Timimoune) mis dans des boîtes de Petri, puis on incube à 28°C pendant 7 jours. Après cette période, les échantillons du sol ont été dilués dans des tubes contenant 10ml d'eau physiologique stérile, ensuite bien agités au Vortex. Cette solution sert à ensemercer les boîtes de Petri à raison de 100 µl. Neuf (09) milieux de culture ont été utilisés sans ajout d'antifongique ou d'antibiotique. On incube les boîtes à 30°C pendant une durée pouvant atteindre 21 jours. Voir la Figure (2) (**Boudemagh et al., 2005**).

Après apparition des premières colonies d'actinomycètes reconnues morphologiquement, et ayant produit des spores de propagation, on entame une étape de purification par repiquage sur milieu SCA.

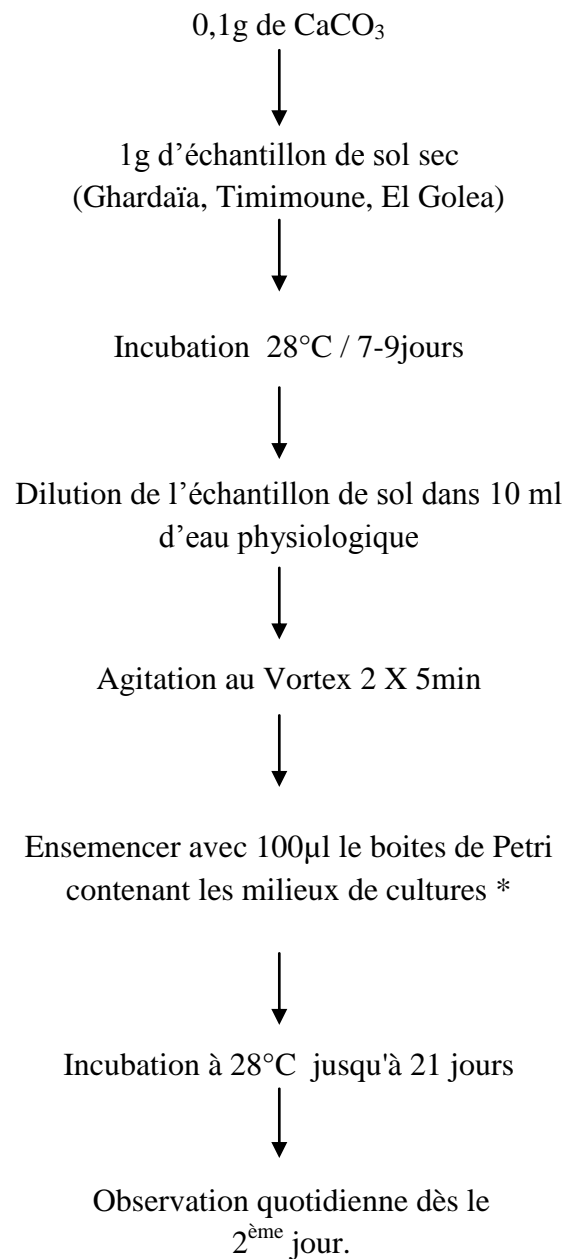
1.6. Conservation des souches

Les souches obtenues après purification sont conservées dans des tubes de gélose incliné SCA, et cela en ensemençant la surface de la gélose avec des spores d'actinomycètes, ensuite on les incube à 28°C. Après croissance et apparition des souches, les tubes sont retirés de l'étuve et conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.



* : les milieux (GLM, SCA, ISP2, Pridham, Chitine, Bennett)

Figure1 : Protocole d'isolement non sélectif d'actinomycètes de sols sahariens



* On utilise 09 milieux de culture (GLM, Pridham, ISP2, glucose-asparagine, SCA, Bennett, Chitine, AGS, YEGA)

Figure2 : Protocole d'isolement sélectif d'actinomycètes des sols sahariens
(Avec traitement au CaCO₃).

2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des actinomycètes

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes, a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar.

2.1. Les souches cibles

Trois souches de référence ont été utilisées : deux bactéries à Gram positif et une bactérie à Gram négatif aimablement fournie par Dr Touati A. (Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la F.S.N.V. de Bejaia)

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
- SARM (*Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline). (collection du laboratoire)

2.2. Standardisation de l'inoculum

Des cultures âgées de 24hensemencées sur Muller-Hinton ont été utilisées. On prélève une importante quantité de cellules avec une ansedans des tubes qui contiennentde l'eau physiologique stérile. Les densités optiqueont été mesurées avec un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini 1240) à une longueur d'onde $\lambda=625$ nm et la valeur de la densité optique DO=0,48-0,49 correspond à 10^7 UFC/ml (déterminée expérimentalement)

2.3. Les tests d'activité

❖ Test des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes isolées ont étéensemencées en stries serrées de façon à avoir un tapis d'actinomycètes sur milieu SCA, puis incubés à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres de 3mm de diamètre ont été découpés et placés sur des boites contenant le milieu Mueller-Hinton préalablementensemencées par écouvillonnage. Les boites ont été mises à 4°C pendant 2 heures pour la diffusion des substances bioactives élaborées par les souches testées, puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Voir figure(3), les diamètres d'inhibition ont été alors mesurés et notés.

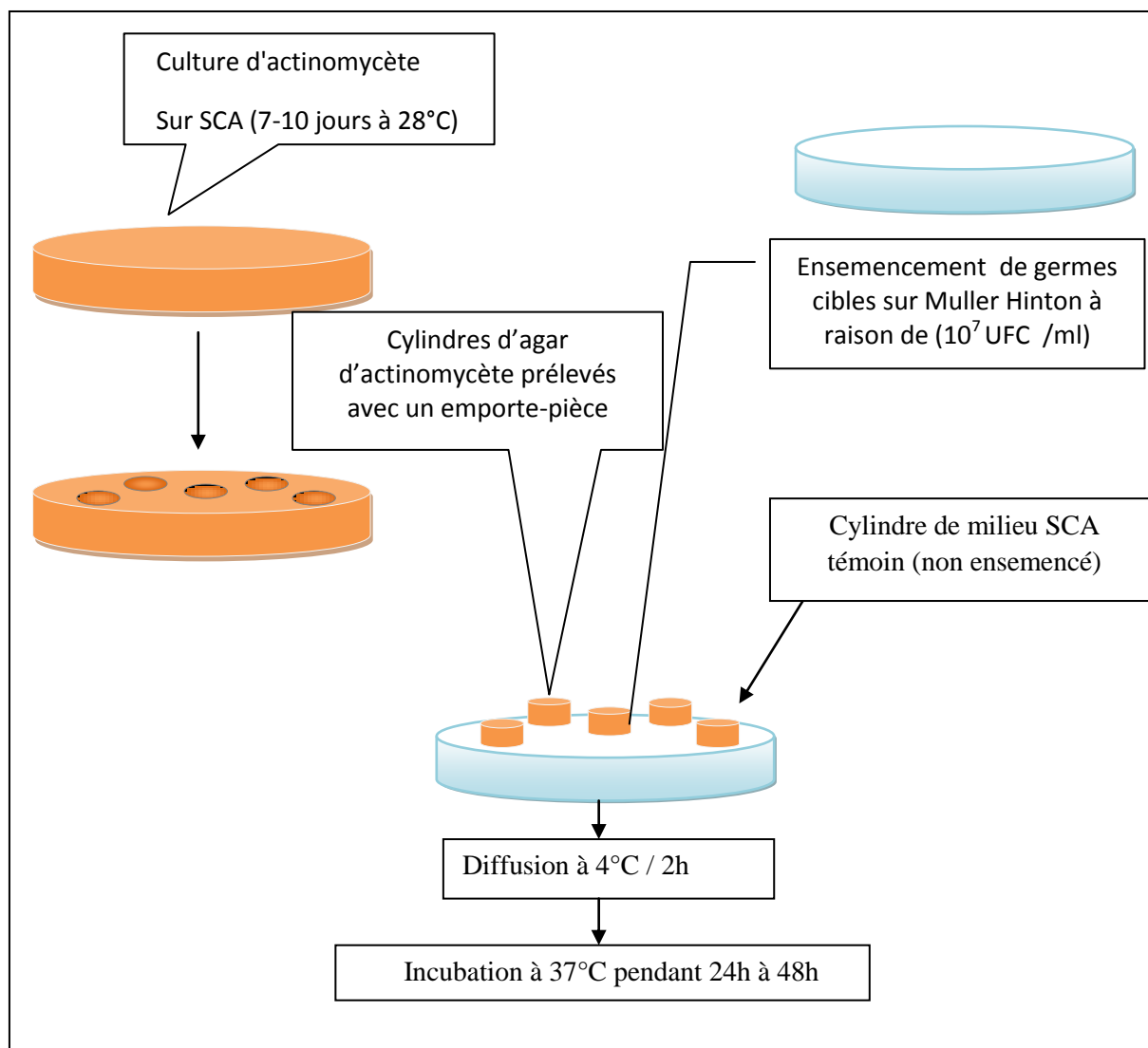


Figure3 : Test de mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar.

3. Etude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées

3.1. Sélection des souches d'actinomycètes

L'étude taxonomique a été réalisée sur des souches pures isolées et sélectionnées sur la base de leur activité antagoniste vis-à-vis des 3 germes cibles testés: 1 bactérie Gram- (*E. coli*) et 2 bactéries Gram+ (*S.aureus*, SARM) pathogènes pour l'homme. Les souches d'actinomycètes qui représentent le plus d'activité (la plus grande zone d'inhibition) et le plus large spectre (active sur tous les germes cibles utilisés) ainsi que le plus petit temps de génération ont été retenues pour une étude taxonomique.

3.2. Etude des caractères morphologiques

3.2.1. Macromorphologie

Il s'agit de déterminer l'aspect des colonies, la couleur du mycélium aérien (MA) et celui du substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles sur différents milieux de culture tels que l'ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7 et l'ISP9 préconisés par «l'International *Streptomyces* Project» (**Shirling et Gottlieb, 1966**) ainsi que sur milieu GYEA (**Athalye et al., 1981**). Les compositions de ces derniers ont été données en annexe (I). Les colonies d'actinomycètes cultivées sur les différents milieux cités précédemment sont observées à l'œil nu et à la loupe binoculaire : CARL ZIESS 475002 (au grossissement 10 x 0,8 et 10 x 2,5).

L'évaluation de la croissance et du développement du mycélium aérien ainsi que la présence de pigments diffusibles sur chaque milieu ont été observé et notés après 7, 14 et 21 jour d'incubation à 28°C.

3.2.2. Micromorphologie

Les observations micromorphologiques ont été réalisées directement sur boîtes de Petri et ce pour étudier le mycélium en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (**Williams et al., 1989**). Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique (CARL ZIESS) à deux grossissements (10x40 et 10x100) après 7 et 14 jours d'incubation.

3.3. Etude chimiotaxonomique

Cette étude est un bon critère de discrimination des différents groupes d'actinomycètes (**Lamari, 2006**). Les analyses ont été effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, elle consiste à déterminer d'une part l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) (LL ou DL = méso) et la présence ou non de la glycine au niveau de la paroi cellulaire par chromatographie ascendante sur couche mince et pour connaître également la composition cellulaire en sucres (recherche de couple de sucres caractéristiques).

3.3.1. Production de la biomasse :

Des spores d'actinomycètes produites au bout de 7 jours d'incubation à 28 °C ont été utilisées pour ensemercer des tubes qui contenant 3 ml de milieu SCA liquide servant de pré culture, ces tubes sont incubés à leur tour dans un bain marie sous agitation à 28°C. Après 7 à 14 jours, ces derniers ont été utilisés pour ensemercer des flacons de 500ml contenant 100 ml de milieu SCA liquide.

3.3.2. Préparation des cellules

Les mycélia des souches sélectionnées ont été récupérés par filtration sur papier Wattman n°1 ; et stérilement mis dans des eppendorfs ; le culot obtenu après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 minutes est lavées avec de l'eau distillée stérile, cette opération a été répétée 3 fois, le culot final est laissé sécher devant le bec-Bunsen. Enfin les eppendorfs ont été mis au réfrigérateur à 4°C pour une utilisation ultérieure.

3.3.3. Détermination des acides aminés pariétaux

Elle consiste en la détermination de l'isomère (LL ou méso) de l'acide diaminopimélique (DAP) et de rapporter la présence ou l'absence de la glycine et de la lysine. La méthode utilisée est celle de **Staneck et Roberts** (1974), qui consiste en une hydrolyse cellulaire à chaud en présence d'acide chlorhydrique, selon le protocole suivant :

❖ Hydrolyse cellulaire

- 10 mg du mycélium sec de chaque isolat d'actinomycète sont hydrolysés pendant 18h à 100°C par 1ml d'HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés.
- Les hydrolysats sont recueillis après filtration sur filtre seringue 0,45µm puis concentrés à sec à l'aide d'un bain de sable à chaud;
- Des lavages répétés avec l'eau distillée sont effectués jusqu'à élimination totale de l'HCl;
- Le résidu sec est finalement repris dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie;

❖ Analyse chromatographique des hydrolysats

Les acides aminés pariétaux sont déterminés par une chromatographie ascendante sur gel de silice (G60) **Staneck et Roberts (1974)**.

