

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبي بكر بلقايد – تلمسان –

Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen –

Faculté de Science de la Nature et de la Vie et **Sciences de la Terre et de l'Univers**



THESE

Présentée pour l'obtention du **grade** de **DOCTEUR EN BIOLOGIE**

Spécialité : **Microbiologie appliquée**

Par : **AKERMI MOULAY M'HAMMED**

Sujet

Elaboration d'un soucier de microorganismes producteurs de métabolite d'intérêt dans le sud-ouest algérien.

Soutenue publiquement, le 01 / 12 / 2022, devant le jury composé de :

M Chabane-Sari Daoudi	Professeur	Univ. Tlemcen	Président
M Djamel Eddine Abdelouahid	Professeur	Univ. Tlemcen	Directeur de thèse
M Amrouche Abdelillah	Professeur	Centre univ. Naama	Examineur
M Makhloufi Ahmed	Professeur	Univ. Bechar	Examineur
M Belyagoubi Larbi	MCA	Univ. Tlemcen	Examineur
M Mebarki Lakhder	MCA	Univ. Bechar	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail fait partie des recherches visées par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement (LAMAABE)-Abou Bakr Belkaid, Université de Tlemcen, sous la direction de Pr. Boumediene Moussa Boudjemaa Ex-directeur de ce laboratoire.

Mes plus sincères remerciements sont adressés au directeur de thèse Monsieur DJAMEL EDDINE ABDELOUAHID, Professeur à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre de l'univers de l'Université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid, de m'avoir fait confiance pour charger à la réalisation de ce sujet de recherche, tout en étant présente et disponible. Je tiens à travers ces quelques lignes à lui exprimer ma profonde gratitude pour les conseils, les encouragements et l'aide précieuse qu'il m'a prodigués tout au long des années passées au laboratoire, riches aussi bien sur le plan scientifique, pédagogique qu'humain. Je lui témoigne de mon profond respect.

Mes remerciements sont également adressés à Mr AMROUCHE Abdelillah Professeur à l'institut de science et de technologie, Département de sciences de la nature et de la vie, Centre universitaire Salhi Ahmed de Naama, d'avoir accepté aimablement de diriger ce travail en qualité de Co-directeur de thèse. Durant toutes ces années, il n'a pas cessé de m'encourager pour surpasser toutes les difficultés de ce long parcours. Ainsi, je tiens à lui remercier chaleureusement pour son dynamisme, sa disponibilité, son aide, ses conseils prestigieux et surtout sa qualité humaine qui m'a été d'un grand soutien.

Mes remerciements sont également adressés à Mr CHABANE-SARI Daoudi, Professeur à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre de l'univers de l'Université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid d'avoir accepté de présider le jury de notre thèse, malgré de bien lourdes charges à la faculté, de m'avoir toujours encouragé et soutenu. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie Mr MAKHLOUFI Ahmed, Professeur à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'Université Tahri Mohamed de Bechar, pour sa grande disponibilité et pour l'intérêt porté à notre travail. Je suis honoré par sa participation au jury de notre thèse.

Je tiens à remercier Mr BELYAGOUBI Larbi, Maître de Conférences à la Faculté des sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre de l'univers de l'Université de Tlemcen Abou Bakr Belkaid, qui me fait l'honneur de juger notre thèse de doctorat, je le remercie pour sa grande gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie grandement Mr MEBARKI Lakhder, Maître de Conférences à la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Tahri Mohamed de Bechar, de participer au jury de notre thèse, je le remercie infiniment pour sa disponibilité, son soutien infaillible et son aide, ses encouragements et pour toutes les discussions enrichissantes.

Mes sincères remerciements et ma profonde gratitude s'adressent à Mme OUZARI Hadda Imène, Professeur et Directrice de recherches au notre collaborateur de l'université d'El-Manar Tunis, de m'avoir si aimablement accueillie à deux reprises dans son laboratoire, elle a orienté judicieusement mon travail. Je suis reconnaissant envers elle pour l'aide qu'elle m'a apportée durant mes périodes de stage, nous y avoir facilité l'accès au sein du laboratoire des microorganismes et des biomolécule actifs (LMBA), Tunis.

Mes vifs remerciements s'adressent aux mes collègues pour leur aide et leur disponibilité à savoir, Pr Benmehdi Houcin pour la rédaction de l'article, Pr Meghite Khaled pour son soutien en la traduction de l'article en anglais, Dr Dalile Halima ces aides précieux pour la rédaction finale de la thèse, Dr Meliani Hayet pour ces aides surtout en partie d'étude des actinomycètes et au travail rigoureux dans le laboratoire, Dr Boulanouar Ali pour ces multiples aides pour réaliser l'analyse bioclimatologique, Dr Benlarbi larbi pour avoir accompagné afin de faire le prélèvement à partir de la Sebkhia N'CHIIHA à Kerzaz, Dr Bousouar Nacer pour la réalisation du profil protéique par la SDS PAGE de nos isolats, Dr Beloufa Ahmed pour ces orientations de valeurs pour réaliser ce travail. Qu'ils trouvent ici mon profond respect.

Je remercie Mr Bouchta Baghdad pour son aide précieux pour les correction et vérification de la langue d'écriture du manuscrit.

Mes remerciements vont aussi aux ingénieurs de laboratoire pédagogique de Fac SNV de Université de Bechar pour leurs collaborations.

Merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette étude.

Dédicace

Je dédie affectueusement cette thèse

À la mémoire de mon Père

À ma Mère

À ma femme avec sa famille.

À mes trois anges filles Aicha, Ihcene et Hafsa

À mes frères et sœurs.

À tous mes amis et proches.



RESUME

La grande diversité des écosystèmes extrêmes dans l'Algérie en particulier dans le sud et le sud-ouest, offre un champ pertinent et riche pour la recherche des microorganismes candidats pour la production des substances bioactives pour des fins thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons ciblé plusieurs écosystèmes afin d'isoler des microorganismes producteurs des métabolites antimicrobiens contre certains pathogènes notamment, *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum albedinis*. Selon les résultats physicochimiques des échantillons du sol, ils se sont montrés variables, le sol de KENADSA et IGLI classés non salés, le sol de BOUKAIS est un sol salé, la sebkha de KENADSA et celui de KERZAZ ainsi que le sol de ksar AOULEF se sont révélés très salés ; la sebkha de TEMENTIT est un sol classé extrêmement salé. Les isolats fongiques sont en nombre de cinquante-six (56) ce qui correspond à 20% des microorganismes isolés dont on a constaté la dominance de deux genres : *Penicillium* et *Aspergillus*. Les 80% des microorganismes trouvés, en nombre de (224) sont des isolats bactériens appartiennent aux familles suivantes : *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Listeriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococaceae*, *Staphylococcaceae*. L'échantillon du sol prélevé du Ksar de Kenadsa permet d'isoler cinquante (50) actinomycètes. Tandis qu'à partir de l'oasis de Timmimoun, nous avons pu isoler 67 actinomycètes. A partir du Ksar SIDI CHAREF, nous avons pu isolés 12 *Bacillus*. L'extrait de métabolites secondaires des isolats par n-butanol est efficace contre la bactérie à Gram négatif et les souches fongiques. Par contre, l'extrait par l'acétate d'éthyle et s'est révélé avoir une activité antibactérienne importante contre les bactéries à Gram positif et une activité modérée contre les bactéries à Gram négatif. L'Analyse chromatographique sur couche mince selon laquelle les composés des extraits utilisés représentent des précurseurs actifs d'antimicrobiens extraits dans le surnageants et retrouvés dans les extraits obtenus d'acétate d'éthyle et n-butanol. L'analyse phylogénétique nous a permis de conclure que nos isolats sont regroupés en onze espèces du genre *Bacillus*, cinq espèces du genre *Pseudomonas* et une espèce du genre de *Shigella*. Les écosystèmes prospectés présentent un réservoir promoteur des microorganismes intéressants potentiellement actifs contre les pathogènes de l'homme et les phytopathogènes testés.

Mots clés : Milieux extrêmes, Métabolites secondaires, Pathogènes, ARNr16S, activité antimicrobienne, Actinomycètes, CCM.

يوفر التنوع الكبير للنظم الإيكولوجية القسوى في الجزائر، وخاصة في الجنوب والجنوب الغربي، مجالاً مهماً وغنياً للبحث عن الكائنات الحية الدقيقة القابلة لإنتاج المواد النشطة بيولوجياً من أجل غايات علاجية. ضمن هذا السياق، استهدفنا العديد من النظم البيئية لعزل الكائنات الحية الدقيقة التي عندها القابلية لتنتج مركبات كيميائية عبارة عن مضادة للميكروبات الممرضة، لأجل ذلك اختبرنا في هذه الدراسة السلالات المرجعية التالية: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum albedinis*. أظهرت نتائج عينات التربة الفيزيائية الكيميائية، والتي كانت متفاوتة ومتغيرة، أن تربة القنادسة وإقلي تصنف غير مالحة، وتربة بوكايس مالحة، وسبخة قنادسة وتربة كرزاز بالإضافة إلى تربة قصر أولف مصنفة على أنها تربة مالحة للغاية. يبلغ عدد العزلات الفطرية ستة وخمسين (56)، أي ما يعادل 20% من إجمالي الكائنات الدقيقة المعزولة التي وجدت مع هيمنة الجنسين: *Penicillium* و *Aspergillus*. 80% من الكائنات الدقيقة أي ما يمثل (224) هي عزلات بكتيرية تنتمي إلى العائلات التالية: *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Listeriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococaceae*, *Staphylococcaceae*. عينة التربة التي تم جمعها من قصر القنادسة مكنتنا من عزل خمسين (50) *Actinomycètes*. بينما عملية العزل من واحة تميمون، أسفرت عن عزل 67 *Actinomycètes*. أما من قصر أولف تم عزل *Bacillus* 12. مستخلص المستقلبات الثانوية في n-butanol فعالة ضد البكتيريا سالبة الغرام والسلالات الفطرية. في المقابل، وجد أن المستخلص في Acétate d'éthyle له نشاط كبير كمضاد حيوي للبكتيريا موجبة الجرام ونشاط أقل منه ضد البكتيريا سالبة الجرام. أثبتت التحليل الكروماتوغرافي للطبقة الرقيقة (CCM) بأن مركبات المستخلصات المستخدمة هي مواد فعالة كمضادات الميكروبات المستخرجة من المادة الطافية التي وجدت من مستخلصات n-butanol و Acétate d'éthyle. ولقد قادنا التحليل الجيني من خلال شجرة القرابة إلى الاستنتاج بأن عزلاتنا تمثل أحد عشر نوعاً من جنس *Bacillus*، وخمسة أنواع من جنس *Pseudomonas* ونوعاً واحداً من جنس *Shigella*. من خلال كل ما سبق ومما أثبتته هذه الدراسة، يمكننا القول بأن النظم البيئية التي تم فحصها تمثل خزناً ممتازاً يحتوي على كائنات دقيقة تستحق الاهتمام لأنها تمتلك مواداً نشطة وفعالة ضد الميكروبات المسببة للأمراض تصيب البشر والنباتية وكذلك الحيوانات.

كلمات مفتاحية: بيئات متطرفة، مستقلبات ثانوية، كائنات ممرضة، ARNr16S، مضادات الميكروبات، *Actinomycetes*، CCM.

ABSTRACT

The great diversity of extreme ecosystems in Algeria, especially in the south and south-west, offers a relevant and rich field for the research of microorganisms candidates for the production of bioactive substances for therapeutic purposes. In this context, we have targeted several ecosystems to isolate microorganisms producing antimicrobial metabolites against certain pathogens, including *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum albedinis*. According to the physicochemical results of the soil samples, they were variable, the soil of KENADSA and IGLI classified unsalted, the soil of BOUKAIS is salty, the sebkha of KENADSA and that of KERZAZ as well as the soil of ksar AOULEF proved very salty; TEMENTIT sebkha is a soil classified as extremely salty. The number of fungal isolates is fifty-six (56), which corresponds to 20% of the isolated microorganisms whose dominance was found in two genera: *Penicillium* and *Aspergillus*. The 80% of the microorganisms found, in number of (224) are bacterial isolates belonging to the following families: *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Listeriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococaceae*, *Staphylococcaceae*. The soil sample collected from Kenadsa Ksar isolates fifty (50) actinomycetes. While from the oasis of Timmimoun, we were able to isolate 67 actinomycetes. From the Ksar SIDI CHAREF, we were able to isolate 12 *Bacillus*. Secondary metabolite extract from n-butanol isolates is effective against Gram-negative bacteria and fungal strains. In contrast, the extract by ethyl acetate has been found to have significant antibacterial activity against Gram-positive bacteria and moderate activity against Gram-negative bacteria. Thin-layer chromatographic analysis that the compounds of the extracts used are active precursors of antimicrobials extracted from the supernatant and found in extracts obtained from ethyl acetate and n-butanol. Phylogenetic analysis has led us to conclude that our isolates are grouped into eleven species of the genus *Bacillus*, five species of the genus *Pseudomonas* and one species of the genus *Shigella*. The investigated ecosystems present a reservoir promoting interesting microorganisms potentially active against human pathogens and phytopathogens tested.

Keywords: Extreme Environments, Secondary Metabolites, Pathogens, ARNr16S, Antimicrobial Activity, Actinomycetes, MCC.

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOEt	Acétate d'Ethyle
ATCC	American Type Culture Collection
ACA	Amidon caséine agar
ADH	Arginine dihydrolase
BLAST	Basic Local Aligement Search Tool
BET	Bromure d'éthidium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDA	Czapex Dox Agar
CDAa	Czapex Dox Agaracidifié
DO	Densité Optique
dATP	Désoxyadénosine-Tri-Phosphates
dCTP	Désoxycytosine-Tri-Phosphates
dGTP	Désoxyguanosine-Tri-Phosphates
dNTP	DésoxyNucléosides-Tri-Phosphates
ddNTP	Didésoxyribonucléoside
DSMO	Diméthylsulfoxyde
ED	Eau distillée
FOA	<i>Fusarium oxysporum f sp albedinis</i>
HPLC	High pressure liquid chromatography
LDC	Lysine décarboxylase
MS	Matière sèche
MEGA 11	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center For Biotechnology Information
ODC	Ornithine décarboxylase
PCR	Polymerase Chaine Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDAa	Potatoes Dextrose Agar acidifié
rf	Rapport frontal
v/v	Rapport volume / volume
ARNr16S	Sous unité de l'ARN ribosomique 16S
t/mn	Tours par minute
UV	Ultra-violet
UF	Unité fongique
UFC	Unité formant une colonie
YES	Yeast Extract Sucrose

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau n°1 Mode d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques (MANCUSO et al., 2021).	9
Tableau n°2 Catégories des microorganismes halophiles (BERRADA, 2012)	24
Tableau n°3 Distribution mondiale des bactéries halophiles modérées à Gram négatif isolées des sols salins ou hypersalins (VENTOSA et al., 2008).	25
Tableau n°4 Distribution mondiale des bactéries halophiles modérées à Gram positif isolées des sols salins ou hypersalins (VENTOSA et al., 2008)	26
Tableau n°5 Quelques genres bactériens isolés à partir du sol (SOBTI, 2015).	28
Tableau n°6 Distribution des microorganismes en fonction de la profondeur de sol (NOUMEUR, 2008).	29
Tableau n°7 Microorganismes producteurs d'antibiotiques (LADJAL, 2012).	36
Tableau n°8 Composés bioactifs isolés des thermophiles terrestres (GIDDINGS & NEWMAN, 2015).	39
Tableau n°9 Présentation des sites de prélèvements	52
Tableau n°10 Origines des souches tests.	60
Tableau n°11 Récapitulatif du programme de thermocycleur	64
Tableau n°12 Moyennes annuelles des précipitations (Béchar 1991-2020)	67
Tableau n°13 Moyennes annuelles des précipitations (Adrar 1991-2020)	67
Tableau n°14 Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle de la station météorologique de Béchar (1991-2020)	68
Tableau n°15 Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle de la station météorologique d'Adrar (1991-2020).	68
Tableau n°16 Détermination de l'étage bioclimatique des stations de Béchar et d'Adrar.	69
Tableau n°17 Résultats obtenus de l'analyse physicochimique des échantillons de sol	70
Tableau n°18 Echelle de la salinité en fonction de la conductivité électrique (SERVANT, 1975).	72
Tableau n°19 Tableau récapitulatif des résultats d'isolement des microorganismes	73
Tableau n°20 Tableau récapitulatif de la distribution des isolats en groupes	73
Tableau n°21 Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de Kenadsa)	75
Tableau n°22 Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de Mazzer)	78
Tableau n°23 Identification probable des espèces fongiques (site de Karzaz)	81

Tableau n°24	Identification probable des espèces fongiques (Site d'Aoulef)	81
Tableau n°25	Identification probable des espèces fongiques (site de Boukais)	82
Tableau n°26	Résultats d'aspect macroscopique des actinomycètes endophytes isolées à partir de trois plantes.	93
Tableau n°27	Caractéristiques morphologiques des isolats purs de l'oasis de Timimmoun, sur milieu ISP2.	94
Tableau n°28	Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la sebkha de Kenadsa	96
Tableau n°29	Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la Grotte de Boukais	98
Tableau n°30	Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la sebkha de Karzaz	99
Tableau n°31	Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la sebkha de Karzaz (suite)	100
Tableau n°32	Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la grotte de Mazzer	101
Tableau n°33	Identification biochimique des <i>Bacillus</i> isolés à partir du K'sar Sidi Charef à Aoulef	102
Tableau n°34	Identification biochimique des <i>Bacillus</i> isolés à partir du K'sar Sidi Charef à Aoulef	103
Tableau n°35	Résultats du screening primaire par la technique de cylindre d'agar	105
Tableau n°36	Résultats de la technique de diffusion par disque	107
Tableau n°37	Résultats de l'activité antibactérienne des isolats évalués par la technique des cylindres d'agar.	108
Tableau n°38	Résultats de l'effet antimicrobien des isolats fongiques contre <i>Salmonella thypimurium</i> , par deux méthodes de la diffusion par disques et par puits.	111
Tableau n°39	Activité antibactérienne des champignons	111
Tableau n°40	Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats actinomycètes contre les microorganismes tests, par la technique de cylindre d'agar.	115
Tableau n°41	Résultats de screening secondaire des isolats bactériens	118
Tableau n°42	Résultats de la séparation des composants des extraits et calcul de leur Rf sur CCM	121
Tableau n°43	Résultats d'identification moléculaire et l'enregistrement dans la GenBank	123

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure n°1	Principales causes de mortalité dans le monde (OMS, 2020). 11
Figure n°2	Morphologie et multiplication de certains groupes de phytopathogènes (GUEST, 2017). 13
Figure n°3	A) Limites de température pour la vie. Les valeurs de la température la plus basse pour chaque taxon principal est indiquée. Les <i>Archaea</i> sont en rouge, les bactéries en bleu, les algues en vert clair, champignons en brun, protozoaires en jaune, plantes en vert foncé et des animaux en pourpre. B) Limites de pH pour la vie. Exemples de pH limites connues pour la vie sont montré. <i>Archaea</i> sont en rouge, les bactéries en bleu, les algues en vert clair, protistes assortis en jaune, champignons en brun, plantes en vert foncé et les animaux en pourpre (OARGA, 2009). 21
Figure n°4	Origine des substances antimicrobiennes (BERDY, 2005). 35
Figure n°5	Différents éléments de palmier utilisés dans la couverture (BOUTABBA et al., 2016). 45
Figure n°6	Vue générale de la sebkha de Tamentit (Adrar) (<i>Photo originale</i>). 46
Figure n°7	Carte géographique présente les sites de prélèvement exploité (GOOGLE MAPS, 2019) 53
Figure n°8	Technique d'antagonisme entre les isolats et les microorganismes tests 61
Figure n°9	Climagramme pluviométrique d' EMBERGER STEWART (1991-2020) 68
Figure n°10	Diagramme ombrothermique région de Béchar BAGNOULS & GAUSSEN (1991-2020) 69
Figure n°11	Diagramme ombrothermique région d'Adrar BAGNOULS & GAUSSEN (1991-2020) 69
Figure n°12	Distribution des isolats fongiques 74
Figure n°13	Activité antibactérienne des souches <i>P. glabrum</i> , <i>A. chevaluri</i> contre les bactéries-cibles <i>Bacillus subtilis</i> (1). 113
Figure n°14	Résultats de la séparation des composants des extraits par CCM 121
Figure n°15	Arbre phylogénétique des espèces identifiées. 125

LISTE DES PLANCHES

	Page
Planche n°1	Symptômes externes du Bayoud (BENLARBI, 2009). 14
Planche n°2	Vue générale de la sebkha de Kerzaz (<i>Photo originale</i>). 47
Planche n°3	Plantes médicinales collectées, a) <i>Atriplex halimus</i> (L'gtaf), b) <i>Rosmarinus officinalis</i> (Laziir), c) <i>Launaea arborescens</i> (Oum-el'bina) (<i>Photo originale</i>). 49
Planche n°4	Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de Kenadsa) 77
Planche n°5	Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de Mazzer) 80
Planche n°6	Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site d'Aoulef) 83
Planche n°7	Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de Boukais) 84
Planche n°8	Identification de <i>Penicillium chrysogenum</i> par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu G25N. C : sur milieu PDA. 85
Planche n°9	Identification de <i>Penicillium citrinum</i> par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu G25N. C : sur milieu PDA. 85
Planche n°10	Identification de <i>Penicillium citreonigrum</i> par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu G25N. C : sur milieu CYA à 25°C. 85
Planche n°11	Identification de <i>Penicillium brevicompactum</i> par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu G25N. C : sur milieu CYA à 25°C. 85
Planche n°12	Identification de <i>Penicillium glabrum</i> par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu CYA à 25°C. C : sur milieu CYA à 5°C. 85
Planche n°13	Identification de <i>Penicillium brevicompactum</i> (S ₅₃) par la méthode de single spore. A : sur milieu MEA. B : sur milieu G25N. C : sur milieu CYA à 25°C. 85
Planche n°14	Identification de l'isolat SF2 par la méthode de single spore. A : milieu G25N à 25°C. B : milieu MEA à 25°C. C : milieu PDA à 25°C. 86
Planche n°15	Identification de l'isolat BTW par la méthode de single spore. A : milieu MEA à 25°C. B : milieu CYA à 25°C. C : milieu PDA à 25°C. 86
Planche n°16	Identification de l'isolat BTA4 par la méthode de single spore. A : milieu MEA à 25°C. B : milieu G25N à 25°C. C : milieu CYA à 25°C. 86
Planche n°17	Identification de l'isolat SF 29 par la méthode de single spore. A : milieu CYA à 37°C. B : milieu CYA à 25°C. C : milieu G25N à 25°C. 86

Planche n°18	Identification de l'isolat SF11 par la méthode de single spore. A : milieu CYA à 25°C. B : milieu G25N à 25°C. C : milieu MEA à 25°C. D : milieu PDA à 25°C.	86
Planche n°19	Identification de l'isolat SF18 par la méthode de single spore. A : milieu CYA à 25°C. B : milieu G25N à 25°C. C : milieu MEA à 25°C. D : milieu PDA à 25°C. E : revers du milieu CYA à 25°C.	86
Planche n°20	Aspect macroscopique et microscopique des souches apparentées aux genres dans les sites de Boukais, Kenadsa et Karzaz. A et A' : <i>Bacillus</i> , B : <i>Neisseria</i> , C et D : <i>Staphylococcus</i> , E : <i>Micrococcus</i> .	90
Planche n°21	Aspects majeurs obtenus pour les isolats après coloration de Gram (x100) (a,f)	91
Planche n°22	Aspects coloniaux obtenus pour les isolats (a, b, c) aspect régulier lisse, (d, e, f) aspect irrégulier lisse.	91
Planche n°23	Aspect macroscopique des actinomycètes endophytes isolées à partir de trois plantes	93
Planche n°24	Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats purs de l'oasis de Timimmoun, sur milieu ISP2.	94
Planche n°25	Observation macroscopique des isolats de K'sar Kenadsa	95
Planche n°26	Observation microscopique des isolats de K'sar Kenadsa	95
Planche n°27	Résultats de l'antagonisme des isolats bactériens contre <i>A. flavus</i> (A, B, C, D, E). <i>E. coli</i> (F, G, H). <i>S. aureus</i> (J, K, L).	104
Planche n°28	Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque. (A) : <i>Listeria</i> , (B) : <i>Staphylococcus</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i> .	107
Planche n°29	Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque. (A) : <i>Micrococcus</i> (5) et <i>Bacillus</i> (6) contre <i>S. aureus</i> (B) : <i>Micrococcus</i> <i>Bacillus</i> (6) et <i>Staphylococcus</i> (7) vis-à-vis <i>E. coli</i> .	107
Planche n°30	Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque (A) : <i>Neisseria</i> (10) et <i>Bacillus</i> (8) vis-à-vis <i>E. coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> ; (B) : <i>Listeria</i> contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; (C) : <i>Neisseria</i> contre <i>Salmonella typhi</i> .	108
Planche n°31	Activité antimicrobienne des isolats fongiques vis-à-vis de <i>Salmonella typhimurium</i> , par la technique des puits et celle de diffusion par disques.	111
Planche n°32	Activité antibactérienne des champignons vis-à-vis de <i>Salmonella typhimurium</i> par la technique de cylindre d'Agar. (A) : <i>Aspergillus flavus</i> (08), (B) : <i>Aspergillus</i> sp. (13), <i>Penicillium</i> sp. (12) <i>Aspergillus</i> sp. (14). (C) : <i>Aspergillus niger</i> (22).	112
Planche n°33	Activité antibactérienne de la souche <i>P. brevicompactum</i> , <i>A. niger</i> dans A et B contre la bactérie-cible <i>Salmonella typhi</i> (4).	113

- Planche n°34** Activité antibactérienne de la souche *A. terreus* contre les bactéries-cibles *Enterococcus faecalis* (2), *Klebsiella pneumoneae* (3), *Salmonella typhi* (4). 113
- Planche n°35** Effet antagoniste des actinomycètes contre les microorganismes tests, par la technique de cylindre d'agar. 115
- Planche n°36** Résultats de la mise en évidence des amplicons de la PCR de nos isolats sur gel d'agarose. 122

TABLE DES MATIERES

	Page
Remerciements	i
Dédicaces	iii
Résumé	iv
ملخص	v
Abstract	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des tableaux	viii
Listes des figures	x
Listes des planches	xi
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Maladies infectieuses, agents pathogènes et résistance aux antibiotiques	4
I. Agents des maladies infectieuses de l'homme	5
II. Agents phytopathogènes	12
II.1. Bactéries phytophages	12
II.2. Champignons phytophages	13
Chapitre 2 : Biodiversité et écologie microbienne d'un écosystème	16
I. Difficultés rencontrées pour l'étude de la biodiversité microbienne	16
I.1. Diversité microbienne dans les grottes (cavernes)	17
I.2. Diversité microbienne des endophytes	19
I.3. Diversité des microorganismes et milieux extrêmes	20
I.3.1. Environnements hypersalins la sebkha	21
I.3.2. Importances des halotolérantes et les halophiles	27
I.4. Diversité de la flore du sol	28
II. Différentes approches taxonomiques	30
II.1. Taxonomie phénétique	30
II.2. Taxonomie génotypique	31
Chapitre 3 : Molécules bioactives	35
I. Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne	40
I.1. Technique des cylindres d'Agar (plug Agar)	40
I.2. Technique des stries transversales (Cross streak)	40
I.3. Technique des disques en papier (filter paper discs)	40
I.4. Technique des puits	41

I.5. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	41
I.6. Chromatographie sur couche mince (CCM) et bioautographie	41
Chapitre 4 : Matériel et méthodes	43
I. Présentation des zones d'étude	43
I.1. Ville de Béchar	43
I.2. Anciennes K'sar patrimoine culturel	44
I.2.1. K'sar de Kenadsa	44
I.2.2. K'sar Sidi Charef d'Aoulef	44
I.3. Sebkha	46
I.3.1. Sebkha de Kenadsa	46
I.3.2. Sebkha de Tamentit	46
I.3.3. Sebkha de Karzaz	47
I.4. Sources d'eau	47
I.4.1. Source d'eau dans l'oasis de Timimoune	47
I.4.2. Ancien k'sar de Mazzer source d'eau (Hammamet)	48
I.5. Grotte de Boukais	48
I.6. Description et classification des plantes médicinales	48
I.6.1. <i>Atriplex halimus</i> L.	49
I.6.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	49
I.6.3. <i>Launaea arborescens</i> Murb.	50
II. Etude climatologique	50
III. Prélèvement des échantillons	51
IV. Analyse physico-chimique du sol	54
IV.1. pH du sol	54
IV.2. Conductivité et Salinité	54
IV.3. Mesure de l'humidité	54
V. Isolement et dénombrement des microorganismes	55
V.1. Traitement des échantillons	55
V.1.1. Actinomycètes	55
V.1.2. <i>Bacillus</i>	56
V.1.3. Autres groupes bactériens et les moisissures	56
V.2. Milieux d'isolement utilisés	57
V.3. Purification et conservation	57
V.4. Identification des microorganismes	57
V.4.1. Actinomycètes	57

V.4.2. <i>Bacillus</i>	58
V.4.3. Moisissures	58
V.4.3.1. Observation macroscopique	59
V.4.3.2. Observation microscopiques (micro-culture)	59
VI. Evaluation de l'effet antimicrobien des isolats	59
VI.1. Screening primaire de l'effet antimicrobien	60
VI.1.1. Technique de diffusion dans la gélose à l'aide de cylindre d'Agar	60
VI.1.2. Technique des stries transversales (Cross streak)	61
VI.1.3. Technique de diffusion dans la gélose à l'aide de disque	61
VI.2. Screening secondaire de l'effet antimicrobien	62
VI.2.1. Fermentation et préparation des extraits	62
VI.2.2. Technique de diffusion dans la gélose à partir des puits	62
VI.2.3. Prédétermination des substances secondaires par CCM	62
VII. Identification moléculaire des isolats par le gène ARNr 16S	63
VII.1. Extraction de l'ADN des bactéries	63
VII.2. Analyse par l'outil BLAST et création de l'arbre phylogénétique	64
Chapitre 5 : Résultats et discussion	66
I. Présentation des sites d'échantillonnage	66
I.1. Etude climatologique	66
I.1.1. Pluviométrie	66
I.1.2. Température	67
I.1.3. Climagramme d'Emberger Stewart	68
I.1.4. Diagramme ombrothermique	69
II. Analyse physico-chimique	69
II.1. pH	70
II.2. Humidité	71
II.3. Conductivité et salinité	71
III. Isolement et dénombrement des microorganismes	72
IV. Activité antibactérienne des bactéries	104
IV.1. Screening primaire	104
IV.1.1. Technique de diffusion par disque	106
IV.1.2. Technique des cylindres d'Agar	107
IV.1.3. Activité antibactérienne des isolats fongiques	110
IV.1.4. Activité antibactérienne des actinomycètes	114
IV.2. Screening secondaire	116

IV.2.1. Différents résultats des extraits	120
IV.2.2. Résultat de l'analyse chromatographique	120
V. Identification moléculaire	122
V.1. Arbre phylogénétique	123
Conclusion et perspectives	126
Bibliographie	129
Annexes	I

INTRODUCTION GENERALE

La grande diversité des écosystèmes originaux dans l'Algérie tels que les oueds, les cours d'eau des régions semi-désertiques, la sebkhia, le marécage salin des régions arides, le désert ou encore les grottes, les sédiments dans les eaux de « Mâjen », les sources d'eau et les anciens K'sar, offre un champ pertinent et riche pour la recherche des microorganismes candidats pour diverses applications, notamment la lutte contre les pathogènes affectant l'homme, le végétale et l'animale. Il y a plusieurs raisons liées à la recherche dans le domaine de la microbiologie, soit pour résoudre les questions liées à la classification des microorganismes ; soit pour procéder à la bioremédiation et au traitement des problèmes d'ordre environnemental qui sont les résultats de l'activité anthropique de l'homme ; ainsi que la recherche des substances bioactives, alternatives ou nouvelles, pour résoudre les problèmes des maladies infectieuses.

Le sol a probablement été le premier écosystème microbien à être étudié en détail. A cause des résultats du développement pratique précoce de la microbiologie comme par exemple, l'augmentation de la production alimentaire grâce à la compréhension de la fixation de l'azote, de la prévention des maladies des plantes et de la détérioration des aliments. Le sol est sans aucun doute le plus complexe de tous les habitats microbiens. En tant que tel, il offre également l'un des plus grands défis aux écologistes microbiens. Malgré la pléthore de la documentation traitant la microbiologie du sol, la compréhension de l'activité, de l'écologie et de la dynamique des populations de microorganismes dans le sol est encore limitée.

Tous les écrits scientifiques sur l'histoire de la vie prouvent que les bactéries, suivies par les autres microorganismes, sont les premiers êtres vivants existant sur la terre, de ce fait, et au cours de cette longue période, ils ont accumulé des expériences physiologiques et des potentialités génétiques importantes, ce qui les qualifie comme une parfaite cible qui constitue un riche réservoir pour la découverte et l'exploitation des produits naturels, dont l'homme bénéficie dans tous les domaines de la vie.

Les maladies infectieuses étaient mortelles, avant la découverte du premier antibiotique par **ALEXANDRE FLEMING** en **1928**. Ce produit a donné l'espoir à l'humanité hélas ça n'a pas duré longtemps à cause de l'utilisation intensive et abusive de ces produits ce qui a conduit à l'émergence des pathogènes résistants et multi-résistants aux antibiotiques. Ce phénomène de résistance est

clairement apparu avec la Staphylocoque productrice de la pénicillinase. À cause de cette résistance qui menace la sécurité sanitaire mondiale, l'OMS à tirer la sonnette d'alarme (**OMS, 2015**).

Sous l'effet de la demande croissante de nouvelles molécules bioactives efficaces contre les microorganismes multirésistants et les maladies infectieuses, la recherche et le développement de nouveaux produits doués d'activités physiologiques nouvelles a été propulsé au rang des défis les plus importants pour l'humanité au 21^{ème} siècle. Les chercheurs estiment que seul 1% des microorganismes vivants sur terre a été découvert, ce qui laisse place à la découverte de multitude de nouvelles espèces et souches microbiennes encore inconnues et qui doivent posséder des métabolismes particuliers et différents et donc la capacité de produire de nouvelles molécules (**MORAKCHI, 2011**).

Ces produits naturels résultant d'un métabolisme de micro-organismes sont les principales sources des bioindustries de fermentation dans divers domaines. Reconnu en tant qu'agent efficace de transformation, de dégradation et de la production d'un certain nombre de métabolites intéressants, les micro-organismes sont largement utilisés en biotechnologie pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires présentant des valeurs ajoutées et activités biologiques d'une importance capitale. On peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques, etc. (**DEMAIN, 2000**). En outre, dans la recherche pharmaceutique, ces produits naturels jouent un rôle important en raison de leur diversité chimique et leur large éventail d'activités biologiques. En effet, selon **GIDDINGS & NEWMAN (2015)**, 80% des médicaments utilisés dans le traitement de diverses maladies sont d'origine naturelle, dont près de 62% de molécules anticancéreuses et 78% d'anti-infectieux utilisés en thérapeutique courante.

Dans ce contexte et à la lumière de ces points évoqués ci-dessus, et afin de contribuer au traitement des maladies infectieuses et de proposer des substances bioactives qui pourraient prendre place parmi les médicaments de l'arsenal thérapeutique anti-infectieux de demain, nous nous sommes fixés comme objectifs, dans notre présent travail, l'isolement des microorganismes à partir de plusieurs biotopes dans le sud-ouest algérien en particulier les sédiment et l'eau de Mâjen, grotte, caverne, k'sar, sebka et des plantes médicinales pour étudier l'aptitude et la possibilité que ces microorganismes offerts comme source prodigieuse de molécules antibiotiques réellement innovantes.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des prospections dans différents biotopes pour isoler des microorganismes possédants des potentiels de l'effet antimicrobien. Ces prospections ont

pour objectifs, la caractérisation du milieu et de l'isolat pour élaborer un soucier des microorganismes producteurs de métabolites d'intérêt.

Le deuxième volet de la thèse consiste principalement à caractériser au niveau biomoléculaire des substances bioactives et l'identification moléculaire des isolats. Nous avons complété cette étude par des tests d'évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits préparés à partir des isolats. Enfin, cette étude est achevée par une pré-identification des molécules responsables de cette activité et l'identification moléculaire des isolats sélectionnés.

Le manuscrit de la thèse comprend deux parties avec une introduction générale, une conclusion et quelques perspectives. La première dresse une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances relatives à notre travail, elle est fractionnée les trois chapitres traitant au début les maladies infectieuses, les agents pathogènes et le problème de la résistance aux antibiotiques, suivi par la biodiversité et l'écologie microbienne des écosystèmes et enfin des généralités sur les molécules bioactives. La seconde partie consacrée au matériel et aux méthodes, présente l'origine du matériel biologique et décrit tous les protocoles expérimentaux exploités. Enchaîné par un cinquième chapitre qui regroupe les résultats et leur discussion. Enfin, le manuscrit s'achève par la présentation des références bibliographiques et les annexes.



Chapitre I

**Maladies infectieuses, agents pathogènes
et résistance aux antibiotiques.**



CHAPITRE I

MALADIES INFECTIEUSES, AGENTS PATHOGENES ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques ont permis de traiter des infections bactériennes telles que la méningite et la bactériémie qui, avant leur introduction, étaient incurables et par conséquent mortelles. Malheureusement, au cours des dernières décennies, la surutilisation et la mauvaise utilisation des antibiotiques ainsi que des facteurs sociaux et économiques ont accéléré la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques, rendant le traitement médicamenteux inefficace. Actuellement, au moins 700 000 personnes dans le monde meurent chaque année en raison de la résistance aux antimicrobiens. Sans de nouveaux et meilleurs traitements, l'organisation mondiale de la santé (OMS) prévoit que ce nombre pourrait atteindre 10 millions d'ici 2050, soulignant un problème de santé qui n'est pas secondaire. En février 2017, à la lumière de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, l'OMS a publié une liste d'agents pathogènes qui comprend les agents pathogènes désignés par l'acronyme ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces *Enterobacter*) auxquelles ont été attribués le « statut prioritaire » le plus élevé car ils représentent la grande menace pour l'homme (MANCUSO et al., 2021).

La liste de l'OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques (OMS, 2017) :

- **Priorité 1 : critique**
 - ✓ *Acinetobacter baumannii*, résistance aux carbapénèmes
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux carbapénèmes
 - ✓ *Enterobacteriaceae*, résistance aux carbapénèmes, production de BLSE
- **Priorité 2 : élevée**
 - ✓ *Enterococcus faecium*, résistance à la vancomycine
 - ✓ *Staphylococcus aureus*, résistance à la méthicylline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine
 - ✓ *Helicobacter pylori*, résistance à la clarithromycine
 - ✓ *Campylobacter spp.*, résistance aux fluoroquinolones

- ✓ *Salmonellae*, résistance aux fluoroquinolones
- ✓ *Neisseria gonorrhoeae*, résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones
- **Priorité 3 : moyenne**
 - ✓ *Streptococcus pneumoniae*, insensible à la pénicilline
 - ✓ *Haemophilus influenzae*, résistance à l'ampicilline
 - ✓ *Shigella spp.*, résistance aux fluoroquinolones

Les maladies infectieuses comprennent toutes les maladies causées par la transmission d'un agent pathogène tel qu'une bactérie, un virus, un parasite, un prion ou un champignon. Ils couvrent donc un large éventail de pathologies bénignes comme le rhume ou l'angine de poitrine, mais aussi très graves comme le SIDA, l'hépatite, le paludisme ou la tuberculose. Bien que la recherche ait permis d'en éradiquer certaines par la mise au point de vaccins et d'antibiotiques spécifiques, il reste encore un long chemin à parcourir pour assurer le traitement de toutes ces pathologies. Nous assistons aujourd'hui également à une augmentation de la résistance aux antibiotiques par les bactéries, ainsi qu'à l'émergence de nouveaux virus encore inconnus. Des recherches continuent à développer des traitements novateurs pour ces maladies (OMS, 2015).

Parmi les causes principales des maladies infectieuses, l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance des microorganismes, ce qui menace la capacité de traiter les maladies infectieuses courantes. Elles entraînent des décès et des incapacités chez des personnes qui, jusqu'à récemment, auraient pu continuer à mener une vie normale. En effet les infections deviennent graves lorsqu'elles sont provoquées par des micro-organismes résistants, ce qui se traduit par une maladie prolongée et un risque de mortalité accru. A titre d'exemple, le taux de mortalité des patients hospitalisés à cause des infections graves, peut être près de deux fois plus élevé que celui des malades porteurs d'infections provoquer par les microorganismes non résistants. En outre, des patients infectés par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, autre source courante d'infections graves dans la communauté et dans les hôpitaux, auraient un risque 64% plus élevé de létalité que les personnes atteintes d'une forme non résistante de l'infection (OMS, 2015).

I. Agents des maladies infectieuses de l'homme

L'espèce humaine est infectée par un grand nombre d'agents pathogènes. Nous sommes certainement l'espèce la plus parasitée sur la planète. Ainsi, plus de 1400 espèces de parasites et microbes ont été énumérées comme pathogènes chez l'humain, parmi elles, plus de 60% sont d'origine

zoonotique, c'est-à-dire provenant des animaux. On notera donc que le pourcentage d'agents pathogènes zoonotiques observés dans toutes les maladies infectieuses touchant l'espèce humaine est le même que celui observé pour les maladies infectieuses épidémiques. Comme il est le même pour les seules maladies infectieuses émergentes. L'émergence n'est donc pas originale en ce qui concerne la grande variété de maladies infectieuses qui affectent et continuent d'affecter l'humanité (**MORAND & FIGUIE, 2016**).

Le milieu hospitalier est un environnement propice à la propagation des infections depuis des malades infectés vers des malades non infectés devenant alors encore plus malades. Ces infections se transmettent d'autant plus facilement que les sujets sont proches et qu'ils sont fragilisés par leur maladie. La transmission de ces infections se fait au hasard des contacts entre patients ou par le personnel soignant. Ces infections acquises à l'hôpital dans près de 5% des cas sont dites nosocomiales, du nom latin *nosocomium*, pour hôpital. Dans certains services plus exposés au risque nosocomial avec des malades plus fragilisés - en unité de soins intensifs, en réanimation, au bloc opératoire -, leur taux peut atteindre 10%. Ces infections représentent au total 2 millions de cas, avec 80 000 décès chaque année aux États-Unis ; en France 750 000 cas, avec de 7 000 à 10 000 décès, 4200 d'entre eux sans autre cause qu'une infection nosocomiale. Le développement de pathogènes multirésistants aux traitements anti-infectieux est un réel problème, propre aux structures hospitalières qui favorisent leur émergence et leur maintien. Ces pathogènes peuvent être retrouvés dans la flore des soignants à l'état de portage, favorisant la transmission aux malades à leur contact (**MADIGAN & MARTINKO, 2007**).

Les infections de la peau et des tissus mous, l'endocardite bactérienne, la pleuropulmonaire et les infections liées aux dispositifs font partie des maladies causées par les zones S. qui vont de modérées à mortelles. Ce microbe est un agent pathogène humain important non seulement parce qu'il est extrêmement infectieux et capable de causer des infections chroniques à long terme, mais aussi parce qu'il a une capacité élevée de développer une résistance aux antibiotiques anciens et nouveaux (**TONG et al., 2015 ; GIMZA & CASSAT, 2021**).

Staphylococcus aureus a un pouvoir pathogène très élevé, peut également exprimer des toxines aussi diverses que la protéine A, l'exfoliatine, la leucocidine, des entérotoxines, la toxine du syndrome du choc toxique, etc. (**HIRAMATSU, 1998 ; LOWY, 1998 ; SANCHEZ et al., 2000**). Le *Staphylococcus aureus* est responsable d'infections variées, fréquemment nosocomiales telles que les infections urinaires (44%), l'infection du site opératoire (ISO) (45%), l'infection sur cathéter, la pneumopathie infectieuse (10-30%) et l'infection cutanée (11%) (**LOIR & GAUTIER, 2010**).

Les espèces d'entérobactéries sont des bacilles aérobies mobiles à Gram négatif de la famille des entérobactéries. Le complexe *Enterobacter cloacae* (ECC) capables de produire une grande variété d'infections, les plus fréquentes sont *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*. Ils peuvent provoquer des infections opportunistes chez des patients immunodéprimés, généralement hospitalisés, ayant acquis un large éventail de mécanismes de résistance aux antibiotiques. De nombreuses souches d'*Enterobacter* produisent des ESBLs et des carbapénemases, dont VIM, OXA, metallo- β -lactamase-1 et KPC. Par ailleurs, dans ce groupe bactérien, un rôle important dans le développement de la résistance aux antibiotiques est représenté par la dépression permanente de l'*ampC* β -lactamases, qui peut être exprimée à des niveaux élevés. Ces souches sont résistantes à presque tous les médicaments antimicrobiens disponibles, sauf la tigécycline et la colistine. En outre, un rapport récent indique que *Klebsiella aerogenes*, qui est peu résistant aux médicaments, a également émergé, montrant une résistance à la colistine antibiotique de dernier recours. Pour compliquer davantage le traitement des infections bactériennes, *K. aerogenes* est capable d'héberger des sous-populations de bactéries résistantes aux colistines qui sont indétectables à l'aide des stratégies de diagnostic actuelles (BAND et al., 2016).

Les souches de *P. aeruginosa* ont des génomes allant de 5 à 7 Mbp, et bon nombre de leurs gènes conservés codent des protéines régulatrices. Cela indique que *P. aeruginosa* peut s'adapter à une variété de facteurs de stress environnementaux. En outre, en raison de la présence de pompes à efflux de résistance-nodulation-division qui séquestrent physiquement les médicaments entrants, cette bactérie a une résistance intrinsèque aux antibiotiques. De plus, *P. aeruginosa* peut également acquérir une résistance aux antibiotiques génétiquement par des mutations ou un transfert de gènes horizontaux (HWANG & YOON, 2019).

Pseudomonas aeruginosa est responsable de la majorité des infections humaines. Les affections causées peuvent être une simple infection cutanée superficielle ou des septicémies fulminantes telles que les infections de l'œil, et les oculaires qui peuvent dans un peu du temps mener à l'absence de la vision. L'infection la plus sévère acquise en communauté, est l'endocardite provenant des seringues contaminées par les usagers de drogues injectables causant la bactériémie (RAHMANI, 2015).

Escherichia coli peut donner lieu à divers types d'infections tels que les infections urinaires (pyélonéphrite aiguë chez l'enfant), septicémies et méningites, infections intestinales E.C.E.P (*E. coli* dits entéropathogènes) ou de gastro-entérite du nourrisson, *E. coli* O157 : H 7 est le sérotype le plus important pour la santé publique (BREAND et al., 1997 ; Savoye, 2011).

Les *Salmonella typhi* sont des protéobactéries anaérobies facultatives, Gram (-) appartenant à la famille des entérobactéries qui provoque la salmonellose, une infection très aigue qui se manifeste dans les 6 à 72 h suivant l'exposition et se caractérise par de : de la fièvre, des nausées, des frissons, une diarrhée, des vomissements, des crampes abdominales et des maux de tête soudains. Il s'agit d'une infection qui se transmet à l'être humain avec des aliments contaminés (principalement : volaille, porc ou bœuf haché crus ou pas assez cuits ; œufs ou produits des œufs crus ou pas assez cuits ; produits laitiers non pasteurisés, comme le lait et le fromage crus et fruits et légumes crus), de l'eau potable infectée et par les animaux (**HASNAOUI, 2022**).

La *Salmonella typhimurium* est la cause bactérienne de gastro-entérite la plus fréquente après *Campylobacter*. Aussi des locations extra-intestinales sont possibles, en particulier des méningites à *Salmonella* chez des enfants et des ostéites (**CRONBERG et al., 1988**), en cas des gastro-entérites, elles ne requièrent aucun traitement antibiotique si elles sont brèves et rapidement résolutive.

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif, des commensaux gastro-intestinaux anaérobies facultatifs capables de persister dans une gamme d'environnements stressants et hostiles. Bien que plus de 50 espèces différentes d'entérocoques aient été décrites, seules deux espèces chez l'homme provoquent la majorité des infections à entérocoques : *E. faecalis* et *E. faecium* (**MANCUSO et al., 2021**).

Enterococcus faecalis représente de nos jours le troisième pathogène hospitalier aux Etats-Unis et le 5^{ème} en France, et sont responsables d'infections urinaires ou intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites (**LEMRISS et al., 2008**).

E. faecium est considérée comme une bactérie superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) car elle est intrinsèquement résistante aux aminoglycosides comme la tobramycine, la kanamycine, la gentamicine étant capable de produire des enzymes modifiant les aminoglycosides (AME), y compris les aminosides nucléotidyltransférases (ANT), les aminosides acétyltransférases (AAC) et les aminosides phosphotransférases (APH). Dans les années 1990, en raison de l'utilisation intensive de la vancomycine, les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont apparus comme le deuxième agent pathogène nosocomial le plus courant (**RAMOS et al., 2020**).

K. pneumoniae est un membre de la famille des entérobactéries, bacilles Gram négatif, couramment encapsulés. *K. pneumoniae* peut causer différents types d'infections nosocomiales, y compris les infections des voies urinaires, la pneumonie, l'abcès du foie, les infections du site chirurgical et les infections de la circulation sanguine, en particulier chez les patients

immunodéprimés (EGHBALPOOR *et al.*, 2019). *Klebsiella* est devenue très résistante aux antibiotiques par l'acquisition généralisée de gènes codant des enzymes, tels que les ESBLs et les carbapénemases. Les souches *K. pneumoniae* résistantes au carbapénem sont les entérobactéries (CRE) les plus importantes sur le plan clinique (LASKO & NICOLAU, 2020).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont nombreux et diversifiés et à cause de la propagation rapide entre les microorganismes (Cf. Tableau n°1). De ce fait, il est nécessaire de classer les antibiotiques en catégories basés sur les différents mécanismes d'action avant de passer à l'analyser des facteurs affectants la résistance à ces molécules. En résumé, les mécanismes d'action et de résistance des principaux groupes d'antibiotiques sont impliqués à l'inhibition de plusieurs processus bactériens qui sont impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire, des protéines, des acides nucléiques et l'inhibition des voies métaboliques. Notamment, la diminution de l'absorption des médicaments, l'altération de la cible des médicaments, l'inactivation des médicaments et l'activation des pompes à efflux des médicaments (MANCUSO *et al.*, 2021).

Tableau n°1 : Mode d'action et mécanismes de résistance aux antibiotiques (MANCUSO *et al.*, 2021).

