



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.



**Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de
l'univers
Département de Biologie.**

**Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-alimentaire au Biomédical
et à l'Environnement (LAMAABE).**

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Magistère en Microbiologie appliquée.

**Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement
Microbien (MQMDM).**

Présenté par

Mr : MESSAOUDI Omar.

**Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices
de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar).**

Soutenue le : / / 2013

Devant le jury

Présidente:	Mme HASSAÏNE Hafida.	Maître de conférences A (UABT).
Examinateur :	Mr ABDELOUAHID Djamel Eddine.	Professeur (UABT).
Examinatrice :	Mme KHELIL Nihel.	Maître de conférences A (UABT).
Rapporteur :	Mr BENDAHOU Mourad.	Maître de conférences A (UABT).

Année universitaire : 2012-2013.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.



**Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de
l'univers
Département de Biologie.**

**Laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-alimentaire au Biomédical
et à l'Environnement (LAMAABE).**

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Magistère en Microbiologie appliquée.

**Option : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement
Microbien (MQMDM).**

Présenté par

Mr : MESSAOUDI Omar.

**Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices
de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar).**

Soutenue le : / / 2013

Devant le jury

Présidente:	Mme HASSAÏNE Hafida.	Maître de conférences A (UABT).
Examinateur :	Mr ABDELOUAHID Djamel Eddine.	Professeur (UABT).
Examinatrice :	Mme KHELIL Nihel.	Maître de conférences A (UABT).
Rapporteur :	Mr BENDAHOU Mourad.	Maître de conférences A (UABT).

Année universitaire : 2012-2013.

Remerciements

Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mr BENDAHOU MOURAD *maître de conférences A* à l'université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) pour avoir accepté de diriger ce travail, et pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit. Ses compétences techniques, son efficacité et surtout sa rigueur ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme HASSAÏNE Hafida *maître de conférences A* à l'université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également Mr ABDELOUAHID Djamel Eddine Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), et Mme Khelil Nihel *maître de conférences A* à l'université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr ASSOULI MUSTAPHA du laboratoire de travaux publics de BECHAR pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes tests pratiques au niveau du laboratoire.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr le directeur du laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (UABT), et à Mr le responsable du laboratoire de Chimie analytique et d'électrochimie (UABT), d'avoir acceptés que je puisse réaliser les analyses Infrarouge et UV-VISIBLE au niveau de leurs laboratoires respectivement.

Je remercie beaucoup Mr BELYAGOUBI Larbi de l'université de Tlemcen pour les documents et Mr LARBI et Melle SMAHI KHAYRA, de l'université de Bechar, pour les produits et les réactifs.

Des remerciements particuliers s'adressent au Pr *SABAOU Nasreddine* de l'école normale supérieure de Kouba (Alger) pour ses conseils concernant l'identification de notre isolat.

Une pensée amicale à mes collègues de la promotion de magistère en l'occurrence BENAMAR IBRAHIM, MORGHAD TOUHAMI, NASS FATIMA ET MEZOUAR DOUNIA pour leur soutien et leur aide et pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

A tous les doctorants du laboratoire de Microbiologie Appliqué à l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement, j'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe.

Une tendre pensée pour mes parents, pour leur patience, leur présence à mes cotés et leur contribution à l'élaboration de ce manuscrit.

Sans Oublier de remercier tous les enseignants, sans aucune exception, qui nous ont prodigué le savoir, tout au long de notre cursus universitaire.

DEDICACES

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Je dédie ce mémoire à ...

Mes très chers parents et ma sœur

Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le
Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et
L'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et
De prier pour moi.

A Mr BENDAHOU MOURAD Maître assistant

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez
toujours été présent.

Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

à tous mes collègues de la promotion de magistère

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de
tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie
ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de
bonheur.