- 20µl de chaque hydrolysat cellulaire ont été déposés sur la plaque de gel de silice;
- 10µl de la solution aqueuse standard de l'acide diaminopimelique (DAP) contenant les deux isomères LL et DL (0,01M), et la glycine (0,2% m/v);
- Un développement de 2h en utilisant le solvant méthanol-eau distillée-acide chlorhydrique-pyridine (80/17,5/2,5/10 v/v) ;
- Les plaques ont été séchées, à température ambiante ;
- La révélation a été effectuée à l'aide d'une solution de Ninhydrine à 0,2% (m/v dans de l'acétone), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5min ;
- Les taches de DAP apparaissent de couleur brune olive virant au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL, par contre la glycine apparait de couleur violette et migrent plus rapidement que les isomères de l'acide diaminopimelique (DAP).

3.3.4. Détermination des sucres cellulaires

La caractérisation des sucres est réalisée selon la méthode de **Lechevalier et Lechevalier (1970)** et **Staneck et Roberts (1974)** (chromatographie ascendante). Elle consiste à déterminer les couples de sucre présents dans la paroi cellulaire.

❖ Hydrolyse cellulaire

- 50mg de mycélium sec ont été hydrolysés par 1ml d'acide sulfurique 1N (dans des tubes à vis hermétiquement scellés) pendant 2h à 100°C ;
- Les hydrolysats acides ont été neutralisés avec une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de Baryum (BaOH₂) jusqu'à obtention d'un pH neutre ;
- Le précipité blanc formé a été éliminé par centrifugation à 4000 tr/min durant 20min ;
- Le surnagent a été recueilli, évaporé à sec avec un bain de sable à chaud ;
- Le résidu final obtenu a été dissout dans 0,3ml d'eau distillée puis analysé par chromatographies ascendante.

❖ Analyse chromatographique des hydrolysats

- 20µl de chaque hydrolysats ont été déposés sur une plaque de CCM, de même que 15µl de chaque solution aqueuse standard des sucres suivant : D-ribose, rhamnose, xylose, galactose, arabinose, glucose ;
- Les plaques CCM ont été développées pendant 2h dans un système de solvant composé d'un mélange de : n-butanol/eau distillée/pyridine/toluène (50/30/30/5 v/v) ;
- Les plaques sont séchées à température ambiante ;
- La révélation a été effectuée à l'aide d'une solution de diphenylamine –aniline, après un chauffage de 5min à 100°C ;
- Les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et violettes à bleues pour les hexoses.

3.4. Etude des caractères physiologiques et biochimiques**3.4.1. Dégradation de divers composés organiques****➤ Utilisation des sucres comme seule source de carbone**

Cette étude a été réalisée sur le milieu ISP9 (**Pridham et gottlib, 1948**). Les glucides ont été ajoutés stérilement au milieu ISP9 (milieu de base) à raison de 1% (M/V), grâce à des seringues stériles.

Les sucres utilisés, sous forme de solution en ampoules stériles, sont les suivants : Adonitol, Fructose, Glucose, Glycérol, Inositol, Lévulose, Maltose, Raffinose, Rhamnose, Saccharose, Sorbitol, Tréhalose et Xylose.

Les boîtes coulées et ensemencées ont été incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9 contenant 1% de glucose (témoin positif).

➤ Dégradation du Tween 80 (Sierra, 1957)

Ce test a été effectué pour voir la capacité des souches d'actinomycètes à dégrader le Tween 80 et cela en utilisant ce milieu: Tween 80 : 10ml ; NaNO₃ : 1g ; extrait de levure : 5g ; solution saline : 50ml ; CaCl₂, 2H₂O: 0,1g ; eau distillée q.s.p. 1000ml; agar : 18g, pH 7,2. La dégradation du Tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

➤ **Dégradation de l'amidon (Gordon et Smith, 1953)**

Ce test a été réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble, des boîtes ont été coulées etensemencées. Après 7 à 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose a été recouverte par une solution de Lugol. Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun ainsi la mise en évidence de l'hydrolyse se traduit par l'absence de coloration autour des colonies.

➤ **Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)**

Les souches d'actinomycètes sontensemencées sur gélose nutritive contenant 0.4% de gélatine, puis incubé pendant 7 à 14 jours à 28°C. L'addition du réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine (auréole claire autour des colonies).

3.4.2. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Ce test a été réalisé sur milieu SCA, les antibiotiques utilisés sont rapportés dans le tableau (III)

Tableau III : Antibiotiques utilisés dans le test de sensibilité

<i>ATB</i>	<i>Concentration</i>	<i>Code</i>	<i>ATB</i>	<i>Concentration</i>	<i>Code</i>
<i>Gentamicine</i>	<i>10µg</i>	CN 10	<i>aztreonem</i>	<i>30µg</i>	AT 30
<i>Nétilmicine</i>	<i>30µg</i>	NET30	<i>ampicilline</i>	<i>10µg</i>	AMP
<i>Amikacine</i>	<i>30µg</i>	AK 30	<i>ciprofloxacine</i>	<i>5mcg</i>	CIP 5
<i>Tobramycine</i>	<i>5µg</i>	TOB	<i>acide nalidixique</i>	<i>30µg</i>	NA 30
<i>Oxacilline</i>	<i>1µg</i>	OX 1	<i>Péfloxacine</i>	<i>10µg</i>	PEF
<i>Cefazoline</i>	<i>15µg</i>	CZ	<i>Erythromycine</i>	<i>15µg</i>	E 15
			<i>Spiramycine</i>	<i>100µg</i>	SP 100
<i>Cefoxitine</i>	<i>30µg</i>	CX 30	<i>Rifampicine</i>	<i>5µg</i>	RIF 5
<i>Céfépime</i>	<i>30µg</i>	FEP 30	<i>Imipeneme</i>	<i>5µg</i>	IMP
<i>Ertapenem</i>	<i>10µg</i>	ETP 10	<i>Céftazidime</i>	<i>30µg</i>	CAZ 30

3.4.3. Croissance à différents pH

Ce test a été réalisé sur milieu SCA liquide à des valeurs différentes de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) chaque tube estensemencé avec une colonie d'actinomycètes, puis incubé dans un bain Marie à agitation à 28°C. Le suivi de la croissance a été effectué à partir du 7^{ème} jour. L'apparition des pelotes et d'un bouillon de culture claire est synonyme d'une bonne croissance et de la pureté de la souche.

3.4.4. Croissance à différentes températures

Ce test a été effectué pour voir la capacité des actinomycètes à croître à différentes températures. Les souches d'actinomycètes sélectionnées ont été ensemencées sur milieu SCA solide et incubées à différentes températures (28, 30, 38, 45°C). La croissance est estimée après 7, 14 et 21^{ème} jours.

3.4.5. Production de la nitrate réductase (Marshall et Bourdon, 1987)

10ml d'un bouillon nitraté ont été mis dans des tubes et puis ensemencés avec les souches d'actinomycètes sélectionnées, l'incubation a été effectuée à 28°C pendant 14 jours.

Trois (03) gouttes de chacun des réactifs de Griss (NR1 et NR2) ont été ajoutées aux tubes : la réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés : si la couleur rouge apparaît cela signifie que les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche testée.

Chapitre III

Résultats

et

Discussion

Dans ce chapitre, les résultats ainsi que leurs discussions sont présentés en trois parties: isolement des actinomycètes, tests d'activité et identification phénotypique et chimiotaxonomique des isolats sélectionnés.

1. Isolement des actinomycètes

Au bout de 5 jours d'incubation à 28°C en milieu solide, les premières colonies d'actinomycètes ont commencé à apparaître. Reconnues par leur aspect morphologique caractéristique, elles apparaissent sèches, rugueuses, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, avec une grande variété de couleur, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Elles se développent lentement par rapport aux champignons et aux bactéries qui envahissent les boîtes de Pétri.

Tous les repiquages des isolats ont été effectués sur milieu SCA avec incubation à 28°C dans le but de purifier les souches.

Les résultats de l'isolement d'actinomycètes (sans traitement préalable des échantillons de sol) sont représentés dans le tableau (IV); ainsi 35 souches sont obtenues à partir de 2 échantillons provenant de Ghardaïa et de Timimoune.

Les résultats de l'isolement d'actinomycètes (obtenu avec traitement CaCO_3) sont présentés dans le tableau (V), 23 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir des 3 échantillons de sol de Ghardaïa, Timimoune et El Golea.

Donc, au total 58 souches ont été isolées, purifiées et conservées, elles ont été classées selon leur couleur. Le code des souches, le milieu d'isolement, les dilutions ainsi que l'origine des échantillons, sont représentés en récapitulatif sur les tableaux (IV et V).

Tableau IV : L'isolement de souches actinomycètes à partir des échantillons de sol non traités.

Série de couleur	Origine	Code	Couleur du Mycélium du substrat	Couleur du mycélium aérien	Milieu d'isolement initial
Blanc	Ghardaïa	G11c	Beige	Blanc	Chitine (sm)
	Ghardaïa	G21c	Crème	Blanc neige	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G31c	Blanc	Blanc cassé	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G3c	Crème	Blanc	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G16c	Jaune	Blanc neige	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G33	Beige	Blanc	SCA (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G20	Jaune	Blanc	SCA (10 ⁻²)
	Ghardaïa	G17c	Blanc	Crème	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G6c	Crème	Blanc	Chitine (sm)
	Ghardaïa	G15	Blanc	Blanc	SCA (10 ⁻⁴)
	Ghardaïa	G29c	Blanc clair	Blanc	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G19c	Jaune	Blanc	Chitine (sm)
	Ghardaïa	G34c	Crème	Blanc neige	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G32	Jaune claire	Blanc	SCA (10 ⁻⁴)
Gris	Ghardaïa	G5c	Crème	Blanc	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G24c	Blanc	Blanc	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G1	Blanc	Blanc neige	SCA (10 ⁻⁴)
	Ghardaïa	G4c	Crème	Gris claire	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G3c	Crème	Gris foncé	Chitine (10 ⁻⁵)
	Ghardaïa	G27c	Blanc	Gris	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G57c	Jaune	Gris claire	Chitine (10 ⁻³)
Jaune	Ghardaïa	G32			Bennett (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G30c	Jaune	Jaune claire	Chitine (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G9c	Jaune	Blanc cassé	Chitine (10 ⁻²)
	Ghardaïa	G26	Jaune	Gris clair	Bennett (10 ⁻³)
	Ghardaïa	G12	Jaune	Blanc	SCA

Rouge ocre	Ghardaïa	G18	Rouge	Rose	Bennett (10^{-4})
	Timimoune	T3	Jaune	Rose claire	SCA (10^{-4})
	Timimoune	T2	Marron	Marron chocolat	SCA (10^{-1})
	Timimoune	T1	Miel	Crème	SCA (10^{-1})
	Ghardaïa	G14	Crème	Blanc	Bennett (10^{-3})
	Ghardaïa	G25c	Rose	Blanc	Chitine (10^{-3})
	Ghardaïa	G10	Marron	Crème	Bennett (10^{-3})
	Ghardaïa	G8c	Blanc	Rose	Chitine (10^{-5})
	Ghardaïa	G23c	Rose	Blanc claire	Chitine (10^{-3})

Nous constatons que 32 souches ont été isolées du sol de Ghardaïa et seulement 3 souches pour celui de Timimoune, la gamme de couleurs obtenues est variée : blanche, grise, jaune et rouge ocre.

La figure 4 ci-dessous qui représente les résultats du tableau (IV) montre clairement que le meilleur milieu d'isolement est celui qui est à base de chitine avec 60% des souches isolées.

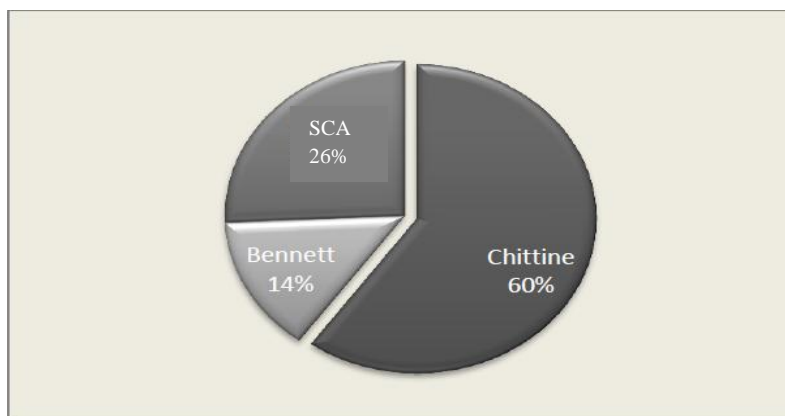


Figure 4 : Isolement d'actinomycètes à partir des échantillons de sol non traités sur différents milieux de culture.

Tableau V : L'isolement d'actinomycètes à partir des échantillons de sol traités au CaCO₃.