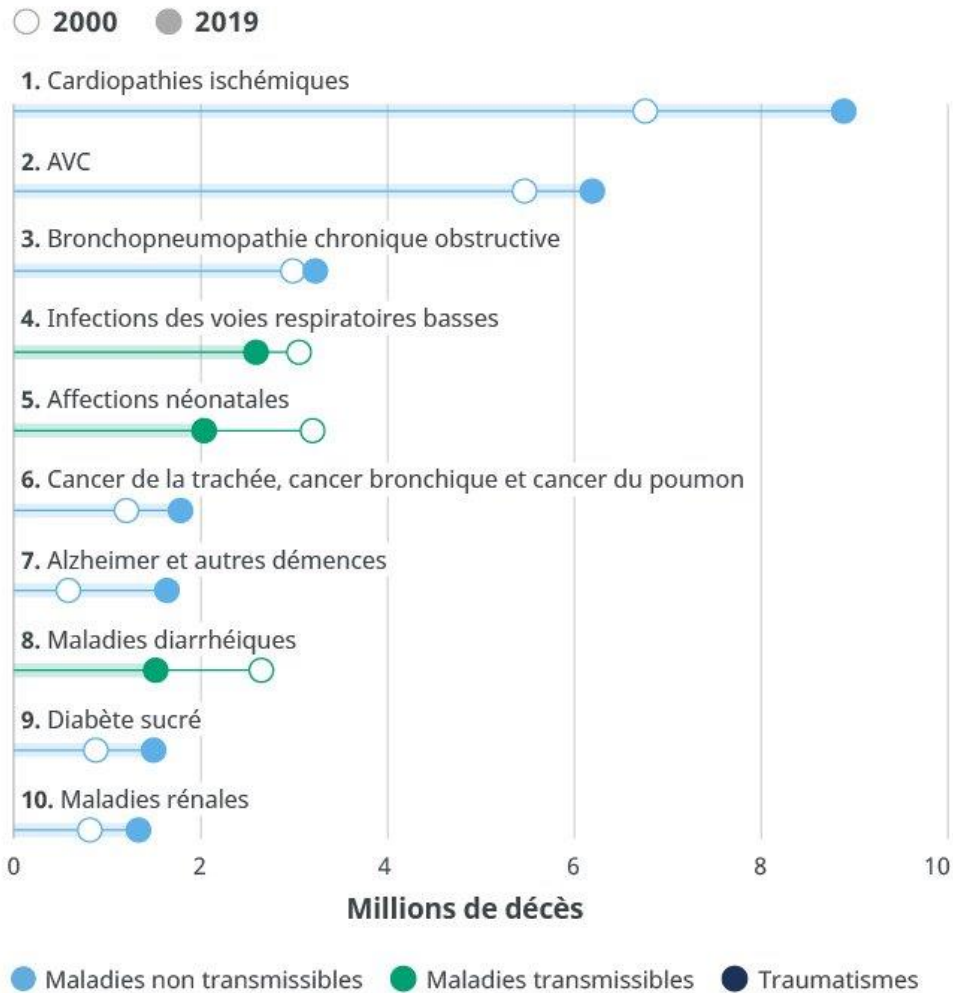
Groupes antimicrobiens	Mécanisme d'action	Mécanisme de résistance
β-Lactamines Pénicillines Céphalosporines Carbapénems	Inhibe la production de paroi cellulaire	Production de : bêta-lactamase, Pénicillinase, Céphalosporinase et Carbapénémase
Inhibiteurs de la β-lactamase	Bloquer l'activité des enzymes β-lactamases	Bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)
Aminoglycosides Chloramphénicol Macrolides Tétracyclines	Inhibe l'assemblage des ribosomes en se liant aux bactéries 30S ou 50S (inhibe la synthèse des protéines)	Multifactoriel (modification enzymatique, modification du site cible et pompes d'efflux)
Fluoroquinolone	Inhiber la réplication de l'ADN	Multifactoriel (mutations géniques au site cible, pompes à efflux et enzyme modificatrice)
Sulfamides et triméthoprim	Inhiber le métabolisme de l'acide folique	Diffusion horizontale de gènes de résistance, médiée par des transposons et des plasmides, exprimant des variants insensibles aux médicaments des enzymes cibles.

Les agents pathogènes ESKAPE représentent des bactéries mortelles avec des propriétés multirésistantes à croissance rapide. Bien que ces bactéries soient génétiquement différentes, les stratégies de résistance qui sous-tendent l'émergence et la persistance de ces agents pathogènes sont largement partagées entre elles, notamment la diminution de l'absorption des médicaments, l'altération de la cible des médicaments, l'inactivation des médicaments et l'activation des pompes à efflux des médicaments. Pour limiter la propagation des agents pathogènes ESKAPE et la résistance aux antibiotiques de manière plus générale, il est devenu impératif d'être plus prudent dans la surveillance et la mise en œuvre de la gestion des antimicrobiens en santé humaine et chez les animaux destinés à l'alimentation. La mise en œuvre de ces programmes ainsi que le développement de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles approches (par exemple l'inhibition de la formation de biofilms et la thérapie bactériophage) sont probablement le seul moyen de ralentir la propagation des souches multirésistantes dans le monde (**MANCUSO et al., 2021**).

Récemment, en 2019, l'OMS a publié un article des statistiques comme montre la figure n°1, intitulé les 10 principales causes de mortalité ont été responsables de 55 % des 55.4 millions de décès survenus dans le monde. On a remarqué entre ces causes de mortalité qu'il y a les maladies infectieuses notamment, bronchopneumopathie chronique obstructive, infections des voies respiratoires basses, état septique et infections néonatales.

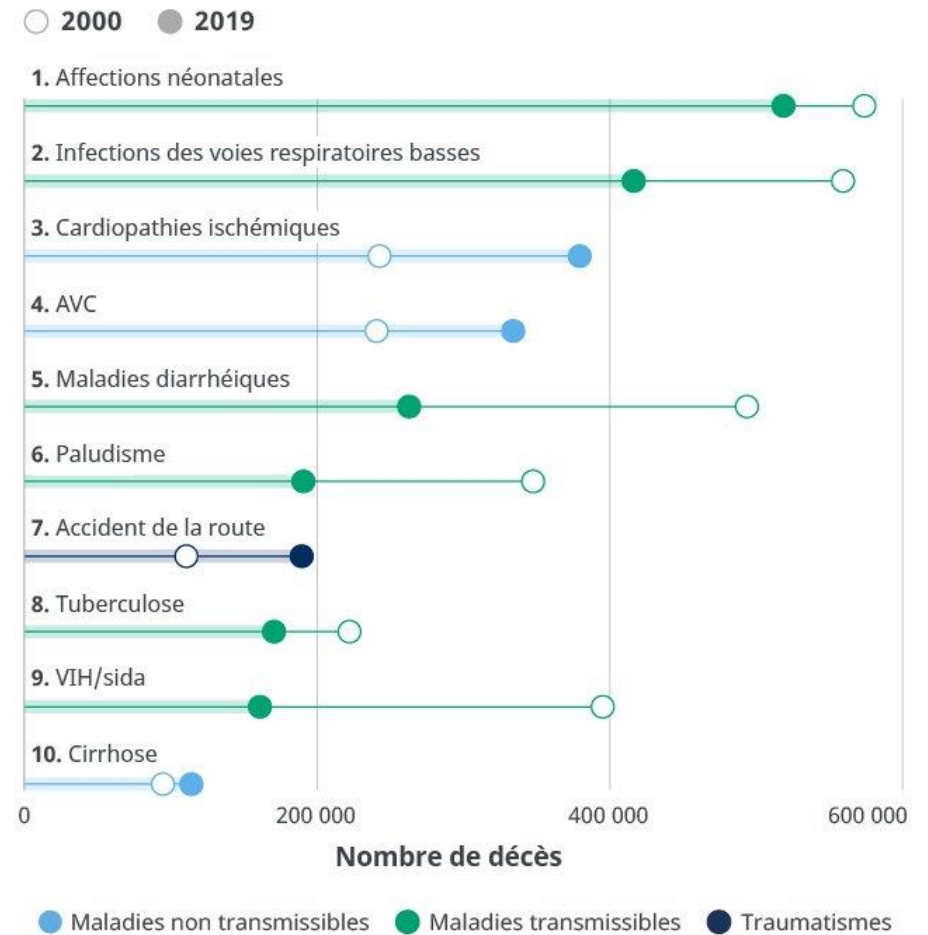
Cet article a conclu que les causes de décès peuvent être regroupées en trois catégories : maladies transmissibles (maladies infectieuses et parasitaires, affections maternelles, périnatales et nutritionnelles), les maladies non transmissibles (chroniques), et les traumatismes (**OMS, 2020**).

Les principales causes de mortalité dans le monde



Source : Estimations sanitaires mondiales de l'OMS.

Les principales causes de mortalité dans les pays à faible revenu



Source : Estimations sanitaires mondiales de l'OMS. Note : classification des pays en fonction de leur revenu établie par la Banque mondiale pour 2020.

Figure n°1 : Principales causes de mortalité dans le monde (OMS, 2020).

II. Agents phytopathogènes

II.1. Bactéries phytophages

Quel que soit les moyens de lutte actuellement utilisés, les maladies qui touchent les plantes entraînent toujours des dégâts considérables de production qui varient selon le type de culture, l'intensité et le type de lutte utilisé. On estime que 10% de la production potentielle mondiale est perdue à cause des maladies de plantes. Ces maladies peuvent affecter les produits après leurs récoltes ou encoure diminuer leur qualité et donc leur valeur ajoutée. On estime que dans certains cas les pertes après récolte s'élèvent jusqu'à 40% de la production potentielle. Transports, traitements, stockages, distribution, consommateurs autant d'étapes où la maladie peut survenir (CORBAZ, 1990).

Les espèces de bactéries phytopathogènes (Cf. Figure n°2) sont sous-divisées en pathovar. Le pathovar est l'entité montrant une spécificité parasitaire vis-à-vis d'une espèce particulière. L'espèce *Xanthomonas translucens*, par exemple, présente de très nombreux pathovars qui s'attaquent aux céréales et graminées. On notera *Xanthomonas translucens* pv *undulosa*, *Xanthomonas translucens* pv *cerealis* et *Xanthomonas translucens* pv *graminis* (CORBAZ, 1990).

Les principaux genres des bactéries phytophages sont les suivants :

1. *Pseudomonas* : bâtonnets droits, avec ou sans flagelle ; dotés le plus souvent d'un pigment jaune fluorescent (*Pseudomonas tabaci* agent du feu sauvage du tabac) ;
2. *Xanthomonas* : bâtonnets avec flagelle (*Xanthomonas campestris* qui provoque la maladie des nervures noires du chou) ;
3. *Erwinia* : bâtonnets mobiles car dotés de plusieurs flagelles (*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien sur poirier, pommier et autres rosacées) ;
4. *Corynebacterium* : bâtonnets droits ou recourbés, immobiles, sans flagelle (*Corynebacterium michiganense* [syn. *Clavibacter michiganensis*] causant le flétrissement bactérien de la tomate) ;
5. *Agrobacterium* : bâtonnets mobiles, avec le plus souvent un flagelle (*Agrobacterium tumefaciens* l'agent du « Crown gall » ou broussin, tumeurs sur tige ou racine) ;
6. *Streptomyces* : genre particulier car formant un pseudomycélium, autrefois classé parmi les champignons-spoires en chaîne, sans flagelle (*Sepiomyces scabies*, agent de lege commune de la pomme de terre).

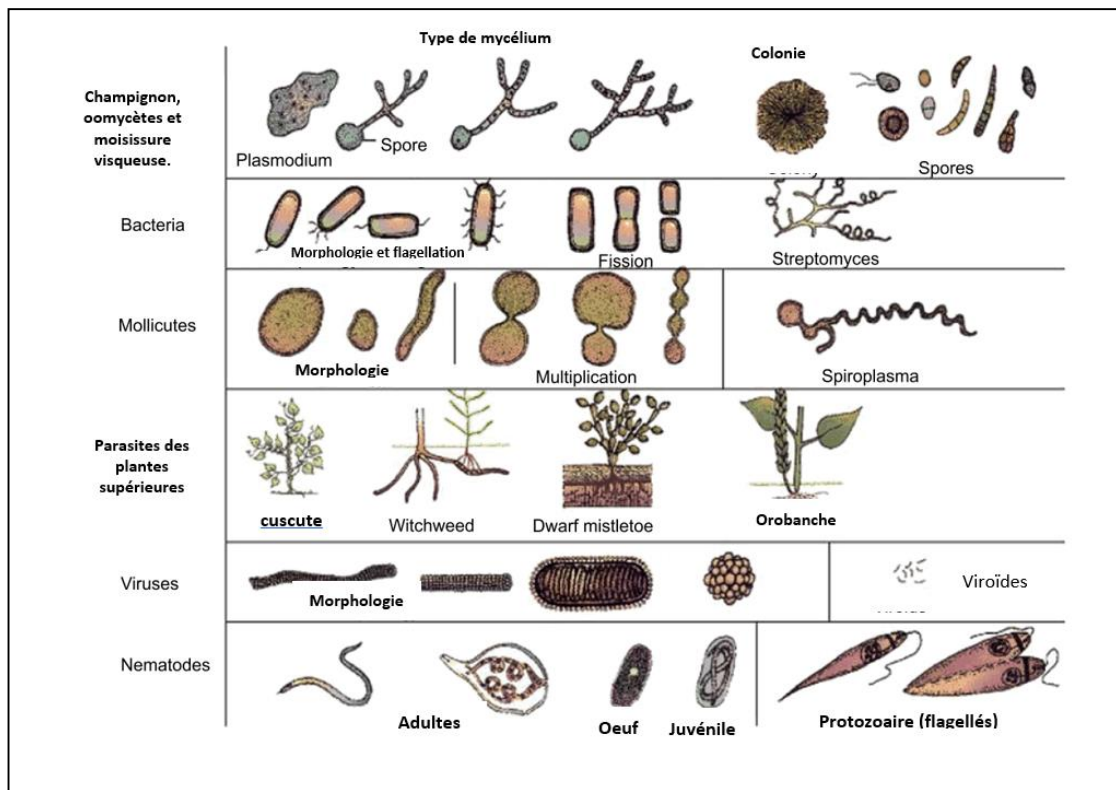


Figure n°2 : Morphologie et multiplication de certains groupes de phytopathogènes (GUEST, 2017).

II.2. Champignons phytophages

Le royaume fongique est vaste, couvrant environ 1.5 à 5 millions d'espèces diverses telles que les levures unicellulaires, les champignons filamenteux, les champignons, les lichens et les agents pathogènes végétaux et animaux. Toutes les espèces fongiques étaient traditionnellement regroupées sous quatre phylums, y compris les champignons basaux (*Chytridiomycota*, *Zygomycota*) et la lignée monophylétique plus récemment dérivée, le dikarya (*Ascomycota*, *Basidiomycota*). Le projet d'arbre de vie fongique a révélé que les lignées basales sont polyphylétiques et qu'il existe donc jusqu'à huit à dix phylums fongiques. Les champignons qui infectent les vertébrés se trouvent dans toutes les principales lignées, et la virulence est manifestée plusieurs fois indépendamment. Un développement récent qui donne à réfléchir concerne l'espèce et il y a donc jusqu'à huit à dix phylums fongiques. La génomique révolutionne notre vision du règne fongique et les séquences génomiques des pathogènes zygomycètes (*Rhizopus*, *Mucor*), des champignons cutanés (dermatophytes, *Malassezia*) et du *Candida* clade d'espèces pathogènes promettent de fournir des informations sur les origines de la virulence (HEITMAN, 2011).

Le genre *Fusarium* compte de nombreuses espèces cosmopolites, peut coloniser l'eau, l'air et le sol dans un éventail de milieux. Elles parasitent les plantes et infectent les parties aériennes et souterraines. Ces espèces sont fréquentes et responsables de la totalité des nécroses racinaires.

Le Bayoud est une maladie causée par un parasite qui a été isolé pour la première fois en 1921 et identifié en 1934 par **MALENÇON**. Il s'agit d'un champignon imparfait, spécifiquement FOA du palmier dattier (Cf. Planche n°1), forme spécialisée du genre *F. oxysporum* est très fréquente retrouvée dans les sols de tous les climats. Dans des conditions naturelles, les racines de certaines plantes (henné, luzerne, orge) cultivées en association avec des arbres dattiers peuvent abriter le pathogène sans présenter de symptômes extérieurs. Ces plantes sont réputées porteuses saines (**BENLARBI, 2019**).

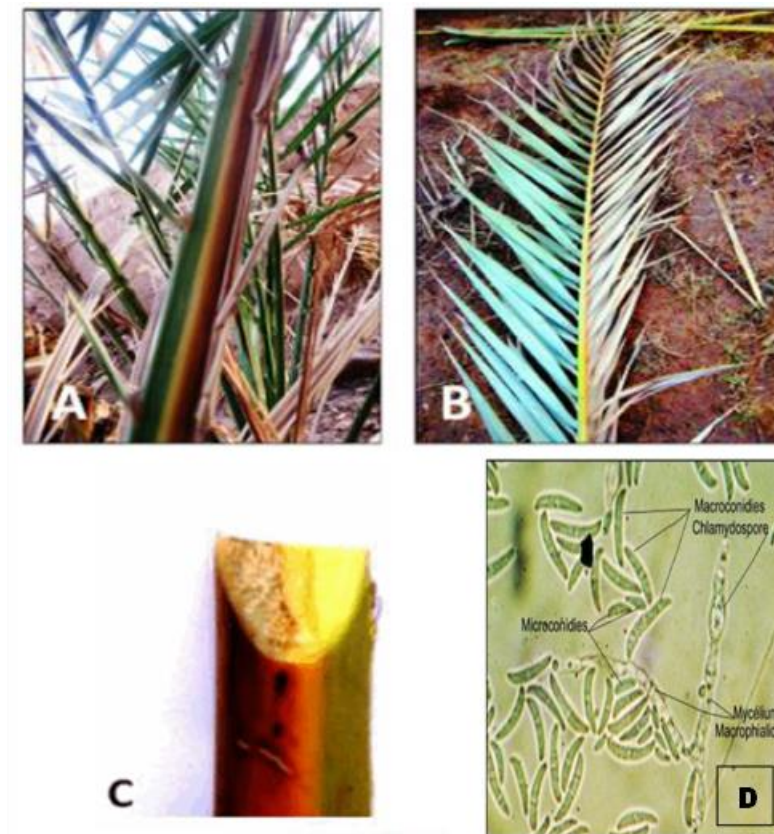



Planche n°1 : Symptômes externes du Bayoud (BENLARBI, 2009).

(A) et (B) début du dessèchement et blanchiment unilatéral d'une palme (début de l'aspect typique plume mouillée) ; (C) symptômes internes : coupe transversale d'un rachis, le brunissement et dessèchement des vaisseaux ; (D) organisation morphologique du FOA : aspects microscopiques des différents types de spores rencontrés chez le FOA.


Le palmier dattier, comme toute espèce végétale, est sous la menace de divers ravageurs et maladies parasitaires, fongiques, bactériennes, à mycoplasmes et non parasitaires, mais la maladie connue sous le nom de Bayoud, trachéomyose due à un champignon appartenant à l'espèce *Fusarium oxysporum* provoquant un dépérissement irréversible du palmier dattier et, par conséquent, des dégâts considérables et définitifs. Le Bayoud sans conteste constitue la maladie la plus grave du palmier dattier. Selon la littérature la vallée du Draâ, au Maroc, et avant 1870 c'était l'histoire d'apparition de cette maladie, puis s'est propagé vers l'ouest pour atteindre Fom El Hassan, en 1960. Alors vers l'est, le Bayoud a été plus spectaculaire progresser dès 1898, la maladie fut signalée dans les palmeraies de Figuig, au Maroc, et Beni Ounif, en Algérie (BENLARBI, 2019). On estime qu'elle a détruit dans l'Algérie et le Maroc plus de douze millions de palmiers dattier (FERNANDEZ et al., 1995).

A titre d'exemple, les *Fusarium* ont occasionnés 2.7 milliards de dollars de perte en production de blé dans les états du Nord et du Centre des Etats-Unis entre 1998 et 2002 (NGANJE et al., 2002). En zone tropicale, les maladies causées par des espèces du genre *Fusarium* sont également nombreuses et provoquent des pertes conséquentes sur des cultures qui revêtent un rôle économique central. Il s'agit de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sur le bananier (PLOETZ, 2006 ; KRA et al., 2011), *Fusarium xylarioides* sur le caféier (GEISER et al., 2005 ; RUTHERFORD, 2006), *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* sur le cotonnier (BENNETT et al., 2011), *Fusarium subglutinans* sur l'ananas (BORRAS et al., 2001), *Fusarium verticillioides* sur la canne à sucre (ABBAS et al., 2012).

Les *Aspergillus* vivent en saprophyte dans le sol précisément au niveau de la rhizosphère, en surface du sol, sur les végétaux en voie de décomposition, sur les fleurs, les aiguilles de conifères, les grains moisissés, les foin, dans le terreau des plantes, les fientes de pigeon, de volailles. Les spores aspergillaires sont disséminées dans l'atmosphère à partir de ces milieux et peuvent pénétrer d'air dans les habitats. Cette moisissure est peu exigeante puisqu'elle peut se développer dans des milieux très pauvres, dans l'eau, mais aussi dans des conditions de sécheresse extrême. Le genre *Aspergillus* renferme plus de 300 espèces dont seulement 5 ou 6 sont reconnues impliquées en pathologie humaine et vétérinaire. Ces espèces pathogènes sont thermotolérantes, supportant des températures allant de 12 à 70°C. Leur durée de vie est sans doute longue, puisqu'un même génotype peut rester présent dans l'environnement de 6 mois à 1 an (ESSAMKAOUI, 2012).



Chapitre II
Biodiversité et écologie microbienne
d'un écosystème



CHAPITRE II

BIODIVERSITE ET ECOLOGIE MICROBIENNE D'UN ECOSYSTEME

L'existence d'une pluralité d'espèces dans les écosystèmes, identifiés en tant que biodiversité, est devenue un thème de recherche national et international majeur depuis la publication de l'ouvrage de **WILSON** en (1988). Le terme "biodiversité" a ensuite été interprété différemment, par exemple selon **GAST et al.** (1991) il s'agit de la variété, de la répartition et de la structure des communautés animales et végétales, y compris toutes les phases démographiques, disposées dans l'espace et le temps. Par ailleurs, **WILCOX** (1984) y ajoutait la notion de diversité génétique. Actuellement ce mot est utilisé largement, les écologistes désignent par ce mot l'ensemble des organismes d'un biotope ou des fonctions qu'ils exercent, cependant, chez les évolutionnistes il désignent l'ensemble des membres d'un clade avec leurs variations, parallèlement les biologistes moléculaires qui étudient les variations d'une enzyme pour mieux comprendre les motifs importants pour une fonction biologique ou pour la structure d'une protéine ou d'un métabolite, par les généticiens des populations qui mesure le taux d'échange génétique ou de variété d'un taxon (**BERTRAND et al.**, 2015).

I. Difficultés rencontrées pour l'étude de la biodiversité microbienne

Pour ce qui est de la biodiversité microbienne, sa caractérisation est confrontée à différents problèmes qui sont regroupés en trois grands points :

- ✓ La question du type de biodiversité à viser : la diversité mondiale des taxons (bactérien, fongique, etc.), la diversité au sein des groupes fonctionnels et la diversité des groupes fonctionnels.
- ✓ La problématique de la représentativité de l'échantillon qui sera utilisé. On estime que la terre compte approximativement 10^{30} procaryotes. Un gramme de terre peut renfermer de 10^4 à 10^5 taxons différents.
- ✓ La difficulté de faire pousser la plupart des microorganismes, ce qui limite notre capacité à comprendre leur diversité au moyen de cette approche.

Ces problèmes chevauchent les questions soulevées par les approches et les critères permettant de caractériser les activités microbiennes réalisées par des consortiums ou d'autres ensembles complexes d'organismes complémentaires. Malgré cette complexité et ces défis, les

études sur la diversité microbienne augmentent rapidement pour diverses raisons (**BERTRAND et al., 2015**).

I.1. Diversité microbienne dans les grottes (cavernes)

Les champignons sont présents dans pratiquement tous les milieux du monde et on les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes car ils ont développé des adaptations très diverses. Les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont les plus proéminents parmi tous les échantillons. D'après leur physiologie, les champignons peuvent, à la différence d'autres plantes, croître dans l'obscurité complète (caverne ou grotte). Ils peuvent également vivre à une profondeur de 3200 mètres au sol. Des prélèvements d'échantillons de sol de trois grottes (Ghar Sokhrane, Ghar Ouled Djaâdi et Ghar Beni Aâd) à Ain Fezza en Algérie, ont été abouti à l'isolement des champignons ; 151 souches appartenant au genre *Penicillium* dont 38 présentent une activité contre les bactéries pathogènes notamment *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi que d'autres travaux dans la région de Tlemcen montrent qu'un isolement des actinomycètes et des moisissures producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte située à Tagema (**BELYAGOUBI et al., 2018**).

Les *Streptomyces* sp. GLD25 isolés de la grotte de Gueldamen ont le potentiel de produire des composés antimicrobiens et antioxydants avec d'importantes applications biotechnologiques et médicales (**DJEBBAH et al., 2021 ; DJEBBAH et al., 2022 ; BELYAGOUBI et al., 2018**).

Une synthèse sur les champignons dans les caves et les mines répertorie 518 genres. Très souvent, les champignons sont des parasites ou des agents de décomposition, mais ils contribuent aussi à la formation de concrétions, y compris les dépôts secondaires de carbonate de calcium. De nombreuses espèces de champignons prolifèrent de façon appropriée lorsqu'il existe une source de carbone. Selon **MIN (1988)**, on trouve souvent des débris organiques dans les cavernes. *Aspergillus*, *Penicillium* et *Mucor* couvrent rapidement ces débris dans les grottes. Le mouvement et la propagation des spores fongiques, qui proviennent principalement de l'extérieur, sont favorisés par les flux d'air. Les taxons fongiques trouvés dans les grottes, en fait, sont communs dans les habitats non souterrains. *Ochroconis anomala* et *Ochroconis lascauxensis*, tous deux isolés de la grotte de Lascaux, sont des exemples de champignons qui l'ont isolé uniquement dans les grottes (**ALONSO, 2018**).

Les taxons bactériens qui sont abondants et plus fréquemment habitants dans les grottes sont les *Nitrospirae*, les Bactéroïdes, les Firmicutes, les Actinobactéries, les Protéobactéries et Actinobactéries. Les Protéobactéries ce sont un groupe très large de point de vue taxonomique car ils sont capables de dégrader une large diversité des composés organiques, de ce fait ils sont réussis à colonisée les grottes. Cependant, les Protéobactéries représentent la majorité des taxons trouvés

dans la grotte d'Altamira et dans la grotte de Lascaux qui sont des grottes anthropisées, et dans la grotte de Jinjia (Chine) non anthropisée. Les *Nitrospirae* sont encore peu étudiée à ce jour. Doté d'une capacité métabolique diverses. Elles sont aérobies et chimiolithoautotrophes obligatoires. Elles oxydent le fer et le nitrate pour tirer leur énergie de croissant, aussi elles ont la capacité de réduisent le sulfate en anaérobiose. Les *Nitrospirae* sont fréquemment existé dans les grottes, comme dans la grotte de Su Bentu en Sardaigne et celle de Lechuguilla (ALONSO, 2018).

Les archées sont leurs existences dans les grottes est variable en fonction de chaque étude. Dans la Wind Cave (Dakota du sud), les *Crenarchaeota* sont dominants alors que les *Euryarchaeota* sont minoritaires, les *Thaumarchaeota* représentent 45% des séquences retrouvés dans la grotte Weebubbie. Dans la grotte de Lechuguilla, des *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* ont été identifiées. La littérature sur les archées reste toujours maigre, bien que les archées soient de plus en plus étudiées (ALONSO, 2018).

Les Bactéroïdes sont des aérobies ou anaérobies facultatifs, et typiquement chimoorganotrophes. Elles contiennent des bactéries mésophiles, psychrophiles et thermophiles. Ses fonctions dans les grottes est assez limité, mais elles jouent un rôle remarquable dans les processus de fermentation et de circulation d'éléments métalliques. Elles représentent 8% et 20% de la composition des biofilms de grottes en Suisse et celle de Carter Saltpenter respectivement. Les Firmicutes sont hétérotrophes et chimiolithotrophes. Quelques représentants sont photohétérotrophes anaérobies. Les Firmicutes réduisent et d'occident le soufre. Ces bactéries prédominent dans les communautés bactériennes de la grotte des Chauves-souris (19.5% des séquences de gènes de l'ARNr16S) ou des grottes de Kartchner (52 % des isolats) (ALONSO, 2018).

Les actinobactéries sont couramment utilisées dans les procédés de biominéralisation car elles produisent une grande variété de cristaux. Parmi les bactéries des grottes, elles sont les plus courantes, 65 % de ce groupe ont été isolées dans une grotte du nord de l'Inde et 80 % dans une grotte du Nouveau-Mexique, ce qui en fait le deuxième (22 % dans la grotte de Llonin) ou le troisième (chez Tito Bustillo) phylum. Les acidobactéries sont une catégorie diversifiée de bactéries, tout comme les protéobactéries. Les acidobactéries des grottes n'ont pas encore été isolées ou cultivées en laboratoire. Ils peuvent être liés à des micro-organismes phototrophes trouvés près des lampes de grotte. Des acidobactéries ont été découvertes dans les grottes d'Altamira et de Su Bentu (ALONSO, 2018).

1.2. Diversité microbienne des endophytes

DE BARY a créé le mot endophyte (Gr. endon, à l'intérieur ; phyton, plante) en 1866. Un endophyte est un microbe, comme un champignon ou une bactérie, qui passe tout ou partie de son cycle de vie dans les tissus sains d'une plante vivante, habituellement sans causer de signes de maladie. Les endophytes pénètrent principalement dans les tissus végétaux par la zone racinaire, mais des parties de plantes en surface comme les cotylédons, les tiges et les fleurs peuvent également être utilisées pour l'entrée. Les bactéries pénètrent dans les tissus par les radicaux de germination, les racines secondaires, les stomates et les sites endommagés. Les endophytes dans les plantes peuvent rester limités au point d'entrée ou se propager à travers la plante en résidant dans les cellules, les interstices intercellulaires, ou le système vasculaire. Ils peuvent également se répandre dans toute la plante. Les bactéries endophytes se trouvent dans les nodules, les tiges, les feuilles, les racines, les graines, les fruits, les ovules et les tubercules (**ANJUM & CHANDRA, 2015**).

Ces microbes endophytes qui vivent dans les tissus de plantes vivantes sont maintenant bien connus comme sources prometteuses, sous-explorées et importantes de nouveaux produits naturels pour l'agriculture, la médecine et l'industrie. L'utilité des endophytes en tant que source de composés bioactifs a été établie au fil du temps, car de nombreux endophytes ont été exposés à de nouveaux métabolites bioactifs tels que des produits chimiques antibactériens, antifongiques, antiviraux, antitumoraux, antioxydants, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, ainsi que bien d'autres (**SUMITA, 2019**).

Les plantes forment des associations avec des microbes et les deux partenaires interagissent simultanément avec l'environnement comme un holobiome plutôt qu'un seul organisme vivant. Dans la nature, ces interactions multitrophiques entre les plantes et leurs acteurs microbiens, représentés principalement par les archées, les bactéries et les champignons, sont la règle. Ces microbes symbiotiques augmentent une couche supplémentaire de fonctions complémentaires complexes qui augmentent souvent la plasticité et l'efficacité de l'hôte, en particulier dans des conditions difficiles (**SUMITA, 2019**).

Parmi les nombreux écosystèmes de la planète, ceux qui ont la biodiversité la plus élevée semblent aussi avoir le plus d'endophytes avec la plus grande quantité et la plus grande diversité de microorganismes. Les environnements terrestres les plus diversifiés sur le plan écologique sont les forêts tropicales et tempérées. Bien que les sites les plus menacés ne couvrent que 1.44 % de la surface terrestre, ils abritent plus de 60 % de la biodiversité terrestre mondiale. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que les endroits où la plante est endémique contiennent des endophytes particuliers qui se sont développés avec les espèces végétales endémiques.

Actinomycète *Pseudonocardia* sp. YIM 63111 est une endophyte isolée à partir de la surface stérilisée de tissu d'une plante médicinale *Artemisia annua* (SUMITA, 2019), *Pezizula cinnamomea*, un champignon couramment associé aux espèces de feuillus en Europe. Il a été isolé en tant qu'endophyte de *Tripterigeum wilfordii*, une plante médicinale originaire d'Eurasie (STROBEL & DAISY, 2003). *Pseudomonas viridiflava* fait partie d'un groupe de bactéries fluorescentes associées aux plantes. Il est généralement associé aux feuilles de nombreuses espèces de graminées et se situe sur et dans les tissus (MILLER et al., 1998). *Pestalotiopsis microspora* est un endophyte commun de la forêt tropicale isolé d'une plante appelée *Taxus wallichiana* (STROBEL et al., 1996). *Pestalotiopsis microspora* a également été isolée de l'arbre en voie de disparition *Torreya taxifolia* et produit plusieurs composés qui ont une activité antifongique (LEE et al., 1995). Un endophyte *Fusarium* sp. de la plante *Selaginella palleascens*, collectée dans la zone de conservation de Guanacaste au Costa Rica, a été testée pour son activité antifongique (BRADY & CLARDY, 2000.).

1.3. Diversité des microorganismes des milieux extrêmes

Le terme « extrémophiles » ne désigne pas la résistance aux conditions extrêmes, il signifie que les cellules se développent et fonctionnent de façon optimale dans ces exigences (ALBER et al., 2001). D'ailleurs, les microbiologistes utilisent le terme « extrémophile » pour décrire les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans lesquelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister, tandis que certains chercheurs proposent le terme « extrêmophile » pour décrire les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne croient pas dans ces environnements (VENTOSA et al., 2015).

Ainsi que, le terme extrémophile est le plus souvent employé pour rapporter des microorganismes procaryotes, puisque la majorité appartient au domaine des *Archaea*. Le règne *Bacteria*, et aussi présent dans ces milieux extrêmes. *Thermus aquaticus* fut la première bactérie extrémophile isolée à partir des sources d'eau chaude du Parc national de Yellowstone aux Etats-Unis (MADIGAN & MARTINKO, 2007).

Un large éventail de groupes microorganismes, y compris de nombreux nouveaux taxons, phylogénétiquement enracinés, survivent et prospèrent dans des environnements extrêmes. Ces écosystèmes uniques et moins complexes offrent une occasion formidable d'étudier les communautés microbiennes naturelles. Les enquêtes sur les gènes marqueurs ont résolu les modèles et les facteurs écologiques de ces assemblages extrémophiles, révélant une vaste diversité microbienne non cultivée et la prédominance souvent des archées dans les conditions les plus extrêmes. De nouvelles études sur l'omics ont révélé des liens entre la fonction communautaire et les variables environnementales, et ont permis la découverte et la caractérisation génomique de nouvelles lignées importantes qui

élargissent considérablement la diversité microbienne et modifient la structure de l'arbre de vie. Ces travaux ont bien évidemment amélioré notre compréhension de la diversité, de l'écologie et de l'évolution des micro-organismes habitants les milieux extrêmes dans la Terre, et ont simplifié l'exploration du microbiote et des mécanismes dans les écosystèmes les plus complexes (SHU & HUANG, 2022).

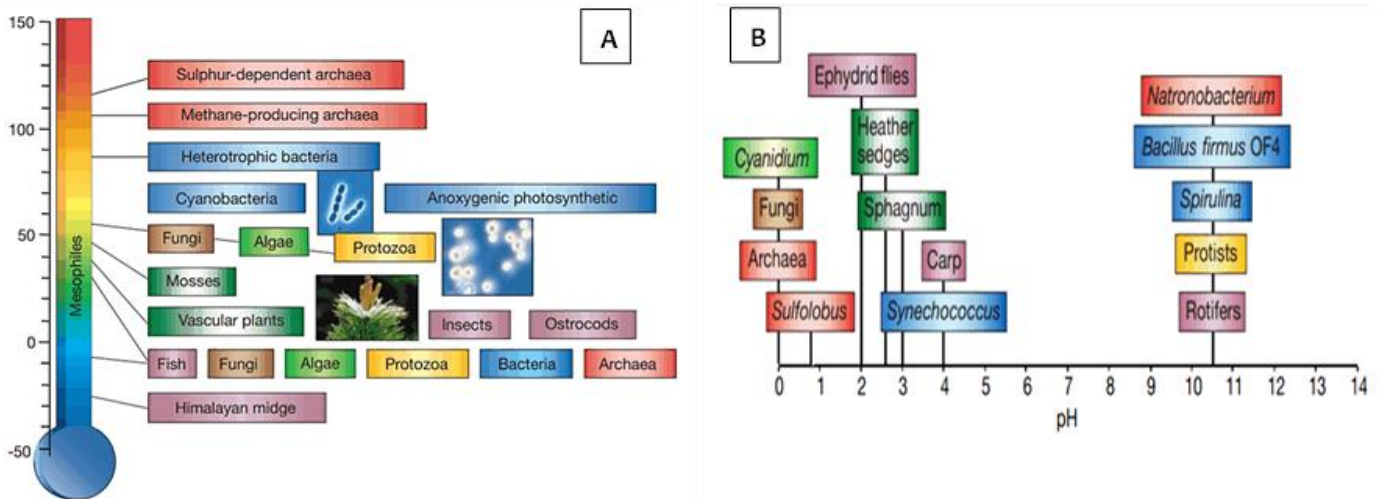


Figure n°3 : **A)** Limites de température pour la vie. Les valeurs de la température la plus basse pour chaque taxon principal est indiquée. Les *Archaea* sont en rouge, les bactéries en bleu, les algues en vert clair, champignons en brun, protozoaires en jaune, plantes en vert foncé et des animaux en pourpre. **B)** Limites de pH pour la vie. Exemples de pH limites connues pour la vie sont montré. *Archaea* sont en rouge, les bactéries en bleu, les algues en vert clair, protistes assortis en jaune, champignons en brun, plantes en vert foncé et les animaux en pourpre (OARGA, 2009).

Le progrès remarquable des méthodes et technique en biologie moléculaire a permis l'isolement de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes à partir de divers environnements salins et hypersalins, elles sont affiliées dans les cinq (5) *phyla* : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (OREN, 2002).

1.3.1. Environnements hypersalins la sebkha

D'après le dictionnaire de géologie (GARREAU, 1991) : Une sebkra du mot arabe sebkha, que l'on trouve en pays désertique ou presque est une dépression temporairement occupée par un lac, en général salé et où se déposent des évaporites.

Les eaux proviennent du ruissellement, mais aussi des nappes phréatiques, les environnements hypersalins sont nombreux et très répandus sur notre planète dont le sol et l'eau sont les deux types majeurs d'environnements salés biologiquement importants, où le facteur sel agit sur

les communautés microbiennes halophiles. Selon leur composition ionique, il existe deux types de milieux hypersalins déférents ; les environnements thalassohalins qui peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou bien d'origine naturelle, comme les sebkhas ou les lagons (**MENASRIA, 2020**).

En raison des effets combinés de diverses conditions environnementales, telles que des concentrations élevées de sel, des températures et un pH élevé, et la faible disponibilité des nutriments et de l'oxygène, ces écosystèmes sont des habitats graves dont la diversité microbienne est restreinte. La plupart des recherches environnementales ont porté sur les écosystèmes aquatiques représentés par les lacs salins et les salines solaires, qui étaient destinés à la production commerciale de sel. Les sols salins, les farines salées et autres articles, les peaux de saumure d'eau profonde et les étangs sont des exemples d'habitats supplémentaires (**VENTOSA et al., 2015**).

Les halophiles sont classiquement classés en fonction de leur croissance optimale dans différentes concentrations de sel. Les deux principaux groupes sont les halophiles extrêmes (croissance optimale supérieure à 15% de NaCl) et les halophiles modérés (croissance optimale de 3 à 15% de NaCl). En revanche, les halophiles légers sont capables de se développer de manière optimale dans des milieux contenant 1 à 3 % de NaCl (**VENTOSA et al., 2015**).

Généralement, la sebkha est allongée sur quelques dizaines à centaines mètres avec une superficie plane en apparence, caractérisée par un tapis de cristallisation saline. Une végétation halophile de densité et de largeur variable lui succède juste à la périphérie. Les revêtements salins pendant la saison sèche sont remarquables, les efflorescences salines recouvrent alors de vastes étendues, elles constituent en un semis de petits cristaux d'une éclatante blancheur, les formes cubiques du chlorure du sodium y dominant, les cristaux peuvent former un voile à peu près continu de fine poussière. Lorsqu'on gratte ces pellicules salines, on découvre un horizon de structure granuleuse, épais de quelques centimètres formés de petits agrégats de sels emprisonnant des particules argileuses (**COQUE, 1962 ; BOUHATA, 2007**).

L'origine des sels présents dans le sol de sebkha est due au processus de salinisation. Ce processus permet l'accumulation de sels à la surface de sol et dans les zones racinaires qui occasionne des effets nocifs sur les végétaux et sur le sol, dont il s'en suit une diminution des rendements, plus précisément la stérilisation de sol (**MERMOUD, 2006**). Pour que le sol considéré comme salin, il doit contenir une concentration en sels soluble supérieure à 0.2% (p/v), et la conductivité électrique de l'extrait saturé de sol excède 4.000 microsiemens par centimètre ($\mu S/cm$) (**CALVET, 2003**). La conductivité électrique (CE) est l'index le plus utilisé pour évaluer la salinité d'un sol. Elle est basée sur le concept de la quantité de courant électrique portée par une solution salée dans les conditions

standards. Cette CE augmente au fur et à mesure que la concentration en sel de la solution augmente. Elle est exprimée en milliohms par centimètre ($m\Omega/cm$) ou millisiemens par centimètre (mS/cm) dans des unités du Système International (SI) (LANDON & MANUAL, 1991).

Dans les sols salins, on trouve un excès de sels solubles tels que : le potassium, le magnésium, le calcium, le chlorure, le sulfate, le carbonate, le bicarbonate et le sodium. Ces sels sont de l'origine de deux types de salinité : le type primaire induit par des facteurs environnementaux et le type secondaire provoqué par des interventions humaines (BERRADA, 2012).

- ✓ **Type primaire ou naturel** : due aux sels se formant lors de l'altération des roches ou à des apports naturels externes.
- ✓ **Type secondaire** : induit par l'activité humaine liée fréquemment à des pratiques agricoles inappropriées (MERMOUD, 2006).

De plus, la concentration en ions solubles (particulièrement ion de sodium) supérieures à 0.15M entraîne des phénomènes hyperosmotiques avec une sortie de l'eau en dehors des cellules microbiennes qui se rétrécissent ou plasmolysent. Les micro-organismes sous l'effet d'environnements hypertoniques meurent ou restent dormants excepté les micro-organismes halotolérants et halophiles qui peuvent résister au sel. Le devenir de cette charge bactérienne est fonction des courants de la masse d'eau, de la dispersion et de la sédimentation des particules fines. Ainsi, cette charge bactérienne peut subir l'agression du milieu via les facteurs abiotiques et/ou biotiques, affectant leur croissance et même leur survie (VENTOSA et al., 2008).

En niveau des sols salins les bactéries présents sont qualifiées des bactéries halophiles. Par définition, un organisme halophile (du grec *allos*, sel et *philein*, aimer) est un organisme qui tolère ou a besoin de sel pour sa croissance. Chez les microorganismes halophiles, deux types d'halophilies sont à distinguer : l'halophilie stricte ou obligatoire et l'halophilie simple ou halotolérante (BERRADA, 2012).

Les bactéries, nécessitant moins de 1% de sel pour une croissance optimale, ne sont pas considérées comme halophiles. En 1988, KUSHNER et KAMEKURA ont réparti les micro-organismes halophiles en différentes catégories selon les gammes de concentrations en sel nécessaire à leur croissance (Cf. Tableau n°2).

Ces gammes de concentration en sel, ont été affinées et s'étendent de 3 à 10% pour les halotolérantes, 9 à 25% pour les halophiles modérés et de 22 à plus de 40% pour les halophiles extrêmes. Ainsi différents arrangements de classification ont été conçus, pour définir les microorganismes en fonction des concentrations de sel (BITTON, 2005 ; LEFEBVRE, 2005).

Tableau n°2 : Catégories des microorganismes halophiles (BERRADA, 2012)

Catégorie	NaCl (M)		NaCl (g/l)	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum
Non halophile	0 - 1.0	< 0.2	0 - 60	< 10
Faiblement halophile	0.2 - 2.0	0.2 - 0.5	10 - 115	10 - 30
Halophile modéré	0.4 - 3.5	0.5 - 2.0	25 - 200	30 - 115
Halophile extrême (Bordeline)	1.4 - 4.0	2.0 - 3.0	80 - 230	115 - 175
Halophile extrême	2.0 - 5.2	> 3.0	115 - 300	> 175
Halotolérant	0 - >1.0	< 0.2	0 - > 175	< 10
Haloversatile	0 - >175	0.2 - 0.5	0 - > 175	10 - 30

Le domaine des *Bacteria* regroupe, la plus grande diversité des halophiles (aussi bien des bactéries halophiles strictes que des halotolérantes), la plupart sont des bactéries halophiles modérées pouvant être aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif, aérobies ou anaérobies facultatifs, elles sont ubiquistes et présentes dans un grand nombre de groupes phylogénétiques (RAPPE & GIOVANNONI, 2003 ; JOHNSON *et al.*, 2007), et ont été largement étudiées par VENTOSA *et al.* Depuis 1998 (Cf. Tableaux n°3 et n°4).

Les bactéries halophiles possèdent des systèmes ou mécanismes pour s'adapter à cette salinité ; le plus souvent, il y a deux stratégies utilisées par les bactéries halophiles pour maintenir une bonne pression osmotique dans le cytoplasme : l'accumulation du KCl qui n'est pas largement utilisé au sein des différents groupes phylogénétiques et physiologiques des halophiles, ou bien la biosynthèse et/ou l'accumulation de solutés compatibles (OREN, 2002 ; SIGLIOCCOLO *et al.*, 2011).

L'accumulation du KCl intervient comme un agent osmorégulateur, il s'accumule à l'intérieur de la cellule pour empêcher la sortie de l'eau vers le compartiment extracellulaire, et même les sous unités fonctionnelle structurelle des cellules sont adaptés à des hautes concentrations (KHEMILI, 2008).

Les solutés compatibles sont de petites molécules osmolytes organiques (les sucres, les polyols, les acides aminés et leurs dérivés, les bétaines et les ectoïnes). Ils sont dits "compatibles" car n'influent pas sur la physiologie et les processus cellulaires même à des concentrations intracellulaires élevées. En plus de leur action protectrice sur la cellule entière, ces solutés ont des effets significatifs sur les biomolécules *in vitro*. Il s'agit à la stabilisation des protéines et des structures d'acides nucléiques (ROBERT, 2005).

En revanche, parmi les bactéries halophiles, certaines sont adaptées à d'autres conditions environnementales en plus de la salinité en l'occurrence les bactéries halophiles thermophiles,

psychrophiles ou alcalophiles. Plusieurs bactéries halophiles se sont avérées être halothermophiles appartenant à plusieurs genres : *Alterococcus agarolyticus* ; *Thermohalobacter berrensensis* ; *Bacillus aeolius* (SHIEH & JEAN, 1998 ; CAYOL et al., 2000 ; GUGLIANDOLO et al., 2003 ; BERRADA, 2012).

Par ailleurs, il a été montré que la température de croissance est en fonction de la concentration en sel (VENTOSA et al., 2008). Plusieurs travaux ont mis en évidence ce rapport entre sel et température chez les bactéries halophiles, à titre d'exemple nous citons le *Planococcus halophilus* qui se développe, à des concentrations en NaCl de 0.01 M à 20°C, pour une croissance à 25°C 0.5 M est exigé (NOVITSKY & KUSHNER, 1976). Ainsi BOWERS et al. (2009) met en évidence la corrélation entre la concentration de sel optimale et la température optimale de croissance chez les bactéries halophiles.

Les bactéries halophiles s'adaptent également à des conditions de pH extrême : les genres *Natronococcus* et *Natronobacterium* ont surtout été isolés des lacs natronés et sont à la fois halophiles et alcalophiles, se développant à des pH supérieurs à 9.

Tableau n°3 : Distribution mondiale des bactéries halophiles modérées à Gram négatif isolées des sols salins ou hypersalins (VENTOSA et al., 2008).