Table des matières

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	
1. Définition et principaux caractéristiques	3
2. Historique	3
3. Morphologie des actinomycètes	4
4. Physiologie de développement	5
4.1 L'oxygène	5
4.2 Le pH	6
4.3 La température	6
4.4 L'activité de l'eau	6
4.5 Tolérance en NaCl	6
5. Cycle de vie	7
6. Distribution des actinomycètes et fonction écologique	8
7. Taxonomie des actinomycètes	9
7.1 La Première période	9
7.2 La seconde période	12
7.3 La Troisième période	15
7.4 La quatrième période	15
8. Antibiotiques sécrétés par les actinomycètes	16
II. Matériels et méthodes	
1. Echantillonnage	17
2. Analyses physico-chimiques du sol	17
2.1 Mesure du pH	17
2.2 Dosage d'humidité	17
2.3 Dosage de la matière organique	20
3. Isolement des actinomycètes	20
3.1 Prétraitement des échantillons	20
3.2 Les milieux de cultures	21
3.3 Préparation de la suspension de dilution et ensemencement	21
4. Observation microscopique	21
5. Purification des isolats	21
6. Conservation des isolats	22

7. L'activité antimicrobienne	22
7.1 Préparation de l'inoculum	22
7.2 Criblage primaire par la technique des cylindres agar	23
7.3 Criblage secondaire	23
8. Essais de caractérisation des principes actifs	24
8.1 Révélation chimique	24
8.2 Révélation microbiologique	25
8.3 Etude spectral des molécules bioactives	25
9. Identification d'isolat	26
9.1 Etude chimio-taxonomique	26
9.2 Etude morphologique	27
9.3 Caractères cultureux	28
9.4 Caractères physiologiques et biochimiques	28
III. Résultats et discussions	
1. Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons du sol	30
2. Résultats d'isollements des actinomycètes	31
3. Diversité morphologique des actinomycètes isolés	35
4. Résultats de l'activité antimicrobienne	37
5. Choix du milieu optimal de production des substances à activité antibactérienne.	42
6. Résultats de l'activité antimicrobienne sur le milieu liquide	45
7. Caractérisation préliminaire de substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3	49
8. Identification de l'isolat LAM143cG3	54
8.1 Etude chimio-taxonomiques	54
8.2 Etude morphologiques	55
8.3 Caractères cultureux	57
8.4 Caractères physiologiques et biochimiques :	58
8.5 Comparaison entre la souche LAM143cG3 et les espèces du genre <i>Spirillospora</i>	59
Conclusion et perspectives	62
Références bibliographiques	65
Annexes	79

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide.	5
Figure 2 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide.	8
Figure 3 : Morphologie des chaînes de spores des actinomycètes.	11
Figure 4 : Morphologie des spores des actinomycètes.	12
Figure 5 : Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B).	12
Figure 6 : Origine des antibiotiques.	16
Figure 7 : Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons (Source : DPAT).	18
Figure 8: Technique de culture sur lame.	28
Figure 9: Nombres de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture.	31
Figure 10: Observation microscopique du mycélium aérien des isolats d'actinomycètes (x100).	38
Figure 11: Observation microscopique de l'isolat LAM142aK2 (x100).	38
Figure 12: Observation microscopique de l'isolat LAM143dL (x100).	37
Figure 13: Observation microscopique de l'isolat LAM192aM (x100).	37
Figure 14: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 en fonction des souches tests utilisées.	43
Figure 15: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 en fonction des milieux de cultures.	43
Figure 16 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis les différents extraits organiques de l'isolat LAM143cG3.	46
Figure 17: Résultat de révélation des taches obtenues par le système de solvant AC-M.	50
Figure 18: Résultat de révélation de la tache obtenue par le système de solvant Et-AM-E.	50
Figure 19 : Résultats de révélation microbiologique de la tache obtenue par le système de solvant (Et-AM-E) en utilisant la souche teste <i>Bacillus streothermophilus</i> .	51
Figure20 : Spectre UV-VISIBL de l'extrait butanolique de l'isolat LAM143cG3.	52
Figure 21: Spectre infrarouge de l'extrait butanolique de l'isolat LAM143cG3.	53
Figure 22: Caractérisation chimio-taxonomique de l'isolat LAM143cG3 ; A : acides aminés ; B : sucres.	55
Figure 23 : Observation microscopique de l'isolat LAM143cG3 (X100).	55

Liste des planches

Planche 1: Prélèvement des échantillons à partir de sebkha de Kenadsa (Bechar).	19
Planche 2 : Test d'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes.	40
Planche 3: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 sur des milieux de culture différents.	44
Planche 4: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 sur milieu liquide.	47