Série de couleur	Origine	Code	Couleur du Mycélium substrat	Couleur du mycélium aérien	Milieu d'isolement initial
Gris	El Golea	G6 tc3	Vert kaki	Gris clair	SCA
	Ghardaïa	G56 tc3	Jaune	Gris foncé	Bennett
	Ghardaïa	G2 tc3	Jaune moutarde	Gris	Bennett
	El Golea	M9 tc3	Jaune	Gris foncé	Bennett
Grenat	El Golea	M1 tc3	Grenat	Blanche	GLM
	El Golea	M3tc3	Grenat	Blanche	GLM
	El Golea	M4 tc3	Grenat	Grise	ISP2
	El Golea	M7 tc3	Grenat	Grenat	SCA
	El Golea	M8 tc3	Grenat	Rouge clair	SCA
	El Golea	M44 tc3	Grenat	Blanche	GLM
Rose	El Golea	M5 tc3	Crème	Rose	AGS
	Ghardaïa	G59 tc3	Crème	Rose	SCA
	El Golea	M20tc3	Rose	Grenat	SCA
	Timimoune	T1tc3	Marron	Rouge claire	Bennett
Blanc	El Golea	M33 tc3	Crème	Blanc	SCA
	Ghardaïa	G4 tc3	Blanc	Blanc	Bennett
	El Golea	M10 tc3	Jaune	Blanc	ISP2
	Ghardaïa	G9tc3	Jaune	Blanc	SCA
	El Golea	G61tc 3	Crème	Blanc neige	SCA
	Mania	M2 tc3	Jaune	Blanc neige	YEGA
	Ghardaïa	G62 tc3	Crème	Blanc	SCA
	Ghardaïa	G44tc3	Jaune citron	Blanc	Bennett
Ghardaïa	G3tc3	Jaune	Blanc	Bennett	

23 souches ont été obtenues à partir des 3 échantillons de sol étudiés, on note 14 souches provenant d'El Golea contre 8 souches de Ghardaïa et seulement une souche de Timimoune. Trois (03) séries de couleur ont été obtenues : blanche, grise et rose.

D'après les résultats du tableau (V) (isolement avec traitement au CaCO₃) le milieu Bennett était le meilleur milieu d'isolement, la figure 5 le montre de façon plus claire.

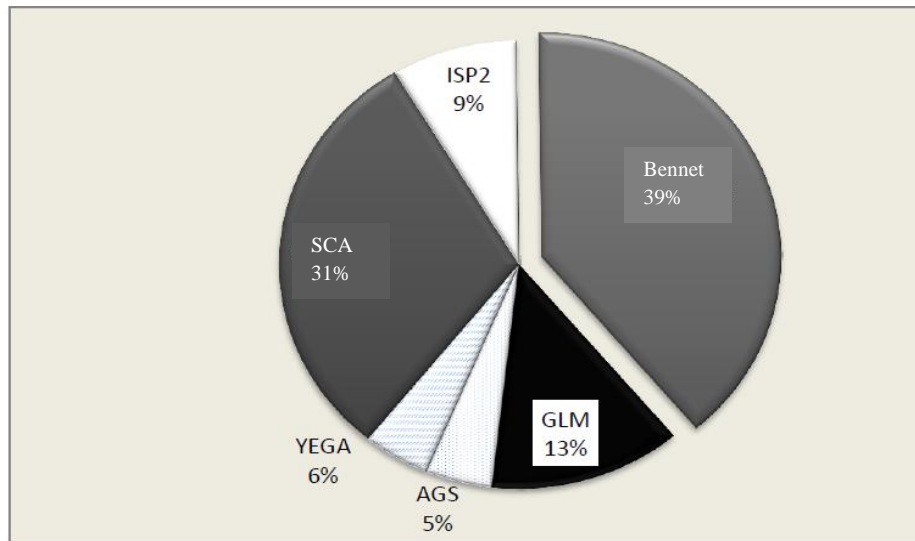


Figure 5 : Isolement d'actinomycètes à partir des échantillons de sol traités au CaCO_3 sur différents milieux de culture

En ce qui concerne l'origine des souches la figure.6 montre que l'échantillon provenant de Ghardaïa a permis l'isolement de 42 souches d'actinomycètes contre 12 pour celui d'El Golea et seulement 04 pour celui de Timimoun.

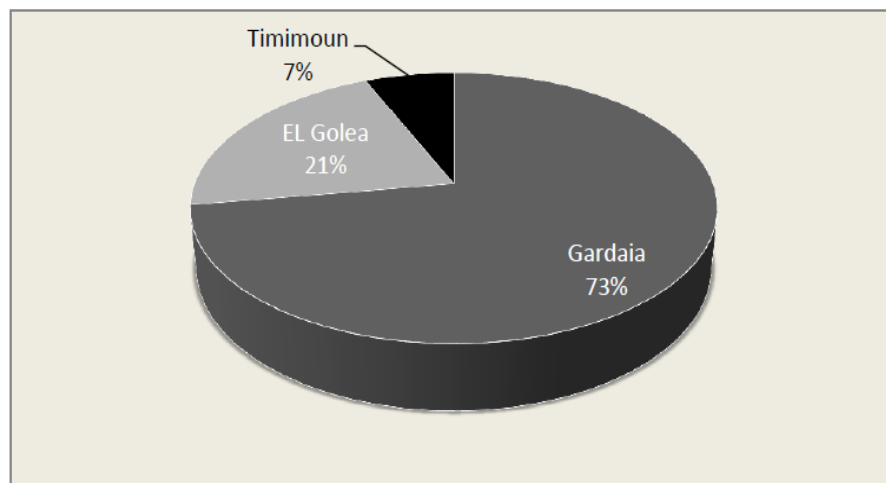


Figure 6 : Origine des échantillons de sol ayant permis l'obtention d'isolats d'actinomycètes.

2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des actinomycètes

L'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes isolées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar, qui a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes testées vis-à-vis des bactéries cibles utilisées. Au total 58 souches d'actinomycètes ont été testées par cette méthode.

La Figure 07 représente les résultats des tests d'activité des souches obtenues à partir des échantillons sans traitement, on remarque que 13 sur 35 souches sont actives sur au moins un germe cible alors que les autres souches n'ont montré aucune activité.

On note des zones d'inhibition importantes des souches G57c, G29c, G26, G30c avec un large spectre, par contre la souche G18 n'est active que sur un Gram négatif : *E. coli*.

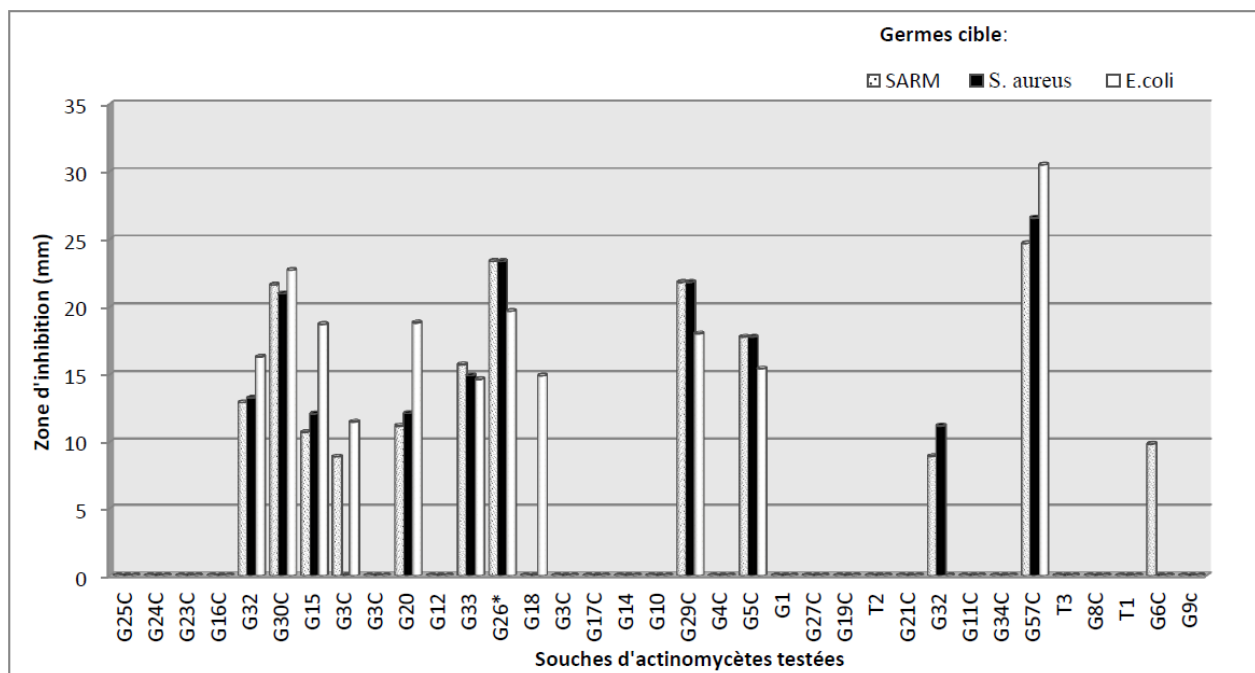


Figure 7: Tests d'activités antibactériennes des souches d'actinomycètes obtenues à partir d'échantillons de sol non traités vis-à-vis des germes cibles.

La figure 08 représente le pourcentage d'activité des actinomycètes testés avec seulement 37% de souches actives, et d'après les résultats on a déduit que le meilleur milieu d'isolement d'actinomycètes producteurs de molécules bioactives antagonistes vis-à-vis des bactéries est le milieu chitine, ce qui est illustré dans la figure 09.

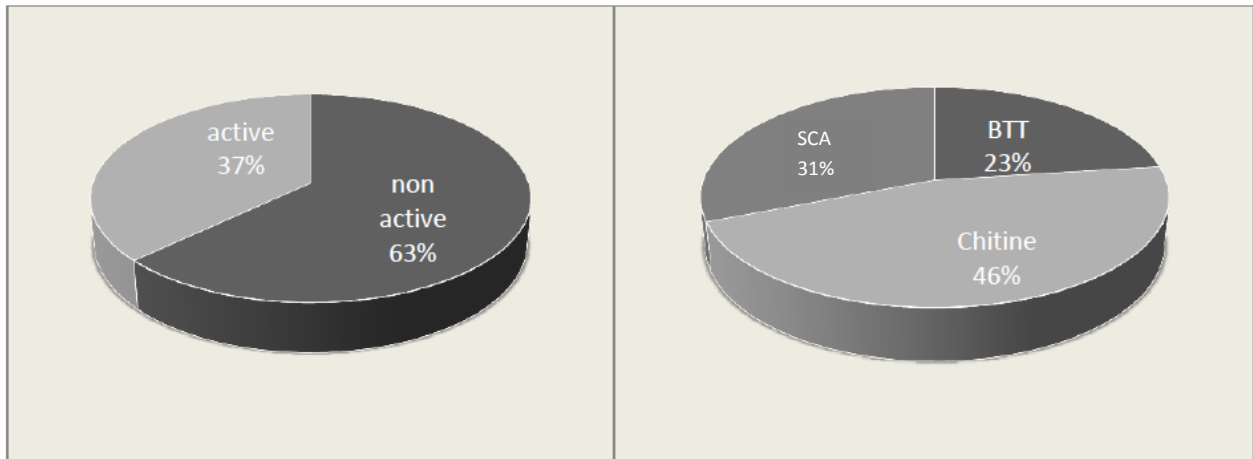


Figure 08 : Distribution des souches d'actinomycètes obtenues à partir des échantillons de sol non traité

Figure 09 : Distribution des souches obtenues à partir du sol non traité en fonction des milieux d'isolement

La figure 10 représente les résultats des tests d'activité des souches obtenues à partir des échantillons de sol traités au CaCO_3 , on remarque que 14/23 souches sont actives sur au minimum un germe cible alors que le reste c'est-à-dire 9/23 des souches n'ont montré aucune activité contre les germe cibles utilisés.

On note des zones d'inhibitions importantes des souches G56tc₃, M5tc₃ et G3tc₃ avec un large spectre, par contre les souches G2tc₃, G4tc₃, G6tc₃ n'ont montré une activité que sur les bactéries à Gram positif (*S.aureus*, SARM).

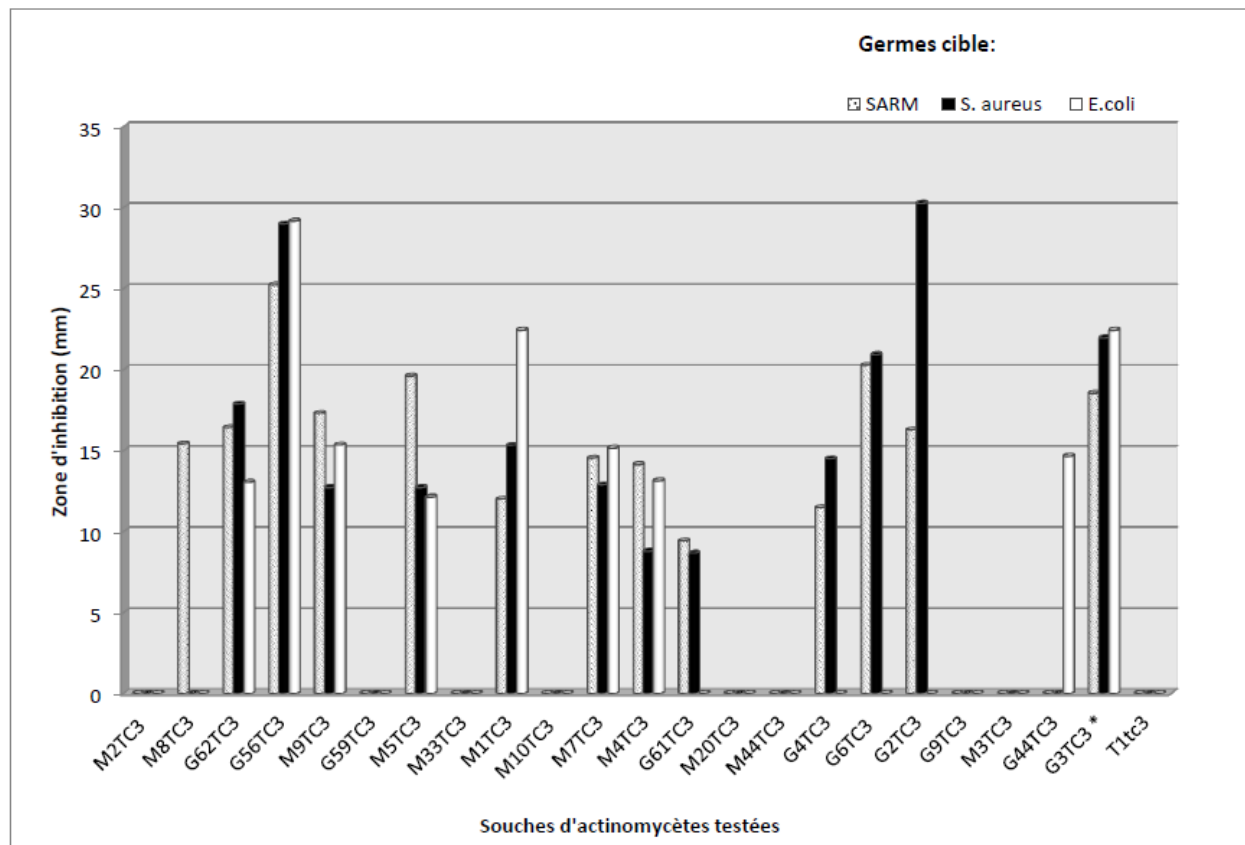


Figure 10: Tests d'activités antibactériennes des souches d'actinomycètes obtenues à partir d'échantillons de sol traités au CaCO_3 vis-à-vis des germes cibles.