Espèces	Lieux d'isolement	Intervalle optimum de NaCl (%)	Référence
<i>Halomonas salina</i>	Saline soil located near Alicante, Spain	20-25 (5)	VALDERRAMA et al., 1991
<i>Halomonas ventosae</i>	Saline soil in Jaen, Spain	3-15 (6-9)	MARTINEZ- CANOVAS et al., 2004b
<i>Halothermotrix orenii</i>	Sediment of a Tunisian Salt Lake	4-20 (5-10)	CAYOL et al., 1994a
<i>Marinobacter excellens</i>	Sediment collected from Chazhman Bay, Sea of Japan	1-15	GORSHKOVA et al., 2003
<i>Marinobacter koreensis</i>	Sea sand in Pohang, Korea	0.5-20	KIM et al., 2006
<i>Marinobacter lipolyticus</i>	Saline soil from Cadiz, Spain	1-15 (7.5)	MARTIN et al., 2003
<i>Marinobacter sediminum</i>	Marine coastal sediment from Peter the Great Bay, Sea of Japan	0.5-18	ROMANENKO et al., 2005
<i>Natroniella acetigena</i>	Mud from the soda lake Magadi, Kenya	10-26 (12-15)	ZHILINA et al., 1996
<i>Orenia salinaria</i>	Salt ponds in salterns in Camargue, France	2-25 (5-10)	MOUNE et al., 2000
<i>Palleronia marismminoris</i>	Hypersaline soil bordering a solar saltern in Murcia, Spain	0.5-15 (5)	MARTINEZ- CHECA et al., 2005
<i>Salipiger mucosus</i>	Hypersaline soil bordering a solar saltern in Calblanche, Murcia, Spain	0.5-20 (3-6)	MARTINEZ- CANOVAS et al., 2004b

Tableau n°4 : Distribution mondiale des bactéries halophiles modérées à Gram positif isolées des sols salins ou hypersalins (VENTOSA *et al.*, 2008)

Espèces	Lieux d'isolement	Intervalle optimum de NaCl (%)	Références
<i>Actinopolyspora iraqiensis</i>	Soil sample in Iraq	5-20 (10-15)	RUAN <i>et al.</i> , 1994
<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	Soil obtained from Death Valley, CA, USA	5-30 (10-15)	YOSHIDA <i>et al.</i> , 1991
<i>Alkalibacillus haloalkaliphilus</i>	Alkaline, highly saline mud from Wadi Natrun, Egypt	5 - 20 (10)	JEON <i>et al.</i> , 2005b
<i>Alkalibacillus salilacus</i>	Soil sediment from a Salt Lake in Xinjiang province, China	5-20 (10-12)	JEON <i>et al.</i> , 2005b
<i>Bacillus krulwichia</i>	Soil from Tsukuba, Ibaraki, Japan	0 - 14	YUMUTO <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus oshimensis</i>	Soil from Ochymanbe, Ochima, Hokkaido, Japan	0 - 20 (7)	YUMUTO <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus patagoniensis</i>	Rhizosphere of the perennial shrub <i>Atriplex lampa</i> in north eastern Patagonia, Argentina	0 - 15	OLIVERA <i>et al.</i> , 2005
<i>Desulfobacter halotolerans</i>	Sediment of Great Salt Lake, Utah, USA	0.5-13 (1.2)	BRANDT & INGVOSEN, 1997
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	10	LI <i>et al.</i> , 2003a
<i>Prauserella alba</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	0-25 (10-15)	LI <i>et al.</i> , 2003c
<i>Prauserella halophila</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	5-2 (10-15)	LI <i>et al.</i> , 2003c
<i>Saccharomonospora halophila</i>	Marsh soil in Kuwait	10-30 (10)	AL-ZARBAN <i>et al.</i> , 2002b
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	5-20 (10)	LI <i>et al.</i> , 2003b
<i>Salinicoccus hispanicus</i>	Saline soil from Alicante and Cadiz, Spain	0.5-25 (10)	MARQUEZ <i>et al.</i> , 1990
<i>Sporohalobacter lortetii</i>	Dead Sea Sediment	6-12 (8.7)	OREN, 1983
<i>Streptomonospora alba</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	5-25 (10-15)	LI <i>et al.</i> , 2003d
<i>Streptomonospora salina</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	15	CUI <i>et al.</i> , 2001
<i>Tenuibacillus multivorans</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	1-20 (5-8)	REN & ZHOU, 2005
<i>Thalassobacillus devorans</i>	Saline soil in South Spain	0.5-20 (7510)	GARCIA <i>et al.</i> , 2005
<i>Virgibacillus koreensis</i>	Salt field near Tae-an- Gun on the Yellow Sea in Korea	0.5-20 (5-10)	LEE <i>et al.</i> , 2006
<i>Virgibacillus salexigens</i>	Soil from Huelva, Cadiz, sevilla and Mallorca, Spain	7-20 (8-10)	GARABITO <i>et al.</i> , 1997
<i>Filobacillus milosensis</i>	Beach sediment from Palaneochori, Bay, Milos, Greece	2-23 (8-14)	SCHLENSER <i>et al.</i> , 2001
<i>Halobacillus halophilus</i>	Salt march and saline soil	2-15 (3-5)	SPRING <i>et al.</i> , 1993 ; VENTOSA <i>et al.</i> , 1983
<i>Halobacillus karajensis</i>	Saline soil of the Karaj region, Iran	1-24 (10)	AMOOZEGAR <i>et al.</i> , 2003b
<i>Lentibacillus salarius</i>	Saline soil Xinjiang, Province, China	1-20 (12-14)	JEON <i>et al.</i> , 2005a
<i>Lentibacillus salicampi</i>	Salt field in Korea	2-23 (4-8)	YOON <i>et al.</i> , 2002
<i>Marinococcus halophilus</i>	Soil saline from Alicante and Cadiz, Spain	1-20 (15)	HO <i>et al.</i> , 1984 ; MARQUEZ <i>et al.</i> , 1992
<i>Marinococcus halotolerans</i>	Soil saline in Quinghai, north-west, china	0-25 (10)	LI <i>et al.</i> , 2005b

<i>Microbacterium halotolerans</i>	Soil sediment of Qinghai, Province, China	0-15 (5)	Li et al., 2005a
<i>Nesterenkonia halotolerans</i>	Hypersaline soil from Xinjiang, Province, China	0-25	Li et al., 2004a
<i>Nesterenkonia xinjiangensis</i>	Hypersaline soil from Xinjiang, Province, China	0-25	Li et al., 2004a
<i>Norcardiopsis baichengensis</i>	Saline sediment from Xinjiang, Province, China	0-18 (5-8)	Li et al., 2006
<i>Norcardiopsis chromatogenes</i>	Saline sediment from Xinjiang, Province, China	0-18 (5-8)	Li et al., 2006
<i>Norcardiopsis gilva</i>	Saline sediment from Xinjiang, Province, China	0-18 (5-8)	Li et al., 2006
<i>Norcardiopsis halophila</i>	Saline soil from Iraq	3-20 (5-15)	AL-TAI & RUAN, 1994
<i>Norcardiopsis halotolerans</i>	Salt march soil in Kuwait	0-15 (10)	AL-ZARBAN et al., 2002a
<i>Norcardiopsis rhodopharea</i>	Saline soil from Xinjiang, Province, China	0-18 (5-8)	Li et al., 2006
<i>Norcardiopsis rosea</i>	Saline sediment from Xinjiang, Province, China	0-18 (5-8)	Li et al., 2006
<i>Norcardiopsis salina</i>	Saline sediment from Xinjiang, Province, China	3-20 (10)	Li et al., 2004b

1.3.2. Importances des halotolérantes et les halophiles

Les bactéries vivant dans les milieux extrêmes, et en particulier les halotolérantes et les halophiles, représentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales. En effet les bactéries halotolérantes et halophiles peuvent être une nouvelle source de composés bioactifs (VENTOSA et al., 2008).

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants décrits sont des hétérotrophes aérobies, trouvés dans les trois domaines de la vie. Dans les environnements avec des concentrations en sel jusqu'à 200-250 g/l, les représentants de bactéries sont responsables de la majeure partie de l'activité hétérotrophe. Ces organismes dernièrement ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies pour exploiter les biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires. Leur utilisation est envisagée dans différents secteurs en particulier la production des enzymes (Amylases, Protéase, Xylanase, Cellulase, etc.) et la plupart d'eux produisent ou accumulent dans le cytoplasme des composés organiques de faibles poids moléculaires (solutés compatibles ou osmoprotecteurs) pour l'équilibre osmotique (AYAD, 2012).

Ainsi que la production de certains aliments fermentés traditionnels en Extrême Orient, tels que la sauce à poissons et la sauce de soja, implique l'activité d'une variété de microorganismes halophiles et/ou fortement halotolérants (AYAD, 2012). Une grande variété de solutés a trouvé des applications en biotechnologie, par exemples l'éctoïne protège également la peau des altérations

causées par les rayonnements ultraviolets d'où son incorporation dans les préparations de certaines crèmes à vocation hydratante (VAN DEN BURG, 2003).

I.4. Diversité de la flore du sol

L'ensemble des composants influence directement sur la microflore de sol. Beaucoup d'études révèlent qu'il existe une grande diversité des communautés microbiennes dans le sol tant du point de vue de la diversité taxonomique que du point de vue des fonctions. En effet, il est estimé, par exemple, qu'un gramme de sol contient environ 10^{10} à 10^{11} bactéries dont 6000 à 50000 espèces de bactéries et plus de 200 mètres d'hyphes de champignons (CURTIS et al., 2002 ; HORNER et al., 2003).

Tableau n°5 : Quelques genres bactériens isolés à partir du sol (SOBTI et al., 2015).

Microorganismes	Rôle
<i>Actinomycètes</i>	Groupe de bactéries appartenant à la flore du sol, qui jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques.
<i>Azotobacter</i>	Bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare).
<i>Pseudomonas spp.</i>	Bactérie aérobie stricte et libre dans le sol. C'est une bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines (PGPR : plant growth-promoting rhizobacteria). Elle crée un bio film adhésif et protecteur (mucilage microbien). Elle a également la capacité de solubiliser le fer.
<i>Bacillus</i>	Une des plus grosses bactéries rencontrées dans les sols. Elle est capable de produire des endospores (résiste à la sécheresse). Elle est impliquée dans le cycle du phosphore (minéralisation microbienne du phosphore organique).
<i>Azospirillum</i>	Bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare).
<i>Rhizobium</i>	Bactérie aérobie stricte qui fixe l'azote atmosphérique en association avec des plantes hôtes (légumineuses) et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare).
<i>Lactobacillus</i>	Bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui sécrète des enzymes permettant de dégrader la matière organique fraîche (lignine, cellulose,). Elle inhibe également certains germes pathogènes.

Les agents de la microflore du sol les plus fréquents sont : les algues, les champignons, les bactéries filamenteuses ou actinomycètes et les bactéries (SOBTI *et al.*, 2015). Mais parfois certains auteurs incluent également dans la microflore du sol les protozoaires et les virus.

Tableau n°6 Distribution des microorganismes en fonction de la profondeur de sol (NOUMEUR, 2008).

Organismes/g de sol ×10 ³					
Profondeur (cm)	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
3 - 8	7800	1950	2080	119	25
20 - 25	1800	379	245	50	5
35 - 40	472	98	49	14	0,5
65 - 75	10	1	5	6	0.1
135 - 145	1	0.4	-	3	-

D'après le tableau n°6, on peut tirer plus que les bactéries, les champignons et les algues sont les microorganismes dominants. Les algues n'existent qu'en surface de sol, car elles ont besoin de la lumière soleil pour leur photosynthèse. Un grand nombre d'espèces a été isolé des sols mais seulement quelques-unes sont communes : *Chlorococcum humicola* et quelques *Oedogonium* et *Vaucheria* (KERBAB, 2018).

C'est ainsi que la grande majorité des champignons isolés formant un grand nombre de spores, particulièrement les Mucorales (*Mucor*, *Mortierella*, *Rhizous*) et les deutéromycètes (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Botrytis*). Ils représentent les deux tiers de la biomasse microbienne du sol. Ils sont hétérotrophes, certains d'entre eux sont saprophytes, ils ont une grande importance dans la fertilisation de sol. Leur rôle le plus déterminant vient du fait qu'ils sont les seuls organismes sur la terre, à part quelques rares bactéries, capable de décomposer la lignine des plantes (est la principale source d'humus dans le sol) (COHEN, 2017).

Cependant, les bactéries sont les plus nombreux et le plus varié, puisque leur densité peut s'élever de dix millions à un milliard par gramme de sol. Du fait de leur petite taille, leur poids reste inférieur à une tonne par hectare de sol. Ce qui donne aux bactéries une place importante dans le sol, c'est leur extraordinaire variabilité biochimique qui leur permet de transformer toutes les substances du sol et de les faire entrer dans le monde vivant (COHEN, 2017). La localisation des bactéries à l'intérieur de la matrice sol est un facteur clé affectant leur survie, leur activité et leurs fonctions écologiques. Déterminer la structure de la communauté bactérienne dans l'espace qui concerne la structure du sol est d'abord fondamental pour élucider les fonctions écologiques (FAUGIER, 2010).

Les bactéries sont localisées soit dans les pores du sol qui représentent jusqu'à 50% du volume total du sol, soit enlisées dans l'argile. La distribution quantitative hétérogène des bactéries dans le sol résulte en une plus grande abondance des bactéries dans les micropores. Le diamètre maximum des pores les plus fréquemment colonisés par les bactéries est estimé entre 2.5 μm et 9 μm pour respectivement les textures fines et grossières du sol. 80% des bactéries sont préférentiellement localisées dans la partie interne des micros et macro porosités, quel que soit le type de sol (FOSTER, 1988 ; GRUNDMANN, 2004).

La diversité bactérienne des sols est difficilement quantifiable. Les travaux de ces dix dernières années tendent vers un consensus selon lequel un gramme de sol contiendrait environ 10^9 cellules microbiennes, parmi lesquelles on pourrait distinguer de 10^4 à 10^6 espèces différentes. La description de la diversité bactérienne repose sur un certain nombre de prérequis et doit tenir compte des conditions environnementales et des incertitudes liées aux méthodes d'analyse (CURTIS *et al.*, 2002 ; GANS *et al.*, 2005 ; JANSSEN, 2006 ; MARTIN, 2011).

II. Différentes approches taxonomiques

La taxonomie s'est appuyée sur l'étude du phénotype exprimé et sur les variations morphologiques qui existent entre les souches. Les critères qui permettent d'apprécier la parenté de différentes souches ont variés dans le temps, ce qui a permis d'utiliser la taxonomie phénétique, la taxonomie numérique, la chimiotaxonomie et la taxonomie moléculaire (MEZIANI, 2012).

II.1. Taxonomie phénétique

Depuis la classification proposée par COHN en 1872 et jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce reposait sur une classification phénétique ou phénotypique (SMAOUI, 2010). Elle concerne la caractérisation à différents niveaux ; morphologique (cellulaire, coloniale), physiologique (pH, température de croissance, accepteurs finals d'électrons, etc.) et biochimique (activités enzymatiques) (VANDECASTEELE, 2008 ; GUERGOURI, 2010). Ces tests constituent la base d'une description formelle des taxons, des espèces et sous-espèces en remontant vers le genre et la famille (VANDAMME *et al.*, 1996). Une classification phénétique a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité d'information réduite (SMAOUI, 2010). Plusieurs techniques phénotypiques sont disponibles pour la caractérisation des isolats, le sérotypage, le lysotypage, et le biotypage.

Le biotypage est une technique très largement utilisée un niveau des laboratoires, il se base sur plusieurs caractères parmi lesquelles on peut définir, la morphologie, le mode de groupement, la mobilité et le type de Gram. Plus que les caractères culturels en milieu liquide et sur milieu solide

(forme de la colonie, sa pigmentation et ses dimensions), le comportement vis à vis des facteurs physico-chimiques aussi il peut être définie (par exemple la température, le pH, la salinité, l'oxygène, etc.), et finalement les caractères biochimiques qui classent les bactéries selon leurs profils enzymatiques et biochimiques. Cette analyse se fait par l'utilisation de galeries d'identifications classiques ou par des systèmes d'identifications prêts à l'emploi vendus dans le commerce tels que l'API (JOHNSON *et al.*, 2007).

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification (KITOUNI, 2007). Ce système est basé sur l'étude de caractères chimiques (MEZIANI, 2012). L'examen des acides aminés de la paroi cellulaire, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (PERRY *et al.*, 2004).

Exemple : chez les bactéries à Gram positif, la composition en acides aminés de la paroi se révèle un critère taxonomique de poids, au niveau du genre, tandis que celle des sucres permet la distinction entre espèces, comme cela a été démontré dans le groupe des bactéries corynéformes (MEYER *et al.*, 2004).

II.2. Taxonomie génotypique

Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle la classification traditionnelle a été de plus en plus remplacée par la classification phylogénétique, qui est uniquement basée sur le modèle évolutif et la notion d'ascendance commune (ou phylogénie) (TIFRIT, 2016). Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse. Trois critères sont classiquement recherchés (MEYER *et al.*, 2004) :

- Le GC% ou coefficient de Chargaff ;
- Le taux d'hybridation ADN/ADN ;
- La séquence des ARN ribosomiaux 16S et 5S.

A l'échelle moléculaire, plusieurs techniques interviennent pour la caractérisation phénotypique des bactéries. La plupart de ces techniques sont applicables à un nombre limité de bactéries et réservées à des laboratoires spécialisés (ALAUZET, 2009).

En 1949, CHARGAFF *et al.*, démonte que le contenu représentant les bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN sont variable d'un individu à un autre mais était constant pour ceux du même espèce (SMAOUI, 2010). Cette variation est exprimé par le G+C % (KITOUNI, 2007).

Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre (**SMAOUI, 2010**). Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN (**TIFRIT, 2016**).

Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte par **MARMUR (1961)** du phénomène de renaturation de l'ADN (**TIFRIT, 2016**). Les hybridations ADN-ADN, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux individus différents. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : si les ADN des deux individus présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche, si les ADN des deux individus ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses (**SMAOUI, 2010**).

Une espèce est définie phylogénétiquement comme l'ensemble des souches ayant des valeurs d'hybridation ADN/ADN supérieures ou égales à 70 % et des valeurs de ΔT_m inférieures ou égales à 5°C (T_m : melting temperature, c'est la température de demi dénaturation d'un homo ou d'un hétéroduplex d'ADN ; ΔT_m : différence de T_m entre l'hybride homologue et l'hybride hétérologue) (**KITOUNI, 2007**).

Les techniques d'hybridation ont permis de rapprocher des genres qui étaient à priori assez éloignés. Exemple : les genres *Shigella* et *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae* sont phénotypiquement éloignés (caractères biochimiques différents) mais génotypiquement, les deux genres sont proches (% d'hybridation supérieur à 70%).

La caractérisation génotypique des bactéries se base soit sur l'analyse de l'ADN génomique, soit en ciblant des gènes précises. Aujourd'hui un nombre important d'études utilisent les gènes codant pour l'ADN ribosomal de la petite sous unité 16S, qui sont largement utilisée pour l'étude de populations bactériennes (**BERDOULAY, 2008**).

CARL WOESE a été le premier, en 1987 à proposer l'utilisation du gène de l'ARN ribosomique 16S comme marqueur de phylogénie. Parmi les trois types d'ARN (23S, 16S et 5S), l'ARN 16S est le plus

souvent analysé. Ce gène de 1500 paires de bases répond à plusieurs critères essentiels pour la taxonomie :

- ✓ Il est ubiquiste, c'est-à-dire présent chez tous les procaryotes, où il remplit la même fonction ;
- ✓ Il évolue lentement ;
- ✓ Il peut être facilement séquencé, car il possède des domaines hautement conservés avec peu de mutations fixées au cours de l'évolution ;
- ✓ Il présente des régions de séquences plus variables qui sont d'autant plus différentes entre deux espèces que celles-ci sont phylogénétiquement éloignées (**FAUGIER, 2010**).

L'utilité du séquençage des ARNr 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARNr 16S est très utile pour classer les individus dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Pour **STACKEBRANDT & GOEBEL (1994)**, lorsqu'il existe moins de 97% de similarité entre les séquences des ARNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN (**SMAOUI, 2010**). L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR (Polymérase Chain Réaction) et le séquençage (**MERIZIG & NAAMI, 2015**).

En outre, la technique d'électrophorèse par SDS-PAGE (dodécylsulfate de sodium), est utilisée pour la caractérisation du profil protéique qui se base sur la séparation des protéines en condition dénaturante et en fonction de leur poids moléculaires. SDS-PAGE des protéines est une technique de criblage, connue pour son important pouvoir de discrimination, permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une même espèce. Elle peut être utilisée à des fins analytiques ou préparatifs, et est relativement rapide, peu coûteuse et reproductible (**BENGUEDOUAR, 2000 ; NDIAYE et al., 2002**).

En effet le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent fort, en se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative, les protéines auront donc toutes une charge apparente négative, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. La comparaison des résultats de séparation avec ceux des souches types permettent de réaliser une caractérisation phénotypique des isolats (**DIERTHARD, 2012**).

L'ARNr 16S a comme avantages d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille de 1540 nucléotides aisément séquençables et d'avoir

une séquence suffisamment informative (**ALAUZET, 2009**). Ces régions hautement conservées et évoluent lentement au cours de temps. L'identification génotypique des bactéries repose sur un plan global généralement constant représenté par la qui détermine les principales phases d'une identification génotypique.

D'une manière générale toutes les méthodes d'identification des bactéries présentent des avantages et des inconvénients. Cependant, les méthodes génotypiques permettent, non seulement de déceler des homologues de structure entre des séquences d'ADN dans le chromosome bactérien, mais aussi d'identifier les bactéries et d'établir une phylogénie fiable relative aux différentes espèces aussi bien cultivables que non cultivables (**KIRK et al., 2004 ; BERRADA, 2012**), et surtout lorsqu'il s'agit des bactéries des environnements extrêmes telle que les thermophiles, les acidophiles et halophiles.



Chapitre III
Molécules bioactives



CHAPITRE III

MOLECULES BIOACTIVES

Les molécules bioactives sont des substances naturelles d'origine biologique élaborées par les microorganismes. Dans la majorité des cas, la synthèse de métabolites secondaires ou molécules possédant une activité biologique, constitue une réponse des microorganismes à un environnement qui leur est défavorable. La recherche de métabolites secondaires s'appuie sur la collection des microorganismes puis passe par des protocoles d'extraction, purification et ce dans le but d'obtention de fractions plus ou moins purifiées qui seront ensuite évaluées sur des cibles biologiques (TAALE, 2016).

Ces molécules bioactives sont variées et diversifiées, car on distingue les bactériocines, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase), les antibiotiques et autres. Les molécules bioactives diffèrent les unes des autres sur leur mode de synthèse et leur spectre d'activité. Ainsi, les bactériocines sont produites par voies ribosomales ou plasmidiques, les peptides NRPS sont codés par des gènes non ribosomiaux tandis que les antibiotiques sont obtenus par actions enzymatiques (TAALE, 2016).

La plupart des substances antimicrobiennes sont produites par les bactéries. En effet, les bactéries sont responsables de 60% de la production, alors que les champignons 38% (Cf. Figure n°4) (BERDY, 2005).

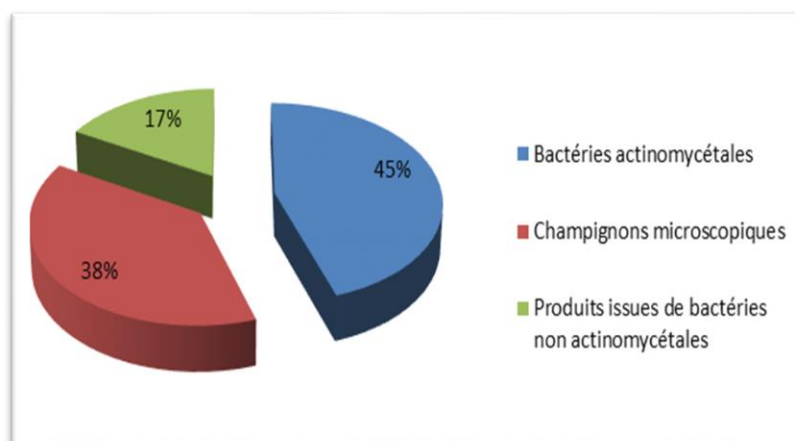


Figure n°4 : Origine des substances antimicrobiennes (BERDY, 2005).

Les bactériocines sont des substances naturelles caractérisée par une activité antimicrobienne, produites par les deux groupes bactériens les Gram positives, les Gram négatives et les archées. Plusieurs définitions des ces substances ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus réputé est celle de KAENHAMMER qui définit « les bactériocines comme des protéines, ou

complexes de protéines, possédant une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice » (KLAENHAMMER, 1988). Parmi les différents types de bactériocines, on distingue les lantibiotiques, les peptides ne subissant pas de modifications post-traductionnelles, les bactériolysines, les peptides complexes, les microcines, les colicines et les archéocines (TAALE, 2016).

Les molécules qui pouvant être synthétisées par des bactéries, sont en nombre considérable. La plupart de ces composés sont en général très actifs, à de très faibles concentrations. Ils peuvent présenter un intérêt économique, notamment comme molécules bioactives. C'est à partir de ces métabolites secondaires que sont principalement recherchés (molécules d'intérêt thérapeutique) (JEAN, 2014). Plusieurs genres sont considérés maintenant comme des producteurs d'antibiotiques. Elles appartiennent généralement aux genres *Bacillus* produisant surtout des antibiotiques polypeptidiques et *Pseudomonas* produisant des antibiotiques de nature plus variée (PODILE & PRAKASH, 1996 ; NEILSEN & SORENSEN, 1997 ; DUFFY & DEFAGO, 1999 ; SADFI et al., 2002).

La répartition des organismes producteurs dans les différentes classes ou ordres fongiques, est en fonction non seulement des capacités de synthèse, mais aussi de la fréquence des diverses espèces dans la nature et de leur aptitude à se développer facilement en culture. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Moniliales constituent le réservoir le plus important (Cf. Tableau n°7) (BOTTON et al., 1990).

Tableau n°7 : Microorganismes producteurs d'antibiotiques (LADJAL, 2012).

Microorganismes	Antibiotiques
<i>Bacillus</i>	Bacitracines, Gramicidines
<i>Pseudomonas</i>	Acide pyolipique, Poycyanine
<i>Aspergillus flavus</i>	Acides aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremoniumu</i>	Céphalosporine
<i>Penicillium chrysogénium</i>	Pénicilline

Les molécules bioactives sont des substances antibactériennes naturelles d'origine biologique élaborées par les bactéries. Ces molécules bioactives sont variées et diversifiées car on distingue les bactériocines, les peptides NRPS (Non Ribosomal Peptides Synthetase), les antibiotiques et autres. Les molécules bioactives diffèrent les unes des autres sur leur mode de synthèse et leur spectre d'activité. Ainsi, les bactériocines sont produites par voies ribosomales ou plasmidiques, les peptides NRPS sont codés par des gènes non ribosomiaux tandis que les antibiotiques sont obtenus par actions enzymatiques (ESSODOLOM, 2016).

Depuis les années 1960, des métabolites secondaires bioactifs ont été isolés et caractérisés structurellement à partir d'eubactéries, d'archées et de champignons, de microorganismes qui ont adopté des stratégies de croissance dans des environnements terrestres extrêmes. Une myriade de produits naturels ont été isolés des extrémophiles terrestres. L'isolement et la bio-activité de ces molécules des extrémophiles suivants sont envisager : thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcaliphiles, halophiles, xérophes, épiphytes ou endophytes, ainsi que des microorganismes métallotolérateurs, radiorésistants et non classifiables (**GIDDINGS & NEWMAN, 2015**).

Les thermophiles terrestres se trouvent partout dans le monde et ont été étendus ; Kamchatka, Nouvelle-Zélande, Thaïlande, Tibet, Italie, Chili et Yellowstone National Park aux États-Unis, notamment pour leur production de enzymes thermostables (Cf. Tableau n°8). Par exemple, la première source d'ADN polymérase Taq était isolé de la souche *Thermus aquaticus* T01 d'une zone géothermique à Yellowstone Parc national. Cette découverte a contribué à l'élaboration d'outils utiles dans les domaines de la génétique, de la biologie moléculaire, de l'enzymologie et d'autres domaines microbiologie thermophile. En outre, l'utilisation de thermophiles a été indubitablement avantageux dans plusieurs procédés industriels, y compris les procédés de traitement de l'eau, de production de combustible et d'élimination du soufre à partir de pétrole brut (**GIDDINGS & NEWMAN, 2015**).

L'aérosolisation de microbes provenant d'environnements froids comme les régions polaires propulse les organismes psychrophiles directement dans l'atmosphère. Les bactéries psychrophiles sont mieux adaptées que la plupart des bactéries à la vie atmosphérique car elles sont déjà adaptées pour survivre à des températures glaciales à des altitudes plus élevées. Il a été démontré que les bactéries recueillies dans les nuages sont capables de croître et de se reproduire à 0°C ce qui laisse croire à l'existence de bioaérosols psychrophiles (**MARGESIN & SCHINNER, 2001**). L'espèce *Psychrobacter* sp. peut croître à des températures de -10 °C à ~30 °C (**CAVICCHIOLI, 2016**). *Geobacillus thermodenitrificans* a été isolée d'un événement marin peu profond de l'île de Vulcano (Italie). *Streptomyces* sp. RM-4-15 produit un métallotolérant frenolicins (**WANG et al., 2013**) *Sphingomonas astaxanthinifaciens* strain TDMA-17 est une espèce Radiotolerante et toxitolérante les chercheurs ont pu identifier un antioxydant produite cette bactérie nommé la staxanthin dirhamnoside (**ASKER et al., 2009**) ; un autre psychrophile et Xerophile fongique *Aspergillus terreus* Thom renferme un légère cytotoxique substance asterredione (**WIJERATNE et al., 2003**).

Il est à signalé que les sols algériens du Sahara abritent une quantité importante d'actinomycètes divers, comme la *nocardiopse* et la *saccharothrix* (**SABAOU et al., 1998 ; BADJI et al., 2005 ; BOUDJELLA et al., 2006**). Ces actinomycètes produisent plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne. Zitouni et ses collègues ont identifié les agents antifongiques ZA01 et ZA02 à partir d'une investigation de 86 isolats ayant une morphologie de *Nocardiopsis* (54 isolats) ou de

Saccharothrix (32 isolats) et ont examiné leurs extraits pour déterminer leur activité antimicrobienne (ZITOUNI *et al.*, 2005). Actuellement, les cyanobactéries comme l'isolats de *Leptolyngbya* isolés d'une source chaude au Groenland sont exploitées pour des glycolipides, phospholipides, triacylglycérides et autres lipides, tels que l'oléique, les acides linoléique et linoléinique, pour la production de biodiesel (SINGH *et al.*, 2014).

Il y a d'autres exemples d'extrêmophiles qui ont été isolés des inclassifiables environnements et déclarés pour produire de nouvelles substances chimiques, exemple de la souche *Microbispora aerate* IMBAS-11A isolée des excréments de pingouins sur on a observé que l'île Livingston, en Antarctique, produisait la microbiaeratine cytotoxique (IVANOVA *et al.*, 2007).

De nouvelles dioxopipérazines liées à l'indole prénylé ont été isolées par Itabashi et ses collègues à partir d'extraits du champignon xérophile *Aspergillus restrictus* des souches A-17 et A. *pennicilliodes* SPEG. La souche SUM3319 a été trouvée dans la poussière domestique dans la préfecture de Hyogo, au Japon, et la surface du thon séché recueilli dans la ville de Yokohama, au Japon, respectivement (ITABASHI *et al.*, 2006).

Tableau n° 8 : Composés bioactifs isolés des thermophiles terrestres (GIDDINGS & NEWMAN, 2015).

Thermophile	Optimal growth temperature (°C)	Source	Compound	Bioactivity	References
<i>Microbispora aerate</i>	50	Penguin excrements	Microbiaeratin 9	Weak antiproliferative/ cytotoxic	Ivanova et al. (2007)
<i>Thermobifida fusca</i>	55	N/A	Fuscachelins A–C (10–12)	Siderophores	Dimise et al. (2008)
<i>Malbranchea sulfurea</i>	40	Soil	Malbranpyrroles A–C (13–18)	Cytotoxic	Yang et al. (2009)
<i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i>	40	Soil	(3-(2-(4-Hydroxyphenyl)-2-oxoethyl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one) 19	Anti-allergic	Andrioli et al. (2012)
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> XA-1; <i>A. flavithermus</i>	60	Thermal spring	Cyclo (Gly-L-Pro) 20	Immunomodulators of carp	Wang et al. (2011a), Liu et al. (2011)
<i>A. kamchatkensis</i> XA-1	60	Thermal spring	Cyclo (L-Ala-4-hydroxyl-L-pro) 21	Immunomodulators of carp	Wang et al. (2011a)
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	60	Thermal spring	Sibyllimycine 22	N/A	Hafenbradl et al. (1996)
<i>Talaromyces thermophiles</i> strain YM1-3	45	Thermal spring	Talathermophilins A–E (23–24; 26–28)	Very weak nematocidals	Chu et al. (2010)
<i>T. thermophiles</i> strain YM3-4	45	Thermal spring	Cyclo (glycyltryptophyl) 25	N/A	Chu et al. (2010)
<i>T. thermophiles</i> strain YM3-4	45	Thermal spring	Thermolides A–F (29–34)	Nematocidals	Guo et al. (2012)

N/A Information non disponible * Températures auxquelles les cultures ont été cultivées

I. Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Plusieurs méthodes ont été développées pour le screening de métabolites secondaires essentiellement les substances antimicrobiennes. La préparation des échantillons biologiques nécessite l'optimisation des conditions de croissance, les procédures d'extraction et les protocoles de la purification (HIGGS *et al.*, 2001).

L'efficacité d'un programme de criblage dépendra de plusieurs critères : le microorganisme producteur, le germe cible et la méthode analytique utilisée.

Le screening permet de détecter *in vitro* et sur milieu gélosé l'effet inhibiteur des microorganismes sélectionnés vis-à-vis des germes cibles, il est rapide, sensible et raisonnable. Il peut être réalisé par plusieurs techniques (CANNELL, 1998 ; HIGGS *et al.*, 2001) :

I.1. Technique des cylindres d'Agar (plug Agar)

Elle consiste à prélever des cylindres d'Agar à partir de la culture du microorganisme d'intérêt et les mettre sur milieu gélosé préalablement ensemencé par le microorganisme test. Les substances diffusent sur la gélose et l'observation d'une zone d'inhibition autour des cylindres après incubation indique la présence de l'effet inhibiteur (ECCLESTON *et al.*, 2008).

I.2. Technique des stries transversales (Cross streak)

Elle consiste à ensemencer le germe sélectionné en strie au centre d'un milieu de culture gélosé, et après incubation (3 à 7 jours) à une température appropriée, le milieu est ensemencé par les germes test en stries de manière à former un angle de 90° avec le germe d'intérêt. Après ré-incubation, l'interaction microbienne est analysée par la mesure de la zone d'inhibition (LERTCANAWANICHAKUL & SAWANGNOP, 2008).

I.3. Technique des disques en papier (filter paper discs)

Elle consiste à déposer des disques stériles en papier filtre, imbibés par un volume défini du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné, sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par le germe test, après incubation, les zones d'inhibition sont mesurées autour des disques (LANCINI & PARENTI, 1982).

I.4. Technique des puits

Elle consiste à former des puits sur un milieu gélosé préalablement ensemencé par le germe test et les remplir par un volume précis du filtrat, du surnageant ou de l'extrait organique du germe sélectionné (LERTCANAWANICHAKUL & SAWANGNOP, 2008).

I.5. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI (ou MIC) est définie comme la plus petite concentration d'un composé antimicrobien qui inhibe la croissance d'une souche après une période d'incubation appropriée. Elle est déterminée *in vitro*, par des dilutions en gélose ou en bouillon. Les germes cibles sont testés pour leur capacité à montrer une croissance visible sur une série de boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé (dilution en gélose) ou sur des microplaques (micro-dilution en bouillon) contenant des dilutions appropriées de l'agent antimicrobien. L'observation est réalisée après une nuit d'incubation, la plus faible concentration dans laquelle il n'y a pas de croissance visible du germe cible correspond à la CMI (KHANNA *et al.*, 2011).

En outre, la CMI peut être détectable à l'œil nu dans des tubes ou des puits de micro-dilution, contrairement à la méthode de macrodilution qui présente des inconvénients notamment, elle est une technique pénible et manuelle, ou il y a un grand risque d'erreurs dans la préparation de solutions antimicrobiennes. Par contre, la reproductibilité et l'économie des réactifs et de l'espace qui se produit en raison de la miniaturisation de l'essai sont les principaux avantages de la méthode de microdilution, ainsi qu'un dispositif de visualisation peuvent être utilisés pour faciliter la lecture et l'enregistrement des résultats avec une grande capacité à discerner la croissance dans les puits. De ce fait, plusieurs méthodes colorimétriques basées sur la l'utilisation de réactifs colorants ont été mise au point : Sels de tétrazolium, 3-(4,5-bromure de diméthyltétrazole-2-yl)-2,5-diphényzolium (MTT) et 2,3-bis {2-méthoxy-4-nitro-5-[(sulfénylamino) carbonyl]-2H-tétrazolium-hydroxyde} (XTT), ils sont souvent utilisés dans la détermination de la CMI soit pour l'activité antifongique ou antibactérienne. Également le colorant bleu d'Alamar (resazurin), est un l'indicateur de croissance qui peut être utilisé à cette fin (BALOUIRI *et al.*, 2016).

I.6. Chromatographie sur couche mince (CCM) et bioautographie

En 1946, GOODALL & LEVI ont combiné la chromatographie sur papier méthode graphique (PC) avec bioautographie de contact pour détecter différentes pénicillines pour leur détermination. Par la suite, FISCHER & LAUTNER introduisent le CCM dans le même domaine. Cette technique combine le CCM biologique et chimique. Plusieurs des travaux ont été réalisés sur le criblage des extraits organiques,

principalement extraits de plantes, pour l'activité antibactérienne et antifongique par CCM-bioautographie. Pour cela, des variétés de techniques sont développées ; la diffusion de l'agar, la bioautographie directe et l'agar-essais de superposition, et qui ont été décrits pour l'investigation de composés microbiens par cette approche (**BALOUIRI et al., 2016**).



Chapitre IV
Matériel et méthodes



CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

L'objectif principal de notre travail est l'élaboration d'un soucier de propagules microbiennes productrices de métabolites secondaires d'intérêts. L'isolement des microorganismes se fait à partir des échantillons prélevés de différents biotopes en particulier : Sebkhass, cavernes, sources d'eau, anciens k'sars et à partir de plantes médicinales. Notre motivation est sollicitée par les propriétés extrêmes et diversifiées qui caractérisent certains de ces environnements abritant des microorganismes extrémophiles d'intérêt sur le plan biotechnologique etc.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons divisé notre travail en trois étapes principales :

- 🔗 Isolement, purification, identification par la galerie biochimique et la conservation des microorganismes ;
- 🔗 Screening de l'activité antimicrobienne des isolats ;
- 🔗 Séparation par chromatographie sur couche mince des extraits actifs sur les pathogènes ;
- 🔗 Identification moléculaire par le gène 16S ;

I. Présentation des zones d'étude

Nous avons prospecté plusieurs biotopes qui s'étalent sur différentes régions du Sud-ouest algérien très connu pour sa diversité écologique, sa richesse en monde vivant, pour isoler des microorganismes d'intérêts. Notre choix a ciblé donc des biotopes très particuliers voir même extrêmes : sebkhas, cavernes, sources d'eau, anciens k'sars et à partir de plantes médicinales *Atriplex halimus*, *Rosmarinus officinalis* et *Launaea arborescens*. Le tableau n°13 regroupe les différents sites de prélèvements.

I.1. Ville de Béchar

La ville de Béchar est située dans l'ouest du Sahara algérien. Elle correspond à une partie de l'ancien département de la Saoura, s'éloigne de 950 km au sud-ouest de la capitale Alger d'une superficie de 5050 km², et d'une population de 279 851 habitants environ. Elle est limitée à l'Est par la Wilaya de Beni abbès, à l'Ouest par le Royaume du Maroc, au Nord par les Wilayas de Naâma et d'El Bayadh, et au Sud par les Wilayas de Tindouf et d'Adrar. Cette ville est caractérisée par un climat aride désertique, avec un régime thermique contrasté et des précipitations rares.

I.2. Anciennes K'sar patrimoine culturel

Dans l'immensité des espaces désertiques et face à l'hostilité de l'environnement l'homme a toujours usé de fins stratagèmes pour survivre dans les milieux les plus extrêmes. L'ensemble du Sahara algérien est parsemé d'établissements humains traduisant ce dispositif défensif contre la nature et les hommes : les k'sour (ILLILI, 2011). Le terme K'sar (pluriel : k'sour), signifie étymologiquement palais (COTE, 2005).

Les « K'sour » sont ces citadelles inaltérables construites sur la route des caravanes reliant le nord et le sud de l'Afrique subsaharienne. Leurs divers dispositifs défensifs ont suscité l'intérêt des chercheurs pour leurs origines historiques, les méthodes de construction et les coutumes nationales qui les ont créés. De ce fait, la communauté traitant tous les aspects de la biodégradation et de la biodétérioration, en particulier dans le domaine du patrimoine culturel, la pleine conscience de la responsabilité doit être soulignée, car chaque pièce du patrimoine culturel et de l'art est unique et irrécupérable (STERFLINGER *et al.*, 2018). La première personne qui a étudié la biodétérioration du papier était CHRISTIAN GOTTFRIED EHRENBURG. De retour en 1818, il termine sa thèse de doctorat sur les champignons, *SYLVAE MYCOLOGICAE BEROLINENSES*, où il décrit la première espèce nommée « *chartarum* ». Dans les années 1980, les pionniers de l'analyse microbiologique moderne ont appliqué ce domaine aux questions d'altération biogénique et de détérioration des monuments et des œuvres d'art à savoir WOLFGANG E. KRUMBEIN en Allemagne, pour n'en citer que quelques-uns (STERFLINGER *et al.*, 2018).

I.2.1. K'sar de Kenadsa

Kenadsa est situé dans le sud-ouest de l'Algérie à environ 20 Km à l'ouest de la ville de Béchar et à 950 km à l'altitude de 806 m, latitude de 31°38' N et longitude de 2°15'W. Il se trouve au fond d'une vallée par un relief montagneux, entouré par la Barga. La Barga est une falaise composée de roches (grès de silice) et de sable fin dans le nord et ouest, ce qui permet une protection optimale contre les rigueurs le climat. Le K'sar de Kenadsa compte parmi les plus importantes cités anciennes de la région sud-ouest algérienne par sa dimension culturelle et religieuse, sa valeur architecturale et l'étendue de son emprise urbaine, le K'sar a tenu une fonction de centre régional rayonnant sur toute la partie Ouest du Maghreb. Ces climats sont caractérisés par une longue et sévère saison chaude (FEZZIOU *et al.*, 2009).

I.2.2. K'sar Sidi Charef d'Aoulef

La ville d'Aoulef est située à la latitude 26°58" Nord, à une longitude de 1°00" Est et à 277m d'altitude. Elle est située à 1411 Km au sud de la capitale Alger, à 101 Km à l'est de Reggane et à 184 Km au sud-est d'Adrar dans la zone du Tidikelt. Administrativement, elle fait partie de la willaya d'Adrar comme chef-lieu de commune. Elle englobe, depuis le découpage administratif de 1984, neuf localités

à savoir : Ouamanat, Takaraft, Djedid, Gasbet Bellal, Gasbet Maïkhaf, Roukina, Zaouit Heinoume, Habbadat et la palmeraie de Tit (45km à l'est). Elle s'étend sur une superficie de 2420 Km² pour une population estimée en 2008 à 21723 habitants soit une densité de 9 ha/km² (BOUTABBA et al., 2016).

La fabrication du Toub, mot berbero-arabe assimilé en espagnol pour prendre la nomination d'adobe, est l'opération la plus importante du processus de construction traditionnel (K'sar), car la durabilité et la solidité de la structure entière de la future maison en dépendait (BOUTABBA et al., 2016).

A Aoulef, il faut généralement creuser à 12 ou 150 cm de la surface pour trouver la terre utile à la construction. Les autochtones utilisaient un récipient qu'ils remplissaient d'un tiers de terre, et qu'ils complétaient avec de l'eau. Pour réussir la fabrication de l'adobe, le taux d'argile dans la terre doit être compris entre 20 à 30%. Une autre technique est pratiquée où la terre extraite est gâchée. Ce processus de fermentation exige 24 heures pour que la terre devienne plus pâteuse et consistante. Pour la construction des plancher, à terrasse accessible, ils utilisent deux matériaux principaux : la terre et les différentes composantes du palmier : stipe khechab enekhal, palmes Djerid, Kornaf, Ziouane, Fedam (BOUTABBA et al., 2016).

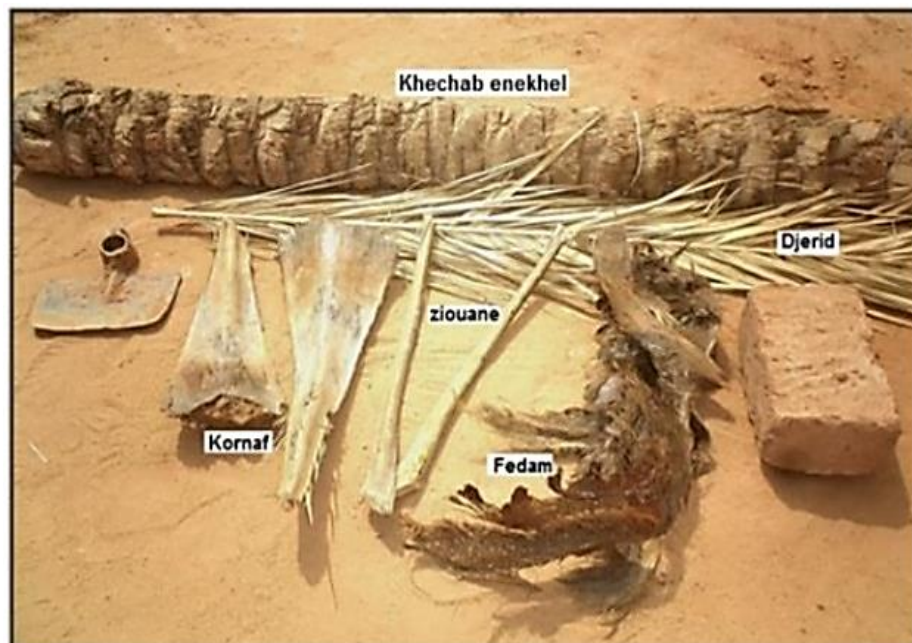


Figure n°5 : Différents éléments de palmier utilisés dans la couverture (BOUTABBA et al., 2016).

I.3. Sebkha

I.3.1. Sebkha de Kenadsa

Le climat à Kenadsa est de type désert, caractérisé par une raréfaction des précipitations (moyenne des précipitations : 45 mm/année), avec une température moyenne (les précipitations sont en moyenne de 45mm/an), et une température moyenne annuelle de 20.5°C, l'humidité annuelle est faible, et ce en dépit de la présence de palmeraies qui promouvoir la mise en place d'un microclimat (BENMOUSSA et al., 2015).

Kenadsa s'inscrit dans le sous-bassin de l'oued Messouar, qui fait partie de la zone de l'oued Béchar. Sur le plan local, on remarque l'existence d'un réseau lâche de petits « chaâbats » peu gravé en topographie. L'ensemble converge vers une sebkha, avant de rejoindre l'oued Messouar. Sur le cours de ce dernier, une digue a été construite, mais qu'est actuellement hors-service à cause de son envasement total (BENMOUSSA et al., 2015).

I.3.2. Sebkha de Tamentit

L'oasis de Tamentit est située à 12 kilomètres au sud de la ville d'Adrar sur la route de Reggane et couvre une superficie d'environ 320 hectares. Elle est située au milieu d'un reg qui correspond à une plaine érodée découpée dans les grès de l'intercalaire continental (Crétacé inférieur), recouvert d'une fine couche de sable, de galets et de débris d'écorce. Cette plaine s'incline doucement d'est en ouest et du sud au nord vers une cuvette qui forme la sebkha. Le seul accident de cette région est un escarpement de grès d'une dizaine de mètres sur lequel est bâti le Ksar et où la palmeraie occupe soit le pied (au nord) ou le revers (du côté sud) de cet escarpement (CHERIFI, 2003).



Figure n°6 : Vue générale de la sebkha de Tamentit (Adrar) (Photo originale).

1.3.3. Sebka de Kerzaz

La sebka étudiée située dans la Daira de « Kerzaz ». Cette dernière est l'une des anciennes Dairas de la wilaya de Béchar située à 120 km au sud-est de Béni-Abbès et à 330 km au sud-est de Béchar. La Daira de « Kerzaz » est composé de trois communes : Kerzaz, Beni-Ikhlef et Timoudi. La sebka de « Kerzaz » est située au sud-est du la ville de « Kerzaz ».



Planche n°2 : Vue générale de la sebka de Kerzaz (Photo originale).

1.4. Sources d'eau

1.4.1. Source d'eau dans l'oasis de Timimoune

Timimoun historiquement est la capitale du Gourara, située à 200 km au nord-est de la ville d'Adrar, chef-lieu de la wilaya à laquelle appartient administrativement la commune. Dans un emplacement central dans le Gourara, sur le bord oriental du grand Erg occidental, Timimoun a historiquement été un centre d'animation des oasis environnantes structurées le long de la sebka ou localisées dans l'erg (Taghouzi et Tinerkouk). Le peuplement des oasis du Gourara actuel résulte d'une succession historique d'apports ethniques divers (OTMANE & KOUZMINE, 2011).

Les régions arides se caractérisent par de faibles précipitations ou des eaux de surface très limitées. Face à ce milieu hostile, les réserves d'eau souterraine constituent majoritairement la base de formation des oasis. Pour exploiter la nappe phréatique, l'homme a d'abord utilisé des puits traditionnels qui reposaient sur l'effort humain ou animal. C'est une technique à faible rendement énergétique important permettant d'avoir un faible débit. Au fil du temps, l'homme a amélioré le système de captage des eaux avec l'invention de la technique des galeries. Cette technique est apparue dans le nord-ouest de l'Iran pour la première fois depuis 3000 ans. C'est l'une des plus belles inventions de l'histoire de l'hydraulique. En raison du succès de ce système d'irrigation dans les oasis

iraniennes, il a été adopté dans une trentaine de pays arides sous différents noms (**BOUALEM et al., 2015**).

I.4.2. Ancien k'sar de Mazzer source d'eau (Hammamet)

La municipalité d'Igli a été fondée en 1960, elle est devenue chef-lieu de Daira après la division administrative de 1991. Igli en tant que commune ; Mazzer en tant qu'agglomération secondaire et Touzdit en tant que région inhabitée (en ruines). Le territoire de la commune d'Igli est situé au centre de la wilaya de Béchar, dans le sud-ouest algérien. Son chef-lieu est situé à 153 km au sud de Béchar, à 1000 km de la capitale Alger et à 63 km au sud de Taghit et à 75 km nord de Béni Abbés, deux lieux touristiques célèbres de la région de Béchar. La superficie : 6220 km² ; les habitants : 6833 (**BENDJELID, 2001**).

A Mazzer, c'est une grosse, source naturelle débouchant d'une grotte de travertin (**GAUTIER & CHUDEAU, 1908**). Le cas de Mazzer est parfaitement clair : à la base de la falaise miopliocène, sur la rive gauche, jaillit une très grosse source ou mieux un petit ruisseau d'eau claire ; il débouche sous une voûte travertineuse qu'il s'est construit lui-même, il donnerait 100 litres à la minute. On l'appelle Ain el Hammam. Il existe d'ailleurs à Mazzer cinq autres petites sources beaucoup moins importantes (**GAUTIER, 1910**).

I.5. Grotte de Boukais

La grotte étudiée est située dans la commune de Boukais de la Daira de Lahmar, 50 km au nord-ouest de la Wilaya de Béchar du sud-ouest algérien. Cette localité s'étant sur une superficie d'environ 1760 Km². La commune de Boukais admet comme limites administratives :

- ✓ Au Nord et l'Ouest par le Maroc ;
- ✓ Au Sud Est par la commune de Lahmar ;
- ✓ Au Nord et Nord Est par la commune de Moughel ;
- ✓ Au Sud par la commune de Kenadsa.

I.6. Description et classification des plantes médicinales

Des échantillons sains des racines, des tiges et des feuilles de chaque plante ont été récupérés et placés dans des enveloppes en papier stériles (Cf. Planche n°3).

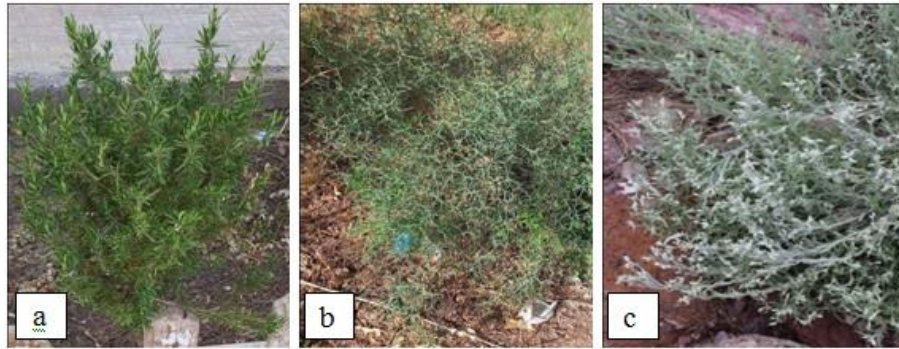


Planche n° 3 : Plantes médicinales collectées, **a) *Atriplex halimus* (L'gtaf), b) *Rosmarinus officinalis* (Laziir), c) *Launaea arborescens* (Oum-el'bina).** (Photo originale).

1.6.1. *Atriplex halimus* L.

Il s'agit d'une espèce qui appartient à la famille d'*Amaranthaceae* et du genre *Atriplex* (QUEZEL & SANTA, 1962), elle de formation steppique salée que l'on retrouve dans les hauts plateaux et le long de la côte, où les conditions propices sont rencontrées avec les polymorphismes selon la salinité, elle se caractérise par des feuilles relativement grandes de 2 à 5 cm, habituellement deux fois plus longues que larges, un peu épaisses et charnues (Cf. Planche n°3). Elles sont ovales et entières peu sinuées et dentées. La fleur est monoïque formée d'épis denses, courtes, nus et groupés. Les graines sont petites et rougeâtres La tige dressée est très rameuse. Les branches sont dressées puis étendues, arrondies, blanchâtres et souvent plus ou moins effilées. Le système racinaire est constitué par une racine principale de 50-90 cm de long, avec de rares racines secondaires de même longueur ou parfois de plus grande longueur sur lesquelles sont placées de nombreuses racines tertiaires courtes et fines. Cette plante est utilisée pour le traitement du goitre et cholestérol (ADOUANE, 2016 ; DELILLE, 2007 ; OZENDA, 2004). Son nom vernaculaire est : l-getaf, legtef, legtuf (Arabe) (SARI et al., 2012).