La figure 11 représente le pourcentage d'activité des actinomycètes testés avec 61% de souches actives, et d'après les résultats on a déduit que les meilleurs milieux d'isolement d'actinomycètes avec traitement de sol au CaCO_3 , producteurs de molécules bioactives antagonistes vis-à-vis des bactéries sont les milieux Bennett et SCA, ce qui est illustré dans la figure 12.

,

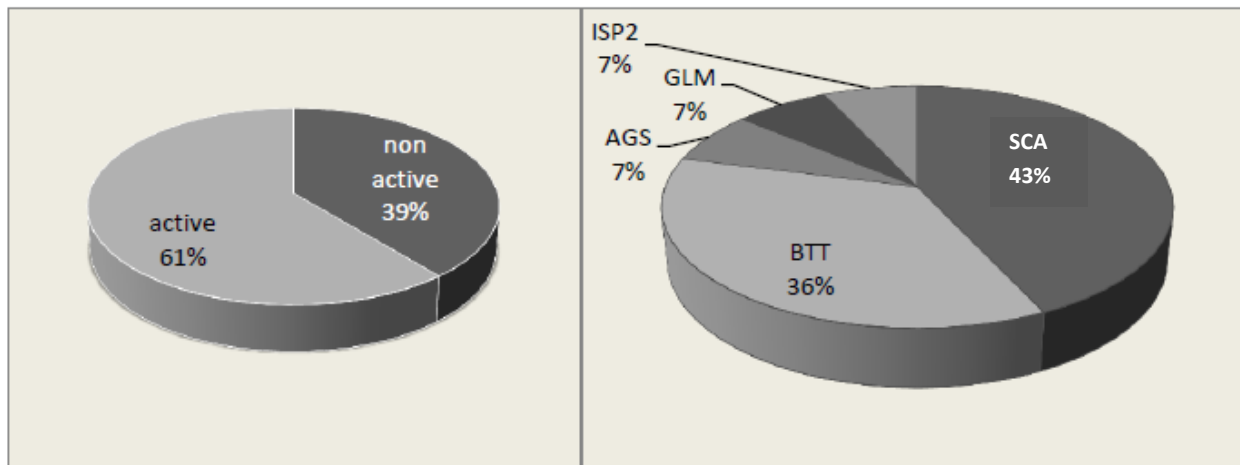


Figure 11 : Distribution des souches d’actinomycètes obtenues à partir des échantillons de sol traités au CaCO₃

Figure 12 : Distribution des souches obtenues à partir du sol traité au CaCO₃ en fonction des milieux d’isolement

Considérant les performances des souches testées, et le temps de génération des souches d’actinomycètes isolées, notre choix s’est porté sur les deux isolats (G26 et G3tc3).

Les isolats **G3tc3**, **G26** ont montré des activités vis-à-vis des trois germes cibles testés, les figures 13 et 14 montrent les zones d’inhibition obtenues.

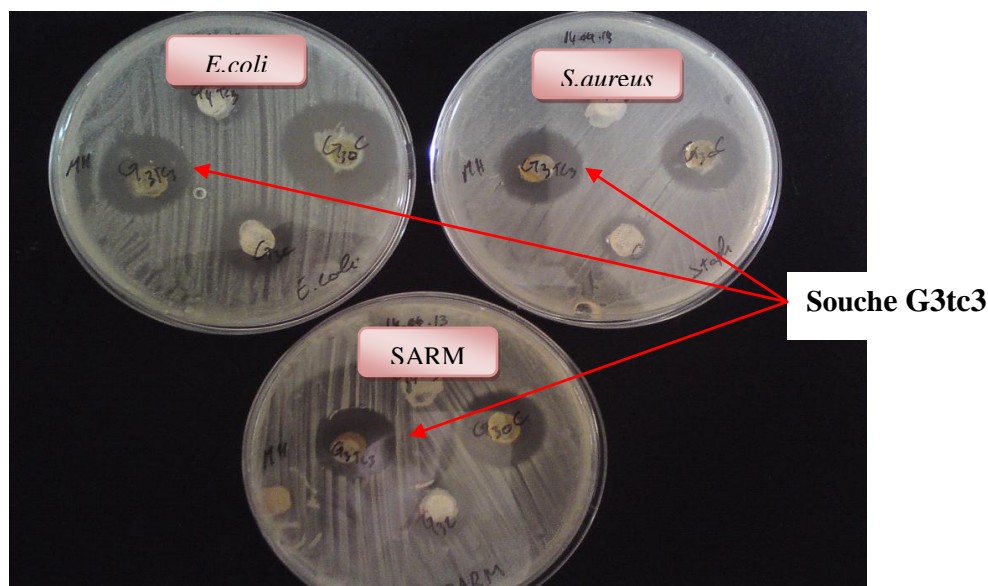


Figure 13 : Activité antagoniste de la souche G3tc₃ vis-à-vis des 3 germes cibles.

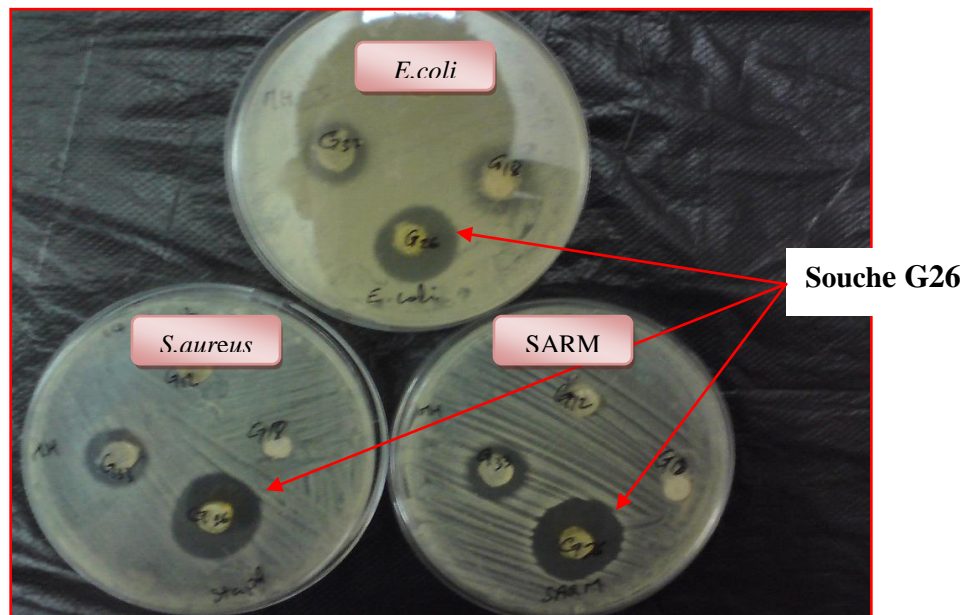


Figure 14 : Activité antagoniste de la souche G26 vis-à-vis des 3 germes cibles.

3. Etude taxonomique des souches sélectionnée

Les deux souches G3tc₃ et G26 sélectionnées ont fait l'objet d'une étude taxonomique.

3.1) Etude morphologique

3.1.1) Macromorphologie

Pour les deux souches sélectionnées (G3tc₃ et G26), on note une très bonne croissance et sporulation sur les milieux : ISP2, ISP3, ISP4 et ISP7 ; moyenne sur milieu : ISP1 et GYEA et absence absolue de sporulation sur milieu ISP9, sachant que les boîtes de pétri ont été incubées pendant 21 jours à 28°C. L'aspect des colonies diffère selon le milieu (voir figure 15), celles-ci présentent un aspect poudreux et rugueux avec un diamètre de 2 à 8 mm pour la souche G26 et de 5 à 20 mm pour la souche G3tc₃.



Figure 15 : Macromorphologie des souches G26 et G3tc₃ cultivés pendant 21 jours à 28°C, vue à la loupe binoculaire (CARL ZIESS 475002)

- a : Souche G26 sur milieu ISP3 (GX8)
- b : Souche G3tc₃ sur milieu ISP2 (GX25)
- c : souche G26 sur milieu ISP7 (GX8)

Tableau VI : Caractéristiques macromorphologiques et culturales de la souche G26

Temps d'incubation	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Pigmentation		Pigment soluble
				MS	MA	
7 ^{ème} Jour	ISP1	+	+	Marron clair +++	Blanc+	Jaune
	ISP2	+	+	Beige +++	Blanc+	-
	ISP3	+	+	Blanc+++	Gris++	-
	ISP4	+	+	Beige+++	Gris +++	Jaune
	ISP7	+	+	Blanc ++	Beige+	Jaune
	ISP9	+	-	Marron +	-	-
	GYEA	+	-	Marron +++	Blanc+	-
14 ^{ème} jour	ISP1	+	+	Marron+	Blanc+	Jaune
	ISP2	++	++	Marron +++	Gris +	-
	ISP3	+++	++	Blanc +++	Gris ++	-
	ISP4	+++	+++	Beige +++	Gris Clair +++	Jaune citron
	ISP7	++	++	Marron +++	Baige+++	-
	ISP9	+	-	Marron +	-	-
	GYEA	+	±	Marron ++	Blanc ±	-
21 ^{ème} jour	ISP1	++	++	Marron++	Blanc++	Jaune
	ISP2	+++	+++	Marron ++	Gris Claire +++	-
	ISP3	+++	+++	Blanc+++	Gris +++	-
	ISP4	+++	+++	Beige +++	Gris foncé +++	Jaune citron
	ISP7	+++	+++	Marron +++	Baige +++	-
	ISP9	+	-	Marron +	-	-
	GYEA	++	+	Marron+++	Blanc ++	-

+ Moyenne

++ Bonne

+++Très bonne

-Absence de croissance

Le tableau (VI) regroupe les résultats de l'étude macromorphologique de la souche G26 et cela à 28°C sur différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours.

Les résultats présentés dans le tableau (VI) montrent que la souche G26 produit des pigments diffusibles jaunâtres sur les milieux ISP1 et ISP4, il y'a eu un début de production sur milieu ISP7 mais celui-ci a disparu après le 14^{ème} jour.

Tableau VII : Caractéristiques macromorphologiques et culturales de la souche **G3tc₃**

Temps d'incubation	Milieux de culture	Croissance	Sporulation	Pigmentation		Pigment soluble
				MS	MA	
7 ^{ème} Jour	ISP1	+	-	Crème +++	-	Jaune
	ISP2	++	++	Blanc +++	Gris +	-
	ISP3	+	+	Blanc+++	Gris +	-
	ISP4	++	++	Blanc+++	Gris++	Jaune
	ISP7	++	++	Beige++	Blanc ++	Jaune moutarde
	ISP9	+	-	Beige+	-	-
	GYEA	+	-	Marron	-	-
14 ^{ème} jour	ISP1	+	-	Crème +++	-	Jaune
	ISP2	++	+++	Blanc+++	Gris clair ++	-
	ISP3	++	+++	Blanc ++	Gris+++	-
	ISP4	+++	+++	Blanc +++	Gris+++	Jaune
	ISP7	+++	++	Beige ++	Gris++	Jaune moutarde
	ISP9	+	-	Beige +	-	-
	GYEA	++	±	Marron	Blanc ±	-
21 ^{ème} jour	ISP1	++	-	Crème ++	-	Jaune
	ISP2	+++	+++	Blanc+++	Gris clair +++	-
	ISP3	+++	+++	Blanc +++	Gris+++	-
	ISP4	+++	+++	Crème +++	Gris foncé	-
	ISP7	+++	+++	Beige +++	+++	Jaune
	ISP9	+	-	Marron +	+++	Jaune moutarde
	GYEA	+++	+	Marron +++	-	-
				Blanc+		

+ Moyenne

++ Bonne

+++Très bonne

-Absence de croissance

Le tableau (VII) regroupe les résultats de l'étude macromorphologique de la souche G3tc₃ et cela à 28°C sur différents milieux après 7, 14 et 21 jours d'incubation. La souche G3tc₃ produit des pigments diffusibles jaunâtres sur les milieux ISP1, ISP4 et ISP7.

3.1.3) Micromorphologie

Pour la souche G3tc₃ Le mycélium du substrat est ramifié et non fragmenté Le mycélium aérien se présente sous forme de filaments agencés en verticilles qui sont positionnés en trépied. Les spores isolées ne présentaient aucune mobilité.

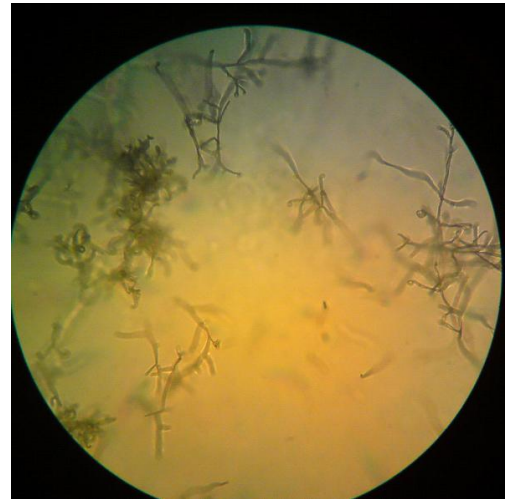


Figure 16 : Observation micromorphologiques de la souche G3tc₃ cultivée sur milieu SCA pendant 2 jours à 28°C au grossissement G (10X40)

Pour la souche G26 les résultats obtenus indiquent que les filaments des mycéliums du substrat (MS) sont fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type RA (Rectus-Apertum). Les spores isolées ne présentaient aucune mobilité.



Figure 17 : Observation micromorphologiques de la souche G3tc₃ cultivée sur milieu SCA pendant 21 jours à 28°C au grossissement G (10X40)

3.2) Etude chimiotaxonomique

La détermination des acides aminés pariétaux a permis de constater la présence de la forme LL de l'acide diaminopimélique et de la glycine pour les deux souches G26 et G3tc3.

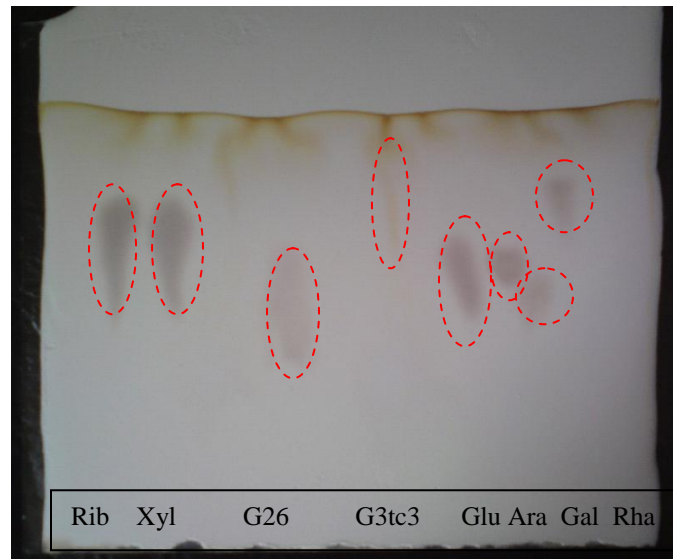


Figure 18 : Caractérisation des sucres pariétaux avec une Chromatographie ascendante sur gel silice (C.C.M) pour les souches G26 et G3tc₃

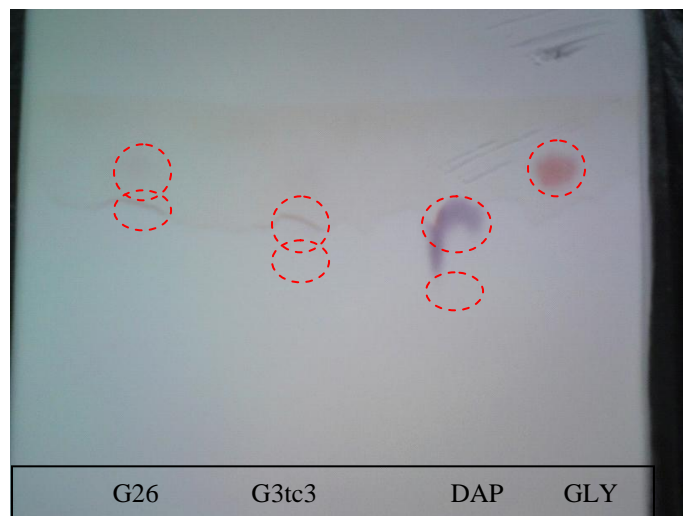


Figure 19 : Caractérisation des acides aminés pariétaux avec une Chromatographie ascendante sur gel silice (C.C.M) pour les souches G26 et G3tc₃

3.3) Etude physiologique

3.3.1) Dégradation des composés organiques

- **les sucres :**

D'après les résultats obtenus, la souche G26 dégrade facilement le glucose, tréhalose, raffinose, fructose, glycérol rhamnose et le lévulose (Figure 20f) et forme un mycélium aérien développé tandis que l'inositol, xylose (Figure 20d), saccharose, maltose sont dégradés mais plus difficilement et le mycélium aérien est faiblement développé mais l'adonitol (Figure 20b) et le sorbitol ne sont pas dégradés et il n'y a pas de formation d'un mycélium aérien.

La souche G3tc₃ dégrade facilement le glucose, tréhalose, raffinose, fructose, glycérol rhamnose et le lévulose (Figure 20e) et forme un mycélium aérien développé tandis que l'inositol, xylose (figure 20c), saccharose, maltose sont dégradés mais plus difficilement et le mycélium aérien est faiblement développé mais l'adonitol (Figure 20b) et le sorbitol ne sont pas dégradés et il n'y a pas de formation d'un mycélium aérien.

Le tableau VIII regroupe les résultats du test de dégradation des sucres, la croissance du mycélium aérien et substrat des deux isolats est détaillée.

Tableau VIII : Test de dégradation des sucres par les deux souches d'actinomycètes sélectionnées.

Les sucres	G26		G3tc ₃	
	MA	MS	MA	MS
Blanc (ISP9)	-	+	-	+
Inositol	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Raffinose	++	+	++	+
Adonitol	-	+	-	+
Saccharose	+	+	+	+
Fructose	++	+	+++	+
Glucose	+++	+	+++	+
Thréalose	+++	+	+++	+
Glycerol	++	+	++	+
Rhamnose	++	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lévulose	++	+	+++	+
Sorbitol	-	+	-	+

+ Moyenne ++ Bonne +++ Très bonne - Absence de croissance

- **le Test de dégradation** du Tween 80 est positif pour les deux souches. Voir la figure (20g).

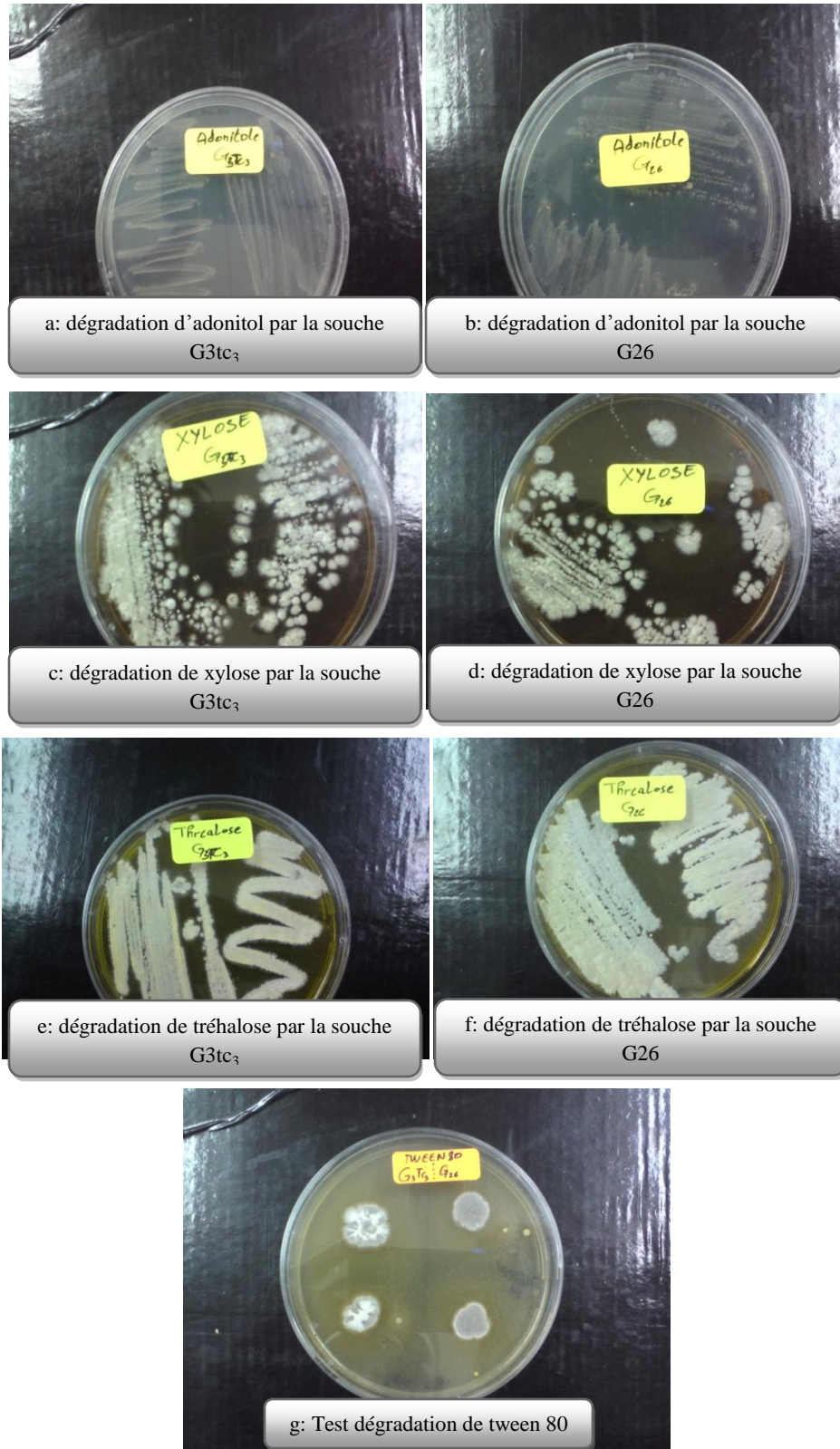


Figure 20 : Planches illustrant la dégradation de divers composés organiques par les souches d'actinomycètes sélectionnées

3.3.2) Croissance à différentes Températures

D'après les résultats obtenus on remarque que les températures 28°C, 30°C, 37°C permettent la croissance des souches G26, G3tc3, alors que la température 44°C n'a pas permis la croissance de ces dernières

Les deux isolats ont montré une croissance maximale à partir du 7^{ème} jour à 37°C les détails de ce test sont représentés dans le tableau (IX)

Tableau IX : Croissances des souches G26 et G3tc₃ à différentes températures pendant 21 jours

Températures		28°C	30°C	37°C	44°C
G ₂₆	7 ^{ème} jours	+	+	+++	-
	14 ^{ème} jours	++	+	+++	-
	21 ^{ème} jours	+++	++	+++	-
G ₃ TC ₃	7 ^{ème} jours	+	+	++	-
	14 ^{ème} jours	++	++	+++	-
	21 ^{ème} jours	++	++	+++	-

+ Croissance moyenne ++ Bonne croissance +++ Très bonne croissance

3.3.3) Croissance à différents pH

Les résultats du test montrent que les deux souches se développent à des pH allant de 5 à 11, mais elles ne poussent pas à pH 4 voir le tableau (X)

Tableau X : Croissance des souches G26 et G3tc₃ à différents pH

pH	4	5	6	7	8	9	10	11
G ₂₆	-	+	+	+	+	+	+	+
G ₃ tc ₃	-	+	+	+	+	+	+	+

+ Croissance - Absence de croissance

3.3.4) Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de ce test ont montré que les deux souches étaient résistantes à tous les antibiotiques de la famille des Beta-lactamines mais très sensibles vis-à-vis des antibiotiques de la famille des aminosides les macrolides ont une activité sur les deux souches d'actinomycètes sélectionnées. Voir figure(21) annexe VIII.

Tableau XI: Tests de sensibilité aux antibiotiques des souches d'actinomycètes.