1.6.2. *Rosmarinus officinalis* L.

Elle se développe spontanément près de la mer. C'est un arbrisseau de la famille des Lamiacée, sous-famille *Nepetoideae*, Tribu *Menthae* (TOUAFEK, 2010). Il mesure entre 50 centimètres et 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé (feuilles en forme d'aiguilles blanchâtres et duveteuses par dessous). La tige est arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètres, cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme plus ou moins simulant des épilieur racine est profonde et pivotante (MOUSSI et al., 2015). Les fleurs sont d'un bleu pâle ou blanchâtre. Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace (Makhloufi et al., 2016). La floraison commence dès le mois de février et se

poursuit jusqu'au avril- mai. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétramère (de couleur brune), ovoïde, est entouré par un calice persistant et sec (Cf. Planche n°3) (BELKHODJA, 2016).

1.6.3. *Launaea borescens* Murb.

Il s'agit d'une plante médicinale de la famille des asteracées qui appartient au genre *Launaea* (Cf. Planche n°3) (MEZACHE, 2010). C'est un buisson épineux qui peut atteindre 1m de hauteur. Les branches sont très ramifiées, armées de nombreuses épines. Les feuilles sont allongées et munies des lobes triangulaires terminés par une petite épine, elles n'apparaissent que chez les sujets jeunes ou pendant l'hiver chez les plantes âgées. Les capitules, de 1.5 cm de diamètre sont solitaires à l'extrémité des rameaux et qui sont cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Ce buisson se rencontre dans les zones subdésertiques de basse altitude (BARKLEY et al., 2006).

II. Etude climatologique

Pour réaliser l'étude bioclimatologique des sites sujet de notre travail, en particulier les deux wilayas de Béchar et Adrar, nous avons collecté les données à partir d'un site officiel *Infoclimat.fr* en version 5.4, ce dernier est un moteur de recherche d'archives météorologiques. Pour cela nous sommes besoin de deux paramètres indispensables :

- 📍 **Pluviométrie** : les moyennes annuelles des précipitations des deux wilaya Adrar et de Bechar dans la période (1991-2020)
- 📍 **Température** : Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle de la station météorologique des deux wilaya Adrar et de Bechar dans la période (1991-2020).

Ces paramètres nous permettent d'établir le Climagramme d'EMBERGER STEWART et la détermination de l'étage bioclimatique des stations de Béchar et d'Adrar. Ainsi que le Diagramme ombrothermique.

L'indice d'EMBERGER définit le degré d'humidité du climat. Il est basé sur les précipitations annuelles P, la moyenne des « maxima » de température du mois le plus chaud (M) et la moyenne des « minima » de température du mois le plus froid (m). Il est convenable aux régions méditerranéennes dans lesquelles pour nous permettre de définir les différents étages climatiques. L'EMBERGER a remarqué que l'amplitude thermique (M-m) lié à l'évaporation, est un facteur important de la répartition des végétaux en particulier dans ces régions méditerranéennes. En réalité, à température moyenne égale, l'évaporation est davantage plus grande que l'amplitude thermique est élevée. Le

facteur de pluie pris en compte est le produit du nombre de jours de pluie par an (n) par le cumul moyen annuel (P) (BENABADJI & BOUAZZA, 2000).

Le quotient pluviométrique d'EMBERGER (Q_2) est exprimé par les valeurs de l'équation suivante :

$$Q_2 = \frac{1000 \times P}{\frac{M + m}{2} (M - m)} = \frac{2000 \times P}{M^2 - m^2}$$

P : Précipitation moyenne annuelle en mm.

M : moyenne des « maxima » du mois le plus chaud (K°).

m : moyenne des « minima » du mois le plus froid (K°).

III. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol ont été prélevés selon la technique de POCHON & TARDIEUX (1962). À l'aide d'une grande spatule stérile, les premières cinq centimètres de la couche superficielle du sol sont isolés, puis avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente présente entre 5 et 15 cm de profondeur (KITOUNI, 2007) 100 à 200 g de sol ont été collectés et déposés sur une feuille d'aluminium stérile sous forme d'une enveloppe.

Recueillir plusieurs échantillons de 500 ml eau de la source d'eau dans des récipients stériles et bien identifiés. L'acheminement des échantillons au laboratoire a été effectué à température ambiante d'environ 25°C, ainsi que l'isolement a été réalisé dans un délai maximal de 6h après le prélèvement (RODIER & LEGUBE, 2009 ; KITOUNI et al., 2005).

Afin d'isoler les actinobactéries endophytes, nous avons sélectionnés trois plantes végétales ayant une histoire ethnobotanique. Ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle, *Atriplex halimus* (L'gtaf), *Rosmarinus officinalis* (Laziir) et *Launaea arborescens* (Oum-el'bina). La récolte de matériel végétal a été réalisée le mois d'avril dans deux sites, l'université Tahri Mohamed et la commune de Kenadsa. Les plantes étudiées ont été récupérées et placées dans des récipients stériles appropriés, apportées au laboratoire et soumis aux procédures d'isolement.

Tableau n°9 : Présentation des sites de prélèvements

Sites	Position géographique sur Google Map	Nature de site	Région (Wilaya)	Date de prélèvement
KARZAZ	29°12'38.6''n 1°15'28.2''w	Sebkha (sebkhel El Melah)	Bechar	Mars 2014
KENADSA	31°31'45.4''n 2°31'37.8''w	Sebkha (près d'oued Messouer)		Mars 2015
	31°33'21.3''n, 2°26'22.7''w	Sol de K'sar Kenadsa		Mars 2014
IGLI	30°19'09.3''n, 2°15'41.5''w	Ancien k'sar de Mazzer source d'eau (Hammamet)		Mars 2014
BOUKAISS	31°55'33.9''n, 2°28'03.6''w	Sol et sédiment du Grotte (cave)		Mars 2015
TIMENTIT	28°03'38.4''n, 0°54'48.9''e	Sebkha	Adrar	Avril 2017
AOULEF	28° 19' 0'' n, 1° 38' 60'' e	Sol et mure d'Ancien k'sar		Avril 2017
TIMIMOUNE	29°25'02.6''n 0°14'29.7''e	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sol périphérique du « Mâdjen » ✓ Sediment du « Mâdjen » ✓ Eau de « Mâdjen » 	Timimoune	Mars 2019
BECHAR	31°36'14.6''n 2°13'56.8''w	À partir de plantes médicinales	Bechar	Mars 2021



Figure n°7 : Carte géographique présente les sites de prélèvement exploité (GOOGLE MAPS , 2019)

IV. Analyse physico-chimique du sol

IV.1. pH du sol

La détermination du pH du sol, consiste à préparer une solution sol - eau P/V et ajouter 0.01 M de CaCl₂, 2H₂O ou 1 N de suspension de KCl. Enfin placer l'électrode dans la suspension préparée et lire le pH à l'aide d'un pH-mètre (TANDON, 2005 ; PANSU & GAUTHEYROU, 2007 ; ESTEFAN et al., 2013).

IV.2. Conductivité et Salinité du sol

La conductivité permet de mesurer la possibilité que l'eau à transférer un courant électrique. Elle permet aussi d'évaluer la présence des sels amalgamés dans le sol. Une conductivité remblai traduit encore usuellement une salinité aidée (PANSU & GAUTHEYROU, 2007 ; RODIER & LEGUBE, 2009). La conductivité électrique a été mesurée par un conductimètre à 25°C, qui donne une indication sur la teneur en électrolytes hydrosolubles (salinité) et a été mesurée sur un extrait aqueux de sol (1/9 p/v) moyennant un conductimètre à électrode. Elle est effectuée après une demi-heure d'agitation et 5 min de repos (AFNOR, 1996 ; PANSU & GAUTHEYROU, 2007 ; ESTEFAN et al., 2013).

La salinité du sol fait référence à la concentration de sels inorganiques solubles dans le sol. Il est normalement mesuré en extraction de l'échantillon de sol avec de l'eau (rapport sol : eau 1 : 1 ou 1 : 5, p/v) ou dans un extrait saturé. Cependant, les rapports sol : solution de 1 : 1 ou plus sont plus appropriés lorsque la quantité de sol est limitée (PETARD, 1993 ; TANDON, 2005). La salinité est mesurée par conductimètre.

IV.3. Mesure de l'humidité

La détermination de la teneur en eau est effectuée par une dessiccation de l'échantillon dans une étuve réglée à 105 ± 2°C jusqu'à une masse constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opère dans des vases de tare, placés dans un dessiccateur (NIELSEN, 2010 ; ESTEFAN et al., 2013). Répéter l'opération jusqu'à poids constant. Le taux d'humidité d'un échantillon est donné par la formule suivante (PETARD, 1993 ; PANSU & GAUTHEYROU, 2007) :

Où : H : humidité.

P_t : poids de la tare.

P₀ : poids de la tare avec échantillon (sol).

P₁ : poids constant après séchage multiple.

$$H \% = \frac{(P_0 - P_t) - (P_1 - P_t) \times 100}{(P_0 - P_1)}$$

V. Isolement et dénombrement des microorganismes

Nous avons ciblé dans notre recherche, plusieurs groupes des micro-organismes, les moisissures, les Actinobactéries, les *Bacillus* et d'autres bactéries, à partir de divers échantillons plus particulièrement le sol, l'eau et les plantes. À cause de ces deux facteurs, la nature de l'échantillon et le type de microorganismes nous avons procédé à plusieurs techniques et manipulations, afin de préparer les échantillons et par conséquent extraire le maximum de micro-organismes.

V.1. Traitement des échantillons

V.1.1. Actinomycètes

Les échantillons de sols sont divisés en trois catégories. La première n'a subi aucun traitement. Alors que la deuxième catégorie, on a séché cinq (05) grammes à l'air puis ils sont mélangés à 0,1 g de CaCO_3 en poudre (TSAO *et al.*, 1960), puis incubés à 28°C (la température ambiante) pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (CAVALLA & EBERLIN, 1994). Enfin la troisième catégorie a été traitée sous une température de 110°C pendant 10 minutes (EI-NAKEEB & LECHEVALIER, 1963 ; KITOUNI, 2007).

Les échantillons d'eaux ont été partagé en deux volumes l'un reste sans traitement et l'autre subi un traitement par le phénol. On a mélangé sous agitation chaque échantillon d'eau avec du phénol à 7 mg/mL pendant 10 minutes. Le mélange a subi une filtration à travers une membrane millipore (0.45µm). Les spores d'actinomycètes ont été récupérées en agitant la membrane avec des billes de verres stériles de 4 mm de diamètre dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) (KITOUNI *et al.*, 2005 ; KITOUNI, 2007).

Les racines, les feuilles et les tiges des plantes utilisées pour l'isolement des actinomycètes endophytes, sont lavées par de l'eau du robinet pour éliminer complètement les particules et débris de sol de la surface et les épiphytes adhérents. Après cela les parties sont séchées à l'air libre pendant 48h à température ambiante. Avant de procéder à l'isolement, nos échantillons sont soumis à une procédure de stérilisation en surface en submergeant les tissus végétaux dans des concentration prédéterminée de différentes solutions dans l'ordre suivant : 1 min dans le tween 20 ; 4 à 10 min dans NaOCl (sodium hypochlorite, eau de javel) à 3% ; 10 min dans $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 2.5% (thiosulfate de sodium) ; 5 min à 75% l'éthanol et dans de l'eau stérile, enfin, un rinçage final dans du NaHCO_3 à 10% (bicarbonate de sodium) pendant 10 min. Après séchage complet dans des conditions stériles, les tissus stérilisés en surface ont été soumis à un séchage continu à 100°C pendant 14 minutes. Ensuite on a vérifié l'efficacité de la stérilisation par une expérience consiste à imprimer la partie de la plante sur la gélose ISP2. L'absence de la croissance microbienne, après l'incubation à 28°C, pendant 14 jours correspond à l'efficacité de la stérilisation (SCHULZ *et al.*, 1993 ; QIN *et al.*, 2016).

Selon les recommandations de **QIN et al. (2016)**, trois techniques d'ensemencement ont été utilisées :

✓ **Technique des morceaux**

Les échantillons ont été émiettés avec ciseaux stérile en petits fragments (0.2 x 0.5 cm), dont ils sont directement déposés sur les milieux d'isolement et maintenue à 28°C pendant 1 à 2 semaines (**YUAN et al., 2008**).

✓ **Technique d'enrichissement**

Un gramme (1 g) de chaque échantillon, a été mélangé à l'aide d'un mortier avec 0.5 g de carbonate de calcium en poudre. Dans une ambiante humide, le mélange a été maintenue à 28°C pendant 1 à 2 semaines. Après l'incubation, les parties des échantillons ont été diluées à 10^{-2} avec de l'eau stérile, ensuite des volumes de 200 µl ont été étalés sur les milieux d'isolement, l'incubation est faite pendant 14 jours à 28°C (**EEVERS et al., 2015**).

✓ **Technique des dilutions**

La solution mère a été préparée par 1g de chaque échantillon avec 9mL d'eau distillée stérile, après avoir été vortex la solution mère, 1mL de cette dernière est transféré vers un tube qui contient 9 mL d'eau distillée ainsi tenue jusqu'à la dilution 10^{-1} . La même opération est répétée à partir de dilution 10^{-1} pour la réalisation de la dilution 10^{-2} . Cent microlitres de chaque dilution ont été ensemencés sur boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture, ensuite et les boites sont incubées pendant 14 jours à 28°C (**EEVERS et al., 2015**).

V.1.2. Bacillus

Pour isoler les *Bacillus*, un gramme (1 g) de sol a été pesé avec précision et transféré dans 9mL d'eau stérile, mélanger suffisamment puis placer sur un agitateur rotatif à 120 tr/min pendant 30 min. Les échantillons ensuite ont été chauffés à 60°C pendant 60 min dans un bain d'eau (**CHILCOTT & WIGLEY, 1993 ; BOOTTANUN et al., 2017**). La solution obtenue a été diluée en série avec de l'eau distillée stérile (**PALLA et al., 2018**).

V.1.3. Autres groupes bactériens et les moisissures

Les autres bactéries et les moisissures ont été obtenus à partir des échantillons de sol, par la méthode de suspension dilution (**BADJI et al., 2005**). Cinq (05) grammes de sol ont été mis en

suspension dans 45 mL d'eau physiologique stérile puis des dilutions décimales (jusqu'à 10^{-9}) ont été réalisées. Un volume de 0.1 mL de chaque dilution a été étalé sur un milieu d'isolement approprié. Les boîtesensemencées ont été incubées selon la température de chaque groupe de microorganisme ; les bactéries 30°C pendant 48h à 72h et les moisissures à 25°C pendant 5 jours. La lecture est faite chaque jour. Notons que tous les essais ont été réalisés en triplicata.

V.2. Milieux d'isolement utilisés

Une large gamme de milieux de culture a été utilisée en tenant compte des microorganismes et la nature de l'échantillon (GUIRAUD, 1998) :

- ✓ **Les milieux** : Gélose ISP2, Gélose de la chitine modifier, Milieux Caséine Amidon Agar (CAA) et milieu de Bennett modifié, employé exclusivement pour l'isolement des actinomycètes (BELYAGOUBI, 2014 ; LI et al., 2017).
- ✓ **Les milieux** : TSA, milieu Luria Bertani Agar LBA et l'extrait de sol et Gélose nutritive pour les *Bacillus* et tous les autres groupes bactériens (LI et al., 2017).
- ✓ **Les milieux** : Potato Dextrose Agar acidifié (PDAA) (COMPAORE et al., 2016), Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) et milieu Soil Glucose Agar (SGA) pour l'isolement des moisissures (NGUYEN, 2007 ; LI et al., 2017).

Il est à noter que le milieu de culture destiné aux échantillons prélevés à partir de la sebkha contient 10% de NaCl. En outre pour pallier au problème de la vitesse de croissance différente entre les microorganismes cas des actinomycètes, 75 µg/mL d'amphotéricine B et 10 µg/mL d'acide nalidixique ont été additionnés aux milieux d'isolement pour inhiber respectivement le développement des champignons filamenteux et les bactéries à Gram négatif (BELYAGOUBI, 2014).

V.3. Purification et conservation

Tous nos isolats sont purifiés par repiquage successif sur les mêmes milieux d'isolement, ensuite, nous avons les conservés soit à -4°C en gélosée inclinée pour des utilisations fréquentes, ou à -20°C en suspension en présence de glycérol à 20 % (v/v) pour une conservation à long terme.

V.4. Identification des microorganismes

V.4.1. Actinomycètes

L'aspect phénotypique de la colonie des actinomycètes et les caractères culturels sont déterminés sur les milieux suivants : Bennett, ISP2 et TSA. Après l'incubation de deux à trois semaines, la croissance et le développement de mycélium sont observés. Nous avons aussi utilisé la technique

de culture sur lamelle (**WILLIAMS & CROSS, 1971 ; HOLT et al., 1994**), qui consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans ISP2 de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose entraînant quelques fragments du mycélium, elle est ensuite déposée sur la lame et examinée au microscope optique aux différents grossissements (**DJEBBAH et al., 2022**). Après l'observation à l'état frais on applique la coloration de Gram pour confirmer les résultats obtenus.

Toutes les autres bactéries isolées ont subi des tests biochimiques d'identification, puis elles sont identifiées selon les clés dichotomiques du Manuel de Bergey de bactériologie systématique (**WHITMAN et al., 2015**).

V.4.2. Bacillus

Nous avons examiné par coloration de Gram les colonies suspectes, ensuite les formes bâtonnet à Gram positif formant des spores ont été sélectionnées pour des éventuels tests d'identification.

Une coloration des spores permet d'identifier avec certitude une inclusion bacillaire comme spore. Cette coloration réalisée selon la technique suivante :

- ✓ Colorer avec une solution aqueuse de vert malachite à chaud : laisser 15 à 20 mn à partir de l'émission de vapeur.
- ✓ Laver à l'eau.
- ✓ Recolorer par une solution aqueuse de mercurochrome pendant une à deux mn.
- ✓ Laver égoutter, sécher au papier filtre.

NB : Les spores apparaissent colorées en vert, les bactéries en rouge.

Plusieurs tests d'identification, notamment l'hydrolyse du citrate, l'utilisation de différents substrats carbonés, la motilité, Voges-Proskauer VP, la recherche de l'uréase, la production d'indole, la catalase, la réduction des nitrates et la production de H₂S ont été effectués (**AMIN et al., 2015**). Après ces tests une galerie biochimique a été exploitée pour les identifier. Une recherche des enzymes extracellulaires a été faite, notamment l'hydrolyse de l'amidon ; l'hydrolyse de la gélatine ; l'hydrolyse de la caséine ; test de lécithinase ; action sur le lait écrémé.

V.4.3. Moisissures

L'identification des moisissures est basée essentiellement sur les caractères morphologiques :

V.4.3.1. Observation macroscopique

Il faut noter que chaque groupe de champignons, fait appel à des techniques propres à leur identification (FRISVAD *et al.*, 2005). On a réalisé plusieurs observations durant et après l'incubation à l'œil nu et au binoculaire notamment, de la couleur du revers de la colonie, de la vitesse de croissance, de la texture et de la couleur du thalle, ainsi que de la présence ou non d'un pigment diffusible, exsudat et odeur, toute on respecte les guides cités ci-dessous :

- ✓ Pour les *Penicillium*, les techniques utilisées consistent à inoculer les souches en trois points sur boîte de Pétri contenant soit le CzapekDox Agar (CzA) ou le Malt Extract Agar (MEA) à 2%. Puis, les cultures sont incubées à une température de 25°C (SAMSON & PITT, 2003 ; PITT & HOCKING, 2009).
- ✓ Pour les *Aspergillus*, la culture a été réalisée sur des CzA à 25°C. Les clés d'identification utilisées sont celles qui ont été proposées par RAPPER & FENNEL (1977) et par SAMSON *et al.* (1996).
- ✓ Pour les *Rhizopus* classés dans l'ordre des Mucorales, on a appliqué les clefs de détermination de ce genre selon SCHIPPER (1978) et CHABASSE *et al.* (2002).

V.4.3.2. Observation microscopiques (micro-culture)

La technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur des lames menées de petits carrés de gélose (4 x 4 mm) de PDAA solidifiés et les recouvrir par des lamelles. Les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubée à 30°C. Après 3 à 5 jours d'incubation, on dépose 2 à 3 gouttes de Lactophénol sur des nouvelles lames stériles afin de gonfler le mycélium et faciliter l'observation microscopique faite à l'agrandissement progressif (x10, x40, x100) des mycéliums. Cette observation à l'aide d'un microscope photonique nous permet à étudier le mycélium, la nature des organes différenciés et les fructifications (têtes conidiennes, spores, etc.) (RAPILLY, 1968 ; DAVET & ROUXEL, 1997).

VI. Evaluation de l'effet antimicrobien des isolats

L'évaluation de l'effet antimicrobien a été faite en deux étapes : la première étape nommée screening primaire, portée sur l'antagonisme entre les isolats et les souches tests ; alors que la deuxième étape nommée screening secondaire, est confirmative, elle consiste à sélectionner les isolats qui présentent un effet inhibiteur contre les pathogènes dans le premier screening, pour tester l'effet inhibiteur de leurs substances extracellulaires sur les bactéries tests.

Tous les microorganismes tests utilisés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne sont des souches de références, ils ont été conservés dans le laboratoire pédagogique de biologie de l'université Tahri Mohammed de Béchar (Cf. Tableau n°10).

Tableau n°10 : Origines des souches tests.

Souches pathogènes	Références	Origine des souches	Coloration de Gram des bactéries
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	L.P.B.U.T.M	Gram positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	L.P.B.U.T.M	Gram positif
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	L.P.B.U.T.M	Gram positif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	L.P.B.U.T.M	Gram négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	L.P.B.U.T.M	Gram négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	L.P.B.U.T.M	Gram négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		L.P.B.U.T.M	/
<i>Fusarium oxysporum f albidinis</i>		VRVSA	/
<i>Aspergillus niger</i>		VRVSA	/
<i>Aspergillus flavus</i>		VRVSA	
<i>Candida albicans</i>		VRVSA	/

VRVSA : Laboratoire de valorisation des plantes et ressources végétales et sécurités alimentaires des zones semi arides de la région sud-ouest Algérien.

L.P.B.U.T.M : Laboratoire pédagogique de Biologie à l'université Tahri Mohammed de Béchar.

Pour la confirmation des microorganismes tests, nous nous sommes basés sur des analyses macroscopiques et microscopiques. Une identification par la plaque API 20 a été utilisée afin de mieux authentifier les bactéries tests.

Un inoculum de tous les microorganismes étudiés est préparé à partir d'une culture jeune de 18 heures. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre fixé à la longueur d'onde de 620 nm de manière à obtenir une absorbance entre 0.08 à 0.1 qui correspond à une charge cellulaire 10^8 cellules/mL. Les souches tests sont ensuite inoculées sur le milieu Muller-Hinton (MH) (HADDOUCHI *et al.*, 2016 ; SFM, 2018). Dans le cas des moisissures, l'inoculum est ajusté à 10^5 conidies/mL à l'aide d'une cellule de Malassez (MELLOUL, 2015).

VI.1. Screening primaire de l'effet antimicrobien

VI.1.1. Technique de diffusion dans la gélose à l'aide de cylindre d'Agar

La technique consiste à ensemercer un tapis de l'isolat bactérien ou fongique sur un milieu gélose à l'aide d'un écouvillon. Puis les bactéries sont incubées à 30°C pendant 18 heures, les

actinomycètes sont incubés à 28°C pendant 7 jours et les moisissures sont incubées à 25°C pendant trois jours. Après l'incubation, un disque de géloses mesure 6mm de diamètre sont prélevés et déposés sur le milieu MH préalablement ensemencé par un microorganisme test à la manière d'un antibiogramme. Avant l'incubation, les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 4 heures pour les bactéries et les moisissures par contre les actinomycètes sont maintenues 18 heures (BOUCHAFFA, 2011). Le résultat positif a été traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance de la souche testée.

VI.1.2. Technique des stries transversales (Cross streak)

Cette méthode consiste à établir un ensemencement des isolats en stries parallèles (Cf. Figure n°8) les uns aux autres et en bas de la boîte une seule strie ensemencé de microorganisme test de façon perpendiculaire à ceux des isolats, l'incubation se fait à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les champignons (Lertcanawanichakul et Sawangnop,2008) .



Figure n°8 : Technique d'antagonisme entre les isolats et les microorganismes tests

VI.1.3. Technique de diffusion dans la gélose à l'aide de disque

Cette technique consiste à préparer une suspension bactérienne dans l'eau peptonée de 10^8 UFC/ml à partir d'une culture de gélose nutritive (GN), incubée à 30°C pendant 18 à 24 heures, puis on centrifuge la suspension à 5000 tours pendant 10 minutes, après la centrifugation on filtre sur papier Whatman 2 ,45 mm de diamètre. Parallèlement, à l'aide d'un écouvillon on ensemence en nappe les bactéries pathogènes sur le milieu de culture MH. Ensuite les disques de papier stérile ont été imprégnés dans le filtrat, séchés à température ambiante puis déposés en surface du milieu de culture MH. Les boîtes de Pétri sont ensuite maintenues à 4°C pendant 2 à 3h avant d'être incubées pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes actives dans le milieu de culture. Enfin, on réalise l'incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures. Après incubation la présence d'une zone claire autour des disques révèle la présence des substances antimicrobiennes dans le surnageant (KHOLKHAL, 2006).

VI.2. Screening secondaire de l'effet antimicrobien

VI.2.1. Fermentation et préparation des extraits

En se basant sur la méthode de culture en milieu liquide inspiré de la méthode décrite par **KHELIL KLOUCHE, (1998)** et **SAADOUN et al. (1999)**, qui consiste à inoculer des souches (les isolats) pures de concentration équivalente à 10^8 UFC/ml dans des flacons de 250 ml contenant 100 mL du milieu BN et soumis sous agitation. Après 72h d'incubation, le contenu de chaque flacon est centrifugé de 5000 tours pendant 20 min. Après la centrifugation, on sépare le surnageant du culot à l'aide d'un papier filtre et le surnageant sera récupéré. On prélève 6 mL du surnageant afin de le mélanger avec trois solvants de polarités différentes à raison de 6 mL, le n-butanol, le benzène et l'acétate d'éthyle, dans des tubes à essais (v/v). Les mélanges obtenus sont agités 10 min sur un vortex. Les différentes phases organiques sont testées contre les microorganismes pathogènes par la technique des puits.

VI.2.2. Technique de diffusion dans la gélose à partir des puits

Un ensemencement est fait en nappe des microorganismes-tests sur un milieu gélosé MH. Puis on a creusé des puits de 6 mm de diamètre en utilisant le bout d'une pipette Pasteur. Enfin, nous avons rempli les puits avec un volume de 50 μ L prélevé à partir de la phase organique des extraits préalablement préparés (**LERTCANAWANICHAKUL & SAWANGNOP, 2008**).

Les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 4h pour permettre la diffusion des substances actives, puis les incubées à 25°C pour les champignons-tests et 37°C pour les bactéries-tests. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour du puits après 24h (**LERTCANAWANICHAKUL & SAWANGNOP, 2008 ; VALANARASU et al., 2010**).

VI.2.3. Pré-détermination des substances secondaires par CCM

Une chromatographie sur papier a été faite selon la méthode de **BETINA**. Pour se faire nous avons choisi trois systèmes de solvants (A, B et C) :

- ✓ Système (A) Phase polaire (acide) : Isoamylacetate - méthanol - acide formique 99% - eau (40 : 20 : 10 : 30 ; V/V).
- ✓ Système (B) Phase polaire (neutre) : n-butanol - méthanol - eau (40 : 10 : 50 ; V/V).
- ✓ Système (C) Phase polaire (Basique) : benzène - cyclohexane - tampon phosphate 0.15M, pH 7.4 (5 : 35 : 60 ; V/V) (**KITOUNI, 2007**).

On a effectué les dépôts des spots de 100 μ l dans des emplacements repérer à l'avance, de nos extraits sur des plaques de CCM en gel de silice d'une dimension de (10cm /10cm), puis ces plaques

préparées ont été mises dans des cuves appropriés émergés a un niveau au-dessous de la ligne de dépôt qui a été tracé légèrement avec un crayon au bord inférieur de la plaque à une distance de 1 cm, chaque cuvette a été remplie par une solution composé d'un des systèmes cités ci-dessus (A, B et C), et l'atmosphère de la cuve doit être saturée en vapeur d'éluant. Ceci impose d'avoir une cuve bien fermée et préparée un certain temps à l'avance. Quand le front de l'éluant arrive à 0.5cm du bord supérieur, on retire doucement la plaque, et on marque au crayon le niveau atteint par le front de l'éluant (hauteur h). Puis après, les plaques ont été séchées à l'air afin d'évaporer l'éluant. La révélation se fait à la lumière U-V (longueurs d'onde 254 nm et 365 nm). Ainsi que, elle nous a permet de mesurer les hauteurs « h » de migration des différentes tâches et calculer les rapports frontaux (BENLARBI, 2019).

VII. Identification moléculaire des isolats par le gène ARNr 16S

Cette partie a été réalisée entièrement au laboratoire de biologie moléculaire des microorganismes (LBM) de l'université de Tunis-AL-Manar selon des protocoles validés, optimisés et propres à ce laboratoire. En pratique, l'identification moléculaire des microorganismes passe par plusieurs étapes :

1. L'extraction de l'ADN ;
2. Préparation du produit PCR ;
3. Migration électrophorétique de l'amplicon.
4. Le séquençage.

VII.1. Extraction de l'ADN des bactéries

A partir d'une culture jeune et pure on racle plusieurs colonies pour former une masse dense de cellules bactériennes. On mélange cette masse avec le TE dans un micro-tube Eppendorf. On met notre mélange dans un bain Marie réglé à une température de 100°C (l'ébullition) afin d'éclater les cellules et libérer l'ADN durant 10 minutes ; puis on le refroidit à une température de - 20°C durant 5 minutes (choc thermique). On centrifuge le mélange à environ 12000 rmp pendant 15 à 20 minutes et on récupère le surnageant, renfermant l'ADN, dans un autre Eppendorf. Pour vérifier la pureté de l'ADN on mesure sa concentration (≥ 250 ng/ μ l) à l'aide d'un nano-drop, la vérification des rapport protéines /ADN ($\geq 1.8 \leq 2$) ; ARN/ADN permet d'ajuster la masse de colonies prélevée au départ (SGROY et al., 2009 ; YARTE et al., 2022).

Le gène de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (appelé ADNr 16S) est l'outil principal utilisé pour l'identification moléculaire des actinomycètes. Il s'agit d'un gène chromosomique d'une taille d'environ 1500 paires de bases présentes chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans

toutes les espèces bactériennes. Ce gène est amplifié par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) grâce à une ADN polymérase (polymérase Taq) isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* (BERANGER, 2014).

On procède à la préparation des réactifs nécessaires à la PCR notamment : dNTP, MgCl₂, Taq, deux amorces 16S (R/F), TP, H₂O, ces derniers constituent le mix, ensuite on ajoute l'échantillon d'ADN. Le volume final préparé de mélange sera 25 µL. Enfin on dépose le mélange réactionnel de PCR dans le thermocycleur réglé au cycle de l'amplification de 16S ci-dessous :

Tableau n°11 : Récapitulatif du programme de thermocycleur

Cycle	Température	Temps
1 :	94.0	0h3m0s
2 :	94.0	0h0m45s
3 :	56.0	0h1m0s
4 :	72.0	0h2m0s
5 :	72.0	0h7m0s
6 :	4.0	Pause

Les amplicons sont vérifiés sur gel d'agarose de 2%. Puis, on a déterminé les séquences de ces produits de la PCR selon le principe de la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence.

VII.2. Analyse par l'outil BLAST et création de l'arbre phylogénétique

L'analyse phylogénétique est l'un des outils indispensables de la biologie évolutive. Elle s'inspire de l'idée d'arbre généalogique. Historiquement, généalogistes et naturalistes ont été les premiers à populariser la visualisation des arbres. En outre, ils ont été utilisés vivement par **CHARLES DARWIN** dans son livre sur l'origine des espèces, qui est depuis devenu une référence. Mais, si l'on remonte dans l'histoire, c'est **WILLI HENNIG**, le père des cladistiques, qui était responsable de la démocratisation des arbres phylogénétiques. De plus, **CHARLES DARWIN** les réutilisa allègrement en 1859 dans son ouvrage devenu référence de l'origine des espèces. Mais si l'on cherche le précurseur historique, c'est en réalité **WILLI HENNIG**, père de la cladistique, qui a réussi à démocratiser les arbres phylogénétiques (Tagu & Risler, 2010).

Il existe plusieurs méthodes pour construire des arbres phylogénétiques. Ces méthodes peuvent se regrouper en trois catégories : méthodes cladistiques, méthodes phénétiques et méthodes

probabilistes. En effet, en fonction des besoins, plusieurs méthodes de génération d'arbres employant différents algorithmes existent et peuvent être utilisées (MACEY, 2002 ; PEVZNER & PUECH, 2006).

La méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) est une méthode focalisée sur la distance, car elle est basée sur les similarités entre paires de séquences. Cette méthode a été dépassée dès l'arrivée de la méthode du **NEIGHBOUR JOINING** (NJ) qui est aussi une méthode de distance, mais elle est remarquablement rapide. De ce fait, elle est convenable pour réaliser des arbres constitués en plusieurs milliers de séquences (TAGU & RISLER, 2010). Une autre méthode dite maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood- ML) : elle est dite de caractère(s), elle repose sur un ou plusieurs caractères à étudier. En réalité, il s'agit d'une méthode probabiliste qui nécessite un modèle d'évolution. Souvent elle décrite comme étant la meilleure méthode, car elle est efficace pour trouver l'arbre le plus proche de la réalité. L'extrêmement lenteur pour faire les calculs la rendre désavantageuse méthode. La méthode du maximum de parcimonie (Maximum Parsimony) : elle est très appréciée car rapide en temps de calcul, mais pas aussi précise que la précédente (ML) (BONNIN & LOMBARD, 2019 ; MACEY, 2002).

Les données de séquençage d'ADN de nos isolats ont été comparées par rapport aux données **GenBank** utilisant l'outil **BLAST** dans le **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ainsi que l'arbre phylogénétique a été réalisé par un outil puissant de la bio-informatique est le logiciel MEGA 11.



Chapitre V

Résultats et discussion



CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Présentation des sites d'échantillonnage

La wilaya de Béchar a un climat de type désertique avec un climat continental, où les étés sont chauds et secs et les hivers sont froids. Les vents de sable sont fréquents et souvent violents. **OUBADI et al. (2020)** a divisé la wilaya de Béchar en deux zones distinctes, à savoir :

« - La zone de transition délimitée par Béni Ounif au nord et le parallèle d'Igli au sud ; très chaude en été et froid rude en hiver. Les précipitations sont un peu plus de 100 mm/an.

- La zone désertique occupe toute la partie sud de la wilaya, avec un régime pluviométrique très faible. Les vents de sable sont très fréquents. »

Les changements de température diurnes ou saisonniers, et la température du sol atteignent des valeurs très élevées en été qui dure plus de six mois. Cela affectera généralement le sol protégé par une végétation dégradée (**OUBADI et al., 2020**).

La wilaya d'Adrar est composée de quatre grandes régions : Gourara (région de Timimoun), Touat (région d'Adrar), Tidikelt (région d'Aoulef) et Tanezrouft (région de Bordj Badji Mokhtar) (**SOPIA et al., 2020**). Cette région se caractérise par un climat chaud et sec, et une amplitude thermique diurne très importante. En effet, les températures maximales peuvent atteindre 50°C dans la saison d'été (**OUVRANE & AOUR, 2018**).

I.1. Etude climatologique

L'étude du climat est une étape indispensable dans tout fonctionnement des écosystèmes. En effet, la pluie avec la température constitue la charnière du climat, elles influent directement sur la végétation d'une part, et sur la vie et le développement des espèces animales d'autre part (**EMBERGER, 1930**).

I.1.1. Pluviométrie

Le régime pluviométrique au Sahara est irrégulier, les pluies peuvent survenir à n'importe quelle saison, dépourvue d'une répartition régulière. **EMBERGER (1930)** définit le climat saharien par celui caractérisé par des précipitations n'ayant pas lieu tous les ans et qui peuvent survenir à tout

moment de l'année. L'origine des précipitations est variable selon les saisons. En été, elles sont dues aux dépressions de moussons. En hiver ces dépressions accompagnent la migration des fronts polaires vers le sud, tandis qu'en saison intermédiaire, les précipitations sont dues aux dépressions Soudan-Sahariennes, traversant les Sahara (DUBIEF, 1963).

Dans les tableaux suivants nous présentons les moyennes annuelles de précipitations des deux stations sujets de notre recherche (Cf. tableaux n°12 et 13).

Tableau n°12 : Moyennes annuelles des précipitations (Béchar 1991-2020)

	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Sep	Oct	Nov	Dec	Aout	Annuelle
P (mm)	2.3	3	4.4	4.7	13.7	7.5	7.1	1.1	4.5	4.4	2.7	2.2	57.6

Tableau n°13 : Moyennes annuelles des précipitations (Adrar 1991-2020)

	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Sep	Oct	Nov	Dec	Annuelle
P (mm)	10.3	11.1	17.1	19.2	12.1	9.2	2.7	4.5	10.7	19.8	27.1	12.7	156.5

1.1.2. Température

La température est considérée comme un facteur abiotique fondamental par l'association directe de son action sur les êtres vivants et leur environnement. Comme tous les autres facteurs climatiques, nous considérons la température moyenne « T », la moyenne des maxima « M » et celle des minima « m », ayant une signification biologique pour connaître la variation des températures (EMBERGER, 1930).

Dans les tableaux suivants nous présentons Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle des deux stations sujets de notre recherche (Cf. Tableaux n°14 et 15).

Tableau n°14 : Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle de la station météorologique de Béchar (1991-2020)

T °C	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Sep	Oct	Nov	Dec	Annuelle
Max	16.5	18.7	22.9	26.9	31.6	36.8	40.9	39.6	34.3	28.2	21.2	17.2	27.9
Min	3.5	6	10	14.4	19	23.7	27.7	27	22.3	16.2	9.2	4.9	15.3
Moy	10	12.4	16.4	20.7	25.3	30.2	34.3	33.3	28.3	22.2	15.2	11	24.24

Tableau n°15 : Températures minimales, maximales et moyennes mensuelles interannuelle de la station météorologique d’Adrar (1991-2020).

T °C	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Annuelle
Max	41.0	34.5	26.8	22.1	21.2	24.3	28.8	33.7	38.2	43.1	46.2	44.9	33.7
Min	25.3	19.0	11.4	6.9	5.4	8.2	12.2	16.7	21.4	25.7	29.0	28.6	17.5
Moy	33.15	26.75	19.1	14.5	13.3	16.25	20.5	25.2	29.8	34.4	37.6	36.75	25.6

1.1.3. Climagramme d’Emberger Stewart

Les stations climatiques de référence prises en considération sont placées sur le climagramme d’EMBERGER (Cf. Figure n°9), en fonction des valeurs calculées de (Q₂) et (m) indiquées dans la figure suivante :

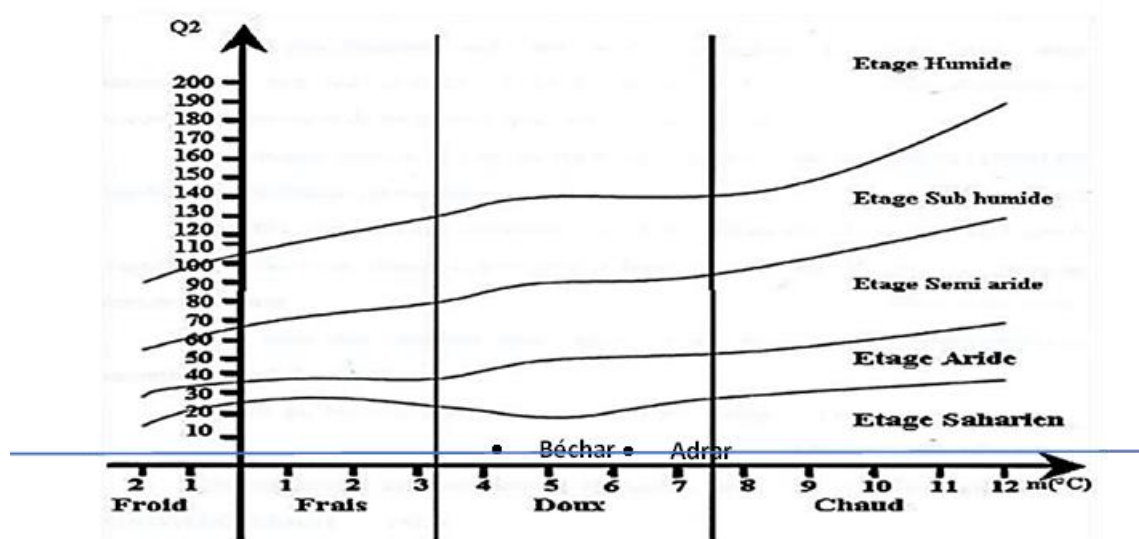


Figure n°9 : Climagramme pluviométrique d’EMBERGER STEWART (1991-2020)

Tableau n°16 : Détermination de l'étage bioclimatique des stations de Béchar et d'Adrar.

Station	Q_2	$m(C^\circ)$	Etage bioclimatique
Station de Béchar	$Q_2 = 14.16$	$m(C^\circ) = 3.5$	Etage bioclimatique saharien à hiver doux
Station d'Adrar	$Q_2 = 4.72$	$m(C^\circ) = 5.4$	Etage bioclimatique saharien à hiver doux

I.1.4. Diagramme ombrothermique

BAGNOULS & GAUSSEN (1957), ont optimisé l'utilisation des températures et des précipitations considérées comme les seuls paramètres les mieux enregistrés, en les figurant ensemble, cela permet de suivre l'évolution des deux paramètres en même temps. L'échelle préconisée par ces auteurs est $P=2T$, ou P est exprimé en mm et T en C° , (**BAGNOULS & GAUSSEN, 1957**). Nous avons tracé les diagrammes ombrothermiques pour l'ensemble de vingt-neuf années. L'analyse des diagrammes donne les résultats suivants :

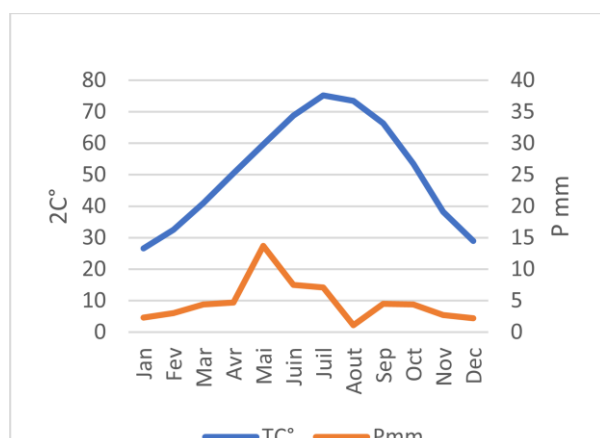


Figure n°10 : Diagramme ombrothermique région de Béchar. **BAGNOULS & GAUSSEN (1991-2020)**

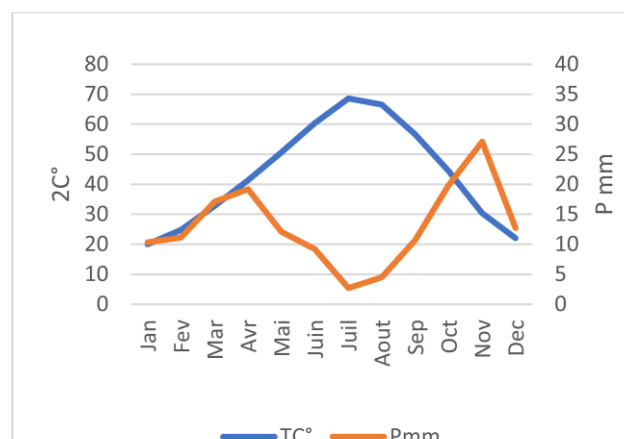


Figure n°11 : Diagramme ombrothermique région d'Adrar. **BAGNOULS & GAUSSEN (1991-2020)**

À partir du diagramme ombrothermique (Cf. Figure n°10), la saison de Béchar caractérisée par une période chaude qui s'étale du mois d'avril jusqu'au mois d'octobre, et période humide qui s'étale d'octobre à avril. Alors que l'autre station d'Adrar (Cf. Figure n°11) est caractérisée par une période chaude qui s'étale durant toute l'année et c'est également le même caractère pour la période humide.

II. Analyse physico-chimique

Les résultats obtenus de l'analyse physicochimique des échantillons de sol sont regroupés dans le (Cf. Tableaux n°17). Il est à noter que la valeur pour chaque paramètre représente la moyenne du tripliqué d'essais.

Tableau n°17 : Résultats obtenus de l'analyse physicochimique des échantillons de sol

Paramètres Sites	Echantillon	pH	Humidité (%)	Conductivité (mS/cm)	Salinité (meq/100 g de sol)
Boukais	Sol	8.30	6.37 faible	4.12 salés	2.18
Kenadsa	Sebkha	8.2	7.21 faible	12.01 très salé	13.37
	Sol (du Ksar)	6.44	3.55 faible	0.9 non salé	0.85
Igli	Sol	7.9	4.2 faible	0.48 non salé	0.44
Kerzaz	Sebkha	7.5	21.8 élevé	13.95 très salé	15.72
Timentit	Sebkha	7.16	2 faible	60.16 extrêmement salé	79.96
Aoulef	Sol (du Ksar)	8.6	0.54 faible	9.7 Très salé	10.62
Bechar	Plantes médicinales	/	/	/	/
Timimoune	Sol périphérique du « Mâdjen »	8	8.14	2.35 Salé	1.131
	Sédiment du « Mâdjen »	8.04	7.98	2.57 Très salé	1.243
	Eau de « Mâdjen »	7.4	/	7.90 extrêmement salé	4.099

II.1. pH

Le pH du sol est l'une des mesures les plus indicatives des propriétés chimiques. Toutes les réactions chimiques et/ou biologiques dans les sols sont influencées par l'activité des protons (H^+), qui est mesurée par le pH. On distingue cinq classes de sol selon l'échelle ci-dessus (PANSU & GAUTHEYROU, 2007) :

- pH < 5 : Sol très acide ;
- pH < 6.5 : Sol acide ;
- pH = 7 (entre 6.5 et 7.5) : Sol neutre, ni acide ni alcalin ;
- pH > 7.5 : Sol alcalin (ou basique) ;
- pH > 8 : Sol très basique.

Les valeurs enregistrées du pH de nos échantillons varient entre 6.44 et 8.6 et selon l'échelle ci-dessus on a constaté que le sol d'Aoulef et de Boukais ainsi que le Sebkha de Kenadsa sont des sols très alcalins. Le sol périphérique et celui des sédiments du « Mâdjen » de Timimoune sont classés comme des sols alcalins. La sebkha de Timentit, eau de « Mâdjen » de Timimoune et de Kerzaz leurs sols sont neutres, alors que le sol d'Igli est alcalin, par contre le sol de Ksar Kenadsa est acide.

Les valeurs du pH de la plupart des sols naturels varient entre 3.00 (extrêmement acide) et 8.00 (faiblement alcalin). Ce paramètre est influencé par divers facteurs, notamment la nature et le type de constituants inorganiques et organiques (qui contribuent à l'acidité du sol), le rapport sol/solution, la teneur en sel ou en électrolyte et la pression partielle de CO₂. Dans ces régions arides et sahariennes, les sols sont généralement alcalins (7.5 < pH < 8.5) (BOUDERHEM, 2018). La salinité élevée des sols agit directement sur le pH et le taux d'humidité. Elle abaisse le potentiel hydrique et réduit fortement la disponibilité de l'eau (LOYER, 1991). Les sols acides (à pH < 7) on les trouve généralement dans les régions humides. Dans ces sols, la concentration en ions H⁺ dépasse celle des ions OH⁻ (TAN, 2010). Une étude classe la Sebkhha de Ouargla dans les catégories salines à alcalines (BOUTELLI et al., 2017) cela concorde avec nos résultats. Ceci est due à la prédominance des sels alcalins, et aussi à la faiblesse du pouvoir tampon intimement liée à la texture du sol (taux d'argile inférieur à 26.2%) (BOUMARAF, 2013).

II.2. Humidité

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Selon LEE & HWANG (2002) le taux d'humidité d'un sol est considéré comme :

- Faible si le pourcentage d'humidité est compris entre (2.0 et 9.0) ;
- Modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9.1 à 13.0 ;
- Elevé si les valeurs sont comprises entre 13.1 et 20.0.

Dans notre cas tous les échantillons sont des sols présentant un taux d'humidité faible allant de 2% jusqu'à 7.21%, sauf le sol de Sebkhhat Karzaz qui a montré un taux élevé d'humidité de l'ordre de 21.7%. Nous avons aussi constaté que le sol d'Aoulef montre un taux aux catégories.

Ce résultat peut être expliqué par la faible humidité du sol saharien et d'autre part par la richesse du sol en argile (COOK, 1993). Ainsi cette teneur peut être expliquée par les faibles humidités relatives des sols sahariens (BOUDERHEM, 2018).

II.3. Conductivité et salinité

Nos échantillons se sont montrés variables selon l'échelle ci-dessous, les sols de Kenadsa et Igli sont classés non salés, le sol de Boukais est un sol salé, la sebkhha de Kenadsa et celui de Kerzaz ainsi que le sol de ksar Aoulef se sont révélés très salés, la sebkhha de Tementit est un sol classé extrêmement salé (Cf. Tableau n°18).

Par définition la salinité est la quantité de sel dissout par kilo d'eau de mer. L'origine des sels responsables de cette salinité est diverse : marine actuelle ou ancienne, pétrographique due aux ions libérés par l'altération de certaines roches sédimentaire, volcanique, hydrothermale, éolienne apportée par des embruns ; elle est aussi très souvent anthropique induite par la mise en valeur hydroagricole et autres aménagements (eaux d'irrigation, remontées de nappes phréatiques, engrais, solutions nutritives des serres et des cultures hors-sol, effluents urbains, etc.).

L'absence totale de la végétation, la température élevée, la rareté des pluies et la forte évaporation pourraient expliquer les quantités de sels solubles dans les échantillons de sol (**HALILAT, 1998**).

Il faut noter que les nappes des calcaires du Turonien et Carbonifère, qui par leur étendue et leur épaisseur, renferment des quantités d'eau appréciables. Mais les eaux de ces nappes ne sont exploitables que dans les environs de la ville de Béchar. Vers l'ouest en direction de Kenadsa ; l'eau est salée, à cause de la présence du Sénonien salifère. Selon Hydrotechneco les potentialités effectives ne doivent excéder le niveau d'exploitation de l'époque (**1975**) soit 80 l/s (2.5 Hm³/an) (**OUBADI et al., 2020**).

Tableau n° 18 : Echelle de la salinité en fonction de la conductivité électrique (**SERVANT, 1975**).

CE (mS/cm)	Degré de salinité
0 – 2	Sol non sale
2 – 4	Sol peu sale
4 – 8	Sol sale
8 – 20	Sol très sale
> 20	Sol extrêmement salé

III. Isolement et dénombrement des microorganismes

Les deux tableaux suivants représentent un état récapitulatif des isolements faits selon les sites de prélèvement et les milieux d'isolement utilisés (Cf. Tableau n°19) :

Tableau n°19 : Tableau récapitulatif des résultats d'isolement des microorganismes

Sites de prélèvements	Types d'isolats	Traitement physique (C°)			Milieux de culture				Nombre Totale	(%)
		Bennett	ISP2	TSA	SGA	PDA	GN	TSA		
Ksar Sidi Charef BEN	Fongiques	/	/	/	IND	06	/	/	06	2
Aissa à Aoulef (Adrar)	Bacillus	/	/	/	00	/	8	4	12	4
Sebkha Timentit (Adrar)	Bactéries	/	/	/	02	/	16	10	28	10
Caverne Mazer d' Igli (Bechar)	Fongiques	/	/	/	IND	21	/	/	21	8
	Bactéries	/	/	/	/	/	8	16	24	9
Caverne Boukais (Bechar)	Fongiques	/	/	/	IND	12	/	/	12	4
	Bactéries	/	/	/	04	/	12	08	24	9
Sebkha de Kenadsa (Bechar)	Bactéries	/	/	/	/	/	16	18	34	12
	Fongiques	/	/	/	/	12	/	/	12	4
Ksar Kenadsa (Béchar)	Actinomycètes	03	06	00	/	/	/	/	09	3
Timimoune (Adrar)	Actinomycètes	05	10	03	/	/	/	/	18	6
Sebkha de Karzaz (Béchar)	Fongiques	/	/	/	IND	05	/	/	05	2
	Bactéries	/	/	/	/	/	15	30	45	16
Béchar (la ville)	Actinomycetes endophytes des plantes médicinales	/	30	/	/	/	/	/	30	11
TOTALE									280	100

IND : indénumbrables

Tableau n°20 : Tableau récapitulatif de la distribution des isolats en groupes

Isolats		Totale		Pourcentage	
Fongiques		56		20 %	
Bactéries	Autres bactéries	155	224	58 %	80 %
	Bacillus	12		4 %	
	Actinomycètes	57		20 %	

Les isolats fongiques sont en nombre de cinquante-six (56), ce qui correspond à 20% des microorganismes isolés. A l'aide des clés d'identification de **PITT & HOCKING (2009)**, nous avons pu

constater la dominance de deux genres *Penicillium* et *Aspergillus*, elles sont très résistantes à la sécheresse et constituent la flore fongique principale du sol (DOMMERMUES & MANGENOT, 1970).

Nous avons constaté que le genre le plus dominant des isolats fongiques est le genre *Aspergillus*. Il représente 50%, il est caractérisé par un thalle cloisonné portant de nombreux conidiophores, dressé, non ramifié, terminé en vésicules ; des conidies globuleuses ou elliptiques, en chaîne divergente ou associée en colonnes compactes. Cette identification correspond aux caractéristiques des souches isolées par BOUTALBA (1997). Les résultats d'identification sont présentés dans les tableaux n°21 et n°22.

Les aspects microscopiques indiquent que trente-neuf (39%) souches présentant un thalle blanc ouvert, conidiophores groupés en faisceaux lâches ou agrégés, des pénicilles mono, bi ou tri verticillées, phialides ampliformes et des conidies disposées en chaîne ; elles sont soit globuleuses, elliptiques ou cylindriques, lisses ou rugueuses. Ce sont les caractéristiques des espèces du genre *Penicillium*. Cette identification concorde avec les études réalisées par BOUTALBA (1997). Ces souches sont autochtones, habituellement isolées à partir du sol (ALVAREZ-RODRIGUEZ et al., 2002). Les espèces identifiées sont regroupées dans les tableaux ci-dessous.

Les genres *Géotrichum*, *Moniliella*, *Chrysonilia*, *Cladosporium* et *Alternaria* sont identifiés mais ils sont moins présents dans nos échantillons que les genres présentés ci-dessus (Cf. Figure n°12).

Ces microorganismes ubiquistes se développent parfaitement en présence d'une activité d'eau importante d'une part et se conservent dans les conditions extrêmes par la formation de conidies et de différentes formes de rhisomorphes et de spores sexuées d'autre part (GRISHKAN et al., 2006 ; MARTIN, 2011).

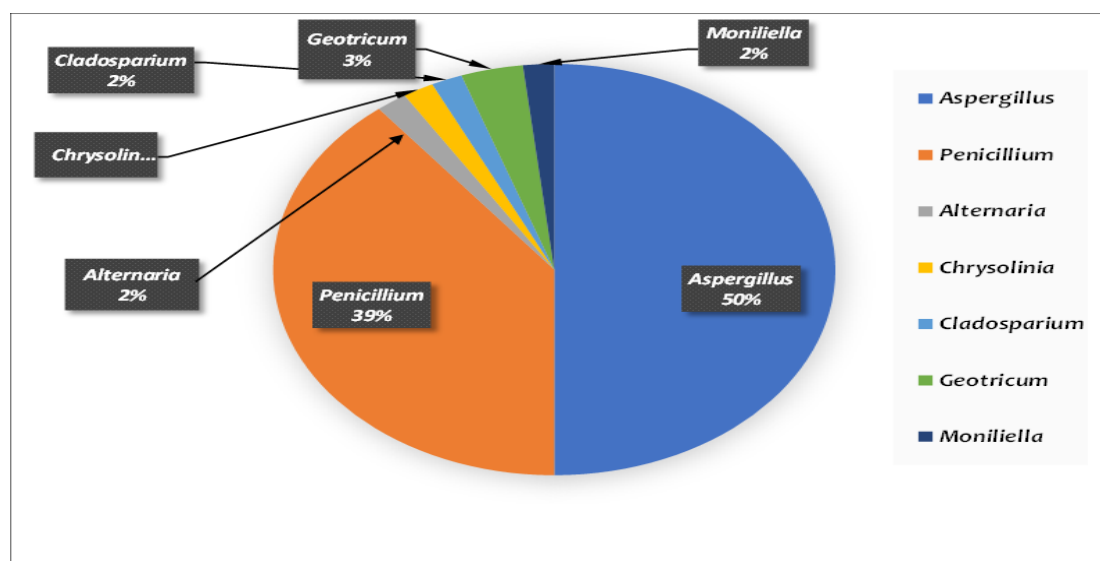
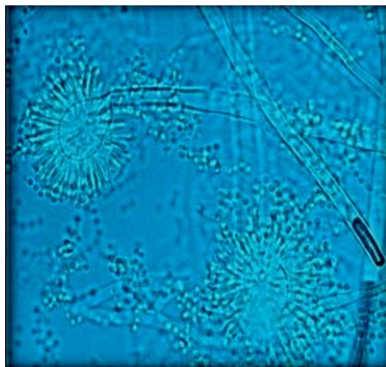


Figure n°12 : Distribution des isolats fongiques

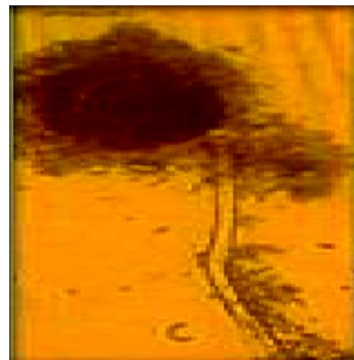
Tableau n°21. Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore
(Site de KENADSA) (Cf. Planche n°4)

Genres espèces	Milieu de culture	Observations macroscopiques		Aspects des observations microscopiques
		Couleur	Diamètre (mm)	
<i>Aspergillus carbonarius</i> S4	CYA 37°C	Crème	61	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs - Conidies : sphériques, globuleuses.
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Jaune clair avec des brillants roses	47	
	MEA 25°C	Points noirs dispersés	37	
	G25N 25°C	Blanc	31	
	PDA	Blanc avec des points noirs	46	
<i>Aspergillus flavus</i> S5	Revers plate	Jaune	-	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs - Conidies : sphériques à subspheroidal, globuleuses à subglobuleuses.
	CYA 37°C	Vert	55	
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Vert pistache avec contour blanc	57	
	MEA 25°C	Points noirs dispersés	37	
	G25N 25°C	Crème	17	
<i>Aspergillus fumigatus</i> S8	PDA	Noir	36	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs - Phialides : serrés. - Conidies : sphériques à subspheroidal.
	Revers plate	Marron clair	-	
	CYA 37°C	Vert	34	
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Vert pistache	41	
	MEA 25°C	Point noir dispersé	39	
<i>Aspergillus spp.</i> S1	G25N 25°C	Marron	29	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes à fleur de terre ou extérieurs - Conidies : sphériques subspheroidal, globuleuses à subglobuleuses.
	PDA	Point noir comme poudre	47	
	Revers plate	Jaune	-	
	CYA 37°C	Vert	55	
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Vert pistache	6	
<i>Aspergillus glaucus</i> S9	MEA 25°C	Points noirs	40	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs - Conidies : sphériques, globuleuses, brunes.
	G25N 25°C	Blanc cassé	31	
	PDA	Noir	45	
	Revers plate	Crème	-	
	CYA 37°C	Vert	58	
	CYA 5°C	Absence	-	
<i>Penicillium implicatum</i> S6	CYA 25°C	Vert pistache	37	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs - Conidies : sphériques, globuleuses, brunes.
	MEA 25°C	Noir	42	
	G25N 25°C	Blanc	27	
	PDA	Noir	38	
	Revers plate	Jaune	-	
	CYA 37°C	Absence	-	
<i>Penicillium variable</i> S11	CYA 5°C	Absence	-	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs. - Phialides : ampulliform à acerose ou presque cylindrique. - Conidies : sphérique à subsphéroïde.
	CYA 25°C	Blanc	22	
	MEA 25°C	Crème	13	
	G25N 25°C	Blanc	17	
	PDA	Vert avec des gouttelettes jaunes	18	
	Revers plate	Crème	-	
<i>Geotrichum spp.</i> S3	CYA 37°C	Absence	-	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs. - Phialides : ampulliform à acerose ou presque cylindrique. - Conidies : sphérique à subsphéroïde.
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Blanc	17	
	MEA 25°C	Crème avec centre noir	13	
	G25N 25°C	Blanc	14	
	PDA	Vert avec des gouttelettes jaunes	19	
<i>Geotrichum spp.</i> S3	Revers plate	Blanc cassé	-	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphes : septés rampants, à embranchements dichotomiques.
	CYA 37°C	Vert	6	
	CYA 5°C	Blanc	11	
	CYA 25°C	Crème	38	
	MEA 25°C	Vert avec des points noirs	32	
	G25N 25°C	Marron	11	
PDA	Vert	29		

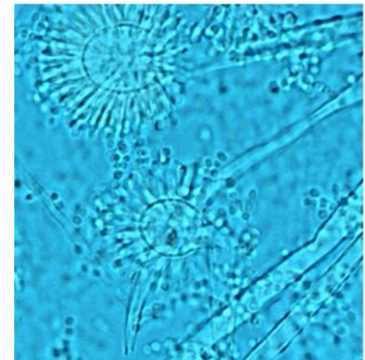
	Revers plate	Marron foncé	-	- Conidies : cylindriques, en forme de tonneau à ellipsoïdales.
<i>Geotrichum</i> spp. S10	CYA 37°C	Absence	-	- Hyphes : septés rampants, à embranchements dichotomiques. - Conidies : cylindriques, en forme de tonneau à ellipsoïdales.
	CYA 5°C	Absence	-	
	CYA 25°C	Vert pistache	28	
	MEA 25°C	Vert	19	
	G25N 25°C	Absence	-	
	PDA	Blanc avec centre noir	36	
	Revers plate	Vert pistache	-	
<i>Alternaria alternata</i> S2	CYA 37°C	Absence	-	- Conidies : ovoïdes. Elles portent souvent à leur extrémité un bec conique à cylindrique, brun et court. - Conidiophores : sont simples, lisses, parfois ramifiées, courts ou allongés.
	CYA 5°C	Crème	20	
	CYA 25°C	Blanc avec centre gris	37	
	MEA 25°C	Marron	35	
	G25N 25°C	Crème	10	
	PDA	Blanc	30	
	Revers plate	Marron	-	
<i>Chrysonilia</i> spp. S7	CYA 37°C	Absence	-	- Conidiophores : non différencié - Arthrospores : sont hyalines portées sur des conidiophores.
	CYA 5°C	Blanc	9	
	CYA 25°C	Marron	34	
	MEA 25°C	Vert avec centre noir	30	
	G25N 25°C	Blanc	10	
	PDA	Vert	29	
	Revers plate	Marron	-	
<i>Moniliella</i> spp. S16	CYA 37°C	Marron plié	Toute la boîte	- Hyphes : large, hyaline. - Conidies : ellipsoïdale, hyaline ou sub-hyaline, court cylindrique.
	CYA 5°C	Vert grisâtre	20	
	CYA 25°C	Absence	41	
	MEA 25°C	Absence	-	
	G25N 25°C	Blanc avec des points noirs	-	
	PDA	Blanc	Toute la boîte	
	Revers plate	Blanc	-	



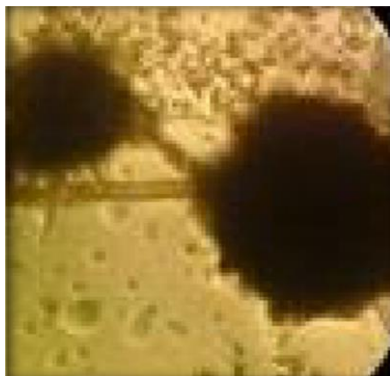
Aspergillus spp S1



Aspergillus carbonarius S4



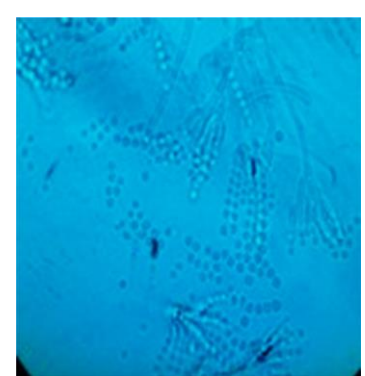
Aspergillus flavus S5



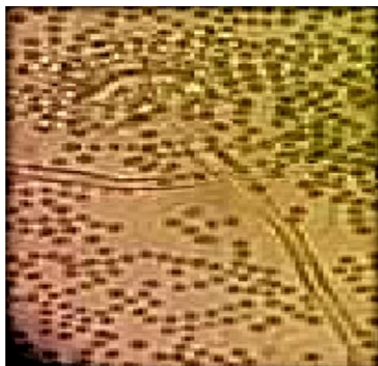
Aspergillus fumigatus S8



Aspergillus glaucus S9



Penicillium implicatum S6



Penicillium variable S11



Geotrichum spp. S3



Geotrichum spp. S10



Alternaria alternata S2



Chrysonilia spp S7



Moniliella spp S16

Tableau n°22 : Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore
(Site de MAZZER) (Cf. Planche n°5)

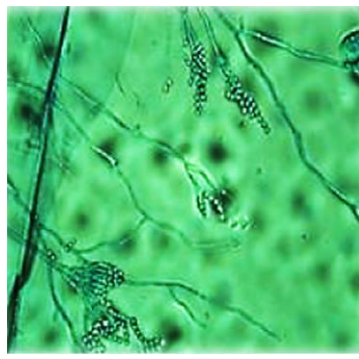
Genres espèces	Milieu de culture	Observations macroscopiques		Aspects des observations microscopiques
		Couleur	Diamètre (mm)	
<i>Penicillium hirsutum</i> S3	MEA 25°C	Vert grisâtre au vert mat	36	- Conidiophores : soutenu des hyphes à la surface. - Phialides : ampulliform, lisses. - Conidies : sphériques.
	PDA 25°C	Vert mat	25	
	G25N 25°C	Blanc au jaune	63	
	CYA 25°C	Blanches au jaune	39	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium nalgiovense</i> S11	MEA 25°C	Vert mat	39	/
	PDA 25°C	Vert grisâtre	31	
	G25N 25°C	Crème	65	
	CYA 25°C	Blanc au vert mat	49	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium citrinum</i> S13	MEA 25°C	Gris + contour blanc	34	/
	PDA 25°C	Blanc avec fissures	23	
	G25N 25°C	Blanc	39	
	CYA 25°C	Blanc	43	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium pelacanicum</i> S18	MEA 25°C	Vert grisâtre	35	- Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs. - Phialides : ampulliform à acerose ou presque cylindrique. - Conidies : sphérique à sub-sphéroïde.
	PDA 25°C	Blanc verdâtre	33	
	G25N 25°C	Beige	52	
	CYA 25°C	Blanc avec fissures	40	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium velutinum</i> S20	MEA 25°C	Vert foncé	31	/
	PDA 25°C	Vert entour blanc	18	
	G25N 25°C	Blanc rose	50	
	CYA 25°C	Absence	Absence	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium chrysogenum</i> S21	MEA 25°C	Turquoise lourde et grisâtre au vert mat	49	/
	PDA 25°C	Vert foncé	25	
	G25N 25°C	Absence	Absence	
	CYA 25°C	Blanc à jaunâtre	50	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium crustosum</i> S23	MEA 25°C	Vert mat	38	/
	PDA 25°C	Vert foncé	26	
	G25N 25°C	Absence	Absence	
	CYA 25°C	Blanc au vert mat	49	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium pelacanicum</i> S30	MEA 25°C	Vert foncé	27	/
	PDA 25°C	Vert mat	31	
	G25N 25°C	Marron	61	
	CYA 25°C	Gris	62	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
<i>Penicillium sp.</i> S31	MEA 25°C	Vert grisâtre	27	/
	PDA 25°C	Ver foncé	31	
	G25N 25°C	Vert grisâtre	61	
	CYA 25°C	Gris	62	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	MEA 25°C	Gris contour jaune	58	

Penicillium citreonigrum S42	PDA 25°C	Gris contour jaune	25	- Conidiophores : soutenu des hyphes aériens. - Phialides : ampulliform. - Conidies : sphériques.
	G25N 25°C	Crème	50	
	CYA 25°C	Crème	46	
	CYA 37°C	Marron foncé	78	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Penicillium brevicompactum S43	MEA 25°C	Vert foncé	31	/
	PDA 25°C	Absence	Absence	
	G25N 25°C	Beige	51	
	CYA 25°C	Beige	46	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Penicillium glabrum S51	MEA 25°C	Vert mat	34	/
	PDA 25°C	Vert foncé	18	
	G25N 25°C	Absence	Absence	
	CYA 25°C	Vert grisâtre	54	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	CYA 5°C	Blanc	43	
Penicillium griseopurpureum S57	MEA 25°C	Vert grisâtre	40	/
	PDA 25°C	Absence	Absence	
	G25N 25°C	Rose pale	50	
	CYA 25°C	Absence	Absence	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	CYA 5°C	Blanc	20	
Aspergillus terreus S26	MEA 25°C	Rose pâle	30	/
	PDA 25°C	Violet	30	
	G25N 25°C	Blanc jaunâtre	62	
	CYA 25°C	Blanc crémeux	52	
	CYA 37°C	Blanc crémeux	37	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Aspergillus fumigatus S34	MEA 25°C	Blanc-vert	56	- Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs. - Phialides : serrés. - Conidies : sphériques à subspheroidal.
	PDA 25°C	Vert	64	
	G25N 25°C	Jaune verdâtre	80	
	CYA 25°C	Jaune verdâtre	70	
	CYA 37°C	Jaune pâle à jaune	25	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Aspergillus niger S44	MEA 25°C	Noir	40	- Conidiophores : soutenu des hyphes extérieurs, lisse, hyalin ou brunâtre. - Phialides : 7-10 µm de long. - Conidies : sphériques, globuleuses, brunes.
	PDA 25°C	Noir	48	
	G25N 25°C	Crème	79	
	CYA 25°C	Blanc salé	64	
	CYA 37°C	Crème	81	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Aspergillus flavus 1 S49	MEA 25°C	Vert pistache	50	- Conidiophores : soutenu des hyphes à fleur de terre ou extérieurs. - Phialides : de taille de 7-10 µm de long. - Conidies : sphériques à subspheroidal, globuleuses à subglobuleuses.
	PDA 25°C	Vert	63	
	G25N 25°C	Jaune verdâtre	46	
	CYA 25°C	Blanc jaunâtre	69	
	CYA 37°C	Marron	72	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Aspergillus flavus 2 S50	MEA 25°C	Vert pistache	35	/
	PDA 25°C	Vert	47	
	G25N 25°C	Jaune verdâtre	64	
	CYA 25°C	Blanc jaunâtre	67	
	CYA 37°C	Crème foncé	67	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
Aspergillus chevalieri S53	MEA 25°C	Vert grisâtre	36	/
	PDA 25°C	Crème verdâtre	44	
	G25N 25°C	Jaune pâle	36	
	CYA 25°C	Crème verdâtre	27	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	CYA 5°C	Absence	Absence	

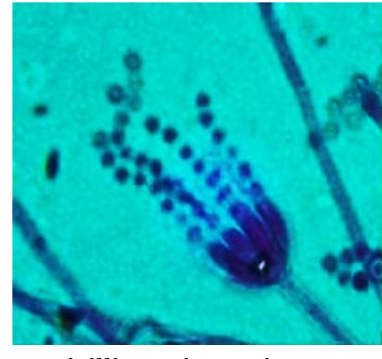
<i>Aspergillus versicolor</i> S56	MEA 25°C	Vert terne- brun à brun-orange	49	/
	PDA 25°C	Vert foncé contour blanc	42	
	G25N 25°C	Jaune pâle	47	
	CYA 25°C	Blanc à chamois ou orange	47	
	CYA 37°C	Marron	85	
	CYA 5°C	Absence	Absence	
<i>Cladosporium herbarum</i> S12	MEA 25°C	Vert olive	11	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphes : septés, sont pigmentés. - Conidiophores : (encore plus foncés) de longueur variable. - Conidies : de grande taille, uni ou pluricellulaires.
	PDA 25°C	Vert foncé	18	
	G25N 25°C	Vert foncé	18	
	CYA 25°C	Noir olive	11	
	CYA 37°C	Absence	Absence	
	CYA 5°C	Blanc	48	



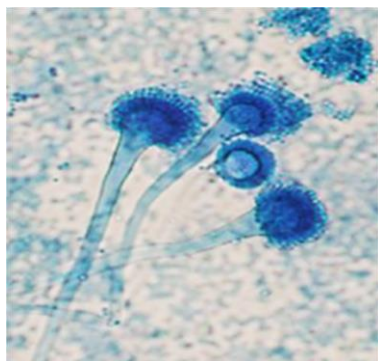
Penicillium hirsutum S3



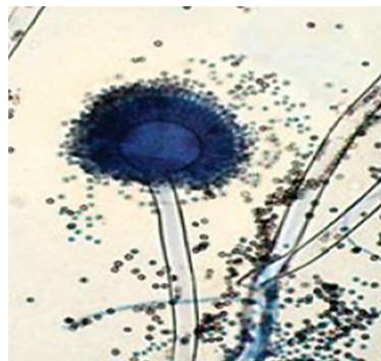
Penicillium pelacnicum S18



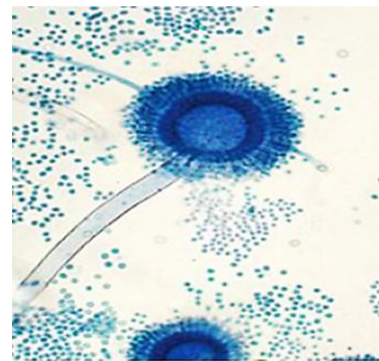
Penicillium citreonigrum S42



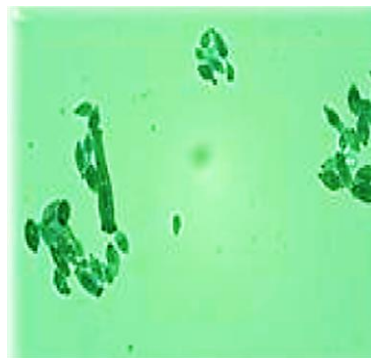
Aspergillus fumigatus S34



Aspergillus niger S44



Aspergillus flavus 1 S49



Cladosporium herbarum S12

Planche n°5 : Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore (Site de MAZZER)

Tableau n°23 : Identification probable des espèces fongiques (site de KARZAZ)

Genres espèces	Milieu de culture	Observations macroscopiques	
		Couleur	Diamètre (mm)
<i>Aspergillus flavus</i> C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ et C ₅	CYA 37°C	Jaune claire	50
	CYA 5°C	/	/
	CYA 25°C	Jaune contour blanc	80
	MEA 25°C	Vert	60
	G25N 25°C	Jaune contour blanc	40
	PDA 25°C	Vert jaunâtre	40
	Revers plate	Jaune claire	80

Tableau n°24 : Identification probable des espèces fongiques (Site d'AOULEF) (Cf. Planche n°6)

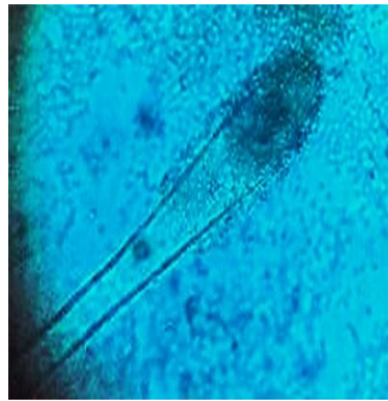
Genres espèces	Milieu de culture	Observations macroscopiques	
		Couleur	Diamètre (mm)
<i>Aspergillus flavus</i> MK1	MEA 25°	Vert	28
	G25N 25°	Jaune contour blanc	6
	CYA 25°	Jaune contour blanc	49
	CYA 37°C	Jaune claire	30
	CYA 5°C	/	/
<i>Aspergillus clavatus</i> MK2	MEA 25°	Vert	15
	G25N 25°	Vert	17
	CYA 25°	Vert	30
	CYA 37°C	Vert	40
	CYA 5°C	/	/
<i>Aspergillus niger</i> MK3	MEA 25°	Noir	31
	G25N 25°	Noire	14
	CYA 25°	Noir	44
	CYA 37°C	Noire	43
	CYA 5°C	/	/
<i>Aspergillus fumigatus</i> MK4	MEA 25°	Vert foncé	29
	G25N 25°	Noire	9
	CYA 25°	Gris	33
	CYA 37°C		20
	CYA 5°C	/	/
<i>Penicillium chrysogenum</i> MK5	MEA 25°	Gris	22
	G25N 25°	Gris	10
	CYA 25°	Brun	31
	CYA 37°C	Brun	17
	CYA 5°C	/	/
<i>Penicillium aethiopicum</i> MK6	MEA 25°	Gris	27
	G25N 25°	Noir	26
	CYA 25°	Gris	29
	CYA 37°C	Noir	40

Tableau n°25 : Identification probable des espèces fongiques (site de BOUKAIS) (Cf. Planche n°7)

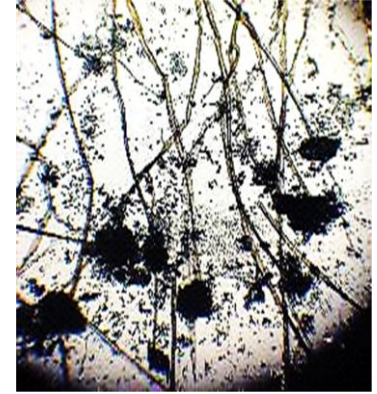
Genres espèces	Milieu de culture	Observations macroscopiques	
		Couleur	Diamètre (mm)
<i>Aspergillus niger</i>	CYA 25°C	Périphérique à granuleuses noire et marron vert	37
	G25N 25°C	Blanc et marron	35
	MEA 25°C	Granuleuses noire + contour vert clair	36
	PDA	Périphérique noir et jaune a vert et blanc au centre	60
<i>Aspergillus carbonarius</i>	CYA 25°C	Périphérique blanche et centre bleu.	27
	G25N 25°C	Blanc périphérique et centre beige	28
	MEA 25°C	Vert foncé + couche blanche	26
	PDA	Bleu et centre blanc+ sclérotés	35
<i>Aspergillus flaviceps</i>	CYA 25°C	Blanc et centre beige	26
	G25N 25°C	Blanc et centre beige	26
	MEA 25°C	Vert clair + bleu vert au centre + blanc périphérique	24
	PDA	Blanc et bleu	16
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CYA 25°C	Blanc + jaune à périphérique	49
	G25N 25°C	Blanc+ granuleuses jaune à périphérique	40
	MEA 25°C	Blanc+ vert foncé au centre	36
	PDA	Vert foncé	27
	CYA 25°C	Marron noir	39
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CYA 25°C	Marron noir	39
	G25N 25°C	Blanc +marron au centre	30
	MEA 25°C	Granuleuses noire	34
	PDA	Noir	34
<i>Aspergillus sp</i>	CYA 25°C	Blanc beige	38
	G25N 25°C	Blanc + centre beige	24
	MEA 25°C	Vert clair et au centre vert foncé +contour blanc	34
	PDA	Blanc + centre bleu	67
<i>Aspergillus sp</i>	CYA 25°C	Marron foncé	41
	G25N 25°C	Blanc + centre beige	30
	MEA 25°C	Vert granuleuses	37
	PDA	Bleu + vert foncé + vert clair	39
<i>Penicillium thomii</i>	CYA 25°C	Blanc + beige au centre	53
	G25N 25°C	Blanc + centre beige	32
	MEA 25°C	Blanc + centre bleu vert	26
	PDA	Vert + centre bleu	42
<i>Penicillium paxilli</i>	CYA 25°C	Blanc et beige au centre	38
	G25N 25°C	Gris et bleu	32
	MEA 25°C	Blanc vert et au centre vert foncé	35
	PDA	Blanc et au centre bleu	47
<i>Penicillium expansum</i>	CYA 25°C	Blanc et centre beige	36
	G25N 25°C	Blanc et au centre bleu	25
	MEA 25°C	Bleu et vert	29
	PDA	Blanc et au centre bleu	17
<i>Penicillium sp</i>	CYA 25°C	Blanc et au centre bleu	30
	G25N 25°C	Beige et blanc	25
	MEA 25°C	Bleu + vert	27
	PDA	Blanc et au centre bleu	08
<i>Penicillium sp</i>	CYA 25°C	Blanc et beige au centre	43
	G25N 25°C	Jaune	42
	MEA 25°C	Vert foncé	39
	PDA	Noir et vert foncé au centre	34



Aspergillus flavus MK1



Aspergillus clavatus MK2



Aspergillus niger MK3

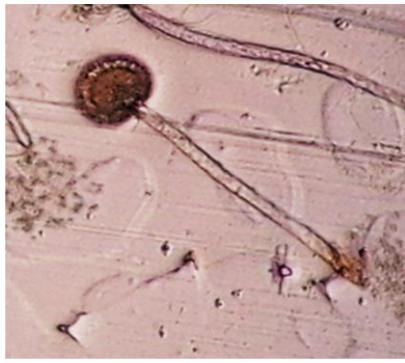


Penicillium chrysogenum MK5

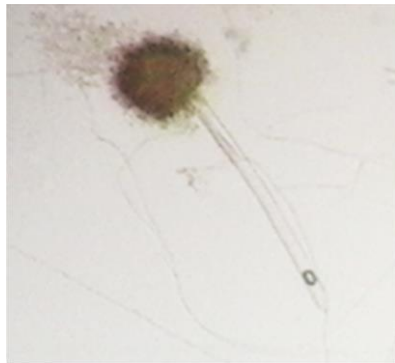


Penicillium aethiopicum MK6

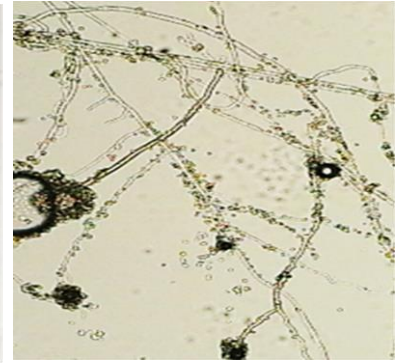
Planche n°6 : Identification probable des espèces fongiques par la technique de single spore
(Site d'AOULEF)



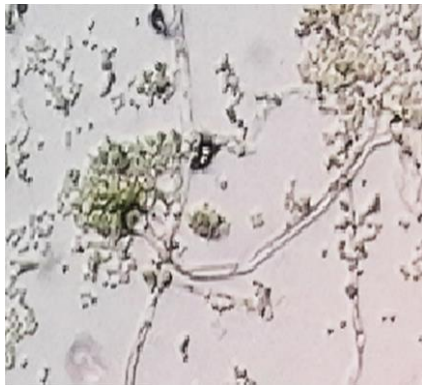
Aspergillus niger



Aspergillus carbonarius



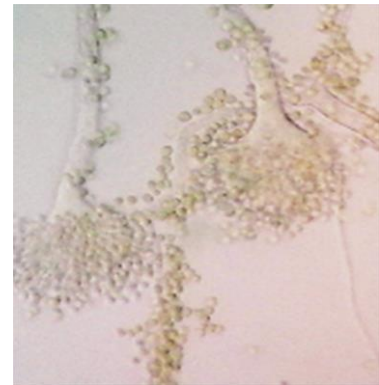
Aspergillus flaviceps



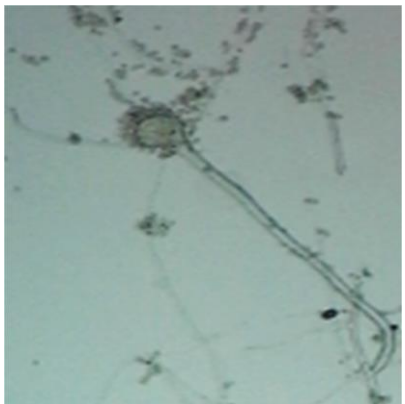
Aspergillus parasiticus



Aspergillus fumigatus



Aspergillus sp.



Aspergillus sp.



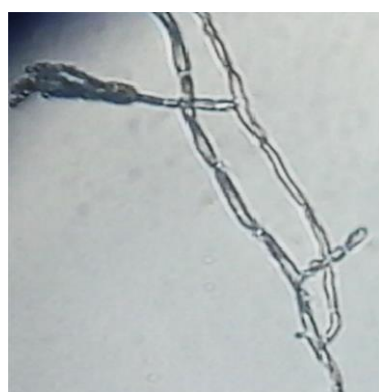
Penicillium thomii



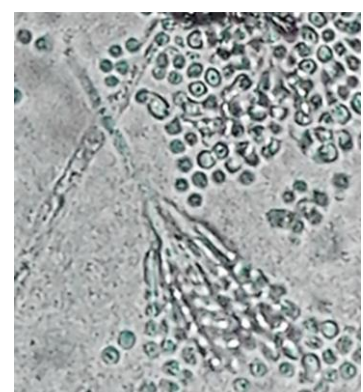
Penicillium paxilli



Penicillium expansum



Penicillium sp.



Penicillium sp.

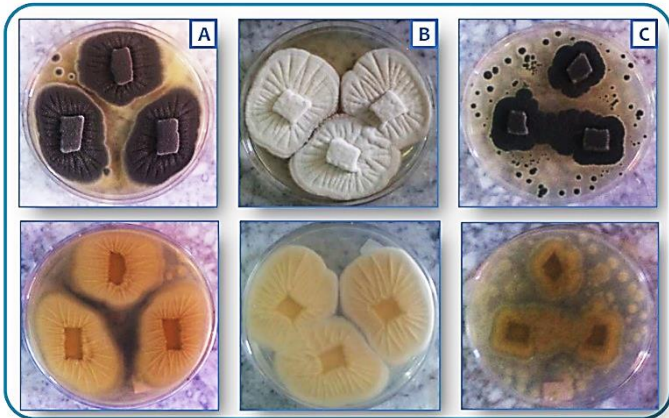


Planche n°8 : Identification de *Penicillium chrysogenum* par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu G25N. **C :** sur milieu PDA.

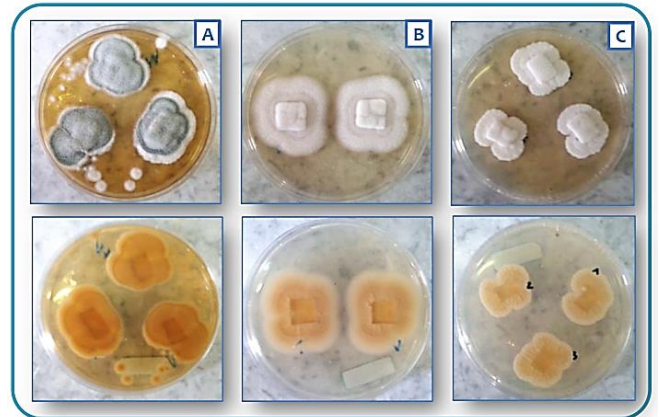


Planche n°9 : Identification de *Penicillium citrinum* par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu G25N. **C :** sur milieu PDA.

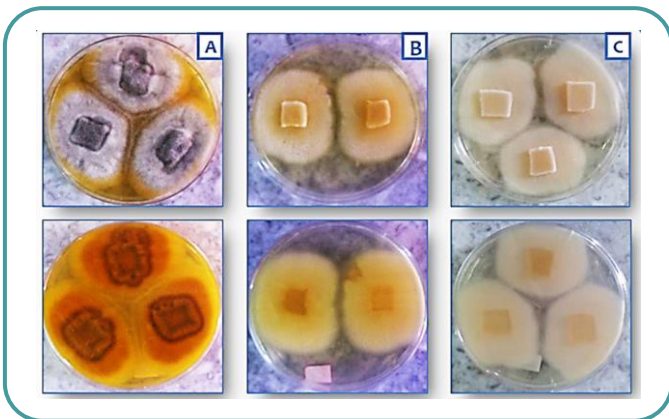


Planche n°10 : Identification de *Penicillium citreonigrum* par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu G25N. **C :** sur milieu CYA à 25°C.

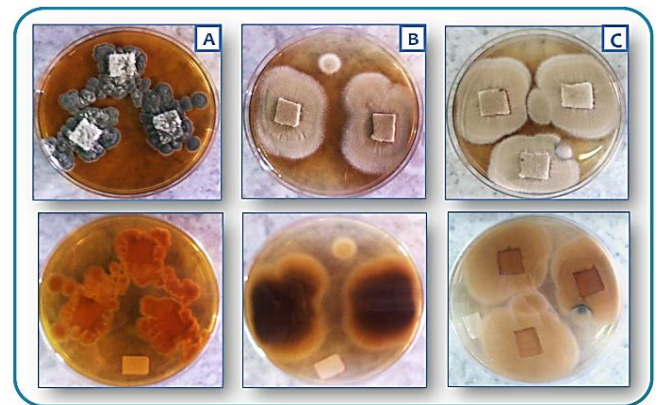


Planche n°11 : Identification de *Penicillium brevicompactum* par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu G25N. **C :** sur milieu CYA à 25°C.

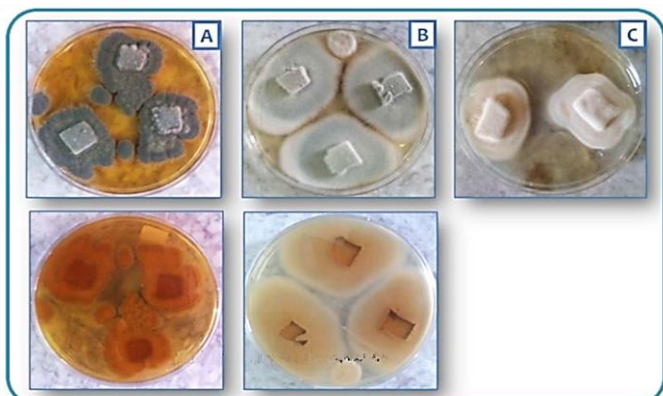


Planche n°12 : Identification de *Penicillium glabrum* par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu CYA à 25°C. **C :** sur milieu CYA à 5°C.

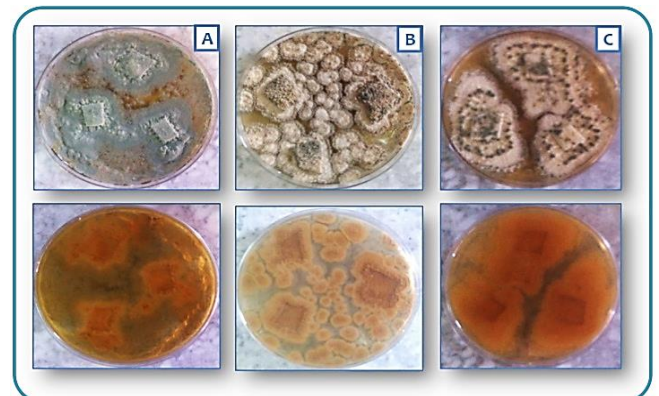


Planche n°13 : Identification de *Penicillium brevicompactum* (S_{53}) par la méthode de single spore.
A : sur milieu MEA. **B :** sur milieu G25N. **C :** sur milieu CYA à 25°C.

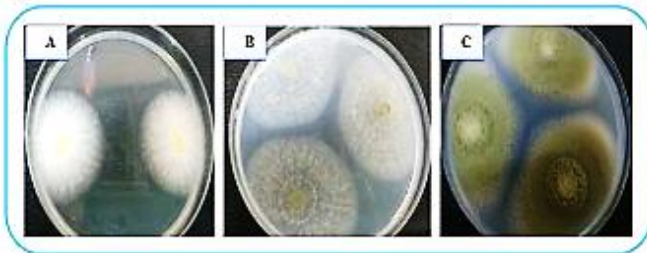


Planche n°14 : Identification de l'isolat SF2 par la méthode de single spore.

A : milieu G25N à 25°C. **B :** milieu MEA à 25°C. **C :** milieu PDA à 25°C.

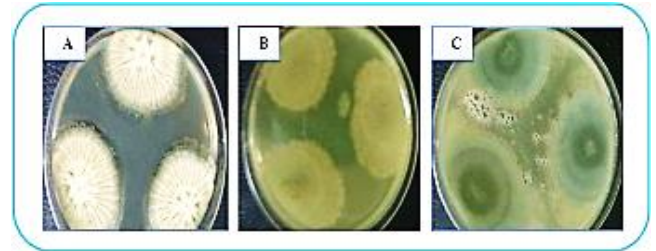


Planche n°15 : Identification de l'isolat BTW par la méthode de single spore.

A : milieu MEA à 25°C. **B :** milieu CYA à 25°C. **C :** milieu PDA à 25°C.

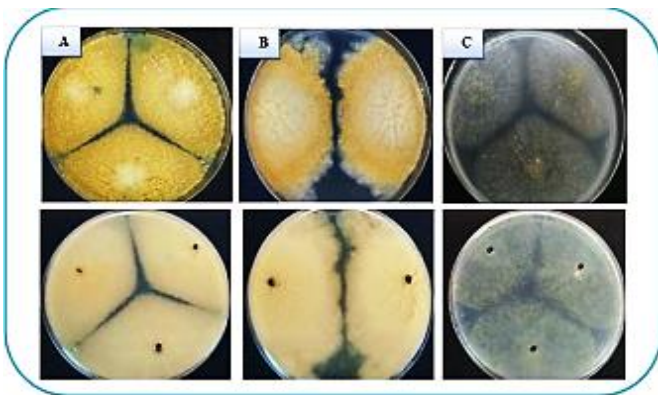


Planche n°16 : Identification de l'isolat BTA4 par la méthode de single spore.

A : milieu MEA à 25°C. **B :** milieu G25N à 25°C. **C :** milieu CYA à 25°C.

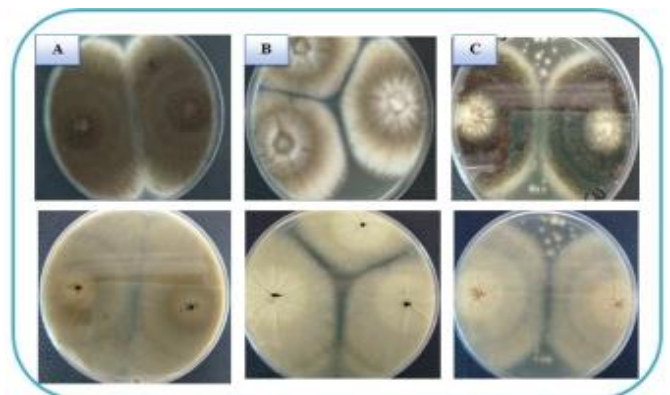


Planche n°17 : Identification de l'isolat SF 29 par la méthode de single spore.

A : milieu CYA à 37°C. **B :** milieu CYA à 25°C. **C :** milieu G25N à 25°C.

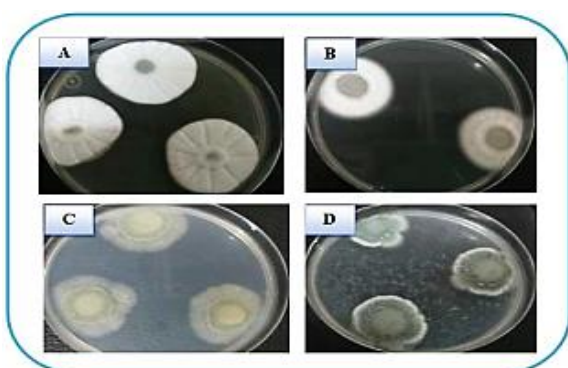


Planche n°18 : Identification de l'isolat SF11 par la méthode de single spore.

A : milieu CYA à 25°C. **B :** milieu G25N à 25°C. **C :** milieu MEA à 25°C. **D :** milieu PDA à 25°C.

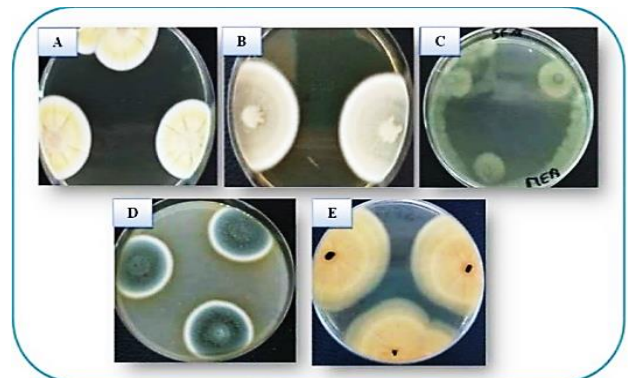


Planche n°19 : Identification de l'isolat SF18 par la méthode de single spore.

A : milieu CYA à 25°C. **B :** milieu G25N à 25°C. **C :** milieu MEA à 25°C. **D :** milieu PDA à 25°C. **E :** revers du milieu CYA à 25°C.

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont présentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés (NOUMEUR, 2008).

Les 80% des microorganismes trouvés, en nombre de (224) sont des isolats bactériens et qui sont identifiés par les méthodes classiques représentées par la détermination de leurs caractères morphologiques et biochimiques. A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques en question, nous avons pu les identifier en faisant appel aux clés dichotomiques de chaque groupe. L'identification reste, cependant, présomptive et non confirmative.

La détermination des familles des isolats a été basée sur la 9^{ème} édition du « Bergey's manual of determinative bacteriology » (1994) sur les caractères phénotypiques des groupes bactériens. En ce qui concerne les espèces qui sont déterminées selon PRESCOTT et al., (2003) ; GUIRAUD (2003) nous trouvons que les isolats appartiennent aux familles suivantes : *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Listeriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococaceae*, *Staphylococcaceae* (Cf. Tableaux n°28, 29, 30, 31, 32).

- ***Bacillaceae***

Ils se présentent sous forme de bacilles à Gram positif, généralement mobiles, sporulés et catalase positive. Cette famille regroupe un nombre très important par rapport aux autres familles, et cela concorde avec les études réalisées par VENTOSA et al., (2015) et BERRADA (2012) qui ont constaté qu'une grande abondance du genre *Bacillus* dans le sol salin, ainsi que CHERIF (2014), a constaté la dominance de *Bacillus* dans les régions salées.

Selon AMEUR (2014) la salinité, le pH, la température, le pourcentage en matière minérale et organique et la nature du sol affectent la dominance de certains genres par rapport à autres.

En effet, la majorité des espèces du genre *Bacillus* sont capables de se développer à des concentrations salines allant jusqu'au 20% ou plus. Elles peuvent aussi pousser à des pH alcalins selon FRITZE (1996), c'est le cas de *Bacillus halophilus* qui tolère des concentrations salines supérieures à 30% et pousse à des pH de 6 à 8 avec un optimum à pH égal à 7 (VENTOSA et al., 2015). *Bacillus pantothenicus* croit à un pH de 9.7 à une concentration saline comprise entre 10% et 20% (FRITZE, 1996) et *Bacillus bogorensis* qui tolère des concentrations salines supérieures à 10 % et exige des pH de 8 à 11 avec optimum à pH égal à 10 (VARGAS et al., 2005).

- **Clostridiaceae**

Les isolats sont des bacilles Gram positif, présentés sous forme isolée ou en chaînette, avec une motilité et possédant une catalase. Selon **DAVET & ROUXEL (1996)**, les bactéries sporulantes du genre *Clostridium* sont abondantes dans le sol.

- **Brevibacteriaceae**

Cette famille se caractérise par une catalase positive, absence de mobilité, nitrate réductase positive. Ces résultats concordent avec ceux de **BERRADA (2012)** qui a pu isoler des bactéries du genre *Brevibacterium* provenant de sédiments prélevés d'un marécage salé et de marais salants.

- **Enterobacteriaceae**

La famille des *Enterobacteriaceae* se caractérise par lactose positive et citrate positive. Les isolats appartiennent au genre *Klebsiella* présentant un lactose positif, absence de mobilité, saccharose positif, H₂S négatif, citrate positif. Parmi les communautés bactériennes du sol, les bactéries du genre *Klebsiella* (**SUBBARAO, 1988 ; KUCEY et al., 1989**).

- **Listeriaceae**

Cette famille présente une catalase positive, une mobilité, indole négatif, nos résultats concordent avec ceux de **BERRADA (2012)** qui a pu isoler des bactéries du genre *Listeria* provenant de sédiments prélevés d'un marécage salé et de marais salants.

- **Micrococcaceae**

Ce sont des coques Gram positif, immobiles, asporulés, groupés généralement en amas irréguliers. Ils sont catalase positive (sauf *Sarcina*). Plusieurs travaux concordent avec ces résultats notamment ceux d'**ERWAN (2001)** qui a pu isoler les bactéries du genre *Micrococcus* à partir du sol salin, il a constaté qu'ils sont halotolérants, ainsi que les études réalisées par **BERRADA (2012)** montrent l'existence des bactéries du genre *Micrococcus* dans le sol halophile au niveau du Bas Loukkos.

- **Neisseriaceae**

Ce sont des diplocoques à Gram négatif, accolés se présentant sous la forme de grains de café ou diplocoques à face aplatie, ils ne sont pas mobiles, mais possédant une catalase positive et

produisant le saccharose. Ces résultats sont confirmés par **GUIRAUD (2003)**, qui rapporte que le sol est un réservoir aux genres *Neisseria*.