ATB	Famille	G26	G3tc ₃
CN 10(Gentamicine)	aminosides	+++	+++
NET30 (Nétilmicine)	aminosides	+++	+++
AK 30 (Amikacine)	aminosides	+++	+++
TOB (Tobramycine)	aminosides	+++	+++
OX 1 (oxacilline)	Bêta-lactamines Classe des pénicillines	R	R
CZ (cefazoline)	Bêta-lactamines céphalosporines de première génération	R	R
CX 30 (cefoxitine)	Bêta-lactamines céphalosporines de seconde génération.	R	R
FEP 30(Céfépime)	Bêta-lactamines groupe des céphalosporines de troisième génération	R	R
ETP 10(Ertapenem)	Bêta-lactamines carbapénèmes	R	R
IMP10 (Imipeneme)	Bêta-lactamines carbapénèmes	R	R
CAZ 30 (Céftazidime)	bêta-lactamines carbapénèmes	R	R
AT 30(aztreonem)	beta-lactamines classe des monobactames	R	R
AMP (ampicilline)	Bêta-lactamines	R	R
CIP (ciprofloxacine 5mcg)	Quinolones de deuxième génération	+	+
NA 30 (acide nalidixique 30µg)	Quinolones	R	R
PEF (Péfloxacin)	Quinolones du groupe des fluoroquinolones.	R	R
E 15 (Erythromycine)	macrolides	+	+
SP 100 (Spiramycine)	macrolides	+	+
RIF 5(Rifampicine)	Rifamycines	R	R

(Les zones d'inhibition R : 0 mm ; + : ≤15mm ; ++ : ≤20mm ; +++ : >20mm)

4. Discussion générale

Au total 23 isolats d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillon traité au CaCO₃, ce chiffre est sensiblement identique à celui trouvé par avec le travail de **Boudemagh, 2005** qui a isolé 27 souches actinomycètes à partir de trois échantillons de sol traité au CaCO₃, toutefois le taux de souche active (61%) dans notre cas est nettement supérieur (61% vs 7,4%).

Le meilleur milieu d'isolement pour les sols traités s'est avéré être le milieu SCA avec 43% d'isolats. Selon **Boudemagh, 2005** le milieu propice pour l'isolement d'actinomycètes de sols Saharien est le GLM qui à obtenir 63% des souches, cela peut être dû à la richesse en substrat carboné de ce milieu. Dans notre cas, celui-ci le milieu a permis d'isoler seulement 7% du total.

A partir des sols non traités on a isolé 35 souches, le milieu chitine vitamine (modifié) a permis l'isolement de 46% des souches.

Les résultats des tests d'activités montrent que 61% de souches isolées d'échantillons de sols traités étaient actives, contre 37% de souches obtenues de sols non traité, ce qui prouve que le traitement du sol a eu un effet positif. D'après **Monisha et al., 2011**, le traitement chimique au CaCO₃ peut améliorer ou favoriser l'isolement d'actinomycètes rare, entre autre de nouvelles souches de *Streptomyces*. Aussi d'autre traitement chimiques, comme au phénol, permettent de sélectionner *Streptosporangium* et *Microbispora* (**Monisha et al., 2011**).

Deux souches, la G26 et G3tc₃ se sont avérées intéressantes, avec une activité importante vis-à-vis des souches tests utilisées à savoir une bactérie Gram négatif (*E.coli*) et deux bactéries Gram positif (*S.aureus*, SARM). Les zones d'inhibition de la souche G26 sont plus importantes que celle de la souche G3tc₃ vis-à-vis du SARM et de *S.aureus*. Par contre la zone provoquée par la G3tc₃ est plus importante que celle de la G26 vis-à-vis de *E.coli*.

Les travaux de **Smaoui et al., 2012** sur une nouvelle espèce de *Streptomyces* et de **Boubetra et al., 2013** sur une souche du genre *Saccharothrix* confirment nos résultats. Leurs souches étaient aussi actives sur un large éventail de germe cible (Gram négatifs et Gram positifs). Par contre les travaux de **Badji et al., 2007** sur la souche *Nonomuraea sp* NM94 ont montré qu'elle n'était active que sur les Gram positifs

Aouiche et al., 2012, ont rapportés des zones d'inhibition nettement supérieures à 37 mm vis-à-vis *S.aureus* contre 23 mm pour notre étude et 46 mm vis-à-vis de *E. coli* contre 22.4 mm pour notre étude, la souche productrice était une *Saccharothrix sp* PAL54 produisant du chloramphénicol

L'étude des caractères cultureux et morphologiques a révélé que les deux isolats G3tc₃ et G26 présentait une très bonne croissance et une sporulation sur les milieux ISP2, ISP3, ISP4, ISP7 et SCA. Une croissance moyenne sur ISP1 pour la G26 et pas de sporulation pour la G3tc₃. Sur le milieu ISP9 aucune sporulation n'est observée pour les deux souches. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Smaoui et al.**, 2012 et **Aouiche et al.**, 2012 qui ont obtenu une bonne croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP2, ISP3 et ISP4 les mêmes résultats sont observés par **Boubetra et al.**, 2013 à une température d'incubation de 30°C.

Les observations macromorphologiques ont permis de distinguer les couleurs des mycéliums aériens qui diffèrent selon le milieu de culture. Pour la G26 la couleur grise s'est manifesté sur milieu ISP2 ISP3 et ISP4, la couleur blanche sur ISP1 et GYEA et une couleur beige sur ISP4. On note une nette différence entre la couleur du mycélium du substrat et celle du mycélium aérien et cela à 28°C. Pour la même température **Badji et al.**, 2007 a eu une couleur blanchâtre pour le mycélium aérien et jaune pour le mycélium substrat. Ce qui confirme la différence courante entre le mycélium du substrat et le mycélium aérien.

Pour la souche G3tc₃, la couleur grise est prédominante, elle apparait sur ISP2, ISP3, ISP4 et ISP7. La couleur est blanche sur GYEA.

En comparant les deux souches étudiées, G26 et G3tc₃, elles présentait une pigmentation jaunâtre sur les milieux ISP1 et ISP4, sur le milieu ISP7: aucune pigmentation pour la G26 et jaunâtre pour G3tc₃. Ces résultats ne sont pas compatibles avec ceux trouvés par **Smaoui et al.**, 2012, **Aouiche et al.**, 2012 et **Badji et al.**, 2007 qui n'ont pas trouvés des pigments solubles sur tous les milieux utilisés.

Les observations micro morphologique de la paroi cellulaire a permis de déduire le genre des deux souches étudiées, la G3tc₃ qui présente un mycélium sous forme de filaments agencées en verticilles qui sont positionnés en trépied avec une même base, est caractéristique au genre *Streptovercillium*. La souche G26 présente un mycélium du substrat (MS) fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type RA (Rectus Apertum) caractéristique du genre *Streptomyces*.

L'étude chimio taxonomique a permis de confirmer les résultats de l'étude micro-morphologique, pour les deux souches l'étude des acides aminés pariétaux a permis de caractériser la forme LL de l'acide diaminopimélique, et de la glycine. Ce qui classe les deux souches dans le chimiotype I. Cela coïncide avec les résultats de **Smaoui et al.**, 2012 qui a isolé une nouvelle souche de *Streptomyces* appartenant au chimiotype I.

Les souches G26 et G3tc₃ peuvent utiliser différent type de sucres comme seul source de carbone, elles poussent très bien sur milieu à base de fructose, glucose, thréhalose, glycerol, lévulose et raffinose. Mais le rhamnose est mieux dégradé par la G26 que par la G3tc₃. Les sucres suivants : inositol, xylose, saccharose et maltose sont plus difficilement dégradables par rapport aux sucres précédents. Les deux souches pressentent une croissance minimale. Quant au sorbitol et a l'adonitol, ils n'ont pas été dégradés par les deux souches ce qui se traduit par une absence de croissance.

Les résultats de **Smaoui et al.**, 2012 pour la souche *Streptomyces sp* TN256 présentaient le même profil, sauf pour l'inositol, le raffinose, le rhamnose, le trehalose et le xylose. **Kitouni, 2007** a aussi obtenu des résultats similaires à notre étude pour *Streptomyces* SS4 sauf pour le saccharose qui n'est pas dégradé. Le Tween 80 est aussi dégradé par nos souches, ce résultat ne concorde pas avec les résultats de **Smaoui et al.**, 2012 et **Boudjella et al.**, 2006.

Les deux souches G26 et G3tc₃ ont montré une croissance à 28°C, 30°C et 37°C mais pas de croissance à 44°C. Les résultats de **Boubetra et al.**, 2013, **Aouiche et al.**, 2012 et **Boudjella et al.** 2006 sont compatibles avec nos résultats mais pas avec ceux de **Badji et al.**, 2007, leur souche a une aptitude de croissance à 45°C

La plage de pH de croissance pour les souches G26 et G3tc₃ s'étend de 5-11 ce qui est remarquablement intéressant pour des applications biotechnologiques. **Smaoui et al.**, 2012 a eu pour sa souche une croissance entre un pH 5-9 alors **Kitouni**, 2007 a obtenu un pH entre 5-12. **Boubetra et al.**, 2013 qui n'a pas obtenu de croissance à pH 5.

Pour la résistance aux antibiotiques, les deux souches ont montré une résistance à tous les antibiotiques de la famille des Bêta-lactamines et une très grande sensibilité aux antibiotiques de la famille des aminosides, les deux souches sont résistantes aux macrolides et au quinolones sauf les quinolones de deuxième génération. Les résultats de **Smaoui et al.**, 2012 sont compatibles avec nos résultats contrairement aux résultats de **Badji et al.**, 2007 dont la souche présentait une résistance à la gentamicine appartenant à la famille des aminosides.

Conclusion

Conclusion générale

Dans ce modeste travail, un isolement d'actinomycètes a été effectué à partir de trois échantillons de sol sahariens provenant des localités de Ghardaïa, Timimoun et El Golea, suivi d'un essai d'identification de deux souches les plus performantes présentant un antagonisme vis-à-vis de bactéries pathogènes : *E. coli*, *S. aureus* et *SARM* cette contribution entre dans le cadre du programme de recherche de métabolites secondaires du laboratoire de microbiologie appliqué dirigé par le Dr Kecha M.

En effet, 58 isolats d'actinomycètes ont été obtenus sur milieux : SCA, chitine vitamine (modifié), Bennett, GLM, GYEA, AGS et ISP2. On a eu 23 souches issues d'un isolement après traitement au CaCO₃ du sol, alors que les 35 autres souches proviennent de sols non traités. Le M2 s'est avéré être le meilleur milieu d'isolement d'actinomycètes dans le premier cas alors que celui à la chitine vitamine (modifié) l'était dans le second cas.

Le sol de Ghardaïa a permis d'avoir plus de 75% des isolats ;

Le traitement des échantillons de sol semblent agir favorablement en limitant les contaminations et en sélectionnant des actinomycètes mésophiles.

Les colonies ont une croissance lente sur milieu chitine-vitamines (modifié) comparativement aux autres milieux utilisés.

Les résultats des tests d'activité ont montré des résultats très intéressants avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 30,5 mm vis-à-vis d'*E. coli*, 30 mm vis-à-vis de *S. aureus* et 25 mm vis-à-vis du *SARM*, connus pour les complications sanitaires qu'ils causent. Un total de 46% des souches était actives vis-à-vis d'au moins un germe cible utilisé.

Les molécules synthétisées agissent aussi bien sur les germes cibles Gram négatifs que sur les Gram positifs avec un effet bactéricide qui pourrait suggérer une action sur la synthèse des composants pariétaux.

Les deux souches performantes : G3tc₃ et G26 ont, donc, été choisies pour leur activité antagoniste vis-à-vis des germes cible utilisés et leurs durée de culture relativement courte par rapport aux autres souches.

Une étude taxonomique a été entamée afin de déterminer le genre ; ainsi l'observation de la micromorphologie a permis de rattacher la souche G3tc₃ au genre *Streptoverticillium* et

la souche G26 au genre *Streptomyces*, l'étude chimio taxonomique a confirmé ce résultat grâce à la recherche des acides aminés et des sucres cellulaires. L'étude physiologique a permis de distinguer différentes nuances entre ces isolats et des similitudes, telles que la température optimale de 37 °C, une plage de pH allant de 5 à 11, une dégradation du Tween80 et une bonne croissance sur diverses sources de carbone : Fructose, Glucose et Thralose et une très grande sensibilité aux antibiotiques appartenant à la famille des aminosides.

De multiples perspectives se présentent pour affiner cette étude à savoir :

- une étude taxonomique approfondie, morphologique (microscope électronique) et (ARNr 16S, hybridation ADN-ADN) pour identifier la souche ;
- élargir le nombre de germes cibles
- optimisations des conditions de cultures ;
- séparation et purification des molécules antibiotiques produites par ces deux souches ;

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

Aouiche A, Sabaou N, Meklat A, Zitouni A, Bijani C, Mathieu F et Lebrihi A. (2012). *Saccharothrix sp.* PAL 54. A new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J Microbiol Biotechnol.* **28**, 943-951.

B

Badji B, Mostefaoui A, Sabaou N, Lebrihi A, Mathieu F, Seguin et Tillequin F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomurea sp.* NM 94. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **34**, 403–412.

Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226p.

Balagurunathan R, Radhakrishnon M et Somasundarom S T. (2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* **4**, 698-705.

Baniasadi F, Shahidi G H et Karimi Nik A. (2009). In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science.* **6**, 268-270.

Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of antibiotics.* **58**, 1-26.

Boubetra D, Sabaou N, Zitouni A, Bijani C, Lebrihi A et Mathieu F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a saharan soil. *Micrological Research.* **186**, 223-230.

Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés

Références bibliographiques

par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger). 177p.

Boudemagh A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine, Algérie, 128p.

Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, Oulmi L, Reghioua S, Zerizer H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A et Boiron P. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale* .**15**, 39-44.

Boudjellaa H, Boutia K, Zitounia A, Mathieu F, Lebrihib A et Sabaoua N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sp* 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research* **161**, 288-298.

Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances Antimicrobiennes à partir de la sebkha de ain mlila. *Sciences & Technologie*. **23**, 5-10.