- ***Pseudomonadaceae***

Cette famille se caractérise par une mobilité variable, flagelle polaire, Gram négatif, catalase positive, nitrate réductase positive, production d'indole est négatif. Selon **RANGARAJAN et al., (2001)**, les régions salées sont occupées par des espèces halotolérantes de *Pseudomonas*.

Les espèces de *Pseudomonas* ont un métabolisme très diversifié, ce qui signifie son pouvoir d'habiter une grande variété d'écosystèmes à partir des eaux douces jusqu'aux milieux hypersalins (**D'SOUZA-AUL et al., 1993 ; POCARD et al., 1994**).

- ***Staphylococcaceae***

Cette famille se présente sous forme des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive. Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par **BOUDARHAM (2011)**, qui a montré que les *Staphylococcus* sont des bactéries halophiles et peuvent croître dans des concentrations élevées, ainsi que **VENTOSA et al., (2015)** ont constaté que les *Staphylococcus* sont modérément halophiles. Les *Staphylococcaceae* sont largement disséminés dans l'environnement, retrouvés dans le sol (**AOUATI, 2009**).

Certaines espèces bactériennes identifiées au niveau du sol extrême ont déjà pu être identifiées dans d'autres environnements. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **GURGOURI (2010)**, qui ont montré que parmi les souches testées présumes ces différents genres : *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*

En effet les bactéries constituent l'essentiel de la microflore du sol et sont extrêmement nombreuses. On estime par exemple que 1g de sol contient entre 10^6 et 10^9 de bactéries (**SOLTNER, 2003 ; KARABI, 2016**). Selon **DOMMERGUES & MANGENOT (1970)** les densités bactériennes dans les sols soumis à des conditions écologiques dures (régions arides et régions polaires), sont faibles mais elles ne tombent rarement au-dessous de 10^4 - 10^5 germes /g de sol sec dans les horizons superficiels, cela est confirmé par nos résultats.

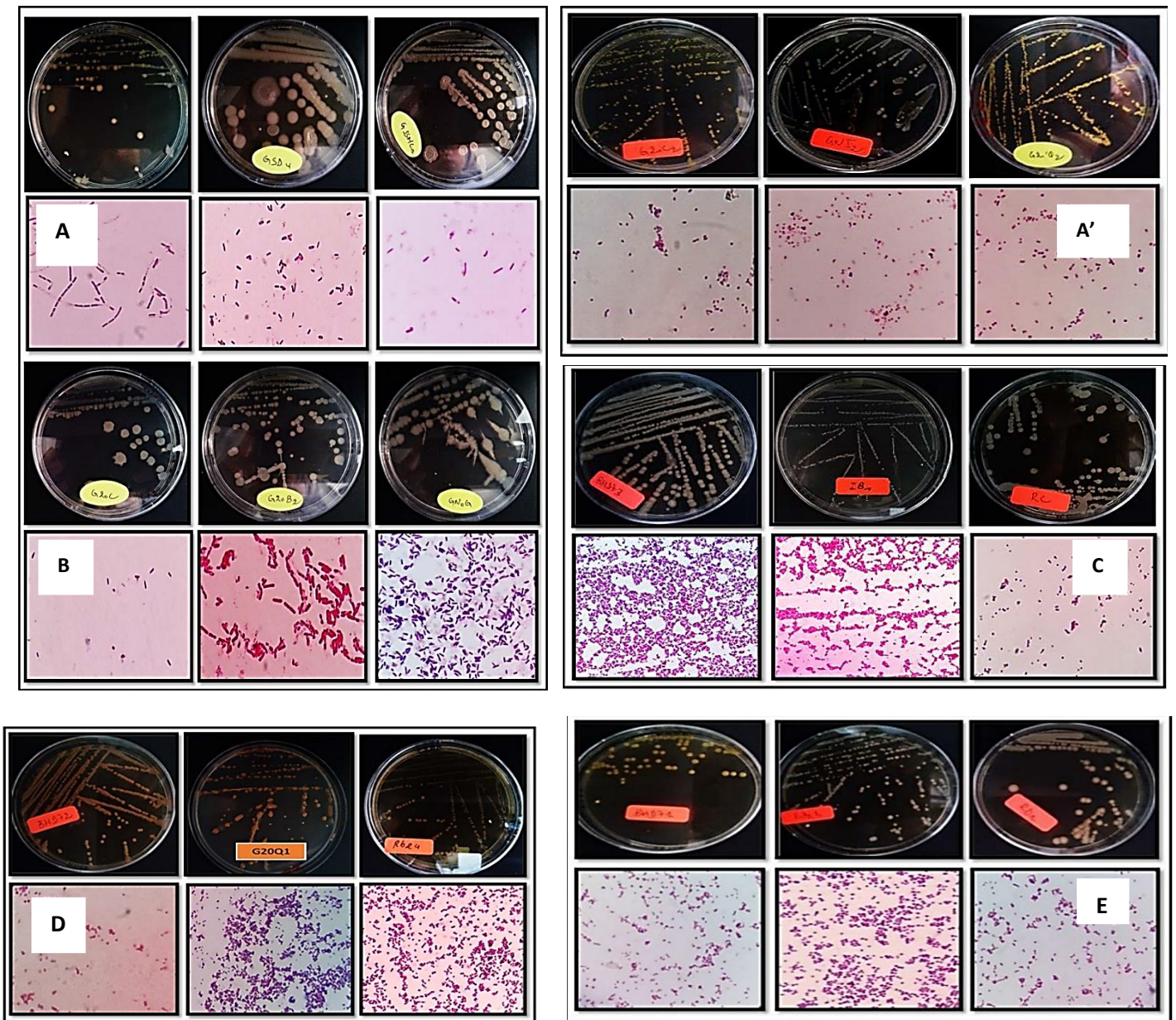


Planche n°20 : Aspect macroscopique et microscopique des souches apparentées aux genres dans les sites de Boukais, Kenadsa et Karzaz. A et A' : *Bacillus*, B : *Neisseria*, C et D : *Staphylococcus*, E : *Micrococcus*.

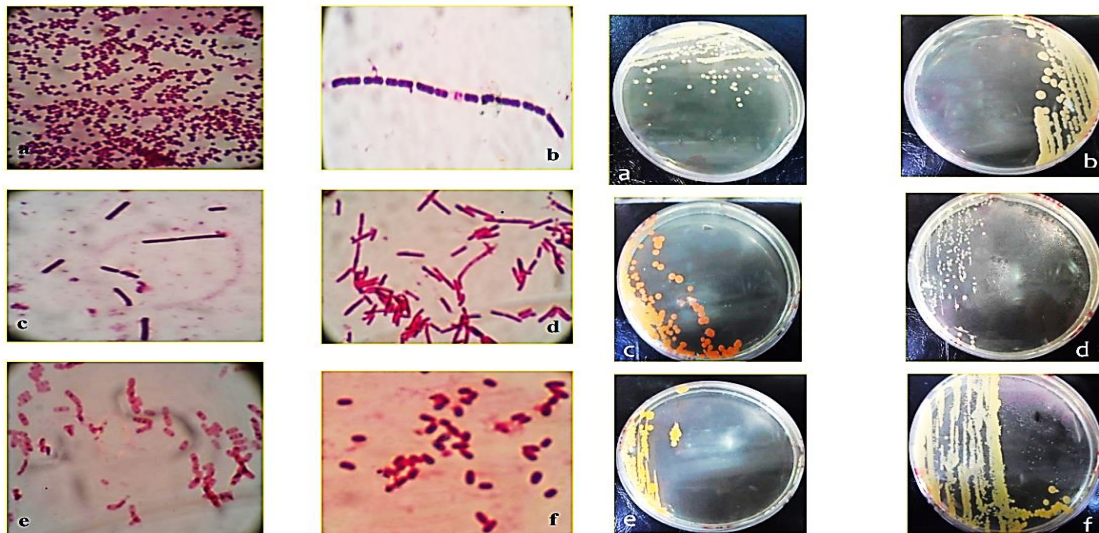


Planche n°21 : Aspects majeurs obtenus pour les isolats après coloration de Gram (x100) (a,f)

Planche n°22 : Aspects coloniaux obtenus pour les isolats (a, b, c) aspect régulier lisse, (d, e, f) aspect irrégulier lisse.

L'échantillon du sol non traité et traité, prélevé du Ksar de KENADSA permet d'isoler cinquante (50) actinomycètes. Tandis que, à partir de l'oasis de Timimoune précisément du sol périphérique de "Mâjen" et les sédiments de "Mâjen", nous avons pu isoler 67 actinomycètes. Par contre nous avons révélé l'absence totale des actinomycètes dans l'eau du "Mâjen".

Cependant, dix (10) isolats endophytes ont été obtenus : AHR1, AHR2, AHR3, AHR4, AHR5, AHT1, ROF1, LAT1 et LAT2 selon les plantes et leurs parties (tige, feuille et racine). De ce fait, nous avons remarqué une rareté importante des actinomycètes dans les plantes que celle obtenu dans le sol.

Les trois facteurs écologiques des échantillons ; pH, matière organique et humidité, ont une influence remarquable sur le nombre et la distribution des actinomycètes (LEE & HWANG, 2002). En outre, la température du sol, le type du sol, la végétation et l'emplacement géographique sont aussi incriminés pour cette variation (ADEGBOYE & BABALOLA, 2012).

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que le nombre des colonies isolées varié selon le milieu de culture utilisé et le prétraitement qu'ont subi les échantillons, et cela influence considérablement sur le type des actinomycètes isolées. On peut détecter les actinomycètes depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur dans le sol (WAKSMAN, 1967). Généralement 10^6 germes par gramme de sol séché peuvent atteint d'après GOODFELLOW & WILLIAMS (1983).

Nous recommandons fortement le traitement des échantillons par la chaleur pour l'isolement des actinomycètes par rapport aux autres traitements chimiques ou par phénol, car il nous a permet d'extraire un nombre important et une diversité remarquable de ce groupe de bactéries

filamenteuses. Cela peut être expliqué par la résistance des conidiospores des actinomycètes à la dessiccation par rapport aux autres bactéries non filamenteuses, soit Gram positif ou négatif (**KHANNA et al., 2011**).

Les colonies d'actinomycètes apparaissent après 14 à 21 jours d'incubation, sur les trois milieux d'isolement utilisés : Bennette, TSA et ISP2. Ces souches sont reconnues par des colonies dures incrustées dans la gélose, bombées avec des couleurs assez variées selon **WILLIAMS & WALLINGTON (1983)** et **KITOUNI (2007)**, ces propriétés représentent un critère de détermination macroscopique et microscopique (aspects filamenteux ramifiés).

La richesse du sol en matière organique favorise le développement des actinomycètes (**LEE & HWANG, 2002**). Ainsi que le milieu Bennett est recommandé pour la croissance et le développement des aérobies comme les actinomycètes (**PORTER et al., 1960**), parallèlement le milieu ISP2 montre un développement important des bactéries filamenteuses (**BENHADJ et al., 2019**). **HAYAKAWA et al., (2008)** affirment que le nombre des actinomycètes est en corrélation positive avec le pourcentage de la matière organique.

L'isolement des actinobactéries endophytes a été effectué pour trois plantes médicinales à savoir : *Atriplex halimus*, *Rosmarinus officinalis* et *Launaea arborescens*, sur trois milieux de culture : ISP2, amidon caséine (AC) et TSA. Au bout de 13 jours d'incubation, les actinobactéries endophytes apparaissent et se développent lentement. Les colonies sont repérées d'après leur aspect caractéristique poudreux et de petite taille, des colonies bien isolées et bombées sont développées avec des couleurs assez variées : gris, blanc, etc., selon **DJABALLAH (2010)** ces propriétés représentent un critère de détermination macroscopique des actinomycètes.

D'après **CRAWFORD et al., (1993)** le TSA est un milieu utilisé en microbiologie pour des bactéries anaérobies et aérobies, mais c'est un milieu faible en teneur en nutriments organiques, il retarde suffisamment les bactéries pour permettre la sporulation des actinomycètes.

Il est noté qu'il n'existe pas une technique universelle d'isolement des actinomycètes. De ce fait, plusieurs auteurs recommandent de varier les méthodes et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**ALLAOUEDDINE, 2007**).

Après l'examen de la chaîne des spores et leur morphologie au microscope, nous avons observé que ces souches étaient des bactéries filamenteuses et elles avaient les caractéristiques morphologiques de la chaîne de spores des *Streptomyces*, ainsi qu'ils avaient la présence de pigment de

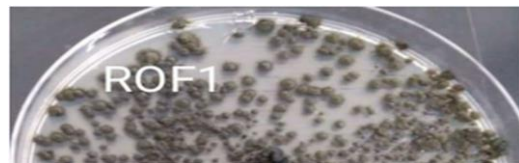
la mélanine qui nous laisse dire qu'ils sont les marqueurs taxonomiques pour le genre *Streptomyces* (SARIGULLU *et al.*, 2013 ; ANDERSON & WELLINGTON, 2001).

Tableau n°26 : Résultats d'aspect macroscopique des actinomycètes endophytes isolées à partir de trois plantes.

Code de souche	Milieu de culture	Aspect de la colonie	Mycélium MS	Couleur
AHR1	ISP2	Poudreuse, Semi Bombée, Moyenne	Présente	Griverdatre
AHR2	ISP2	Ronde, Petit, Semi-Bombée	Présente	Blanchâtre
AHR3	ISP2	Poudreuse, Semi-Bombée, Moyenne, Irrégulier		Grisâtre
AHR4	AC	Semi-Bombée, Ronde, Petit,	Présente	Jaune
AHR5	AC	Poudreuse, Semi-Bombée, Ronde, Petit	Présente	Beige
AHT1	ISP2	Poudreuse, Semi-Bombée, Ronde, Petit	Présente	Jaune
AHF1	ISP2	Poudreuse, Ronde, Bombée, Moyenne	Présente	Blanc
LAT1	AC	Poudreuse, Ronde, Bombée, Moyenne	Présente	Noire
LAT2	AC	Poudreuse, Semi-Bombée, Moyenne, Ronde	Présente	Jaune
ROF1	ISP2	Poudreuse, Ronde, Bombée, Moyenne	Présente	Noire



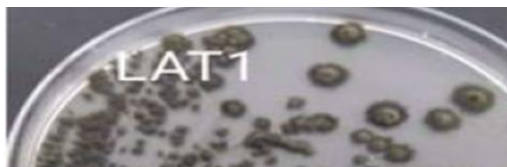
Isolés à partir d'*Atriplex halimus*



Isolés à partir *Rosmarinus officinalis*



Isolés à partir de *Atriplex halimus*



Isolés à partir de *Launaea arborescens*

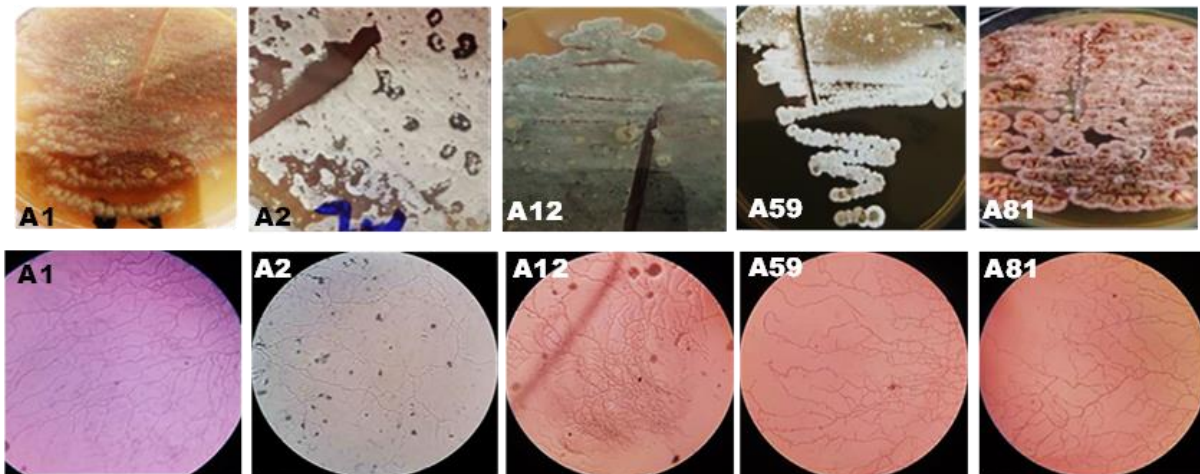


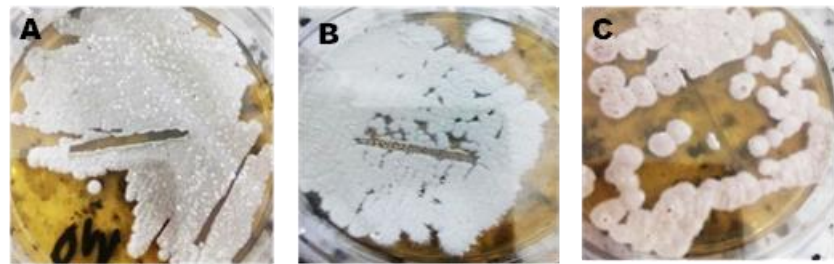
Isolés à partir de *Launaea arborescens*

Planche n°23 : Aspect macroscopique des actinomycètes endophytes isolées à partir de trois plantes.

Tableau n°27 : Caractéristiques morphologiques des isolats purs de l'oasis de Timimmoun, sur milieu ISP2.

Isolats	Mycélium végétative		Mycélium aérien		Pigment diffusible
	Pigmentations	Développement	Pigmentations	Développement	
A1	Marron	Riche	Marron	Riche	-
A2		Riche		Moyen	+
A11	Blanc	Riche	Gris	Pauvre	+
A12	Gris	Riche	Vers	Moyen	+
A23	Blanc	Riche	Gris	Moyen	-
A26	Blanc	Plus riche	Blanc-gris	Riche	+
A58	Blanc	Riche	Gris	Riche	-
A59	Jaune	Riche	Gris	Moyen	+
A60	Jaune	Plus riche	Gris – blanc	Riche	+
A61	Jaune	Plus riche	Gris	Moyen	+
A62	Gris	Plus riche	Gris – blanc	Moyen	+
A63	Gris	Riche	Gris – blanc	Pauvre	+
A64	Blanc	Riche	Gris	Pauvre	+
A67	Blanc	Moyen	Gris foncé	Pauvre	+
A75	Jaune	Moyen	Vers	Riche	-
A76	Jaune	Riche	Vers-blanc	Riche	+
A81	Marron	Moyen	Violet	Moyen	-

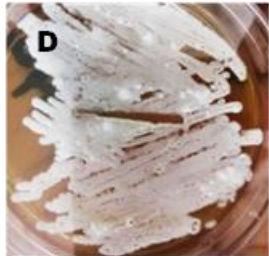
**Planche n°24** : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats purs de l'oasis de Timimmoun, sur milieu ISP2.



Gris parsemé de blanc

Blanche

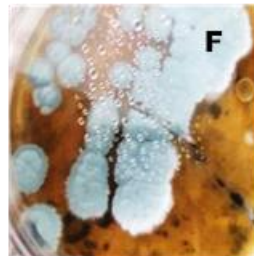
Rose



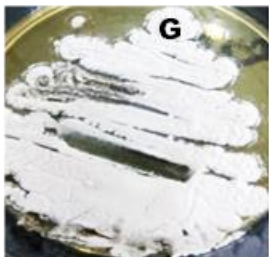
Blanche



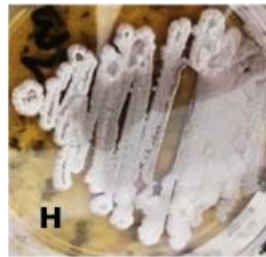
Gris



Vert



Crème



Gris blanchâtre



Gris foncé

Planche 25 : Observation macroscopique des isolats de Ksar KENADSA

(A) : ACTD11, (B) : ACTB9, (C) : ACTE5, (D) : ACTD15, (E) : ACTD2, (F) : ACTD3,
(G) : ACTB2, (H) : ACTB1, (I) : ACTB18

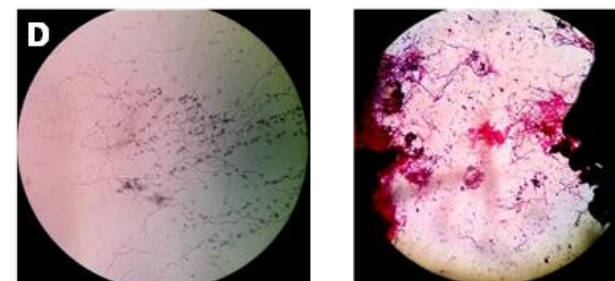
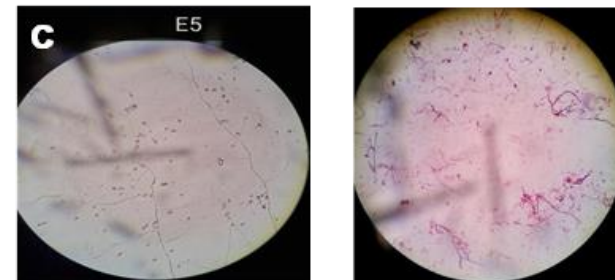
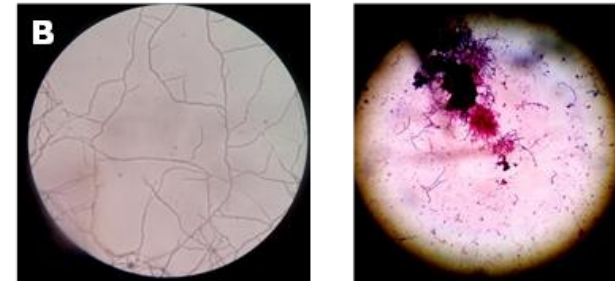
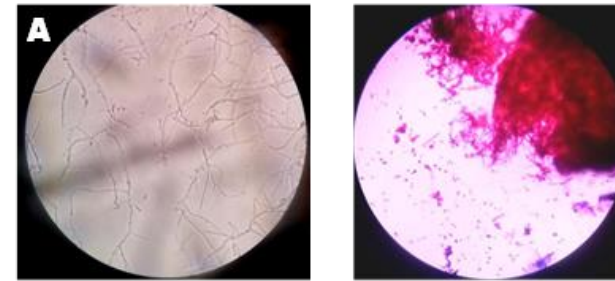


Planche 26 : Observation microscopique des isolats de Ksar KENADSA

(A) : ACTD51, (B) : ACTD5, (C) : ACTD1, (D) : ACTB1.

Tableau n°28 : Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la sebka de Kenadsa

SITE DE PRELEVEMENT	PRESUMEE	ISOLATS	Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Nit	Ox	Cat	Amyl	Cell	Gél	Cas	Lip	Dnas	Cit	Man	RM	VP	ind	Chap	Mob	Gram	Respiration	Spore	Bâtonnet	Cocci	Coccobacille	
SEBKHA DE KENADSA (BECHAR)	<i>Listeria sp.</i>	B1	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	A	+	Bâtonnet				
	<i>Bacillus sphaericus</i>	B2	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	AS	+	Bâtonnet				
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	B3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	ANS	+	Bâtonnet			
	<i>Bacillus brevis</i>	B4	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B5	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B6	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet			
	<i>Citrobacter</i>	B7	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	AAF	-	Bâtonnet		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	B8	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	AAF	-		Cocci		
	<i>Clostridium sp.</i>	B9	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	ANS	-			Coccobacille	
	<i>Neisseriaceae</i>	B10	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	A	-		Cocci		
	<i>Clostridium paraperfringens</i>	B11	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	ANS	-	Bâtonnet			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	B12	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	A	-		Cocci		
	<i>Bacillus sp.</i>	B13	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Neisseriaceae</i>	B14	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	A	-		Cocci		
	<i>Clostridium sp.</i>	B15	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus lentus</i>	B16	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Clostridium sp.</i>	B17	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	AN	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus circulans</i>	B18	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B19	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B21	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B23	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	B24	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B25	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Klebsiella sp</i>	B26	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	A	-	Bâtonnet			
	<i>Listeriaceae grayi</i>	B27	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Klebsiella sp</i>	B28	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sphaericus</i>	B29	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	B30	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			

<i>Clostridium butyricum</i>	B31	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	AN	-	Bâtonnet		
<i>Enterobacter</i>	B33	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas putida</i>	B36	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	AS	-	Bâtonnet			
<i>Bacillus sp.</i>	B38	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Listeriaceae sp.</i>	B39	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Bacillus sp.</i>	B42	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		

Tableau n°29 : Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la Grotte de Boukais.

SITE DE PRELEVEMENT	PRESUMEE	ISOLATS	Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Nit	Ox	Cat	Amyl	Cell	Gél	Cas	Lip	Dnas	Cit	Man	RM	VP	ind	Chap	Mob	Gram	Respiration	Spore	Bâtonnet	Cocci	Coccobacille	
Grotte de Boukais (BECHAR)	<i>Brevibacterium linens(actino)</i>	RH1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	RH2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	RH3	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus subtilis</i>	RH4	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus sp.</i>	RH7	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus pasteurii</i>	RH8	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	RH9	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	A	-		Cocci		
	<i>Bacillus badus</i>	RH10	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus pasteurii</i>	RH11	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		
	<i>Pseudomonas sp.</i>	RH12	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	A	-		Cocci	
	<i>Bacillus badus</i>	RH13	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus badus</i>	RH14	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Enterococcus cloacae</i>	RH15	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	A	-		Cocci		
	<i>Planococcaceae sp</i>	RH16	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-		Cocci	
	<i>Planococcaceae kurthia</i>	RH17	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	RH18	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	A	-		Cocci	
	<i>Bacillus badus</i>	RH19	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Bacillus badus</i>	RH20	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet			
	<i>Micrococcus luteus</i>	RH21	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-		Cocci	
	<i>Bacillus sp</i>	RH22	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas sp.</i>	RH23	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	AS	-			Coccobacille	
<i>Pseudomonas sp.</i>	RH24	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	AS	-			Coccobacille	
<i>Micrococcus sp.</i>	RH25	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	A	-	Bâtonnet			
<i>Pseudomonas sp.</i>	RH26	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			
<i>Pseudomonas sp.</i>	RH26a	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet			

Tableau n°30 : Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la Sebkhha de Karzaz.

PRESUMEE	ISOLATS	Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Nit	O _x	Cat	Amyl	Cell	Gél	Cas	Lip	Dnas	Cit	Man	RM	VP	ind	Chap	Mob	Gram	Resp	Spore	Bâtonnet	Cocci	Coccobacille
<i>Micrococcus</i>	CB1	+	-	-	+	+	+	+	+			-	-	-	-	+			+		-	+	A	-		Cocci	
<i>Clostridium sp.</i>	CB2	+	-		+	+	+	-							-	-			-		-	+	AN	-	Bâtonnet		
<i>Micrococcus</i>	CB3	+	-	-	+	+	+	+	+			-	-	-	-	+			+		-	+	A	-		Cocci	
<i>Bacillus spp</i>	CB4	+	+		-	+	-	+		+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	CB5	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	CB6	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		Coccobacille
<i>Mycobacterium</i>	CB7	+	+		-	+	+	+							-	-			-		-	+	A	-			Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB8	+	+		+	+	+	+		+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Micrococcus varians</i>	CB9	+	+		+	+	+	+							-	-			-		+	+	A	-		Cocci	
<i>Enterococcus sp.</i>	CB10	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Micrococcus luteus</i>	CB11	+	+		+	+	-	+							-	-			-		-	+	A	-		Cocci	
<i>Pseudomonas</i>	CB12	+	+		+	+	+	+							-	-			-		-	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas</i>	CB13	+	+		+	+	+	-							-	+			-		+	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Micrococcus</i>	CB14	+	+		+	+	+	-							-	-			-		-	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas</i>	CB15	+	+		+	+	-	+							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Pseudomonas</i>	CB16	-	-		-	+	-	+							-	-			-		-	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas</i>	CB17	-	-		+	+	+	-							-	-			-		-	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Veillonella</i>	CB18	-	-		-	-	+	+							-	-			-		-	-	A	-		Cocci	
<i>Bacillus spp</i>	CB19	+	+		+	-	-	+							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB20	+	+		+	+	+	+							-	+			-		+	-	A	-	Bâtonnet		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CB21	-	-		-	+	-	+							-	+			-	+	+	+	A	-		Cocci	
<i>Neisseria sp</i>	CB22	-	-		-	+	+	+							-	-			-		+	-	A	-			Coccobacille
<i>Neisseria sp</i>	CB23	-	+		-	+	-	+							-	+			-		+	-	A	-			Coccobacille

Tableau n°31 : Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la Sebkh de Karzaz (suite).

PRESUMEE	ISOLATS	Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Nit	Ox	Cat	Amyl	Cell	Gél	Cas	Lip	Dnas	Cit	Man	RM	VP	ind	Chap	Mob	Gram	Respiration	Spore	Bâtonnet	Cocci	Coccobacille
<i>Acinetobacter spp.</i>	CB24	+	+		-	-	-	+	+		+	-	+		-	+			-		-	-	A	-		Cocci	
<i>Acinetobacter spp.</i>	CB25	+	+		-	+	+	+							-	+			-		+	-	A	-			Coccobacille
<i>Acinetobacter spp.</i>	CB26	-	-		-	-	+	+							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Acinetobacter spp.</i>	CB27	+	-		-	-	+	+							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB28	-	-		+	-	+	-							-	+			-		+	+	A	-	Bâtonnet		
<i>Veillonella</i>	CB29	-	+		+	+	-	-							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Veillonella</i>	CB30	-	-		-	-	-	+							-	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Veillonella</i>	CB31	+	+		+	+	-	+							+	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB32	-	-		-	-	+	+							+	-			-		+	-	A	-			Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB33	+	+		+	-	+	-							+	-			-		-	-	A	-			Coccobacille
<i>Neisseria sp</i>	CB34	+	+		-	+	+	+							+	+			-		+	-	A	-		Cocci	
<i>Neisseria sp</i>	CB35	+	+		+	+	+	+							-	+			-		+	-	A	-		Cocci	
<i>Staphylococcus</i>	CB36	+	-	-	-	-	+	+	+			-	-	-	-	-			+	+	+	+	A	-		Cocci	Coccobacille
<i>Staphylococcus</i>	CB37	+	-	-	-	-	+	+	+			-	-	-	-	-			+	+	+	+	A	-		Cocci	Coccobacille
<i>Bacillus spp</i>	CB40	-	-		-	-	-	+							-	-			-		-	+	A	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus spp</i>	CB42	-	-		-	+	+	+							-	-			-		-	-	A	+	Bâtonnet		
<i>Veillonella</i>	CB43	+	+		-	+	-	+							-	+			-		+	-	A	-		Cocci	
<i>Veillonella</i>	CB44	-	-		-	+	+	+							-	-			-		-	-	A	-		Cocci	
<i>Veillonella</i>	CB45	+	+		-	+	-	+							-	+			-		+	-	A	-		Cocci	
<i>Pseudomonas</i>	CB46	+	-	-	+	+	+	+	+			-	+	-	-	-			+		-	-	AS		Bâtonnet		
<i>Mycobacterium</i>	CB47	-	-		-	+	-	+							-	+			-		-	+	A	-			Coccobacille
<i>Neisseria sp</i>	CB49	+	+		-	+	+	+							-	+			-		+	-	A	-		Cocci	

Tableau N° 32 : Résultats d'identification biochimique des isolats bactériens de la grotte de Mazzer.

PRESUMEE	ISOLATS	Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Nit	Ox	Cat	Amyl	Cell	Gél	Cas	Lip	Dnas	Cit	Man	RM	VP	ind	Chap	Mob	Gram	Respiration	Spore	Bâtonnet	Cocci	Coccobacille
<i>Escherichia</i>	GMS ₁	+	+	+	-	+	-	+			-		-		-	+	+	-	+	-	+	-	AAF	-	Bâtonnet		
<i>Pseudomonas</i>	GMS ₂	+	+	-			+	+	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	-	AS		Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₃	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Escherichia</i>	GMS ₄	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-		-	+	+	-	+	-	+	-	AAF	-	Bâtonnet		
<i>Sporolactobacillus</i>	GMS ₅	+	+	+			+	-	+	-	+	+	+		-	+	+	+	-	+	-	+	A		Bâtonnet		
<i>Lactobacillus</i>	GMS ₆	+	+	+			+	+	+	-	+	+	+		-	-	+	+	-		-	+	AN		Bâtonnet		
<i>Sporolactobacillus</i>	GMS ₇	+	+	+			+	-	+	-	+	+	+		-	+	+	+	-	+	-	+	A		Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₈	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₉	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₀	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Lactobacillus</i>	GMS ₁₁	+	+	-			+	+	+		+	+	+		-	-	+	+	-		-	+	AN		Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₂	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₃	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₄	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Listeria</i>	GMS ₁₅	+	+	-			+	+	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	+	AAF		Bâtonnet		
<i>Listeria</i>	GMS ₁₆	+	+	-			+	+	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	+	AAF		Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₇	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Bacillus</i>	GMS ₁₈	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	AAF	+	Bâtonnet		
<i>Escherichia</i>	GMS ₁₉	+	+	-	-	+	-	+	+		-	+	+		-	+	+	-	+	-	+	-	AAF	-	Bâtonnet		
<i>Micrococcus</i>	GMS ₂₀	+	-	-			+	+	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	+	A			Cocci	
<i>Micrococcus</i>	GMS ₂₁	+	-	-			+	+	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	+	A			Cocci	
<i>Micrococcus</i>	GMS ₂₂	+	+	+			+	-	+		+	+	+		-	+	+	+	-		-	+	AN			Cocci	
<i>Pseudomonas</i>	GMS ₂₃	+	+	-			+	-	+		+	+	+		-	+	+	+	-		+	-	AS		Bâtonnet		
<i>Escherichia</i>	GMS ₂₄	+	+	+	-	+	-	+	+		-	+	+		-	+	+	-	+	-	+	-	AAF	-	Bâtonnet		

Tableau n°33 : Identification biochimique des *Bacillus* isolés à partir du Ksar SIDI CHAREF à Aoulef

IDENTIFICATI EN PRESUMEE	ISOLATS	Cat	Respir	nit	Man-mob	Uré	Cit	Ind	Acét	Gaz sur glucose	Acide sur glucose	Position de spore	45°C	55°C	65°C	Groupe selon Priest
<i>B. Circulants</i>	BP1	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	T	+	+	-	I
<i>B. Sporothermodurans</i>	BP2	+	AS	+	+	-	+	-	-	-	v	C	+	+	+	II
<i>B. Licheniformis</i>	BP3	+	AAF	+	+	-	-	-	+	-	+	C	+	+	-	II
<i>B. Lentus</i>	BP4	+	AAF	+	+	-	-	-	-	+	+	C	-	-	+	II
<i>B. Farraginis</i>	BP5	+	AAF	-	-	-	+	-	-	-	v	C	+	-	-	
<i>B. Carboniphilus</i>	BP6	+	v	+	-	-	-	-	-	-	v	C	-	-	-	
<i>B.Pumilus</i>	BP7	+	AS	-	-	-	+	-	+	-	+	C	+	+	-	II
<i>B. Niacini</i>	BP8	+	AAF	+	+	-	-	-	-	-	v	T	+	-	-	
<i>B. Cereus</i>	BP9	+	AS	-	-	-	+	-	+	-	+	C	-	-	-	II
<i>B.Megaterium</i>	BP10	+	AS	-	+	-	+	-	-	-	+	C	-	-	-	II
<i>B.Tequilensis</i>	BP11	+	AAF	+	+	-	+	+	-	-	v	C	+	-	-	
<i>B. subtilis</i>	BP12	+	v	+	+	-	+	-	-	+	+	C	+	-	-	II

Tableau n°34 : Identification biochimique des *Bacillus* isolés à partir du Ksar SIDI CHAREF à Aoulef

IDENTIFICATION PRESUMEE	ISOLATS	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂
<i>B. Circulants</i>	BP1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. Sporothermodurans</i>	BP2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. Licheniformis</i>	BP3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>B. Lentus</i>	BP4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. Farraginis</i>	BP5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. Carboniphilus</i>	BP6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B.Pumilus</i>	BP7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. Niacini</i>	BP8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. Cereus</i>	BP9	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>B.Megaterium</i>	BP10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B.Tequilensis</i>	BP11	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	BP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

IV. Activité antibactérienne des bactéries

IV.1. Screeing primaire

Pour tester le potentiel de l'activité antimicrobienne de nos isolats bactériens contre des pathogènes, nous avons réalisé plusieurs méthodes : technique de cylindre d'agar ; technique de puit et technique d'ensemencement en stries croisés. Les résultats de cette dernière méthode d'antibiose ont révélé un effet positif de tous les isolats testés sauf les isolats : (RH13), (RH7), (CB28), (B24) se sont montrées sans effet, en outre le F.O.A. est montré une résistante vis-à-vis tous les isolats, par contre elle est sensible face à l'effet des actinomycètes ACTE10 ; ACTD7 ; ACTD1 ; ACTD3 ; ACTX1 et ACTE1 (Cf. Tableau n°35 et Planche n°27).

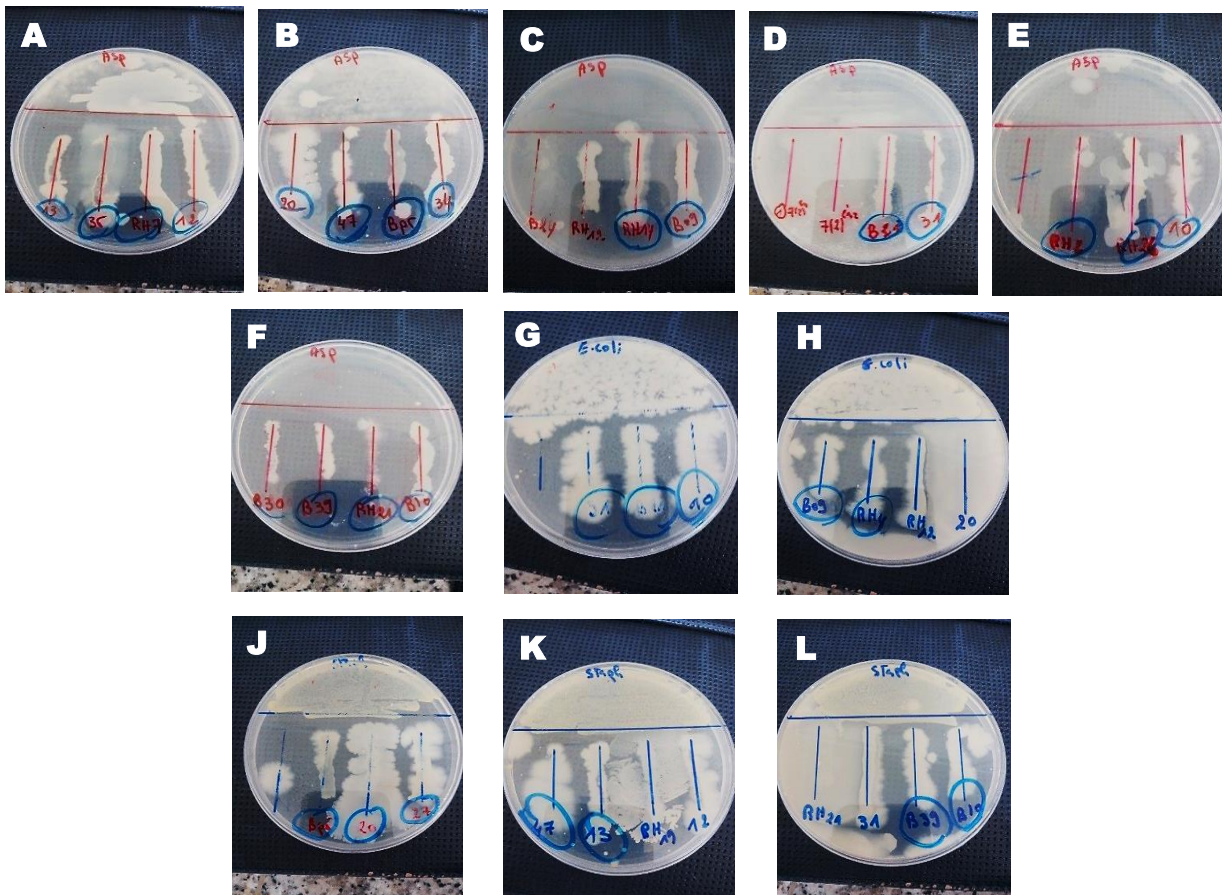


Planche n°27 : Résultats de l'antagonisme des isolats bactériens contre *A. favus* (A, B, C, D, E). *E. coli* (F, G, H). *S. aureus* (J, K, L)

Tableau n°35 : Résultats du screening primaire par la technique de cylindre d'agar

Pathogènes Isolats	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. flavus</i>	F.O.A
CB40	+	+	+	-
RH21	+	-	+	-
B10	+	+	+	-
RH2	-	-	+	-
RH26	-	-	+	-
CB10	+	-	+	-
B21	+	-	+	-
B31	+	-	+	-
RH14	-	-	+	-
B09	+	-	+	-
B38	-	+	+	-
CB32	-	+	+	-
BP5	+	+	+	-
B34	-	+	+	-
RH3	+	+	+	-
B30	+	-	-	-
RH7	-	-	-	-
RH19	-	-	-	-
B24	-	-	-	-
B26	-	+	-	-
RH12	-	+	-	-
GMS17	+	+	-	-
CB19	+	+	-	-
RH7	-	+	+	-
CB16	-	-	+	-
B42	-	-	+	-
RH26a	-	+	+	-
B13	-	+	+	-
B12	-	-	+	-
RH4	+	-	+	-
ACTE10	+	-	-	+
ACTD7	-	-	-	+
ACTD1	-	-	+	+
ACTD3	-	-	-	+
ACTX1	-	-	-	+
ACTE1	-	-	-	+

(+) : Effet positif ; (-) : Effet négatif

Le résultat de l'activité antibactérienne obtenu par la méthode de diffusion par disque et la méthode de cylindre d'Agar, montre une inhibition positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm selon SCHILLINGER & LUCKE (1989).

D'après ce travail, les diamètres de zones d'inhibition relevés, varient de 10 à 50 mm. Notons que la plus faible activité (10mm) a été observée pour l'isolat du genre *Staphylococcus* contre la bactérie *E. coli* et que la plus forte activité a été observée chez l'isolat du genre *Clostridium* contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de l'ordre de 50 mm.

De par les résultats prélevés et en fonction de leurs diamètres d'inhibition les isolats sont classés en 3 groupes :

- Souches à effet antibactérien fort, où le diamètre se situe entre 26 et 40 mm ;
- Souches à effet antibactérien intermédiaire avec un diamètre de 20 à 25 mm ;
- Souches à effet antibactérien faible, dont le diamètre égale à 10 - 18 mm.

IV.1.1. Technique de diffusion par disque

D'après le Tableau n°36, l'isolat *Brevibacterium* (Rh26) a révélé un effet contre une seule bactérie cible, par contre toutes les autres souches ont montré des résultats positifs vis-à-vis deux ou trois bactéries cibles. Ainsi que sept isolats ont révélé une activité contre *P. aeruginosa* et *E. faecalis*, suivis par six (06) isolats qui ont montré une activité vis-à-vis *S. aureus*. Alors que, la souche teste *E. coli* a été inhibée par deux isolats *Listeria* (B39) et *Staphylococcus* (Rh12).

Les isolats classés en 1^{er} groupe ont provoqué une importante inhibition vis-à-vis *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* dont le diamètre d'inhibition le plus important est de 40 mm observé chez les souches : *Clostridium* (Rh7), *Klebsella* (B26), *Bacillus* (B13) et (B29) vis-à-vis les bactéries pathogènes. Suivie par le 2^{ème} groupe, qui contient un nombre d'isolats moins important par rapport au 1^{er} groupe, dont les diamètres étaient de 20 à 22 mm. *Clostridium* (Rh7) ayant fourni un diamètre de 20 mm vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* alors que la souche *Micrococcus* (Rh22) a montré un diamètre de 22 mm vis-à-vis de la même bactérie-cible. Le dernier groupe comporte seulement trois souches dont deux souches de *Micrococcus* (Rh22) et *Brevibacterium* (Rh26) ont montré un diamètre de 18 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* respectivement, et une souche de *Staphylococcus* (Rh12), a révélé le plus faible diamètre (10 mm) vis-à-vis d'*E. coli* (Cf. Planche n°27, 28).

Tableau n°36 : Résultats de la technique de diffusion par disque

Selon le diamètre de la zone d'inhibition	GROUPE 1 (mm)				GROUPE 2 (mm)				GROUPE 3 (mm)				
	(2)	(3)	(4)	(5)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(1)	(2)	(3)	(4)
RH7	40	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
RH22	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	18	-	-
B29	-	-	-	40	-	20	-	-	-	-	-	-	-
B13	-	40	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-	-
RH26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-
RH12	27	-	-	36	-	-	-	-	-	10	-	-	-
B12	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RH2	-	-	32	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-
B9	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B26	40	26	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RH3	36	28	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-
B39	30	34	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : Zone nulle ; (1) *E. coli* ; (2) *Enterococcus faecalis* ; (3) *Pseudomonas aeruginosa* ; (4) *Salmonella typhi* ; (5) *Staphylococcus aureus* .

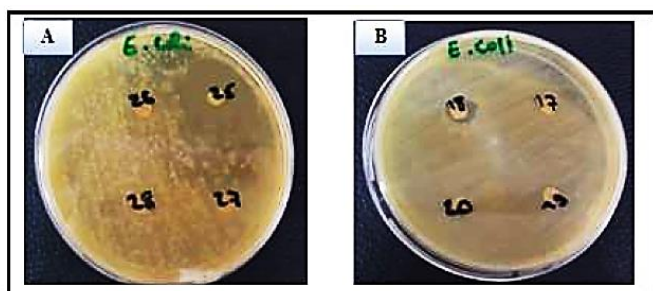


Planche n°28 : Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque. (A) : *Listeria*, (B) : *Staphylococcus* vis-à-vis d'*E. coli*.

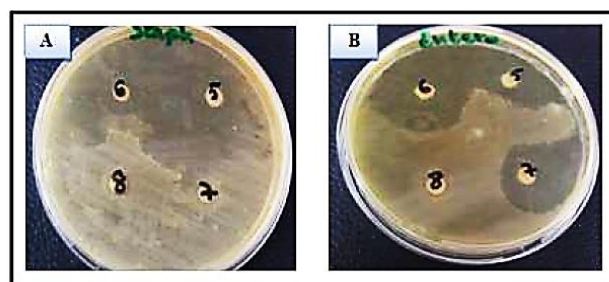


Planche n°29 : Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque. (A) : *Micrococcus* (5) et *Bacillus* (6) contre *S. aureus* (B) : *Micrococcus* *Bacillus* (6) et *Staphylococcus* (7) vis-à-vis *E. coli*.

IV.1.2. Technique des cylindres d'Agar

Les résultats du test de l'activité antibactérienne des isolats sont évalués aussi par la technique des cylindres d'Agar (Cf. Tableau n°37 et Planche n°29). Les isolats montrent un effet contre une seule

bactérie cible à l'exception de la souche *Neisseria* (B10) qui a donné un effet contre deux bactéries cibles, cinq souches ont donné un fort effet antibactérien et une seule souche à un effet intermédiaire.

Tableau n°37 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats évalués par la technique des cylindres d'Agar

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RH7	-	50mm	-	-	-
B13	-	-	-	22mm	-
B10	-	43mm	-	28mm	-
B30	-	-	32mm	-	--
B39	-	-	-	-	48mm

(-): Zone nulle.

Les plus importantes activités antibactériennes sont observées par la souche *Bacillus* (50 mm) vis-à-vis de la bactérie cible *S. typhimurium* et de la souche *Listeria* vis-à-vis de *P. aeruginosa*. La souche *Neisseria* (43 mm) a montré un effet vis-à-vis *S. typhimurium*. Deux souches ont donné un effet contre *E. coli*, la souche *Neisseria* (28 mm) et la souche *Bacillus* (22 mm). La souche B30 a fourni un résultat vis-à-vis *E. faecalis*. Aucun effet antibactérien contre *S. aureus* n'a été perçu.

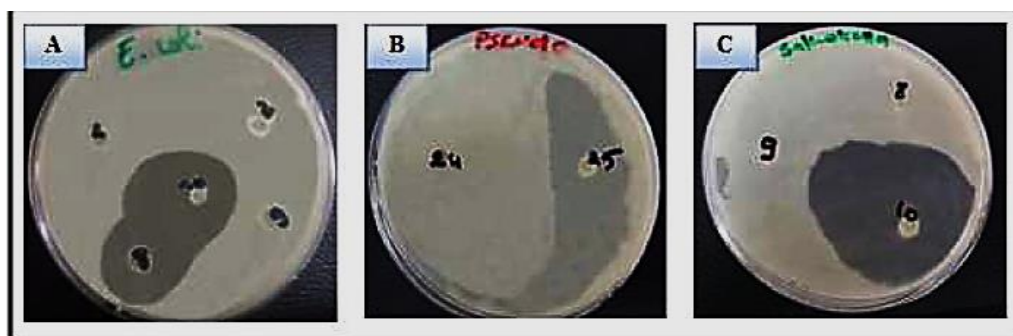


Planche n°30 : Activité antibactérienne des isolats par la technique de diffusion par disque

(A) : *Neisseria* (10) et *Bacillus* (8) vis-à-vis *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ; (B) : *Listeria* contre *Pseudomonas aeruginosa* ; (C) : *Neisseria* contre *Salmonella typhi*.

En comparant ces résultats à ceux du premier test, on remarque que les zones d'inhibition obtenues par la technique des cylindres d'Agar étaient nettement supérieures à celles obtenues par la technique de diffusion par disque, mais le nombre des souches ayant fourni un résultat positif était

supérieur à ceux de la technique des cylindres d'Agar. Donc la plupart des souches ont donné un effet par le test de diffusion par disque.

A titre d'exemple, pour la méthode des disques, les souches *Staphylococcus* (RH12), *Klebsella* (B26) et *Micrococcus* (RH3) ont fourni un effet contre trois bactéries cibles *S. aureus*, *S. typhimurium* et *P. aeruginosa* par contre, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour le test fait par la technique des cylindres d'Agar. La souche *Listeria* (B39) a inhibé la croissance de *P. aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 48 mm et 30 mm respectivement par la technique des cylindres et de diffusion par disque.

Le criblage des activités biologiques de nouveaux isolats constitue toujours la voie essentielle pour proposer, rechercher ou vérifier si une souche possède une activité biologique, qui permet de tester l'effet d'une molécule sur une cible biologique. Elle consiste à diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes (LARPENT & Sanglier, 1989 ; OUHDOUCH et al., 2001 ; HILALI et al., 2002 ; LEMRISS et al., 2003).

D'après les travaux de KILLIAN & FEHER (1939), les sols désertiques ne sont pas stériles et ils sont peuplés d'une microflore très variée. L'étude sur les sols désertiques suscitent de plus en plus un intérêt chez plusieurs chercheurs (HILALI et al., 2002 ; ZITOUNI et al., 2005). Les raisons principales sont d'étudier la biodiversité de ces sols en microflore et de tester leur capacité de produire de nouvelles molécules à diverses activités biologiques (FINANCE et al., 1985 ; LARPENT & Sanglier, 1989 ; HACENE et al., 1994 ; OUHDOUCH et al., 2001 ; ZITOUNI et al., 2005).