Breton A, Theilleux J, Sanglier J J et Vobis G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In : *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J P et Sanglier J J. Edition: Masson. Paris. 481p.

C

Cragg G M, Newman D J, Whipps J M et Ousley M A. (2005). Natural product in drug discovery and developpement. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.

Cross T et Goodfellow M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. *In: Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Sykes G. and Skinner F.A. (Eds.), Academic Press. London and New-York, pp.11-112.

Références bibliographiques

D

Dairi T. (2005). Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by actinomycetes. *Journal of Antibiotics*. **58 (4)**, 227- 243.

Demain A et Lancini G. (2006). Bacterial Pharmaceutical Products *in* Procaryotes. **1**. 812-833.

E

El-Sayed E S. (2000). Production of thaxtomin A by two species of *Streptomyces* causing potato scab. *Folia. Microbiol.* **6**, 99-104.

Elwan S H , Dab A et Al-Gounaim Y. (1985). Ecology of the *Streptomyces* flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 99-104.

H

Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica.* **22 (1)**, 12-19.

Hong K, et al. (2009). *Marine Drugs*. Vol- 7, issue 1, 24–44.

G

Gao M, Yang M, Hu J, Shao B, Zhang H, et Li H. (2003). Identification of ubiquinones and menaquinones in activated sludge by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. of Chromato. A.* **1007**, 31-37.

Grandhimathi R, Arunkumar M, Selvin J, Thangavelu T, Sivaramakrishnen S et Kiran G S. (2007). Potentiel antimicrobien d'actinomycètes marins associés aux éponges. *Journal of Medical Mycology.* **18**, 16-22.

K

Khachatourians G G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association (CMAJ).* **159 (9)**, 1129-1136.

Références bibliographiques

Khamna S, Yokota A, Peberdy J F et Lumyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. EurAsian Journal of BioSciences. **4**, 23-32.

L

Larpen J J. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens. Edition : Tec et Doc. 280p.

Lamari N L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou, p.156

Lechevalier M P. et Lechevalier H A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int.J.sys.bacteriol. **20**, 435-443.

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

Locci R. (1994). Actinomycetes as plant pathogens. European Journal of Plant Pathology. **100**, 179-200.

Loria A. (1986). The national institute of health quality control program. III. Fllox-up studies (phase 3). Rev. Invest. Clin. **38**, 435-440.

Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine, P248

M

Monisha Khanna, Renu Solanki ,Rup Lal (2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. International Journal of Advanced Biotechnology and Research .**2**, 357-375.

Références bibliographiques

Marchal N, Bourdon J L, et Richard C L. (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, pp. 67-122.

O

O'Donnell A.G, Goodfellow A G M, et Minnikin D E. (1982). Lipids in the classification of Nocardioïdes: Reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) Lochhead in the genus Nocardioïdes (Prauser) emend. O'Donnell et al., as *Nocardioïdes simplex* comb.nov. Arch.Microbial., **133**. 323-329.

Oskay M, Tamer A U et Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology. **3 (9)**, 441- 446.

Ouhdouch Y. (2003). Actinomycètes. Premier atelier national du réseau Nafrinet-Maroc. Institut Scientifique 23-23/10/2003. Semlalia. Marrakech.

P

Pizzul L. (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp.39-43.

R

Rong X, Guo Y et Huang Y. (2009). Proposal to reclassify the *albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* sp. Solvifaciens. Syst. and App. Microbiol. **32**, 314-322.

S

Schwarz S, Kehrenberg C et Walsh T R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. International Journal of Antimicrobial Agents. **17**, 431-437.

Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. J. Microbiol. Serol. **23**, 15-22.

Références bibliographiques

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, 181p

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

Sujatha P, Bapi-Raju K V et Ramana T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* **160**, 119-126.

Suzuki K, Nagai K, Shimiza Y and Suzuki Y. (1994). Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, **8 (2)**, 122-127.

T

Tanaka Y and Omura S. (1993). Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 57-87.

Thomson C J, Power E, Ruebsamen-Waigmann H et Labischinski H. (2004). Antibacterial research and development in the 21st Century-an industry perspective of the challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* **7 (5)**, 445-50.

V

Valanarasu M, Duraipandiyan V, Agastian P et Ignacimuthu S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces spp* ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Mycol Med.* **18**, 147-153.

W

Ward A C et Bora N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Ecol. Indus. Microbiol.* **9**, 279–286.

Références bibliographiques

Williams S, Locii R, Beswick A, Kurtboke D, Kuznetsov V, Le Monnier F, Long P, Maycroft K, Palma R, Petrolini B, Quarouni S, Todd J, West M. (1993). Detection and identification of novel actinomycètes. *Pres Microbiol.* **144**, 653-656.

X

Xavier Devanya R, Shanmugavel Sakthivelkumar, Kuppu Rajendran, Sundaram Janarthanan. (2012). Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* pp.140-146.

Y

Yamamura H (2005). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* Vol-55, issue 1: 433-436.

Yuriko N, Noriyoshi S, Koshi A, Yoshito K et Ken-ichi H. (2007). Reliable and sensitive analysis of amino acids in the peptidoglycan of actinomycetes using the advanced Marfey's method. *J. Microbiolo. Method.* **70**, 306–311.

Z

Zaitlin B and Watson S B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths. Tenets and truths. **40 (9)**, 1741-1753.

Zhang J. (2011). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths *Modern Applied Science.* Vol-5, issue 2: 124-127.

Zhang J W, Zeng R Y. (2007). Purification and characterization of a cold-adapted α -amylase produced by *Nocardiopsis sp* 7326 isolated from prydz bay, Antarctic. *Marine Biotechnol.* **10**, 75–82.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharothrix sp* SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud MAMMERI de TiziOuzou, 231p.

Annexes

Annexe I

1. isolement : les milieux suivants sont utilisés pour l'isolement des actinomycètes :

- **Glucose asparagine** : Glucose, 10g ; asparagine, 0.5g ; K₂HPO₄, 0.5g ; agar, 15g ; eau distillée, 1000 ml ; pH 7.2 ; autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- **Milieu de Pridham** : Glucose, 10g ; extrait de levure 4g ; extrait de malt, 10g ; agar, 20g ; eau distillée, 1000 ml ; pH 7.3 ajusté avec du KOH ; autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- **GLM** (Glucose extrait de malt et de levure) : Glucose, 10g ; extrait de levure, 3g ; extrait de malt, 3g ; peptone 5 g ; eau distillée, 1000 ml ; pH 7.2 autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- **M 2** (wiliams modifier) : Agar, 18g ; amidon, 10g ; KNO₃, 2g ; K₂HPO₄, 2g ; NaCl, 2g ; caseine, 0,3g ; MgSO₄, 7H₂O, 0,005g ; CaCO₃, 0,02g ; FeSO₄, 7H₂O, 0,01g ; eau distillée 1000ml ; pH 7.2 autoclaver à 120 °C pendant 20 min.
- **Bennett** : peptone 2g, glucose 10g, extrait de viande 1g, extrait de levure 1g, agar 18g, eau distillé 1000ml, ph 7,2. (**B. Badji A. Riba et al. ; 2005**).
- **Chitine** : chitine 2g, K₂HPO₄ 0,2g, NaCl 0,3g, CaCo3 0,02 g, FeSo4, 7H2O 10mg, agar 18g, eau distillé 1000ml, ph 7,5 (**Badji et al., 2005**).
- **AGS**: Arginine 1g, Glycérol 12,5g, KH₂PO₄ 1g, NaCl 1g, MgSO₄, 7H₂O 0,5g, Fe(SO₄)₃ 6H₂O 0,01g, CuSO₄, 5H₂O 0,001g, ZnSO₄, 7H₂O 0,001g, MnSO₄, H₂O 0,001g, agar 18g, PH 7,2 (**Jihani et al. 2012**).
- **YEAGA**: Extrait de levure 10g, glucose 10g, agar 18g, eau distillé q.s.q :1000ml, PH 6,8 (**B. Badji A. Riba et al. ; 2005**) .

2. Etude morphologique : Les milieux ISP ont été préconisés par « International Streptomyces Project » (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

- Milieu **ISP1** : Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p :1000 ml. pH = 7,2
- Milieu **ISP2** : Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 ml ; agar: 20 g. pH 7,2.
- Milieu **ISP3** : Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.
 - Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0, 1 g ; MnC12, 4H₂O: 0, 1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.1 g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

- Milieu **ISP4**: Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; Na Cl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ; CaCO₃: 2 g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.
- Milieu **ISP7** : Glycérol : 15 g ; L-tyrosine: 0,5 g ; L-asparagine: 1 g ; K₂HPO₄: 0,5 g ; MgSO₄,7H₂O :0,5 g ;NaCl: 0,5 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 ml ; agar: 18 g ;eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.
- milieu **ISP9** : (NH₄)₂S₀4 : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g; MgSO₄, 7H₂O : 1g; Solution saline* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.
 - Solution saline: CuSO₄, 5H₂O: 0,64g; FeSO₄, 7H₂O: 0,11 g; MnCl₂, 4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

Annexe II

Les révélateurs chimiques utilisés pour les C.C.M

1- Diphénylamine-aniline : révélateur des glucides

- Solution à vaporiser : dissoudre 4 g de diphénylamine, 4 ml d'aniline et 20 ml d'acide phosphorique dans 200 ml d'acétone.
- Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 min à 100°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

2- Ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés et des osesamines.

- Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.
- Traitement complémentaire: chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette, rose).

Annexe III

Tableau XII: traitement chimiques et physique pour isolement des actinomycètes rare du sol

(Monisha K, 2011)

Type de traitement	Traitement	Genre sélectionné
Traitement chimique	Phénol,	<i>Microbispora, Streptomyces, Streptosporangium</i>
	Carbonate de calcium, chitine	<i>Streptomyces</i>
Milieu d'isolement sélectif	Acide humique vitamine agar	<i>Herbidospira, Microbispora, Microtetraspora, Streptosporangium</i>
	Propionate de sodium, milieu chitine	<i>Streptomyces</i>
	HV agar +acide nalidixique	<i>Actinomadura, Microbispora, Micromonospora, Microtetraspora, Streptomyces, Streptosporangium, Nocardia</i>
Antibiotique	Acide nalidixique, pénicilline G	<i>Rhodococcus</i>
	Kanamycin, acid nalidixic, trimethoprim	<i>Actinokineospora</i>
	Gentamicin	<i>Streptosporangium, Actinomadura, Micromonospora</i>
	Novobiocin	<i>Actinoplanes, Thermoactinomyces</i>
	Penicillin, acid Nalidixic	<i>Saccharothrix</i>
	Rifampicin, Streptomycin, Kanamycin	<i>Actinomadura</i>
	Tunicamycin	<i>Micromonospora</i>
Chimiotactisme	Xylose, chloride, γ -collidine, bromide et vanillin, HV agar avec acid nalidixic	<i>Actinoplanes, Catenuloplanes, Dactylosporangium</i>
	Traitement a la chaleur, HV agar avec acide nalidixique et Kanamycine	<i>Microbispora, Actinomadura</i>
	Traitement a la chaleur ,HV agar avec acide nalidixique	<i>Spirilliplanes</i>
Centrifugation	Centrifugation, HV agar avec acide nalidixique et trimethoprim	<i>Actinoplanes, Actinokineospora, Actinosynnema, Catenuloplanes, Cryptosporangium, Dactylosporangium, Geodermatophilus, Kineosporia, Sporichthya</i>
	Gradient de sucrose centrifugation, HV agar avec acide nalidixique	<i>Nocardia</i>
Cellulose infiltration method	Cellulose infiltration method, Modified Bennett medium containing cycloheximide and canadacidin	<i>Streptomyces, Micromonospora, Nocardia, Actinoplanes</i>

Annexe IV :

Tableau XIII : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non Antifongiques produites par les actinomycètes

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

Annexe V

Tableau XIV: Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
1/Les agents antibactériens		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	Takahashi et al., 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidine	Jinenez et al., 2009
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigine	Liu et al., 2007
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	Inoue et al., 2007
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
<i>Verrucosipora sp.</i>	Abyssomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
2/ Les agents antifongiques		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	Fukunaga et al., 2008
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacétate	Hwang et al., 2001
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	Mukai et al., 2006
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	Carle et al., 2003
3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes		
Spinosad. Insecticide neurotoxique	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Williamson et al., 2006
Herbicides. Exemple 1. 2,4-Dihydro-4-(β -D- ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)- triazol-3-one	<i>Actinomadura sp</i>	Schmitzer et al., 2000
Exemple 2. Herbimycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Omura et al., 2006

Annexe VI

Tableau XV : Actinomycètes isolé de différents habitats (Monisha K, 2011)

S.No.	Actinomycete	Habitat
1	<i>Actinomadura, Actinosynnema, Amycolatopsis, Arthrobacter, Frankia, Geodermatophilus, Gordonia, Kitasatospora, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardioides, Nocardiosis, Nonomurea, Psuedonocardia, Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salinispora, Streptomyces, Streptosporangium, Tsukamurella, Verrucosipora, Williamsia</i>	Marin
2	<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Bogoriella, Kribbella, Microbispora, Micromonospora, Nocardia, Nonomurea, Nocardiosis</i>	Les sols acide et alcalin
3	<i>Bifidobacterium, Rhodococcus, Nocardia, Gordonia</i>	échantillons fécale
4	<i>Actinomadura, Micromonospora, Microtetraspora, Saccharomonospora, Streptomyces, Thermoactinomyces</i>	Source thermale
5	<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Microbispora, Microtetraspora, Nocardia, Nocardiosis, Saccharothrix</i>	Desert
6	<i>Amycolatopsis, Laceyella, Planifilum, Saccharomonospora, Streptomyces, Thermoactinomyces, Thermobifida, Thermoflavimicrobium, Thermonospora, Thermus</i>	Compost
7	<i>Arthrobacter, Friedmanniella, Modestobacterium, Nocardia, Nocardiosis, Pseudonocardia, Streptomyces</i>	échantillons de provenance Glacial
8	<i>Streptomyces</i>	Radiation