Dans cette partie, on a réalisé des tests d'antibiose de plusieurs échantillons provenant des sols arides du Sud-Ouest Algérien. Selon les résultats obtenus, les zones d'inhibition sont différentes selon la technique utilisée ; la méthode des cylindres d'Agar repose sur un contact direct entre les bactéries (test et ceux à tester), par contre la technique de diffusion par disque repose sur l'effet inhibiteur des surnageants des cultures des bactéries isolées. Les mêmes conditions sont utilisées durant ces méthodes telles que la température, la période d'incubation, les souches tests et les milieux de culture.

Le spectre d'activité de la substance inhibitrice est testé également sur deux genres de bactéries à Gram+ (*Enterococcus* et *Staphylococcus*) et trois genres de bactéries à Gram - (*Salmonella*, *Pseudomonas* et *Escherichia*). Les résultats positifs sont traduits par l'apparition des zones d'inhibition claires autour des diamètres. Les bactéries isolées représentent un effet généralement plus sensible aux Gram positif que les Gram négatif, ceci explique l'effet bactéricide des bactéries. Selon BISWAS et al. (1991) ont constaté que les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ et

agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (LAMMI, 2011).

Les résultats négatifs enregistrés envers les mêmes bactéries test peuvent être probablement dus à la résistance de ces dernières aux bactéries pathogènes, donc ces souches ont développé une résistance. Selon LAMMI (2011), ces résultats négatifs des isolats sur les microorganismes test peuvent être également expliqués par l'absence de récepteurs spécifiques aux substances bioactives produites par ces bactéries chez ces microorganismes.

Une autre hypothèse plausible, est que la quantité de ces substances synthétisées par les isolats de bactéries ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la CMI de chaque microorganisme test utilisé (DE OLIVA NETO et al., 2004).

IV.1.3. Activité antibactérienne des isolats fongiques

La mise en évidence de cette activité est réalisée par la technique de diffusion par disques en milieu gélosé MH, la technique des puits et la technique de cylindre d'Agar.

Le premier test effectué est la technique de diffusion par disques ; les résultats sont montrés dans le Tableau n°38 et la planche n°30. Les souches fongiques sont divisées en 3 groupes selon le diamètre de la zone d'inhibition :

Le premier groupe présente les souches qui ont des effets antibactériens forts, où les diamètres allant de 30 à 27 mm. La souche *Penicillium paxilli* (30 mm) ainsi que la souche *Penicillium sp.* (27 mm) ont montré une activité par la technique de diffusion par disques et deux genres d'*Aspergillus* (27 mm) et *Penicillium* (30 mm) ont montré une activité aussi importante par la méthode des puits.

Le deuxième groupe présente les souches ayant des effets antibactériens moyens, dont les diamètres varient entre 24 à 20 mm. L'activité de ce groupe a été exercée beaucoup plus par le genre *Penicillium*, dont les espèces apparentées sont *Penicillium olsonii* (24 mm) et *Penicillium paxilli* (20mm) par la méthode des puits, par contre un seul genre de *Penicillium* et d'*Aspergillus* présentent le même diamètre de 20 mm par la méthode de diffusion par disques.

Le troisième groupe présente les souches ayant des effets antibactériens faibles, dont les diamètres varient de 17 à 15 mm. Les souches à effet antibactérien faible, *Penicillium sclerotiorum* (15mm) même diamètre pour un seul genre d'*Aspergillus* et le même diamètre pour deux autres souches *Penicillium sp.* BTY2, *Aspergillus sp.* SF27 et *Aspergillus niger* a révélé un diamètre de 17 mm.

Tableau n°38 : Résultats de l'effet antimicrobien des isolats fongiques contre *Salmonella typhimurium*, par deux méthodes de la diffusion par disques et par puits.

Bactéries tests	Groupe	Méthode de diffusion par disques		Méthode de diffusion par puits	
		Isolats	Diamètre (mm)	Isolats	Diamètre (mm)
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	<i>Penicillium sp.</i>	27	<i>Apergillus sp.</i>	27
		<i>P. paxilli</i>	30	<i>Apergillus sp.</i>	30
	2	<i>Penicillium sp.</i>	20	<i>P. paxilli</i>	20
			20	<i>Penicillium sp.</i>	20
		<i>Apergillus sp.</i>		<i>P. olsonii</i>	24
				<i>Apergillus sp.</i>	20
	3	<i>Penicillium sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>	20
				<i>P. sclerotiorum</i>	15
		<i>Penicillium sp.</i>	15	<i>A. niger</i>	17
			<i>Apergillus sp.</i>	15	

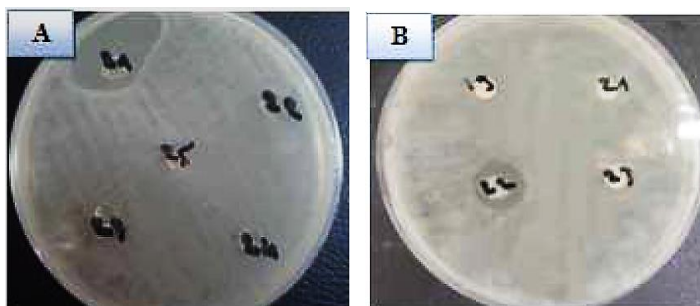


Planche n°31 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*, par la technique des puits et celle de diffusion par disques.

Tableau n°39 : Activité antibactérienne des champignons

Bactéries tests	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3	
	Isolats	Diamètres	Isolats	Diamètres	Isolats	Diamètres
<i>S. typhimurium</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	30 mm	<i>Penicillium sp.</i> <i>A. niger</i> <i>Aspergillus sp.</i>	22 mm	<i>A. flavus</i> <i>Penicillium sp.</i>	18 mm 17 mm
	<i>A. terreus</i>	27 mm		25 mm		
	<i>Penicillium sp.</i>	35 mm		25 mm		
	<i>Aspergillus sp.</i>	30 mm				
<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>	29 mm	<i>A. terreus</i>	20 mm	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	<i>Aspergillus sp.</i>	17 mm
<i>E. faecalis</i>	-	-	<i>Aspergillus sp.</i>	25 mm	-	-



Planche n°32 : Activité antibactérienne des champignons vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* par la technique de cylindre d'Agar.

(A) : *Aspergillus flavus* (08), (B) : *Aspergillus sp.* (13), *Penicillium sp.* (12) *Aspergillus sp.* (14).
(C) : *Aspergillus niger* (22).

La plupart des isolats fongiques ont développé une activité antibactérienne au moins sur une des bactéries tests. En effet, ces souches sont connues pour leur production de substances à effet antibactérien (BOTTON *et al.*, 1990). Ces métabolites secondaires biologiquement actifs, sont synthétisés en fin de croissances et ils sont de structures chimiques différentes de celles des protéines (ATTALAH & KACEM-CHAOUCHE, 1992). Les isolats *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium* ont aussi présenté une activité antibactérienne. En effet, il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de substances bioactives. Parmi les isolats qui ont présenté une activité antibactérienne à fort effet ; *Aspergillus chevalieri* (S53), *Aspergillus terreus* (S26).

Par ailleurs, les résultats du test d'antibiose ont montré que les 3 bactéries-cibles, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Salmonella typhi* sont sensibles à la souche *Aspergillus chevalieri* avec un diamètre d'inhibition de 22, 60 et 34 mm respectivement, et le même constat peut être dressé pour la souche *Aspergillus terreus* qui a présenté un effet sur les 3 bactéries-cibles *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* avec un diamètre d'inhibition de 19, 10 et 25 mm respectivement. Pour ce qui est de la souche *Cladosporium herbarum* l'efficacité n'a été enregistrée que sur les deux bactéries-cibles *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition de 20 et 30 mm respectivement.

La souche *Aspergillus flavus* a présenté un effet uniquement sur la bactérie-cible *Salmonella typhi* avec un diamètre d'inhibition de 40 mm. L'exploitation des résultats du criblage nous a permis de révéler une activité antibactérienne plus ou moins importante chez la plupart des souches ; Les extraits brute de différentes souches fongiques ont démontré une plus forte activité sur les bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif particulièrement la bactérie-cible *Bacillus subtilis*. Ceci s'adapte aux résultats obtenus par KHOLKHAL (2006). En effet, le milieu de culture peut

jouer un rôle décisif dans la présence de l'activité antibactérienne par différentes voies et ce par son influence à savoir, sa composition, sa richesse en matière nutritives, son pH et même son état liquide ou solide. (KHOLKHAL, 2006). Selon GADEN-JUNIOR (2000), la production des métabolites est sous l'influence de la composition des milieux de cultures, sa richesse en nutriments, plus d'autres aspects.

Différentes sources de carbones et d'azotes peuvent agir sur la synthèse des enzymes impliqués dans le métabolisme primaire et secondaire. Les microorganismes sont capables d'utiliser une large variété de sources de carbones et d'azotes. En outre, le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires par différents mycètes (DUMENIL & SANGLIER, 1989). De faibles variations de pH peuvent avoir des effets particuliers sur la productivité d'une souche (HATA et al., 1971).

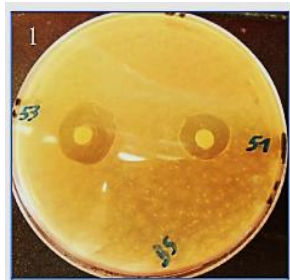


Figure n°13 : Activité antibactérienne des souches *P. glabrum*, *A. chevaluri* contre les bactéries-cibles *Bacillus subtilis* (1).

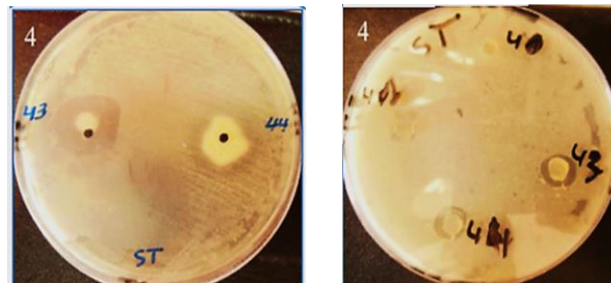


Planche n°33 : Activité antibactérienne de la souche *P. brevicompactum*, *A. niger* dans A et B contre la bactérie-cible *Salmonella typhi* (4).

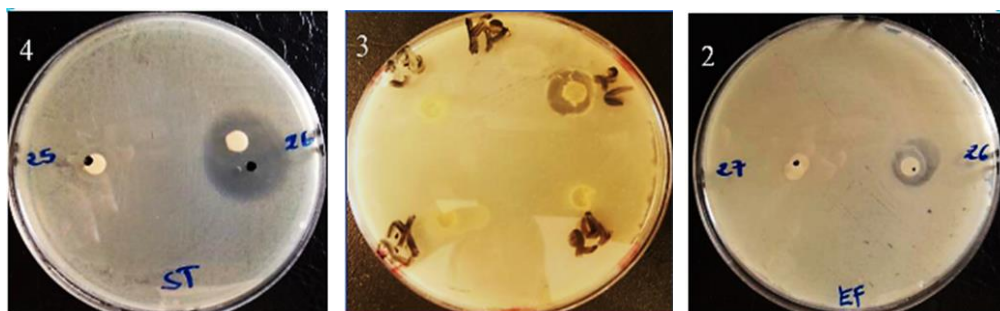


Planche n°34 : Activité antibactérienne de la souche *A. terreus* contre les bactéries-cibles *Enterococcus faecalis* (2), *Klebsiella Pneumoneae* (3), *Salmonella typhi* (4).

IV.1.4. Activité antibactérienne des actinomycètes

Dans le tableau n°40 nous avons sélectionné que les isolats d'actinomycètes actifs contre les microorganismes tests. Ces résultats indiquent qu'uniquement 17.07 % des isolats possèdent une activité antimicrobienne contre au moins une bactérie test, ces résultats sont variables d'un isolat à un autre.

L'effet antimicrobien de nos isolats actinomycètes se montre positif contre les microorganismes tests. Les pourcentages des isolats actifs en ordre décroissant sont : 61.53%, 42.30%, 38%, 23% et 7% respectivement pour *Candida albicans*; *E. coli*; *Staphylococcus aureus*; *Fusarium oxysporum albidinis*.

Nos résultats montrent que *Staphylococcus aureus* était très sensible vis-à-vis l'effet des isolats ACTB7, ACTE11, ACTD8, ACTE3, ACTE12, ACTD15, ACTD12, ACTD6, ACTE5 et ACTB18 ; il faut noter qu'une sensibilité maximale a été enregistrée contre ACTE5 avec une zone d'inhibition de (25mm).

L'activité antibactérienne envers *Escherichia coli* a été observée chez 12.19% des isolats. Cette dernière était très sensible contre les isolats ACTE7, ACTB13, ACTE11, ACTB7, ACTE10, ACTE12, ACTB8, ACTD18. Les deux isolats ACTE3 et ACTD11 présentent des zones d'inhibition importantes (25 mm et 24 mm) successivement.

L'isolat ACTD8 est sans effet contre *Aspergillus* et F.O.A. **BOUGHACHICHE et al. (2005)** et **BOUDEMAGH et al. (2005)** expliquent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

L'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positif pourrait être expliquée par la composition chimique de la membrane des Gram positif par le peptidoglycane et l'absence de la couche lipopolysaccharide (LPS) qui est présenté chez les bactéries à Gram négatif. Cette couche rend la membrane cellulaire imperméable aux substances lipophiles (**KIM et al., 2000**). Nos résultats sont inversement aux résultats obtenus par **George et al. (2012)**, qui évoque la sensibilité des bactéries à Gram positif aux sécrétions d'actinomycètes par rapport aux bactéries à Gram négatif. L'absence d'activité antibactérienne pour certains isolats d'actinomycètes vis-à-vis des germes tests pourrait être due au développement d'une résistance contre ces substances antimicrobiennes.

D'après nos résultats, et selon l'étude faite par **BOUDRAHEM (2015)**, six (6) isolats d'actinomycètes se sont avérés producteurs de substances anti *Staphylococcus aureus*. **Driche (2016)**

a sélectionné trois isolats présentant une activité non négligeable antagoniste vis-à-vis des bactéries à Gram positif en particulier les *Staphylococcus aureus*.

Tableau n°40 : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats actinomycètes contre les microorganismes tests, par la technique de cylindre d'agar.

Isolats	Diamètre de la zone d'inhibition en mm				
	S. aureus	E. coli	C. albicans	A. flavus	F.O.A
ACTB7	18	22	-	-	-
ACTE11	16	10	7	-	-
ACTB13	-	14	14	-	-
ACTE7	-	15	-	-	-
ACTD11	-	24	19	-	-
ACTD8	13	5	21	-	-
ACTE10	-	13	-	-	8
ACTE3	20	25	24	-	-
ACTE12	18	21	17	-	-
ACTB8	-	22	-	-	-
ACTD15	20	-	26	-	-
ACTD12	16	-	20	-	-
ACTD6	15	-	16	-	-
ACTD9	-	-	20	-	-
ACTD4	-	-	8	-	-
ACTD10	-	-	21	-	-
ACTB9	-	-	22	-	-
ACTD7	-	-	21	-	-
ACTE5	25	-	-	-	-
ACTB4	-	-	-	15	-
ACTD1	-	-	-	18	13
ACTD3	-	-	-	-	13
ACTX1	-	-	-	-	10
ACTE1	-	-	-	-	22
ACTB3	-	-	7	-	-
ACTB18	12	13	10	-	-

(-): Zone nulle.

Les travaux de **George et al.** (2012) confirment également les mêmes résultats que nous avons obtenus.

Nombreuses publiés scientifiques confirment l'effet antimicrobien des actinomycètes contre *Candida albicans*, ce qui concorde fortement avec nos résultats. Une étude montre que parmi 115 isolats isolés à partir de sol, 11,30% des isolats étaient significativement actifs contre *Candida albicans*

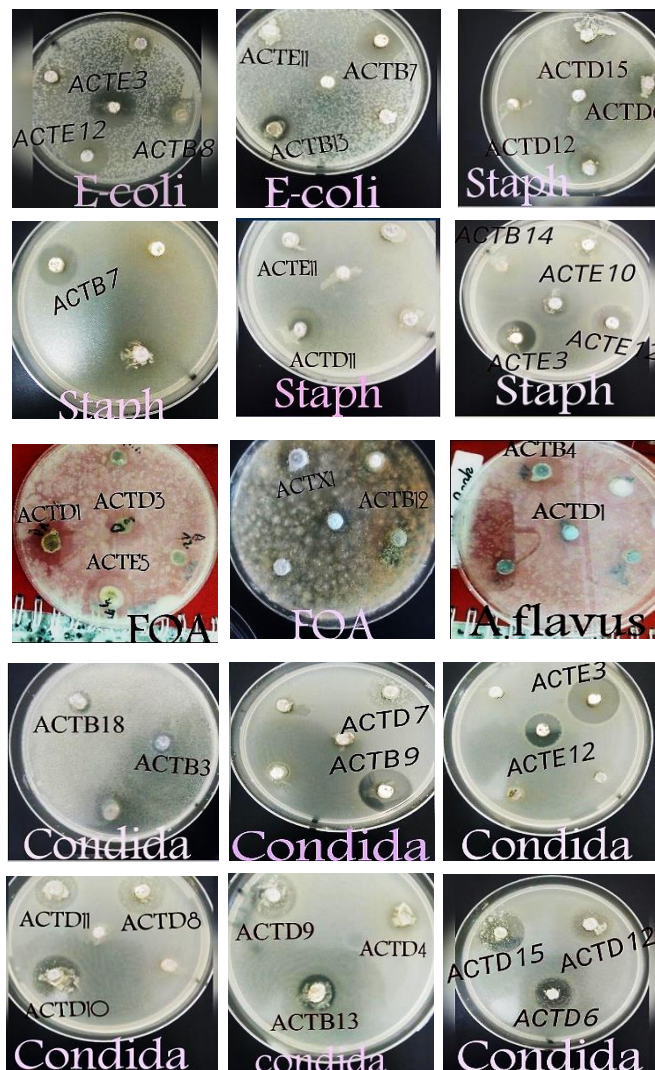


Planche n°35 : Effet antagoniste des actinomycètes contre les microorganismes tests, par la technique de cylindre d'agar.

(CHANDRASHEKAR *et al.*, 2019). Une évaluation de la bioactivité actinobactérienne de mangrove d'origine indienne contre *C. albicans* révèle que les deux isolats VITGAP240 et VITGAP241 se sont avérées avoir une activité antifongique potentielle contre tous les *C. albicans* testés (PAVAN *et al.*, 2018). Parmi les 51 espèces du genre *Streptomyces* 38 % ont montré une activité antimicrobienne contre un ou plusieurs organismes testés et six ont montré une activité prometteuse à large spectre contre tous les organismes testés *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (PANDEY *et al.*, 2011). Un criblage primaire de l'activité antimicrobienne a été effectué contre plusieurs organismes de test : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC25922) par la méthode de stries perpendiculaires, 43.34 % des isolats d'actinomycètes se sont révélés être de puissants producteurs d'antimicrobiens, parmi lesquels 46.34 % étaient efficaces contre les organismes de test Gram-positif et 12.19 % contre les organismes de test Gram-négatif (ANUPAMA *et al.*, 2020).

Il faut noter que les travaux de recherche faites sur l'antagonisme des actinomycètes vis-à-vis la souche *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* sont très rare et on peut dire même ils sont absents, en contrepartie il existe certains travaux utilisant autre forme spéciale de *Fusarium oxysporum f.sp.*, notamment la forme *F. o. dianthi*, *F. o. cyclaminis* et de *F. o. lycopersic* (SABAOU *et al.*, 1983). Ce dernier auteur avec son équipe ont découvert une actinomycète (X10) appartenant probablement au *Streptomyces*, isolé d'une souche de *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* avait des activités antibiotiques, mycolytiques et parasitaires contre neuf phytopathogènes "spéciaux" de *Fusarium oxysporum*. Selon CARTER & LOCKWOOD (1957) et les autres LOCKWOOD & LINGAPPA (1963), cette activité antagoniste est fréquemment observée chez les actinomycètes. Ces chercheurs ont isolé 14 actinomycètes capables de lyser le mycélium vivant de *Glomerella cingulata*, tandis que ZOGG (1976) a isolé un actinomycète à fort effet hypholytique sur le champignon *Gaeumannomyces graminis* (SABAOU *et al.*, 1983).

IV.2. Screening secondaire

Les résultats de screening secondaire sont présentés dans le tableau n°41. Nous avons remarqué que les extraits des solvants (ES1) benzène ; (ES2) n-butanol et (ES3) l'acétate d'éthyle, montrent une meilleure activité antifongique contre *A. flavus* et parallèlement les deux premiers solvants précédents révèlent un effet inhibiteur seulement sur *E. coli*, par contre l'effet antimicrobien contre la *S. aureus* a été exercé unique par l'extrait benzoïque (ES3).

L'extrait de métabolites secondaires des isolats par n-butanol est efficace contre les bactéries à Gram négatif et les souches fongiques. Par contre l'extrait par l'acétate d'éthyle est révélé avoir une

activité antibactérienne importante contre les bactéries à Gram positif et une activité modérée contre les bactéries à Gram négatif.

La plupart des extraits d'acétate d'éthyle des isolats sélectionnés ont montré une grande activité inhibitrice, cette inhibition est probablement due à la production de métabolites secondaires bioactifs plutôt qu'à la compétition pour les nutriments car les composés antibactériens sont sécrétés dans le milieu de culture. Selon les diamètres des zones d'inhibition, l'activité antibactérienne a été classée comme suit :

- a) Réponse très forte, diamètre de zone ≥ 30 mm ;
- b) Forte réponse, diamètre de la zone 21–29 mm ;
- c) Réponse modérée, diamètre de la zone 16–20 mm ;
- d) Réponse faible, diamètre de la zone 11–15 mm ;
- e) Peu ou pas de réponse, diamètre de zone ≤ 10 mm (MUTAI et al., 2009).

Nous avons remarqué que les souches CB40 ; B29 ; CB19 ; B21 ; RH4 ; CB10 ; RH2 ; RH7 ; RH3 ; B12 ; RH22 ; B26 ; RH26a ; RH26 ; B30 ; B9 et B42 ont une forte réponse contre *Aspergillus flavus*, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de la zone entre 21 et 29 mm. Ainsi que les souches présentent une réponse modérée de diamètre de la zone 16–20 mm sont B29 ; CB32 ; CB19 ; RH2 ; RH7 ; RH3 ; B13 ; RH22 ; GMS17 ; RH14 ; RH12 et B30 vis-à-vis *Aspergillus flavus* et *E. coli*.

Par contre une faible réponse a été enregistrée chez les souches suivantes : B31 ; RH21 ; RH4 ; CB10 ; B10 ; RH26a ; B21 et B42 contre *Aspergillus flavus* et *Staphylococcus aureus*.

Enfin les souches qui sont révélées peu ou pas de réponse avec un diamètre de zone d'inhibition ≤ 10 mm sont : CB40 ; CB28 ; CB32 ; B24 ; B10 ; B12 ; B13 ; B26 ; RH14 ; RH26 et B21 contre *Aspergillus flavus* et *E. coli*.

Le criblage secondaire de nos isolats (Cf. Tableau n°41), majoritairement appartenant au genre *Bacillus* à 73% suivi par le genre *Pseudomonas* à 6% puis avec un pourcentage de 3.33% pour chacun du genre *Shigella* et *Enterococcus*, s'est révélé actif contre tous les pathogènes choisis. Plusieurs auteurs ont montré l'activité antimicrobienne de ses bactéries dans leurs travaux de recherches.

Bacillus mojavensis SF16 inhibe la croissance d'*Erwinia amylovora* avec un diamètre de 18.3 mm et inhibée par *Bacillus sp.* 2026-2 avec un diamètre de 21 mm ainsi que *Bacillus subtilis* B1 montre une inhibition de 15% de la croissance mycélienne du *F. osysporum f. sp. albedinis* (ZAHIR et al., 2018).

Tableau n°41 : Résultats de screening secondaire des isolats bactériens

Pathogènes Solvants Isolats	<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	ES1	ES2	ES3	ES1	ES2	ES3	ES1	ES2	ES3
B31	15	13	/	/	/	/	/	/	/
CB40	10	30	/	/	/	/	/	/	/
CB28	10	10	/	/	/	/	/	/	/
B29	20	26	/	/	/	/	/	/	/
CB19	20	25	/	/	/	/	/	/	/
CB32	17	10	/	/	/	/	/	/	/
RH21	31	12	/	/	/	/	/	/	/
RH4	24	15	/	/	/	/	/	/	/
B24	10	10	/	/	/	/	/	/	/
CB10	23	11	/	/	/	/	/	/	/
RH2	20	25	/	/	/	/	/	/	/
RH7	20	25	/	/	/	/	/	/	/
RH3	31	23	/	/	/	/	/	/	/
B10	12	10	/	/	/	/	/	/	/
B12	30	30	8	/	/	/	/	/	/
B13	19	10	/	/	/	/	/	/	/
RH22	17	30	23	18	/	/	/	/	/
B26	15	10	30	/	/	/	/	/	/
GMS17	20	/	20	/	/	/	/	/	/
RH14	/	/	16	/	/	7	/	/	/
RH26a	/	/	25	/	/	/	/	/	13
CB16	/	/	/	/	/	/	/	/	/
RH26	30	/	8	/	/	/	/	/	/
RH12	19	10	/	/	/	/	/	/	/
B30	/	/	31	23	/	16	/	/	25
B21	/	/	12	10	/	/	/	/	/
B9	/	/	31	23	/	/	/	/	/
RH13	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B38	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B42	/	23	/	/	/	/	/	/	14

Solvants **S1**: benzène; **S2** : n-butanol; **S3** : l'acétate d'éthyle

Le genre *Bacillus* est capable de produire un grand nombre d'AMP et est donc considéré comme un point de départ prometteur dans la recherche de nouvelles substances inhibitrices. Plusieurs études ont montré que les membres de ce genre produisent une large gamme de substances antimicrobiennes, y compris les lipopeptides non ribosomiques, les bactériocines et autres types de peptides (SUMI *et al.*, 2015). La souche *B. subtilis* MIR15 présentait une activité antimicrobienne contre *P. aeruginosa*, *E. coli* et *M. luteus*. Ainsi que les souches appartenant aux : *B. thuringiensis*, *B. subtilis* et *B. megaterium* étaient actives contre *E. coli* et *Y. enterocolitica*. Différentes souches sont rapportées comme efficaces contre *S. aureus* : *B. subtilis* ATCC 6633, *B. megaterium* Y6 et *Bacillus spp.* TEM-FA-19. En outre, 14 souches de *Bacillus* étaient influentes contre *M. flavus* (YILMAZ *et al.*, 2006).

Les espèces *Bacillus* qui produisent des antibiotiques sont : *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*. Certains antibiotiques produits par *Bacillus* qui sont utilisés dans les traitements médicaux de nature polypeptidiques sont : la bacitracine, gramycidine S, polymyxine, tyrotricidine. Ainsi que tous les antibiotiques produits par l'espèce *Bacillus* sont plus efficaces contre les bactéries Gram-positif ; par contre, elles sont relativement moins efficaces comme antifongiques et contre les bactéries Gram-négatif. Les espèces de *Bacillus* ont un large spectre de leur effet antimicrobien, ils sont utilisés comme agents antifongiques, des agents antiviraux, agents anti-améobocytaires et des anti-mycoplasmes. De plus, il a été démontré que les espèces de *Bacillus* sont capables de produire une variété de peptides antimicrobiens. La surfactine, lipopeptide cyclique est un peptide antimicrobien important possédant une activité antibactérienne exerçant une action de perturbation de la membrane bactérienne (HORNG et al., 2019).

Des expériences antagonistes montrent que la souche *B. subtilis* JA fortement inhibe la croissance de *F. graminearum*, *R. solani*, *P. irregule* et *C. fulvum* qui sont des champignons phytopathogènes qui peuvent entraîner de graves pertes de production agricole (CHEN et al., 2008).

Cinq souches (P66, P30, P15, P64 et P20) isolées en Algérie ont été sélectionnées à partir d'une collection de 120 souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Pseudomonas putida*. Ces souches ont montré des potentialités appréciables dans les actions de biocontrôle et de biostimulation de la croissance végétale (BENCHABANE et al., 2000).

Les composés produits par *P. aeruginosa* tels que les phénazines ont des effets inhibiteurs contre le SARM (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) et peuvent être un traitement alternatif pour contrôler les infections causées par le SARM (CARDOZO et al., 2013).

Pseudomonas aeruginosa inhibe la croissance de : *Mycobacterium smegmatis* (12mm), *M. aurum*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Escherichia coli* DH5a et *Erwinia chrysanthemi*. Alors que *Pseudomonas moraviensis* SP9 inhibe la croissance d'*Erwinia amylovora* (A.I : 12.8 mm), et *Pseudomonas* sp. P1 a une inhibition de 15% de la croissance mycélienne du *F. osyosporum* f. sp. *albedinis* (ZAHIR et al., 2018).

P. aeruginosa a de puissantes activités antimicrobiennes. L'APC ou de la pyocyanine sont des composants antimicrobiens potentiels ont de forts effets inhibiteurs contre les cocci à Gram positif et le diplocoque à Gram négatif, mais pas contre les bacilles à Gram négatif. Ces résultats seront significatifs pour le traitement et la prévention de diverses infections en clinique, en particulier le SARM, le VISA et les infections fongiques (XU et al., 2017).

IV.2.1. Différents résultats des extraits

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes différents morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composant structurel lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (ZERROUG, 2018). La différence obtenue entre l'effet des extraits d'acétate d'éthyle, n-butanol et le benzène, sachant que chaque solvant permet d'extraire des composés différents, peut être expliquée par le fait que les composants bioactifs n'ont pas été bien dissous ou en très petite quantité, donnant par conséquence peu d'effet, et possible que les composants bioactifs ont une polarité qui est facile à extraire par l'acétate d'éthyle (OGUNDARE *et al.*, 2006).

Les bactéries sont des procaryotes avec une paroi cellulaire mince et un système génétique relativement simple, qui améliorent la pénétration facile des substances bioactives, conduisant à la manipulation du système génétique à la suite d'une interruption bioactive. Ainsi que les deux groupes de microorganismes différents morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composants structurels lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (ZERROUG, 2018). Les champignons, cependant, sont des eucaryotes à paroi cellulaire chitineuse (polysaccharides contenant de l'azote) qui empêchent la pénétration facile des substances bioactives. Encore une fois, les bactéries Gram positif possèdent une paroi cellulaire perméable qui ne limite généralement pas la pénétration des antimicrobiens comme le font les bactéries Gram négatif. La composition structurelle et la disposition de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif sont telles qu'elles ne permettent pas facilement la pénétration des composés bioactifs (OGUNDARE *et al.*, 2006).

IV.2.2. Résultat de l'analyse chromatographique

Nous avons utilisé la technique analytique de la chromatographie qui est sélective et sensible pour la mise en évidence du profil des métaboliques des extraits bruts de nos isolats.

Dans le but de séparer et savoir les compositions des extraits de nos isolats, nous avons réalisé des extractions par différents solvants pour effectuer une séparation par chromatographie sur couche mince selon les systèmes suivants :

- Système (I) phase polaire (acide) : isoamylacetate-méthanol-acide formique 99 % - eau (40 : 20 : 10 : 30 ; V/V).
- Système (J) phase polaire (neutre) : n-butanol - méthanol - eau (40 : 10 : 50 ; V/V).
- Système (E) phase polaire (Basique) : benzène - cyclohexane - tampon phosphate 0.15 M, pH 7.4 (5 : 35 : 60 ; V/V).

A la fin de la migration des spots déposés, une révélation des plaques CCM par un procédé physique (radiation UV à 265 nm) a été réalisé. La figure n°14 présente les résultats de la chromatographie sur plaque CCM et permettant de calculer le rapport frontal (Rf) dont ils sont illustrés dans le Tableau n°42.

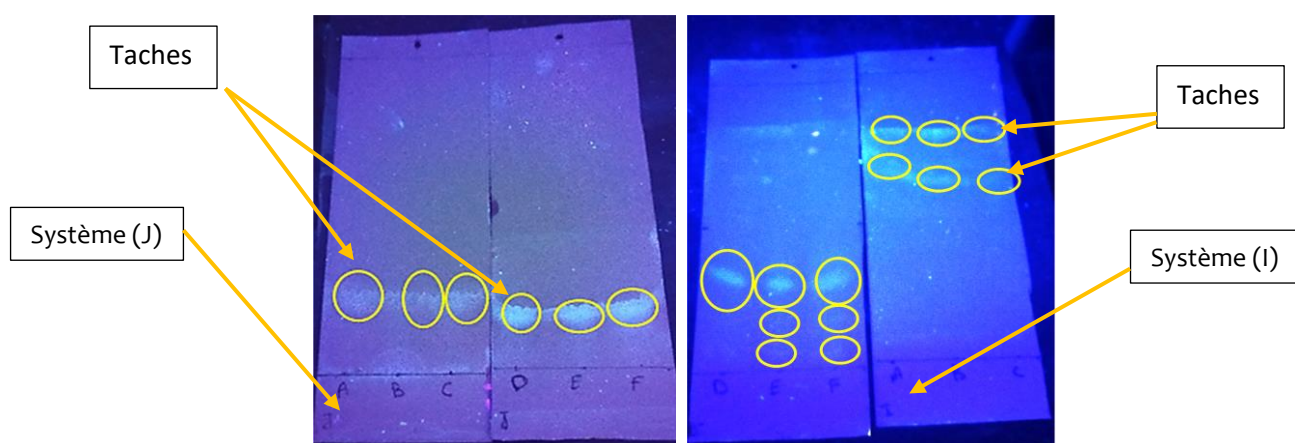


Figure n°14 : Résultats de la séparation des composants des extraits par CCM

Tableau n°42 : Résultats de la séparation des composants des extraits et calcul de leur Rf sur CCM.

Ordre spots	Isolats	Système (I)			Système (J)	
		Rf(1)	Rf(2)	Rf (3)	Rf (1)	Rf (2)
A	RH26a	0.78	0.94	/	0.55	/
B	B30	0.73	0.94	/	0.55	/
C	RH14	0.73	0.94	/	0.55	/
D	RH22	0.10	/	/	0.33	/
E	RH3	0.05	0.15	0.36	0.33	/
F	CB10	0.05	0.15	0.36	0.44	/

Pour le système (J) nous avons observé une seule tache pour chaque extrait brut testé RH26a ; B30 ; RH14 ; RH22 ; RH3 et CB10, par contre dans le deuxième système (I) nous révélons : trois taches pour RH3 et CB10, deux taches pour RH26a et B30, une tache pour l'extrait de l'isolat RH22. Cependant, pour le système (E) nulle tache a été observée sur la plaque CCM.

Ces résultats primitifs permettent l'hypothèse selon laquelle les composés des extraits utiles représentent des précurseurs actifs d'antimicrobiens extraits dans le surnageant et retrouvés dans les extraits obtenus d'acétate d'éthyle et n-butanol. L'affinité aux solvants organiques des molécules bioactives est un facteur important dans l'extraction de ces dernières (BOUGHACHICHE *et al.*, 2005).

V. Identification moléculaire

L'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des 17 isolats étudiés (B12, B9, B10, B13, B2, B29, B30, B31, RH2, RH3, RH4, RH7, RH12, RH14, RH22, RH26, RH26a) a été réalisée dans l'objectif de vérifier l'efficacité du protocole d'extraction ainsi que la pureté de l'ADN. Le gel du produit de PCR est montré dans la Planche n°36. La taille recommandée est de 1500 paires de base.

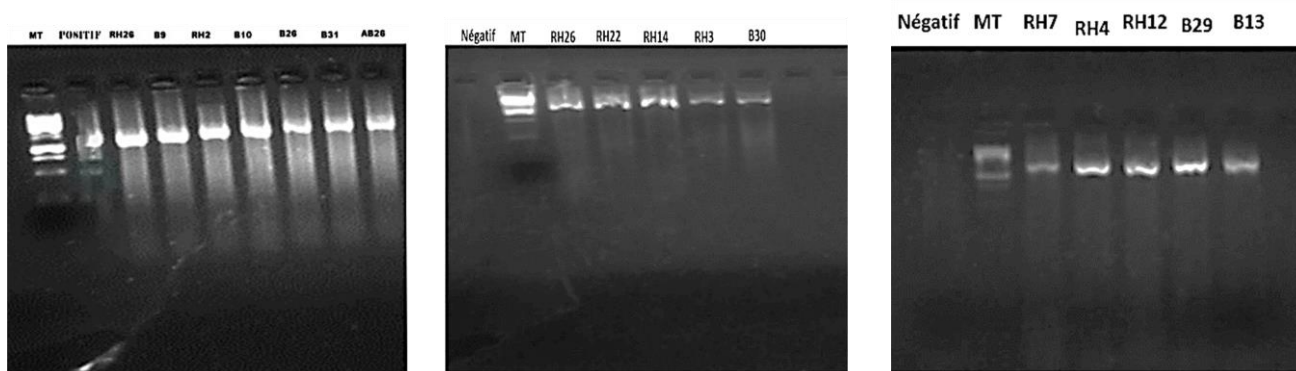


Planche n°36 : Résultats de la mise en évidence des amplicons de la PCR de nos isolats sur gel d'agarose.

L'identification moléculaire des isolats sélectionnés par rapport à leur potentiel antimicrobien montre qu'ils appartiennent aux *Bacillus* en premier rang suivi par le genre *Pseudomonas* ainsi qu'une seule bactérie appartient au genre de *Shigella*. Le pourcentage de similarité de nos isolats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°43 : Résultats d'identification moléculaire et l'enregistrement dans la GenBank.

Isolats	Identification	Origine de l'isolats	Homologie (%)	GenBank Numéros d'Accession
B9	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.29%	OM841555
B10	<i>Shigella boydii</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.44%	OM841556
B12	<i>Bacillus mojavensis</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.45%	OM841557
B13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	SEBKHA DE KENADSA	98.08%	OM841558
B29	<i>Bacillus Vallismortis</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.01%	OM841559
B30	<i>Bacillus subtilis</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.55%	OM841560
B31	<i>Bacillus thuringiensis</i>	SEBKHA DE KENADSA	99.28%	OM841561
RH2	<i>Bacillus Vallismortis</i>	GROTTE DE BOUKAIS	99.37%	OM841562
RH3	<i>Bacillus wiedmannii</i>	GROTTE DE BOUKAIS	99.52%	OM841563
RH4	<i>Bacillus proteolyticus</i>	GROTTE DE BOUKAIS	98.32%	OM841564
RH14	<i>Bacillus fungorum</i>	GROTTE DE BOUKAIS	99.85%	OM841565
RH22	<i>Bacillus wiedmannii</i>	GROTTE DE BOUKAIS	99.63%	OM841566
RH26a	<i>Pseudomonas helleri</i>	GROTTE DE BOUKAIS	97.12%	OM841567
B26	<i>Bacillus mojavensis</i>	SEBKHA DE KENADSA	95.85%	/
RH7	<i>Pseudomonas fragi</i>	GROTTE DE BOUKAIS	95.25%	/
RH12	<i>Pseudomonas fragi</i>	GROTTE DE BOUKAIS	96%	/
RH26	<i>Pseudomonas helleri</i>	GROTTE DE BOUKAIS	95%	/

V.1. Arbre phylogénétique

Le phylogramme ci-dessous a été produit de l'alignement des séquences d'ARNr 16S des différentes souches et des séquences des espèces selon la base de données génomiques NCBI (Cf. Figure n°15).

L'analyse phylogénétique de ce phylogramme nous a permis de conclure que nos isolats sont regroupés en onze espèces du genre *Bacillus*, cinq espèces du genre *Pseudomonas* et une espèce du genre de *Shigella*. La classification ascendante hiérarchique (CAH) des 17 souches bactériennes a permis de visualiser quatre groupes homogènes identifiés. Ce regroupement des séquences des isolats avec les espèces de la base de données NCBI est cohérent avec les résultats du séquençage du gène de l'ARNr 16S.

L'analyse des distances phylogénétiques sur le dendrogramme suivant la méthode **NEIGHBOR-JOINING** a révélé que chaque paire des souches (B13 et RH4) ; (RH3 et RH22) ; (B12 et B30) est identique et il est similaire avec un pourcentage de 98.08% à *Bacillus thuringiensis* 98.32% à *Bacillus proteolyticus* ; 98.32% et 99.63% à *Bacillus wiedmannii* ; 99.45% à *Bacillus mojavensis* et 99.55% à *Bacillus subtilis* respectivement (Cf. Tableau n°43).

Il faut noter que les isolats B26, RH7, RH12 et RH26 chacun est similaire avec un pourcentage de 95.85 % à *Bacillus mojavensis*, 95.25 % à *Pseudomonas fragi*, 96 % à *Pseudomonas fragi*, 95 % à *Pseudomonas helleri* respectivement. Ceci nous laisse dire qu'ils ont enregistré les plus bas pourcentages d'homologie que les autres souches. Il a été établi qu'un pourcentage d'homologie du gène codant pour l'ARNr 16S entre 95 et 97 % à l'intérieur d'un même genre indique une nouvelle espèce. En outre si le pourcentage d'homologie est supérieur à 97% dans ce cas il est nécessaire qu'une autre méthode doit être testée, comme l'hybridation ADN-ADN des génomes, pour confirmer si une souche appartient à une espèce existante ou est une nouvelle espèce. Un pourcentage d'hybridation sous le seuil de 70% indique une nouvelle espèce. En fin on ne peut cependant affirmer quoique ce soit sans avoir plus d'informations. Cela corrobore avec d'autres auteurs qui confirment que lorsque le pourcentage d'homologie des souches est supérieur à 97% ceci indique la même espèce et lorsque le pourcentage d'homologie est de 93% à 97% ceci indique le même genre mais une espèce différente, qui est le cas de nos isolats B26, RH7, RH12, RH26. Tandis qu'un pourcentage d'homologie inférieur à 93% plus vraisemblablement indiquera une nouvelle espèce bactérienne pas encore répertoriée dans la base de données (**BEKENNICHE, 2012**).



Figure n°15: Arbre phylogénétique des espèces identifiées. L'histoire évolutive a été déduite en utilisant la méthode NEIGHBOR-JOINING avec la méthode Bootstrap. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode p-distance. Cette analyse comprenait 43 séquences de nucléotides. Toutes les séquences contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Les analyses évolutives ont été menées sous le logiciel MEGA11.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'analyse microbiologique de la diversité des communautés microbiennes d'environnements extrêmes présente un intérêt sanitaire, industrielle, pharmaceutique et agronomique important. Elles permettent la découverte des métabolites secondaires produits par les microorganismes d'intérêt.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification des microorganismes producteurs des molécules bioactives d'intérêt, de ce fait, nous avons adopté une approche phénotypique et génotypique. Cela après avoir réalisé une étude bioclimatologique de différents biotopes dans le Sud et de Sud-Ouest algérien en l'occurrence : KARZAZ, KENADSA, IGLI, BOUKAISS, TIMENTIT, AOULEF, TIMIMOUNE, BECHAR, ADRAR ; ainsi que l'analyse physico-chimique des échantillons de chaque site de prélèvement. Un screening primaire et secondaire de l'activité antimicrobienne des isolats accompagnée d'une analyse chromatographique des extraits est réalisée ; et grâce à cette démarche que nous avons pu élaborer un soucier de microorganismes isolés toutes d'un environnement naturel extrême producteurs des métabolites potentiellement actifs contre plusieurs pathogènes.

À partir du diagramme Ombrothermique, la saison de Béchar est caractérisée par une période chaude qui s'étale du mois d'avril jusqu'au mois d'octobre, et une période humide qui s'étale d'octobre à avril. Alors que l'autre station d'Adrar caractérisée par une période chaude qui s'étale durant toute l'année et c'est également le même caractère pour la période humide. Les valeurs enregistrées des analyses physicochimiques des échantillons les qualifient extrêmes notamment le pH de nos échantillons qui varie entre 6.44 et 8.6, ce qui nous permet de constater que le sol d'AOULEF et de BOUKAIS ainsi que la sebkha de KANADSA sont des sols très alcalins. La sebkha de TIMENTIT, eau de « Mâdjen » de TIMIMOUNE et de KARZAZ leurs sols sont neutres, alors que le sol d'Igli est alcalin par contre le sol de ksar KENADSA est acide. A l'aide des clés d'identification de **PITT et HOCKING (2009)**, les isolats fongiques sont en nombre de cinquante-six (56), ce qui correspond à 20% des microorganismes isolés, nous avons pu constater la dominance de deux genres : *Penicillium* et *Aspergillus*. Ils sont très résistants à la sécheresse et constituent la flore fongique principale du sol. Les bactéries représentent un pourcentage de 80% des microorganismes trouvés, en nombre de (224) sont des isolats bactériens et elles sont les plus abondantes et métaboliquement les plus actives du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont présentées : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et

anaérobies. D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que le nombre des colonies isolées varie selon le milieu de culture utilisé et le prétraitement qu'ont subi les échantillons, et cela influence considérablement sur le type des actinomycètes isolés.

D'après ce travail, les diamètres de zones d'inhibition relevés, varient de 10 à 50 mm. Les isolats classés en 1er groupe ont provoqué une importante inhibition vis-à-vis d'*E. faecalis*, de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* dont le diamètre d'inhibition le plus important est de 40 mm, observé chez les souches suivantes : *Clostridium* (Rh7), *Klebsella* (B26), *Bacillus* (B13) et (B29) vis-à-vis des bactéries pathogènes. L'effet antimicrobien de nos isolats actinomycètes se montre positif contre les microorganismes tests. Les pourcentages des isolats actifs en ordre décroissant sont : 61.53%, 42.30%, 38%, 23% et 7% respectivement pour *Candida albicans* ; *E. coli* ; *Staphylococcus aureus* ; *Fusarium oxysporum albidinis*.

D'après la lecture des résultats de screening secondaire, ont remarqué que les extraits des solvants (ES1) benzène ; (ES2) n-butanol et (ES3) l'acétate d'éthyle, montrent une meilleure activité antifongique contre *A. flavus* et parallèlement les deux premiers solvants cités précédemment révèlent un effet inhibiteur seulement sur *E. coli*. Par contre l'effet antimicrobien contre la *S. aureus* a été exercé unique par l'extrait benzoïque (ES3).

L'identification moléculaire des isolats sélectionnés par rapport à leur potentiel antimicrobien montre qu'ils appartiennent aux *Bacillus* en premier rang suivi par le genre *Pseudomonas* ainsi qu'une seule bactérie appartient au genre de *Shigella*. On a pu enregistrer 13 souches isolées à partir de la Sebka de KENADSA et la Grotte de BOUKHAIS.

Notre étude est donc le point de départ pour approfondir et caractériser les propriétés des microorganismes, possédant des capacités antimicrobiennes, isolés des environnements extrêmes. Cependant les microorganismes investigués ici nous permet de conclure que les milieux extrêmes dans le sud-ouest Algérien sont riches et dotés d'une diversité microbienne prometteuse pour sélectionner des isolats pertinents à des fins thérapeutiques des industriels.

Cette contribution peut être complétée par des études supplémentaires et nécessaires afin d'enrichie, d'améliorer ce travail et sans doute pour obtenir des résultats meilleurs. Pour cela nous proposons les points suivants :

1. L'optimisation des conditions de production des métabolites biactifs au niveau des techniques de fermentation et d'extraction.

2. Poursuivre des études sur tous les isolats en purifiant leurs métabolites secondaires bioactifs, en déterminant leur structure chimique et leurs CMI contre les pathogènes multirésistants aux antibiotiques.
3. Exploiter les nouvelles techniques de caractérisation moléculaire et identification comme la MALDI-TOF, la méthode MLST (Multilocus Sequence Typing).
4. Evaluer la résistance aux antibiotiques des microorganismes tests.
5. L'étude du potentiel biotechnologique des isolats.
6. Une investigation chimique qui aboutira à l'identification et la purification de nos molécules bioactives.
7. Tester d'autre effet biologique de ces isolats (Antiparasitaire, antitumoral et l'effet insecticides, etc.).
8. Tester la capacité de biodégradation de nos isolats et la mesuré par des méthodes quantitatives comme l'HPLC ou la GC et évaluer leur potentiel face aux polluants.

**REGULAR ARTICLE**

Isolation and Characterization of Antibacterial *Bacillus* species from Soil Samples in Southern Algeria

Moulay M'Hammed Akermi^{1*}, Djamel Eddine Abdelouahid¹, Abdel-Ilah Amrouche², Halima Dalile³

¹Microbiology Applied to Biomedical Agrifood and Environment, abou bekr Belkaid University, Tlemcen, Algeria

²Sustainable Management of Natural Resources in Arid and Semi-Arid Zones Institute of Science and Technology - Department of Natural and Life Sciences - Salhi Ahmed-Naama University Center, Algeria

³Environment and Health Research Laboratory, University of Sidi-bel-Abbes, Sidi-bel-Abbes, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 11 Apr 2020

Revised: 21 Jun 2020

Accepted: 27 Jun 2020

***Corresponding Author:**

Email: mokermi@yahoo.fr

Telephone: (+213)671056096

Keywords: Antimicrobial activity; *Bacillus*; resistant pathogens; Algerian South

ABSTRACT

Aiming to find a *Bacillus* capable to inhibit standard pathogenic bacteria growth, search has been conducted in Southern Algeria. The oldest Algerian Ksar soils could be a precious resource of both bacillus taxa and bioactive compounds. A 2000 soil, distributed at a rate of 50g, was sampled from various places (east, west, north and south directions) in the Ksar site. Isolation media nutrient agar (GN) and tryptic soy agar (TSA) were inoculated by spreading tablecloth by 01 ml of dilution previously prepared. Their antibacterial activity against four pathogenic bacteria was evaluated according to two stages consisting of a primary and secondary screening. A phenotypic and biochemical characterization was carried out for the isolates selected according to their antibacterial power. Soils samples thereof led to the recovery of 44 diverse bacillus strains. Seven bacillus strains amid the 44 recovered were selected for their antibacterial properties. Tests indicated that *Bacillus* (BP2) and *Bacillus* (BP4) strains showed the two widest inhibition zones against *Salmonella typhi* with a diameter of 35 and 25 mm respectively. Against *Escherichia coli* the former (BP2) exhibited a 22 mm inhibition zone. Thus, the current study based on Algeria South soils samples seems promising for discovery of new bacillus strain and novel bioactive substances.

1. Introduction

Antimicrobial resistance has grown, more rapidly than new health products being developed, threatening public health in an unprecedented wide scale (Yilmaz et al., 2006). According to WHO (World Health Organization) the number of resistant pathogens has been growing such that antimicrobial drugs available are no longer effectual and some of it seemingly useless (Parisien et al., 2008). Inade-

quate consumption of inappropriate antibiotics as well as inadequate dosage have been recognized as the main causes of the advent of resistant pathogenic microorganisms.

Peptides, created by the bacillus family, have shown most recently a large antimicrobial aptitude in dealing with pathogenic microbes (Sumi et al., 2015), in particular the Lichenin and Bacillocin produced by *B. licheniformis*, as reported by (Pattnaik



Bibliographie



BIBLIOGRAPHIE

Abbas M, Reza Farrokhi N, Nasrin Noras M., (2012). *Fusarium verticillioides* from surgarcane, vegetative compatibility group and pathogenicity. *Plant Protection Science*, 48(2) : 80-84.

Adegboye, M. F., & Babalola, O. O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res*, 7(15), 2255-2261.

Adouane, s. (2016). Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès, Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra. 209 pages.