Annexe VII

Tableaux XVI: Taxonomie du phylum XXVI Actinobacteria (Goodfellow M. 2012)

Classe	ordre	famille	genre	
Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i> <i>Actinobaculum</i> <i>Arcanobacterium</i> <i>Mobiluncus</i> <i>Varibaculum</i>	
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae	<i>Actinopolyspora</i>	
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i> <i>Aeriscardovia</i> <i>Alloiscardovia</i> <i>Gardnerella</i> <i>Metascardovia</i> <i>Parascardovia</i> <i>Scardovia</i>	
	Catenulisporales	Catenulisporaceae	<i>Catenulispora</i>	
		Actinospicaceae	<i>Actinospica</i>	
	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i> <i>Turicella</i>	
		Dietziaceae	<i>Dietzia</i>	
		Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	
		Nocardiaceae	<i>Nocardia</i> <i>Gordonia</i> <i>Millisia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Skermania</i> <i>Smaragdiococcus</i> <i>Williamsia</i>	
			Segniliparaceae	<i>Segniliparus</i>
			Tsukamurellaceae	<i>Tsukamerulla</i>
			Frankiales	Frankiaceae
	Acidothermaceae	<i>Acidothermus</i>		
	Cryptosporangiaceae			
	Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus</i> <i>Blastococcus</i> <i>Modestobacter</i>		
		Nakamurellaceae		<i>Nakamurella</i> <i>Humicoccus</i>
	Glycomycetales	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i> <i>Stackebrandtia</i>	
	Jiangellales	Jiangellaceae	<i>Jiangella</i> <i>Haloactinopolyspora</i>	
	Kineosporiales	Kineosporiaceae	<i>Kineospora</i> <i>Kineococcus</i> <i>Quadrisphaera</i>	
	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> <i>Acaricomus</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Citicoccus</i> <i>Kocuria</i> <i>Nesterenkonia</i> <i>Renibacterium</i> <i>Rothia</i> <i>Yaniella Zhihengliuella</i>	
		Beutenbergiaceae	<i>Beutenbergia</i> <i>Miniimonas</i> <i>Salana</i> <i>Serinibacter</i>	
Bogoriellaceae		<i>Bogoriella</i> <i>Georgenia</i>		
Brevibacteriaceae		<i>Brevibacterium</i>		
Cellulomonadaceae		<i>Cellulomonas</i>		

		<i>Oerskovia</i> <i>Tropheryma</i>
	Dermabacteraceae	<i>Dermabacter</i> <i>Brachybacterium</i>
	Dermacoccaceae	<i>Dermacoccus</i> <i>Demetria</i> <i>Kytococcus</i>
	Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i> <i>Kineosphaera</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Arsenicococcus</i> <i>Humihabitans</i> <i>Janibacter</i> <i>Knoellia</i> <i>Kribbia</i> <i>Lapillicoccus</i> <i>Ornithinicoccus</i> <i>Ornithinimicrobium</i> <i>Oryzihumus</i> <i>Phycococcus</i> <i>Serinicoccus</i> <i>Terrabacter</i> <i>Terracoccus</i> <i>Tetrasphaera</i>
	Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>
	Microbacteriaceae	
	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i> <i>Cellulosimicrobium</i> <i>Isoptericola</i> <i>Myceligenerans</i> <i>Xylanibacterium</i> <i>Xylanimicrobium</i> <i>Xylanimonas</i> <i>Rarobacter</i>
	Ruaniaceae	<i>Ruania</i> <i>Haloactinobacterium</i> <i>Sanguibacter</i>
	Micromonosporales	Micromonosporaceae <i>Micromonospora</i> <i>Actinocatenispora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Asanoa</i> <i>Catellatospora</i> <i>Catenuloplanes</i> <i>Couchioplanes</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Krasilnicovia Longispora</i> <i>Luedemanilla</i> <i>Pilimelia</i> <i>Polymorphospora</i> <i>Salinispora</i> <i>Spirilliplanes</i> <i>Verrucosispora</i> <i>Virgisporangium</i>
	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae <i>Propionibacterium</i> <i>Aestuariimicrobium</i> <i>Brooklawnia</i> <i>Friedmanniella</i> <i>Granulicoccus</i> <i>Luteococcus</i> <i>Microlunatus</i> <i>Micropruina</i> <i>Propionicicella</i> <i>Propionicimonas</i> <i>Propioniferax</i> <i>Propionimicrobium</i> <i>Tessaracoccus</i>

		Nocardioidaceae	<i>Nocardioides</i> <i>Actinopolymorpha</i> <i>Aeromicrobium</i> <i>Kribbella</i> <i>Marmoricola</i>
	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i> <i>Actinoalloteichus</i> <i>Actinokineospora</i> <i>Actinosynnema</i> <i>Amycolatopsis</i> <i>Crossiella</i> <i>Goodfellowiella</i> <i>Kibdelosporangium</i> <i>Kutzneria</i> <i>Lechevalieria</i> <i>Lentzea</i> <i>Prauserella</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Saccharopolyspora</i> <i>Saccharothrix</i> <i>Streptoalloteichus</i> <i>Thermocrispum</i> <i>Umezawaea</i>
	Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
	Streptosporangiales	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium</i> <i>Acrocarpospora</i> <i>Herbidospora</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspore</i> <i>Nonomuraea</i> <i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Planotetraspore</i> <i>Sphaerisporangium</i> <i>Thermopolyspora</i>
		Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i> <i>Haloactinospora</i> <i>Streptomonospora</i> <i>Thermobifida</i>
		Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora</i> <i>Actinocorallia</i> <i>Actinomadura</i> <i>Spirillospora</i> <i>Thermobispora</i>
Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	<i>Acidimicrobium</i> <i>Ferrimicrobium</i> <i>Ferrithrix</i>
Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Coriobacterium</i> <i>Atopobium</i> <i>Collinsella</i> <i>Cryptobacterium</i> <i>Denitrobacterium</i> <i>Eggerthella</i> <i>Olsenella</i> <i>Slackia</i>
Nitriliruptoria	Nitriliruptorales		
	Euzebyales	Euzebyaceae	<i>Euzebyae</i>
Rubrobacteria	Rubrobactrales	Rubrobacteraceae	<i>Rubrobacter</i>
Thermoleophilia	Thermoleophilales	Thermoleophilaceae	<i>Thermoleophilum</i>
	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>
		Conexibacteraceae	<i>Conexibacter</i>
		Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>

Annexe VIII

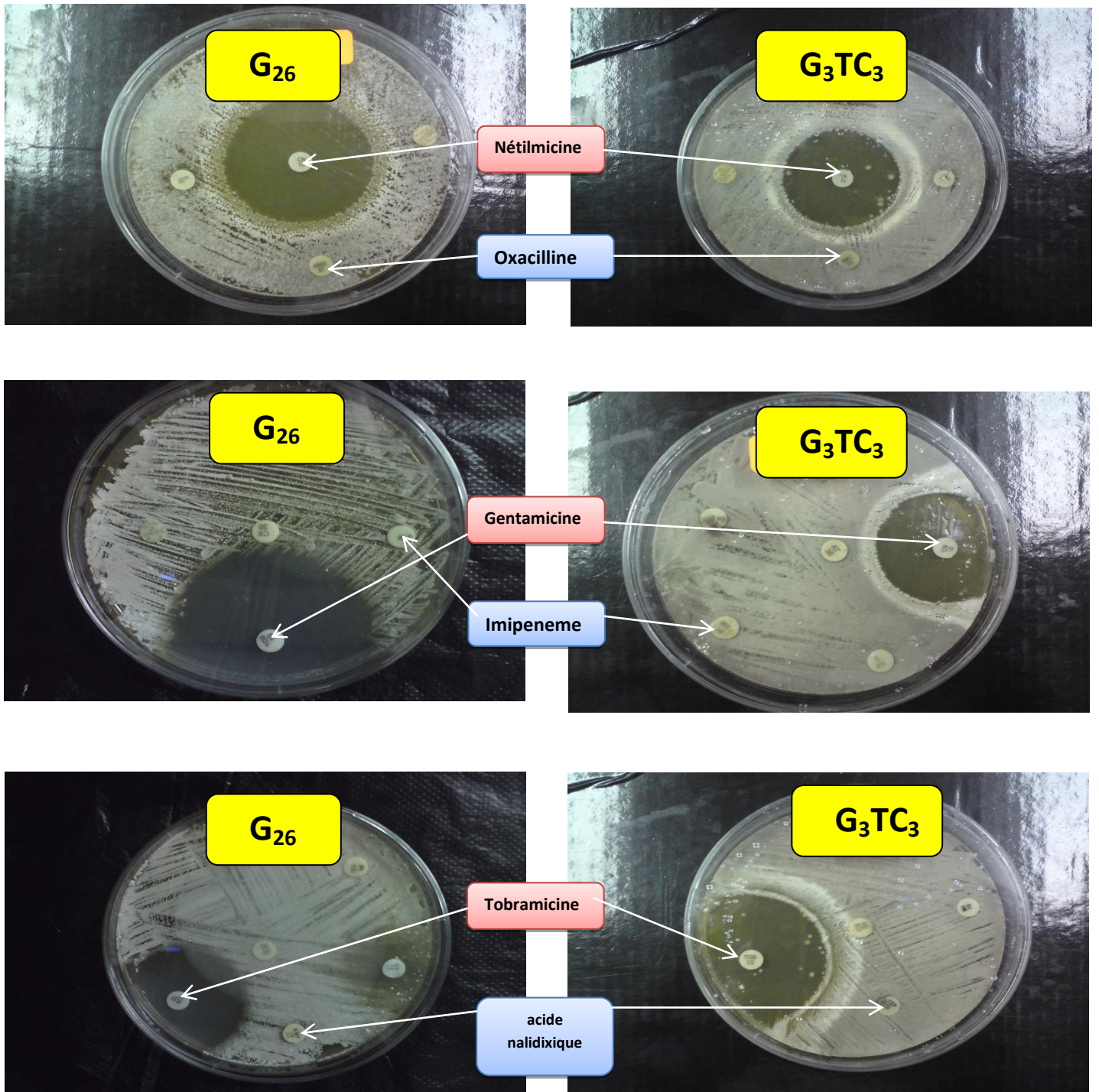


Figure 21 : planche illustrant la sensibilité des actinomycètes aux antibiotiques.

Résumé

Un isolement d'actinomycètes a été effectué à partir d'échantillons de sols provenant de Ghardaïa, Timimoun et El Golea. Ainsi un traitement du sol au CaCO₃ a été effectué pour un isolement sélectif des actinomycètes producteur d'antibiotiques. Deux isolats G26 et G3tc₃ ont été sélectionnées pour leur activité antagoniste performante vis-à-vis des germes cible Gram positif (*E.coli*) et Gram négatif (*S.aureus* , SARM) , une étude taxonomique a été entreprise dans le but de les identifier jusqu'au genre.

Au total 58 souches ont été isolées, parmi elles 23 proviennent de l'échantillon du sol traités au CaCO₃ et 35 souches de sol, sans traitement. L'échantillon provenant de Ghardaïa a permis d'isolé 75% des souches. Un total de 27 souches actives a été obtenu, ce qui représente 46%.

L'étude morphologique a permis de rattacher les souches G3tc₃ et G26 au genre *Streptovercillium* et *Streptomyces* respectivement et l'étude chimiotaxonomique a confirmé ce résultat. Ces deux isolats ont montré une croissance maximale à 37°C et à des pH allant de 5 à 11. Une très grande sensibilité aux antibiotiques appartenant à la famille des aminosides a été observée.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptovercillium*, *Streptomyces*, antibiotiques, sol saharien, isolement.

Abstract

Soil samples were isolated from Ghardaia, Timimoun and El Golea. As well, a soil treatment CaCO₃ was made for selective isolation of actinomycetes producing antibacterial compounds. Two strains G26 and G3tc₃ have been selected for their antagonistic activity towards target Gram-positive (*E. coli*) and Gram-negative bacteria (*S.aureus*, SARM). Taxonomic study was undertaken in order to identify at the genus level.

A number of 58 strains were isolated from the screening. Among these, 23 strains were obtained from samples after soil treatment with CaCO₃ and 35 strains from soil without treatment. The soil sample from Ghardaia has allowed 75% of the isolated strains. A total of 27 actives strains were selected representing 46%.

Based on morphological study, the strains G3tc₃, G26 were attached to the genera *Streptovercillium* and *Streptomyces* respectively and chemotaxonomic study confirmed these results. Both isolates showed maximum growth at 37 ° C and at pH values ranging from 5 to 11. These selected strains have a high sensitivity to antibiotics belonging to the aminoglycoside family.

Keywords: Actinomycetes, *Streptovercillium*, *Streptomyces*, antibiotic activity, Saharan soil, isolation.