Afnor, (1996). Qualité des sols. Recueil de normes françaises, Afnor Paris.

Alauzet C., (2009). Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Nancy, 372pages+annexes.

Alber S., Vossenber J., Driessen A. and Konings W., (2001). Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, *Extremophiles*, 5: 285-294.

Allaoueddine B., (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycètes productrices de molécule antifongique, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantin. 152pages + annexes.

Alonso L., (2018). Hétérogénéité spatio-temporelle du microbiote de la grotte de Lascaux (Doctoral dissertation, Université de Lyon) ,128pages+ annexes.

Álvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocana, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J., Larriba, G., & Coque, J. J. R. (2002). Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2, 4, 6-trichloroanisole by O methylation of 2, 4, 6-trichlorophenol. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 5860-5869.

Ameur, H., (2014). Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride, Thèse de doctorat en microbiologie, université Ferhat Abbas Sétif 1 : p145 + annexes.

Amin, M., Rakhisi, Z., ZAREI, A.A., (2015). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties, 2, 23233.

Anderson, A. S., & Wellington, E. M. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 797-814.

Anjum, N., & Chandra, R. (2015). Endophytic bacteria: optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(4), 233-238.

Anupama S, Aishwarya T., Anupa B., Muskan S., Prativa S., Sagar A., (2020). « Isolement, caractérisation et dépistage des actinomycètes producteurs d'antimicrobiens à partir d'échantillons de sol », International Journal of Microbiology, vol. 2020, Article ID 2716584, 7 pages,

Aouati, H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline: Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques Mémoire Magistère en microbiologie appliqué et biotechnologie microbienne. Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine, Algérie.94 pages.

Asker D, Amano S-I, Morita K, Tamura K, Sakuda S, Kikuchi N, Furihata K, Matsufuji H, Beppu T, Ueda K (2009) *Astaxanthin dirhamnoside*, a new astaxanthin derivative produced by a radio-tolerant bacterium, *Sphingomonas astaxanthinifaciens*. J Antibiot 62 : 397–399.

Attalah, M., Kacem-Chaouche, N. (1992). Production of ochratoxin A in asemisynthetic. In: The second Regional Mycoligical Conference RMC2, Cairo. Egypt.

Ayad. R (2012). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaire chez des microorganismes halophiles aérobies isolé d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Thèse de Magistère. Université de Constantine. 177 pages

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

Bagnouls, F., & Gaussen, H. (1957). LES CLIMATS BIOLOGIQUES ET LEUR CLASSIFICATION. Annales de Géographie, 66(355), 193–220.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2), 71-79.

Band, V. I., Crispell, E. K., Napier, B. A., Herrera, C. M., Tharp, G. K., Vavikolanu, K., ... & Weiss, D. S. (2016). Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. Nature microbiology, 1(6), 1-9.

Barkley TM, Brouillet L, Strother JL. (2006). Asteraceae. in Flora of North America, vol. 19. Oxford University Press, New York, Pages 3-69.

Bekenniche, N., (2012) Exploration de la biodiversité microbienne dans des sites pollués par les hydrocarbures en Algérie (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).171 pages +annexes.

Belkhodja, H. (2016). Effet Des Biomolécules Extraites À Partir De Différentes Plantes De La Région De Mascara : Evaluation Biochimique Des Marqueurs D'ostéoarticulation Et De L'activité Biologique [Thèse de Doctorat, Université Mustapha Stambouli - Mascara].128 pages.

- Belyagoubi, L.** (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens (Doctoral dissertation, thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, 209p.
- Belyagoubi, L., Belyagoubi-Benhammou, N., Jurado, V., Dupont, J., Lacoste, S., Djebbah, F., ... & Saiz-Jimenez, C.** (2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *International Journal of Speleology*, 47(2), 8.
- Benabadji, N., & Bouazza, M.** (2000). Quelques modifications climatiques intervenues dans le Sud-Ouest de l'Oranie (Algérie Occidentale). *Journal of Renewable Energies*, 3(2), 117-125.
- Benchabane, M., Bakour, R., Toua, D., & Boutekrabt, A.** (2000). Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30(2), 243-246.
- Bendjelid, A.** (2001). La ville et les géographes oranais. Analyse critique des mémoires universitaires en géographie (1992-2001). *Insaniyat / إنسانيات*. Revue algérienne d'anthropologie et de sciences sociales, (13), 75-93.
- Benguedouar, A.** (2006). Etude de la symbiose : *Rhizobium Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. Thèse de doctorat. Université de Constantine.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z.** (2019). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 706-712.
- Benlarbi, L.**, (2019) Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Thèse Doctorat. Université ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM.175 pages.
- Benmoussa, Y., Rezzoug, C., Remini, B., & Belhadj, M.** (2015). Ressources et partage de l'eau dans l'oasis de Kenadsa (Sud-Ouest Algerien) : approche historique et constat. *Cinq Continents*, 5(11), 81-92.
- Bennett RS, Spurgeon DW, DeTar WR.** (2011). Efficacy of four soil treatments against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on cotton. *American Phytopathological Society*, 95(8) : 967-976.
- Beranger, M.** (2014). SPV 1 : Extraction de la fraction d'ADN, libre de nucléosomes, contenant les gènes actifs du testicule ou du foie de verrat/SPV 2 : Contrôle de 16 couples d'amorces par PCR (Polymérase Chain Reaction), 28 pages.
- Berdoulay, M.** (2008). Analyses physico-chimiques et microbiologiques de façades en pierre exposées aux embruns marins du Golfe de Gascogne. Thèse de Doctorat. Université De Pau.
- Berdy J.** Bioactive microbial metabolites. *Tokyo Journale Antibiotque* 58, (2005) : p 1-26.

- Berrada, I.** (2012). Etude de la biodiversité des bactéries telluriques halophiles au niveau du Bas Loukkos (Marais salants & Marecage de Beggara). 142 pages.
- Bertrand, J. C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Ngando, T. S.** (Eds.). (2015). Environmental microbiology: fundamentals and applications. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 933 pages.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. et Ray, B.** (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, *PediocinACH*, by *Pediococcus acidilactici*H. Applied and Environmental Microbiology. 57:1265-1267.
- Bitton, G.** (2005). Wastewater microbiology. John Wiley & Sons. 772 pages
- Bonnin, T., & Lombard, J.** (2019). Situer l'analyse phylogénétique entre les sciences historiques et expérimentales. Philosophia Scientiæ. Travaux d'histoire et de philosophie des sciences, (23-2), 131-148.
- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J.G., Sermswan, R.W.,** (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. AMB Express. 7, 16.
- Borras O, Santos R, Matos AP, Cabral RS, Arzola M.** (2001). A first attempt to use *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant for fusarirose disease. Plant Breeding, 120(5): 435-438.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy P., Larpent J., Reymond P., Sanglier J., Vayssier Y. and Veau P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ième Ed, Masson, Paris : p512.
- Boualem, R., Jean, A., & Bachir, A.** (2015). The garden foggara of Timimoun (Algeria): The decline of hydraulic heritage. Asian Journal of Water, Environment and Pollution, 12(3), 51-57.
- Bouchaffa, K.,** (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire de Magister. 90 pages.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua, S., ... & 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(1), 39-44.
- Bouderhem, A.** (2018). Utilisation des souches bactériennes telluriques sahariennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 107 pages.

- Boudjella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N** (2006) Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil *Microbiol Res* 161 : 288–298
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., Oulmi, L., Boudemagh, A., Kitouni, M., & Boulahrouf, A.** (2005). Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une Actinomycetale isolée de Sebkhia de Ain Mlila (Algérie). *Antibiotiques*, 7(4), 234-238.
- Bouhata, R.** (2007). Analyse de la dynamique des sebkhas et son impact sur la vulnérabilité au risque d'inondation dans les dépressions endoréiques situées entre zana et madghassen à l'aide de l'imagerie satellitaire landsat. Thèse de Doctorat, université de Batna. 152 pages.
- Boumaraf, B.** (2013). Caractéristiques et fonctionnement des sols dans la vallée d'Oued Righ, Sahara Nord Oriental Algérie. Thèse de Doctorat, université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE .80 pages.
- Bourguignon, C., & Bourguignon, L.** (2008). Le sol, la terre et les champs : pour retrouver une agriculture saine. Sang de la terre, Paris, France 223 p.
- Boutabba, H., Mili, M., & Boutabba, S. D.** (2016). L'architecture domestique en terre entre préservation et modernité : cas d'une ville oasienne d'Algérie" Aoulef". *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (10) (2016) 3558-3570.
- Boutalba, S.** (1997). Contribution à l'étude de la flore fongique du lac d'El Goléa : taxonomie, écologie et production de métabolites. Mémoire de Magistère en biologie. Université Abou Bekr Belkaid. 80 pages.
- Boutelli, M. H., Mekhloufi, N., & Lahrach, A.,** (2017). Evolution de la minéralisation et traitement de la dynamique des sels au sien du sol et de l'eau phreatique au niveau de la sebkha de ouaragla. الملتي الدولي الثاني حول: الموارد المائية" تقييم وإقتصاد وحماية" يومي الاثنين والثلاثاء 21 و22 ديسمبر 2016
- Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J.** (2009). Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life?. *Saline systems*, 5(1), 1-8.
- Brady, SF et J. Clardy.** (2000). CR377, un nouvel agent antifongique pentakétidique isolé d'un champignon endophyte. *J. Nat. Prod.* 63 : 1447-1448.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L., & Tomassone, R.** (1997). A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *International journal of food microbiology*, 38(2-3), 157-167.
- Calvet, R.** (2003). Le sol : propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales (Vol. 2). France Agricole Editions. 511 pages.

Cannell R. How to approach the isolation of natural products. In: Natural Products Isolation. Ed. Cannell R. J. P. Human Press. New Jersey, (1998): p 1-51.

Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R., Andrade, C. G., Silveira, W. D., & Nakazato, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1), 1-8.

Carter, H. P., & Lockwood, J. L. (1957). Methods for estimating numbers of soil microorganisms lytic to fungi. *Phytopathology*, 47, 151-154.

Cavalla M, Eberlin T. (1994). Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron* ;19:13-7.

Cavicchioli, R. (2016). Sur le concept de psychrophile. *ISME J* 10, 793-795.

Cayol, J. L., Ducerf, S., Patel, B. K., Garcia, J. L., Thomas, P., & Ollivier, B. (2000). *Thermohalobacter berrensensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 559-564.

Chabasse, D., Bouchara, J.-P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P., (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation, BIOFORMA*. 230 bd Raspail 75014 Paris.161pages.

Chandrashekar, A., Muralidharan, A., Koteshwara, A., Alex, A. T., & Subrahmanyam, V. M. (2019). Isolation and Characterization of an actinomycete strain producing an antifungal metabolite effective against *Candida albicans*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(10), 4601-4606.

Chargaff, E. and Vischer E. (1949) The composition of the desoxyribose nucleic acids of thymus and spleen. *J. Biol. Chem.* 177:405-416.

Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 180-186.

Cherif H., (2014). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp.* et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides, thèse de doctorat en microbiologie, université Ferhat Abbas Sétif 1: p162.

Cherifi, T. (2003). Etude de l'influence de la structure de la végétation sur les peuplements d'oiseaux dans l'Oasis de Tamentit (Adrar). Mémoire de Magister, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediène (USTHB).111pages.

Chilcott, C., Wigley, P., (1993). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61, 244-247.

Christiane, P., Chuvfrank, B., Dominique, B. Et Frank, B. (2006). Microbiologie pathogène de l'infection formation H+, formation en stérilisation.

- Cohen, A. G.** (2017). Des lois agronomiques à l'enquête agroécologique. Esquisse d'une épistémologie de la variation dans les agroécosystèmes. Tracés. Revue de sciences humaines, (33), 51-72.
- Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., Traore, A.S.,** (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 10, 198-210.
- Cook, R. J.** (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annual review of phytopathology, 31(1), 53-80.
- Coque, R.** (1962). La Tunisie présaharienne : étude géomorphologique (No. 551.409611). A. Collin.
- Corbaz, R.** (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques. 1st edition, Presses polytechniques et universitaires romandes, 284 pages.
- Coté, M.** (Ed.). (2005). La ville et le désert : le Bas-Sahara algérien. Karthala Éditions, 306 pages.
- Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M., Ousley M.A.** (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol 59:3899-905.
- Cronberg G., Lindmark G., Bjork S.** Mass opment of the flagellate Gonystomum semen (Raphidophyta) in Swedish forest lakes - an effect of acidification? Hydrobiologia 161, (1988): p 217-236.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(16), 10494-10499.
- Davet, P., Rouxel, F.,** (1997). Détection et isolement des champignons du sol, Editions Quae. 203 pages.
- De Oliva Neto, P., Ferreira, M. A., & Yokoya, F.** (2004). Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. Bioresource technology, 92(1), 1-6.
- De Souza, J. T., De Boer, M., De Waard, P., Van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M.** (2003). Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. Applied and environmental microbiology, 69(12), 7161-7172.
- Delille, L.** (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Edition Berti. Alger, 122.
- Demain, A. L.,** (2000). Microbial biotechnology. Trends in biotechnology, 18(1), 26-31.
- Dierthard. B** (2012). Electrophorèse SDS PAGE : principe et exemple d'application en STL Biotechnologies. Article de Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen.

- Djaballah C.** (2010). Biodiversité des Actinomycètes Halophiles et Halotolérante Isolat de la sebkha d'Ain Mlila, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, pp :1-94.
- Djebbah, F. Z., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Belyagoubi, L., Kherbouche, F., Abdelouahid, D. E., & Ravindran, B.** (2022). Isolation and characterisation of *Streptomyces* sp. Strain GLD25 with antimicrobial and antioxidant effects from Gueldaman cave (GLD1), Akbou-Algeria. *Journal of King Saud University-Science*, 34(1), 101719.
- Djebbah, F. Z., Belyagoubi, L., Abdelouahid, D. E., Kherbouche, F., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., & Ravindran, B.** (2021). Isolation and characterization of novel *Streptomyces* strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens. *Journal of Infection and Public Health*, 14(11), 1671-1678.
- Dommergues Y., et Mangenot F.,** (1970). *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie (Eds.), Paris. 803 pages.
- Driche, E.** (2016). Isolement, taxonomie et caractérisation des molécules bioactives d'actinobactéries des sols sahariens antagonistes de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en sciences biologiques. L'école Normale Supérieure De Kouba-Alger.
- Dubief, J.** (1963). Le climat du Sahara, tome 2, fascicule 1. Mem. de l'Inst. de Rech. Sahariennes, 275.
- Dubief, J.** (1965). Le climat du Sahara. In *Annales de géographie* (Vol. 74, No. 403, pp. 360-361). Persée-Portail des revues scientifiques en SHS.
- Duffy B. et Defago G.** (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* 65: p 2429- 2438.
- Dumenil G. et Sanglier J.J.** (1989) Physiologie de la production des antibiotiques, dans :Larpent J.P. et Sanglier J.J. *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson Edition Paris : 195-217.
- Eccleston G., Brooks P., Kurtboke D.** The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia, *Marine Drugs*, 6, (2008): p 243-261.
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J., & Weyens, N.** (2015). Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial biotechnology*, 8(4), 707-715.
- Eghbalpoor, F., Habibi, M., Azizi, O., Asadi Karam, M. R., & Bouzari, S.** (2019). Antibiotic resistance, virulence and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in community-and hospital-acquired urinary tract infections in Iran. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 66(3), 349-366.
- El-Nakeeb, M.A., Lechevalier, H.A.,** (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied microbiology*. 11, 75-77.

- Emberger, L.** (1930) La végétation de la région méditerranéenne : Essai d'une classification des groupements végétaux *Revue Générale de Botanique*, 42, 641-662+705-721.
- Erwan, L.**, (2001). Le sel et les microorganismes, thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de maison alfort : p143.
- Essamkaoui, I.**, (2012), Les onychomycoses à moisissures et pseudodermatopytes à l'hôpital militaire d'instruction. Thèses de pharmacie, univ Mohammed V de Rabat, 132 pages
- Essodolom T.** (2016). Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du soumbala, du bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines, thèse de doctorat en : sciences biologiques appliquées, université Ouaga 1 par Joseph Ki-Zerbo, : p207.
- Estefan, G., Sommer, R., Ryan, J.**, (2013). *Methods of soil, plant, and water analysis. A manual for the West Asia and North Africa region*. 3.
- Faugier, A.** (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires "the rare biosphere". Thèse de doctorat en Microbiologie, Ecole Centrale de Lyon, France. 173 pages.
- Fernandez D, Lourd M, Ouinten M, Tantaoui A et Geiger JP.** (1995). Le Bayoud du palmier dattier. Une maladie qui menace la phoeniculture. *Phytoma. La défense des végétaux*. n°469.
- Fezzioui, N., Khoukhi, M., Dahou, Z., Aït-Mokhtar, K., & Larbi, S.** (2009). Bioclimatic architectural design of ksar de kenadza: south-west area of Algeria hot and dry climate. *Architectural Science Review*, 52(3), 221-228.
- Finance C., Ouhdouche Y., Jaques A., Bonaly R.**, (1985). Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycétales isolées à partir des milieux naturels. *Ana. Biol. Clin (Paris)*. 43: 652.
- Foster, R. C.** (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and fertility of soils*, 6(3), 189-203.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P., Samson, R.A.**, (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*. 28, 442-453.
- Fritze, D.** (1996). *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 98-101.
- Gaden-Junior EL.**, (2000). Fermentation process kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 67: pp 629-639.

- Gans, J., Wolinsky, M., & Dunbar, J.** (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309(5739), 1387-1390.
- Garreau, J.** (1991). Foucault (A.) et Raoult (J.-F.). —Dictionnaire de géologie. In: *Norois*, n°150, Avril-Juin 1991. Amérique du Nord. p. 235 ;
- Gast WRJ, Scott DW, Schmitt C et al.** (1991) Blue Mountains Forest health report—new perspectives in forest health. Pacific Northwest Region, Portland, p 182
- Gautier, E. F.** (1910). La conquête du Sahara. A. Colin. Essai de psychologie politique. Paris, Librairie Armand Colin, 1910. In - 12, [iv] + 261 p .326 pages.
- Gautier, É. F., & Chudeau, R.** (1908). Missions au Sahara (Vol. 1). Librairie A. Colin, Original provenant de la New York Public Library, Armand Colin. 371 pages.
- Geiser, D. M., Lewis Ivey, M. L., Hakiza, G., Juba, J. H., & Miller, S. A.** (2005). *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 97(1), 191-201.
- George, M., Anjumol, A., George, G., & Hatha, A. M.** (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res*, 6(10), 2265-2271.
- Giddings, L. A., & Newman, D. J.** (2015). Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. In *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles* (pp. 1-75). Springer, Cham.
- Gimza, B. D., & Cassat, J. E.** (2021). Mechanisms of antibiotic failure during *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T.** (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189-216.
- Grishkan I., Zady E. and Nevo E.** (2006). Soil crust micro fungi along a south ward rainfall gradient in desert ecosystems. *European Journal of soil Biology*. 42(1): 33-42.
- Grundmann, G. L.** (2004). Spatial scales of soil bacterial diversity—the size of a clone. *FEMS microbiology ecology*, 48(2), 119-127.
- Guergouri, I.** (2010). Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) productrices des biosurfactants. Mémoire de Magistère en microbiologie. Université de Mentouri de Constantine.74 pages.
- Guest, D.I.,** (2017). *Plant Pathology, Principles*, Editor(s): Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Academic Press, pp. 203 – 212.

- Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Caccamo, D., & Stackebrandt, E.** (2003). *Bacillus aeolius* sp. nov. a novel thermophilic, halophilic marine Bacillus species from Eolian Islands (Italy). Systematic and applied microbiology, 26(2), 172-176.
- Guiraud, J.-P.**, (2003). La microbiologie alimentaire. Dunod : Paris. 696 pages.
- Hacene H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G.**, (1994). Screenig for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. Microbios. 79:81-5.
- Haddouchi, F., ZERHOUNI, K., Sidi-Yekhelef, A., Chaouche, T.M.**, (2016). Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. rupestre. Bulletin de la Société Royale des Sciences de liège. 85, 152-159.
- Hayakawa, M., K, Ishizawa et H, Nonomura** (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. J. Ferment. Technol ., 66: Pp :367-373 .
- Halilat, M. T.** (1998). Etude expérimentale de sables additionné d'argile comportement physique et organisation en conditions salines et sodiques. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure agronomique-Khalef Abdellah alias Kasdi Merbah.
- Hasnaoui, I.** (2022). Étude de l'impact du lactosérum électro-activé sur la croissance des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et leur pouvoir antibactérien contre *Salmonella enterica*. Mémoire de maîtrise, Université Laval, 90 pages
- Hata, T., Omura, S., Iwai, Y., Nakagawa, A., Otemi, M., Ito, S. and Matsuyer, T.** (1971). A new antibiotic kinamycin, fermentation, isolation, purification and properties. J. Antibiotic. 24 : 353- 359.
- Hébert, L.** (2008). Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis* (Doctoral dissertation, Université de Caen).158 pages.
- Heitman J.** (2011). Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. Fungal biology reviews, 25(1), 48–60.
- Higgs R., Zahn J., Gygi J. et Hilton M.** Rapid methods to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. Applied and Environmental Microbiology, 67, (2001) : p 371-376.
- Hilali L, Khattabi A, Nssarlah N, Malki A, Finance C.**, (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel Marocain. Rev Biol Biotech. 2:49-53.
- Hiramatsu, K.** (1998). The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. The American journal of medicine, 104(5), 7S-10S.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.**, (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology.

- Horner-D. C., M., Leibold, M. A., Smith, V. H., & Bohannon, B. J.** (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology letters*, 6(7), 613-622.
- Horng, Y. B., Yu, Y. H., Dybus, A., Hsiao, F. S. H., & Cheng, Y. H.** (2019). Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB Express*, 9(1), 1-9.
- Hufty, A.** (2001). Introduction à la climatologie : le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine. Travaux du Département de géographie de l'Université Laval ; Presses Université Laval. 542 pages.
- Hwang, W., & Yoon, S. S.** (2019). Virulence characteristics and an action mode of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
- Illili Mahrouf,** (2011), «Contribution à l'élaboration d'une typologie "umranique" des ksour dans le Gourara », *Insaniyat / 219-197 | 52-51*, إنسانيات.
- Itabashi T, Matsuishi N, Hosoe T, Toyazaki N, Udagawa S-i, Imai T, Adachi M, Kawai K-i** (2006) Two new dioxopiperazine derivatives, arestrictins A and B, isolated from *Aspergillus restrictus* and *Aspergillus penicilloides*. *Chem Pharm Bull* 54:1639–1641.
- Ivanova V, Kolarova M, Aleksieva K, Gräfe U, Dahse HÄ, Laatsch H** (2007) Microbiaeratin, a new natural indole alkaloid from a *Microbispora aerata* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica. *Prep Biochem Biotechnol* 37:161–168.
- Janeway, C. A., & Murphy, K.** (2018). *Immunobiologie de Janeway*. De Boeck Supérieur .920 pages.
- Janssen, P. H.** (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1719-1728.
- Jean G.** (2014) *Bactéries marines et biotechnologie*. Quae DL Paris, 1 : p175.
- Jerome J. Perry, James T. Staley, Stephen Lory,** (2004), *Microbiologie : cours et questions de révision*, Dunod, 891 pages.
- Johnson A.M., Thurlow L.R., Zwenger R.S. And Gillock E.T** (2006). Partial Characterization of Two Moderately Halophilic Bacteria from a Kansas Salt Marsh. *The Prairie Naturalist* 39(1) : 29–39.
- Johnson, A. M., Thurlow, L. R., Zwenger, S. R., & Gillock, E. T.** (2007). Partial characterization of two moderately halophilic bacteria from a Kansas salt marsh. *The Prairie Naturalist*, Great Plains Natural Science Society. 39(1),3-2007.
- Karabi, M.** (2016). Fonctionnement microbiologique des sols oasiens. cas de quelques sols de la région de ouargla. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques. Université de ouargla.215 pages

Kerbab, S. (2018). Les actinomycètes d'un sol salé : rôle des osmoprotecteurs naturels. Mémoire de Magistère en sciences biologiques. Université de Ferhat Abbas de Sétif. 133 pages.

Khanna M., Solanki R. et Lal R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2 (3), (2011) : p 357-375.

Khelil Klouche, N. (1998). Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuses extrêmophiles, notamment *Metallogenium* sp (Doctoral dissertation, Thèse de Magister en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen, Institut des sciences de la Nature. Algérie. 157p).

Khemili, S. (2008). Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites (Doctoral dissertation, Boumerdès).125pages.

Kholkhal, W. (2006). Recherche de nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques à partir du sol et des concrétions sédimentaires des grottes de Aïn Fezza. Mémoire de Magistère en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid.84+Annexes.

Killian Ch. Et Feher D., (1939). Microbiology of desert soils. *Encyclopedie Biologique*. pp: 21-127.

Kim W.S., Wang Y., Fang A and Demain A.L, (2000). Methionine interference in rapamycin production involves repression of demethylrapamycin methyltransferase and adenosylmethionine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol 44 : 2908-2910.

Kirk J. L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P.N., Klironomos J., Lee H. And Trevors J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58 : 169–188.

Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Constantine : Université Mentouri, 2007 : 68-71).

Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*. 15, 45-51.

Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.

Kra, K. D., Diallo, H. A., Kobenan, K., Kone, D., & Kouadio, Y. J. (2011). Diagnostic de la fusariose du bananier sur les cultivars grande naine (*Musa AAA*) et corne 1 (*Musa AAB*) à la périphérie du District d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 1501-1514.

Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., & Leggett, M. E. (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228.

Kushner, H., & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria, in "Halophilic bacteria" (F. Rodriguez-Valera, ed.) (pp. 109-140).

Ladjal S., (2012). Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*pinus halepensis* mill) de la région de M'Sila, mémoire de magister en biologie végétale: p 81+Annexes.

Lammi S. (2011). Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens, mémoire de Magistere en Biotechnologies Microbiennes, université Mentouri de Constantine: p 65 + annexes.

Lancini G. et Parenti F. The Antibiotics. In: *Antibiotics an integrated view*. Springer-Verlag. New York, USA. Inc, (1982): p 1-241.

Landon, J. R., & Manual, B. T. S. (1991). A handbook for soil survey and agricultural land evaluation in the tropics and subtropics. Hong Kong: Longman Scientific and Technical Group Ltd, Taylor & Francis. 530 pages.

Larbi, M. B. (2019). Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f sp *albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Université doi. org/10.1007/s10816-018-9372-4.

Larpent J.P. Et Sanglier J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p.

Lasko, M. J., & Nicolau, D. P. (2020). Carbapenem-resistant Enterobacterales: considerations for treatment in the era of new antimicrobials and evolving enzymology. *Current infectious disease reports*, 22(3), 1-12.

Lee J Y., Hwang B K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *can J Microbiol*, 48(5) : pp 407-17.

Lee, JC, X. Yang, M. Schwartz G. Strobel et J. Clardy. (1995). La relation entre un arbre nord-américain en voie de disparition et un champignon endophyte. *Chim. Biol.* 2 : 721-727.

Lefebvre, O. (2005). Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier. 269 pages.

Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifali S., Fassouane A., Boiron P., (2003). Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* 49:669-74.

- Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S.** (2008). A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 5(2), 161-171.
- Li, S., Ming, H., Duan, Y.-Y., Huang, J.-R., Zhao, Z.-L., Zhang, L.-Y., Ji, W.-L., Meng, X.-L., Li, W.-J., Nie, G.-X.,** (2017). *Nocardia tengchongensis* sp. nov., isolated from a soil sample. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110, 1149-1155.
- Lockwood, J. L., & Lingappa, B. T.** (1963). Fungitoxicity of sterilized soil inoculated with soil microflora. *Phytopathology*, 53(8), 917-+.
- Loi n° 19-12 du 14 Rabie Ethani 1441** correspondant au 11 décembre 2019 modifiant et complétant la loi n° 84-09 du 4 février 1984 relative à l'organisation territoriale du pays.
- Loir Y. et Gautier M.,** (2010). *Staphylococcus aureus*. Ed Lavoisier : p282.
- Lowy, F. D.,** (1998), "*Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med." : 520-532.
- Loyer, J. Y.** (1991). Classification des sols salés : les sols Salic. Cahier ORSTOM, série Pédologie, 51-61.
- Macey, J. Robert.** (2002). "Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual for Molecular Biologists." : 196-197.
- Madigan M.T., Martinko J.M.** (2007). Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Pp. 1012.
- Madigan, M., & Martinko, J.** (2007). Brock. Biologie des micro-organismes. 11 e édition. Person Education France, 599-60.
- Makhloufi G., Liu S., Dai H., Makhloufi G., Heering C., Janiak C., Hartmann R., Proksch P.** (2016). Cytotoxic 14-membered macrolides from a mangrove-derived endophytic fungus, *Pestalotiopsis microspora*. *Journal of natural products*, 79(9), pp : 2332-2340.
- Malençon, G.** (1950). Le " Bayoud", maladie fusarienne du palmier-dattier en Afrique du nord. *Fruits*, 5(8), 279-289.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E. et Biondo, C.** (2021). Résistance bactérienne aux antibiotiques : les agents pathogènes les plus critiques. *Pathogens (Bâle, Suisse)*, 10 (10), 1310.
- Margesin, R., & Schinner, F.** (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
- Margesin, R., Schinner, F., Marx, J. C., & Gerday, C.** (Eds.). (2008). Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Berlin : Springer. (pp. 1-462).

- Martin J.F., Casqueiro J., Kosalkova K., Marcos A.T. and Gutiérrez A.** (1999). Penicillin and cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Leeuwenhoek*, 75: 21-31.
- Martin, F.** (2011). Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation, thèse de Doctorat, Université de Grenoble. 247 pages.
- Melloul, E.,** (2015). Aspergillose aviaire : développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde (*Meleagris gallopavo*) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole, Paris Est. 222 pages.
- Menasria, T.** (2020). Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien, Doctoral dissertation, Université de Batna 2, 152 pages.
- Merizig H., Naami F.** (2015) Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de Ouargla. Mémoire de Master en Microbiologie fondamentale et appliquée, Université Kasdi merbah ouargla, (2015) : 65pp + annexes.
- Mermoud, A.** (2006). Cours de physique du sol : Maîtrise de la salinité des sols. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, 23.15 pages.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A.,** (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition, Doin, Paris : 429pp.
- Mezache N.** (2010). Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille Asteraceae : *Senecio giganteus* Desf. et *Chrysanthemum myconis* L. Thèse de doctorat en phytochimie. Université de Mentouri, Constantine. 202 pages + annexes.
- Meziani M.** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire de Magistère en biochimiques, Université Mentouri de Constantine, (2012) : 66pp + annexes.
- Miller, R. V., C. M. Miller, D. Garton-Kinney, B. Redgrave, J. Sears, M. Condron, D. Teplow, and G. A. Strobel.** (1998). Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. Appl. Microbiol.* 84 :937-944.
- Min K.H.,** (1988). Fungus flora of Seongrya Cave in Korea. *Transactions of the Mycological Society of Japan.* 29: 479-487.
- Morakchi H.,** (2011), Isolement et identification de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives au niveau du lac Oubeira : Etude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité, THESE de Doctorat en microbiologie, Université Badji Mokhtar Annaba, p 129.
- Morand, S., & Figuié, M.** (2016). Emergence de maladies infectieuses : Risques et enjeux de société. Editions Quae. 139 pages.

- Moussi, M., Filali, H., Tazi, A., & Hakkou, F.** (2015). Ethnobotanical survey of healing medicinal plants traditionally used in the main Moroccan cities. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(8), 164-182.
- Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V.** (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1), 143-148.
- Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Judie P., Ndoye I** (2002). Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des *Rhizobiums* d'*Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne supsp. Raddiana (Savi) Brenan. *African. Journal of Science and Technology. Science and Engineering Series* 3(1):33-43.
- Neilsen P. & Sdrensen J.** (1997). Multi-target and medium-idependant fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhozosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: p183-192.
- Nganje, W. E., Bangsund, D. A., Leistriz, F. L., Wilson, W. W., & Tiapo, N. M.** (2002, December). Estimating the economic impact of a crop disease: the case of *Fusarium* head blight in US wheat and barley. In *National Fusarium Head Blight Forum Proceedings*. Vol. 2002, pp. 275-281.
- Nguyen, M.T.**, (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam : étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines.
- Nielsen, S. S.** (2017). Introduction to food analysis. *Food analysis*, 3-16.
- Noumeur, S.R.**, (2008). Biodégradation du 2, 4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Thèse de Doctorat en Biologie : Université Mentouri Constantine. P, 15.
- Novitsky, T. J., & Kushner, D. J.** (1976). *Planococcus halophilus* sp. nov., a facultatively halophilic coccus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(1), 53-57.
- Oarga, A.** (2009). Life in extreme environments. *Revista de Biologia e ciencias da Terra*, 9(1), 1-10.
- Ogundare A. O., Adetuyi F. C. and Akinyosoye F. A.**, (2006). Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology*; 5(18): 1663-1668.
- Oren A.** (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.
- Organisation mondiale de la Santé (OMS)**, (2017). « L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques » (communiqué), févr. Référé à <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/>
- Organisation mondiale de la Santé (OMS)**, (2020). Les 10 principales causes de mortalité. Référé à

<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Organisation mondiale de la Santé (OMS),. Resistance aux antimicrobiens. (2015). Consulté le 25/05/2016. In <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/fr/>

Otmane, T., & Kouzmine, Y. (2011). Timimoun, évolution et enjeux actuels d'une oasis saharienne algérienne. *Insaniyat/إنسانيات*. Revue algérienne d'anthropologie et de sciences sociales, (51-52), 165-183.

Oubadi, M., Hamou, A., Faci, M., & Farhi, Y. (2020). Impacts des canicules sur les contraintes environnementales dans la région de Béchar. *Journal Algérien des Régions Arides*, 14, 80-101.

Oudrane, A., & Aour, B. (2018). Modelisation numerique du confort thermique pour un logement en zone saharienne. *Communication science et technologie*, 2(22), 105-118.

Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C., (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur.j.Soil.Biol.* 37 :69-74.

Ozenda, P. (2004). Flore et végétation du Sahara, CNRS.662 pages

Palla, M.S., Guntuku, G.S., Muthyala, M.K.K., Pingali, S., Sahu, P.K., (2018). Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 7, 250-256.

Pandey, A., Ali, I., Butola, K. S., Chatterji, T., & Singh, V. (2011). Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 2(4), 384-392.

Pansu, M., Gautheyrou, J., (2007). Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods, Springer Science & Business Media. Editeur Physica-Verlag. Livre numérique.993pages.

Pavan Kumar, J. G. S., Gomathi, A., Vasconcelos, V., & Gothandam, K. M. (2018). Bioactivity assessment of Indian origin—mangrove actinobacteria against *Candida albicans*. *Marine Drugs*, 16(2), 60.

Pétard, J., (1993). Les méthodes d'analyse. Tome 1. Analyses de sols. Notes techniques, 5, p.196.

Pevzner, P., & PUECH, N. (2006). Bio-informatique moléculaire : Une approche algorithmique. Springer. (p. 66).

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. New York: Springer. (Vol. 519, p. 388).

Ploetz, R. C. (2006). *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653-656.

Pocard J.A., L.T. Smith, G.M. Smith, et D. Le Rudulier. (1994). A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.* 176: 6877–6884

- Pochon, J., & Tardieux, P.** (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol (Vol. 11). Editions de la Tourelle. 111 pages.
- Podile A. et Prakash A.** (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Cas journal microbiology*. 42, : p 533-538.
- Pollack, M.** (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*, 6(Supplement_3), S617-S626.
- Porter, J. N., Wilhelm, J. J., & Tresner, H. D.** (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Applied microbiology*, 8(3), 174-178.
- Potvin, E.** (2007). Génomique fonctionnelle de *Pseudomonas aeruginosa* et analyse moléculaire fine d'un facteur sigma-anti-sigma (Doctoral dissertation, Université Laval). 284 pages.
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J.** (2003). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur. 1 137 pages.
- Qin, S; Li, W.J; Dastager, S.G; Hozzein, W.N.** (2016). Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations. *Frontiers Media*; 7:1415.
- Quezel, P., & Santa, S.** (1962). New flora of Algeria and southern desert regions. *New flora of Algeria and southern desert regions*. 1170 pp.
- RAHMANI, S.** (2015). Impact de la carence en fer et de l'infection par *Pseudomonas* sur le système immunitaire des enfants hospitalisés. Thèse de doctorat université Université Djillali Liabes De Sidi Bel Abbes. pp226+Annexes.
- Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. D. L. E., Igrejas, G., & Poeta, P.** (2020). Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. *Microorganisms*, 8(8), 1118.
- Rangarajan S., Loganathan P., Saleena L. et Nair S.,** (2001). Diversity of pseudomonads isolated from three different plant rhizospheres. *J. Appl. microbiol.* 91: p742-749.
- Rapilly, F.,** (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Éditeur : Institut national de la recherche agronomique. 103 pages.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J.,** (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.
- Rapper, K., Fennel, D.,** (1977). The fungus *Aspergillus*, RE Krieger Publishers New York. *American Journal of Plant Sciences*, Vol.4 No.8, p1594-1596.
- Roberts, M. F.,** (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 1(1), 1-30.

- Rodier, J., Legube, B.,** (2009). L'analyse de l'eau -10e éd, Dunod. 1759pages.
- Rutherford MA.** (2006). Current knowledge of coffee wilt disease, a major constraint to coffee production in Africa. *Phytopathology*, 96 : 663-666.
- Saadoun, I., Hameed, K., Moussauui, A.** (1999) Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios*. 1999 ; 99 : 173-179.
- Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A, Mostefaoui A, Zitouni A, Lamari L, Bennadji H, Lefèbvre G, Germain P** (1998) Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 9 : 147-153
- Sabaou, N., Bounaga, N., & Bounaga, D.** (1983). Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et autres formae speciales. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(2), 194-199
- Sadfi N., Cherif M., Fliss I., Boudabous A. et Antoun H.** (2002). Evaluation of *Bacillus* isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal Plant Pathol* . 83: p 101-118.
- Samson, R.A., Pitt, J.I.,** (2003). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, CRC Press.501pages.
- Sanchez I., Soriano A., Martinez J., Mensa F., Marco M., Almela A., Moreno-Martinez F., Munoz M., Jimenez de Anta and Soriano E.,** (2000), Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*, 30 : p 368-373.
- Sari, M., Hendel, N., Boudjelal, A., & Sarri, D.** (2012). Inventory of medicinal plants used for traditional treatment of eczema in the region of Hodna (M'sila-Algeria). *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 1(4), 97.
- Sarigullu, F., Emel, K., Isil, U., & Omer, C.** (2013). Determination of antibacterial activities of isolated *Streptomyces* strains from soil at Çukurova University in Turkey. *J Food Agr Env*, 11, 922-4.
- Savoie, F.** (2011). Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. Thèse de Doctorat en microbiologie, Université de Bourgogne.198pages.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K.** (1989). Inhibiting salmonellae growth in fresh spreadable Mettwurst (dry sausage eaten relatively fresh) made without sugar. *Fleischwirtschaft* 69 1-4.
- Schipper, M.A.A.,** (1978). On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Stud. Mycol.* 1978, 17, 1-48.

- Schlesner, M.** (2008). The Halobacterium salinarum taxis signal transduction network: a protein-protein interaction study. These de Doctorat, Université de München. 209 pages + annexes.
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., & Aust, H. J.** (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological research*, 97(12), 1447-1450.
- Servant, J.** (1975). Contribution à l'étude pédologique des terrains halomorphes. L'exemple des sols salés au sud et au sud-ouest de la France. Thèse Doct. d'Etat Montpellier, S.E.S. INRA, 2 tomes, I: 194p; II: Fig., Pl. et annexes.
- SFM,** (2018) Recommandations Du Comité De l'antibiogramme De La Société Française De Microbiologie. V. 1.0.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V.,** (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied microbiology and Biotechnology*, 85(2), 371-381.
- Shieh, W. Y., & Jean, W. D.,** (1998). *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Canadian journal of microbiology*, 44(7), 637-645.
- Shu, W. S., & Huang, L. N.,** (2022). Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 219-235
- Sigliocco, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S.,** (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC structural biology*, 11(1), 1-12.
- Singh J, Tripathi R, Thakur IS.,** (2014) Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO₂ and biodiesel production. *Bioresources Technol* 166:345-352
- Smaoui S.** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en biologie, Université de Toulouse, (2010) : 207pp + annexes.
- Sobti, S., Belhadj, H. A., & Djaghoubi, A.** (2015). Isolation and characterization of the native Rhizobia under hyper-salt edaphic conditions in Ouargla (southeast Algeria). *Energy Procedia*, 74, 1434-1439.
- Sofia, A. G., Nadjette, D., Rabéa, G. T., & Rahmania, F.** (2020). Abondance et diversité de la mycoflore associée à *Hyoscyamus muticus* L. subsp. *falezlez* (Coss.) Maire ; une plante médicinale de la région d'Adrar. *Journal Algérien des Régions Arides*, 14(1), 141-149.
- Soltner, D.** (2003). Les bases de la production végétale. Tome I. Le sol et son amélioration. Collection Sciences et Techniques Agricoles. 23ème. Ed. Paris, 472 pp

- Soriano, A., Martinez, J. A., Mensa, J., Marco, F., Almela, M., Moreno-Martinez, A. & Soriano, E.** (2000). Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases*, 30(2), 368-373.
- Stackebrandt E. and Goebel B.M.** (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.
- Sterflinger, K., Little, B., Pinar, G., Pinzari, F., de los Rios, A., & Gu, J. D.** (2018). Future directions and challenges in biodeterioration research on historic materials and cultural properties. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 10-12.
- Strobel, G., & Daisy, B.** (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502.
- Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, RS Sidhu et WM Hess.** (1996). Taxol de *Pestalotiopsis microspora*, un champignon endophyte de *Taxus wallichiana*. *Microbiologie* 142 : 435-440.
- Subbarao, S. K.** (1988). The Anopheles culicifacies complex and control of malaria. *Parasitology Today*, 4(3), 72-75.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T.** (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian journal of microbiology*, 61(2), 93-103.
- Sumita, J.** (2019). *Endophytes and Secondary Metabolites*. Éditeur Springer International Publishing, 720 pages.
- Taale, E.** (2016). Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Appliquées, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO.206+annexes
- Tagu, D., & Risler, J. L.** (2010). *Bio-informatique : Principes d'utilisation des outils*. Editions Quae. 270 pages.
- Tan, K. H.** (2010). *Principles of soil chemistry*. CRC press. 390 pages.
- Tandon, H.L.S.,** (2005). *Methods of analysis of soils, plants, waters, fertilisers & organic manures*, Fertiliser Development and Consultation Organisation.203pages.
- Tifrit A.** (2016). Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Génomique. Université Hassiba Benbouali de Chlef. 148+annexes.

- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G.** (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661.
- Touafek, O.** (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du Nord et du Sud algériens. Thèse de doctorat en sciences université Mentouri Constantine. 282 pages.
- Tsao, P. H., Leben, C., & Keitt, G. W.** (1960). An enrichment method for isolating Actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. *Phytopathology*, 50(1), 88-89.
- Valanarasu, M., Kannan, P., Ezhilvendan, S., Ganesan, G., Ignacimuthu, S., & Agastian, P.** (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(4), 290-297.
- Van Den Burg, B.** (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.
- VANDAMME, Peter, POT, Bruno, FALSEN, E., et al.** (1996). Taxonomic Study of Lancefield Streptococcal Groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and Proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 46, no 3, p. 774-781.
- Vandecasteele, J.** (2008). *Petroleum Microbiology: Concepts, Environmental Implications, Industrial Applications*. France: Editions Technip. pages 880.
- Vargas, V. A., Delgado, O. D., Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B.** (2005). *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic, halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 899-902.
- Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R. T.** (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80-87.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C., & Marquez, M. C.** (2008). Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. *Microbiology of extreme soils*, 87-115.
- Waksman, S. A.** (1967): *The Actinomycetes. A summary of current knowledge*. pp.vi+280 pp.
- Wang X, Shaaban KA, Elshahawi SI, Ponomareva LV, Sunkara M, Zhang Y, Copley GC, Hower JC, Morris AJ, Kharel MK, Thorson JS** (2013) Frenolicins C-G, pyranonaphthoquinones from *Streptomyces* sp. RM-4-15. *J Nat Prod* 76:1441-447).
- Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., & Dedysh, S.** (2015). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). W. B. Whitman (Ed.). Hoboken, NJ: Wiley.

- Wijeratne EMK, Turbyville TJ, Zhang Z, Bigelow D, Pierson LS, VanEtten HD, Whitesell L, Canfield LM, Gunatilaka AAL** (2003) Cytotoxic constituents of *Aspergillus terreus* from the rhizosphere of *Opuntia versicolor* of the Sonoran Desert. *J Nat Prod* 66:1567–1573.
- Wilcox, B. A.** (1984). In situ conservation of genetic resources: Determinants of minimum area requirements. in *National Parks: Conservation and Development*, ed. J. A. McNeely and K. R. Miller. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. Pp. 639-47.
- Williams S. T.; Wellington E. M. H.** (1983). Actinomycetes. In: Eds. Page A.L., Miller R.H., Keency O.R.: *Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties*, second ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp. 969–987.
- Williams, S., Cross, T.**, (1971). Chapter XI actinomycetes, *Methods in microbiology*, Vol. 4, Elsevier, pp. 295-334.
- Wilson, E. O.** (1988). The current state of biological diversity. *Biodiversity*, 521(1), 3-18.
- Xu, L. Q., Zeng, J. W., Jiang, C. H., Wang, H., Li, Y. Z., Wen, W. H., ... & Huang, C. Y.** (2017). Isolation and determination of four potential antimicrobial components from *Pseudomonas aeruginosa* extracts. *International journal of medical sciences*, 14(13), 1368.
- Yarte, M. E., Gismondi, M. I., Llorente, B. E., & Larraburu, E. E.** (2022). Isolation of endophytic bacteria from the medicinal, forestal and ornamental tree *Handroanthus impetiginosus*. *Environmental Technology*, 43(8), 1129-1139.
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y.** (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological research*, 161(2), 127-131.
- Yuan H., Zhang X., Zhao K., Zhong K., Gu Y. and Lindström, K.** (2008). Genetic characterization of endophytic actinobacteria isolated from the medicinal plants in Sichuan. *Annals of microbiology*, 58(4), 597-604.
- Yves, L. L., LARPENT J.P., & Michel, G.**, (2009). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. 300 pages.
- Zahir, I., Babouchi, M., Boulanour, H., & El Louyti, M.** (2018). Effet des microorganismes isolés à partir des biotopes marocains sur les phytopathogènes : revue bibliographique. *AGROBIOLOGIA*, 8(2), 971-983.
- Zerroug, A.**, (2018). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Mémoire de magister en microbiologie. Université de Ferhat Abbas –Setif.70pages.
- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.**, (2005). *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 156:984–993.

Zogg, H. (1976). Problems of biological soil disinfection. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(4), 299-303.



Annexes



Annexes

Les milieux de culture

Mueller Hinton

Extrait de viande	2g
Amidon	1,5 g
Peptone	17,5g
Eau distillée	1000 mL
Agar	17 g

TSA (Gélose Trypticase de soja)

Trypticase	17 g
Soytone	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000mL

Milieu ISP2

Glucose	4g
extrait de levure	4g
extrait de malt	10g
eau distillée q.s.p	1000mL
Agar	20g

Bouillon nutritif

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000 mL

Milieu SGA (Soil Glucose Agar) a base de sol

Sol	500g
Agar	18g
Eau distillée	500ml

Mélanger a poids égale sol et eau. Autoclave 1 heure à 130⁰C filtre le mélange sur un papier filtre a chaud. Vérifier le pH qui doit être voisin de la neutralité, on ajoute l'agar. Après ébullition stériliser à autoclave à 120⁰C pendant 20min.

Gélose nutritive

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar	15-20g
Eau distillée	1000mL

PDA

Pomme de terre (macération 700ml de filtrat)	200g
Glucose	4g
Agar	8g

Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

Amidon	10g
Gélose nutritive	2,8 g
Eau distillée	100ml
Agar	15-20g
pH	7,5

Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

Gélatine	0,4 g
Gélose nutritive	2,8 g
Eau distillée	100 mL
pH	7,5

Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80	10 mL
NaNO ₃	1 g
Extrait de levure	5 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g
Agar	18 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,5

Gélose nutritive + Caséine

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar	15-20g
Eau distillée	1000mL
Lait écrème	52,63 mL

Solution de lactophénol pour l'observation microscopique (état frais) :

Phénol pur cristallisé	10g
Acide lactique	10g
Glycérol pur	20g
Eau distillé	10mL

Composition des milieux utilisées pour identification biochimique :**Mannitol mobilité :**

Hydrolysats tryptique de caséine	10,0 g/L
Mannitol	7,5 g/L
Rouge de phénol	0,04 g/L
Nitrate de potassium	1,0 g/L
Agar	3,5 g/L

Ph = 7,6

TSI :

Tryptone	14,0 g/L
Extrait de levure	3,0 g/L
Extrait de viande	3,0 g/L
Glucose	1,0 g/L
Lactose	10,0 g/L
Saccharose	10,0 g/L

Chlorure de sodium	5,0 g/L
Thiosulfate de sodium	0,3 g/L
Citrate ferrique ammoniacal	0,3 g/L
Rouge de phénol	24,0 mg/L
Agar	13,5 g/L

pH = 7,4 ± 0,2

Viande foie :

Base viande foie	30,0 g/L
Glucose	2,0 g/L
Agar	6,0 g/L

Ph = 7,4

Citrate de simmons

Citrate de sodium	1,0 g/L
Bleu de bromothymol	0,08 g/L
Chlorure de sodium	5,0 g/L
Sulfate de magnésium	0,2 g/L
Hydrogénophosphate de potassium	1,0 g/L
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1,0 g/L
Agar	15,0 g/L

PH 6,9

Chapman:

Peptone	10,0 g/L
Extrait de viande de bœuf	1,0 g/L
Chlorure de sodium	75,0 g/L
Mannitol	10,0 g/L
Rouge de phénol	0,025 g/L
Agar	15,0 g/L

pH = 7,4

King A :

Peptone	20,0 g/L
Glycérol	10,0 g/L
Sulfate de potassium	10,0 g/L
Chlorure de magnésium	1,4 g/L
Agar	12,0 g/L

Ph = 7,2

King B :

Peptone	20,0 g/L
Glycérol	10,0 ml/L
Phosphate dipotassique	1,5 g/L
Sulfate de magnésium	1,5 g/L

Agar 15,0 g/L

Ph = 7,2 ± 0,2.

Gélose à l'esculine

Peptone: 10,0 g/L

Esculine: 1,0 g/L

Citrate de fer ammoniacal : 1,0 g/L

Agar: 20,0 g/L

Ph = 7,4

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche 50 g

Agar 5 g

Eau distillée 1000ml

Milieu YGS (Yeast Glucose Succrose)

Succrose 20 g

Glucose 20 g

Extrait de levure 20 g

Eau distillée 1000 ml

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH₂PO₄ 0.75 g

Czapek Concentre 7.5 ml

Extrait de levure 3.7 g

Glycérol 250 g

Agar 12 g

Eau distillée 750 ml

pH 7

Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre 10 ml

KH₂PO₄ 1 g

Extrait de levure 5 g

Sucrose 30 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000ml