Liste des tableaux

Tableau 1: Types de paroi chez les actinomycètes	14
Tableau 2 : Résultats des analyses physicochimiques des dix échantillons de Sebkhah de Kenadsa.	30
Tableau 3: Nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon.	31
Tableau 4: Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats d'actinomycètes vis-à-vis des souches testées.	38
Tableau 5: Sensibilité des différentes souches testées vis-à-vis des substances antimicrobiennes secrétées par les différents actinomycètes isolés.	39
Tableau 6: Résultats de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis des souches testées, de l'isolat LAM143cG3 cultivé sur différents milieux de culture.	42
Tableau 7: Activité antimicrobienne des différents extraits organiques de l'isolat LAM143cG3 par la méthode de disque de papier.	45
Tableau 8: Récapitulatif des résultats de la caractérisation chimique des substances antimicrobiennes secrétées par l'isolat LAM143cG3.	49
Tableau 9: Spectre d'absorption des antibiotiques de structures polyéniques .	52
Tableau 10 : Caractéristiques chimio-taxonomiques de l'isolat LAM143cG3	54
Tableau 11: caractères culturels de l'isolat LAM143cG3 sur les différents ISP.	57
Tableau 12 : Croissance de l'isolat LAM143cG3 sur le milieu Bennett à différentes concentrations de NaCl.	58
Tableau 13: Croissance de l'isolat LAM143cG3 à différentes températures.	58
Tableau 14: Utilisation des différentes sources de carbones par l'isolat LAM143cG3	59
Tableau 15: Comparaison des caractères chimio-taxonomiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques de notre isolat LAM143cG3 avec les espèces du genre <i>Spirillospora</i> .	60

Liste des abréviations

AC-M : Acétate d'éthyle-méthanol.

ADN : L'acide désoxyribonucléique.

ARN : L'acide ribonucléique.

ATCC: American type collection culture.

A_w : activité d'eau.

CAA : Milieu caséine amidon agar.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

CCM : chromatographie couche mince.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

C° : degré Celsius.

DAP : L'acide 2,6 diaminopimélique.

DPAT : Direction de la Planification et de l'Aménagement du Territoire.

Et-AM-E : Ethanol- ammoniac- eau.

FeSO₄ 7H₂O : sulfate de fer sept fois hydraté.

g : Gramme.

G+C: Coefficient de Chargaff.

HCl : acide chlorhydrique.

IR : infrarouge.

ISP2 : Milieu International *Streptomyces* Project.

KH₂PO₄ : phosphate monopotassique.

K₂HPO₄ : phosphate dipotassique.

LPS : Lipopolysaccharidique.

MgSO₄ 7H₂O : sulfate de magnésium sept fois hydraté.

ml : millilitre.

mm: millimètre.

MnCl₂ 4H₂O : chlorure de manganèse quatre fois hydraté

M2 : Milieu amidon extrait de levure peptone.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NH₄Cl: chlorure d'ammonium.

(NH₄)₂ SO₄: sulfate d'ammonium.

nm: nanomètre.

OMS : **Organisation mondiale de la Santé.**

pH : potentiel d'hydrogène.

P/V : Poids/Volume.

Rf : Rapport Frontal.

rpm : Rotations par minute.

UV : Ultra-Violet.

ZnSO₄ 7H₂O : sulfate de zinc sept fois hydraté

% : pourcent.

Introduction

Introduction

Abraham et **Chain** décrivent en **1945**, une substance produite par un colibacille, qui inhibait complètement la pénicilline et la dénommèrent pénicillinase. En **1945**, **Fleming** mit en garde la population, dans un article du New York Times daté du 26 Juin 1945, contre une utilisation abusive de la pénicilline pouvant conduire à l'apparition et à la propagation des bactéries résistantes. Cinq ans plus tard, à Paris et à Londres, la moitié des souches de Staphylocoque était résistante à la pénicilline (**In Briand, 2009**). A partir de cette époque, le problème de la résistance des antibiotiques s'est propagé dans le monde et devient un problème mondial. En effet, l'OMS a déclaré par le biais de sa directrice générale « Margaret Chan » lors de la journée mondiale de la santé organisée le 7 Avril 2011: « *...Si nous ne prenons pas d'urgence des mesures pour corriger cette situation et en protéger les acquis, nous allons vers une ère post-antibiotiques, dans laquelle de nombreuses infections courantes ne pourront plus être soignées et recommenceront à tuer* ».

Vu ses considérations ci-dessus, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par :

- Synthèse de nouvelles molécules et/ou héli-synthèse à partir de structures connues.
- Exploiter les populations microbiennes non cultivables par le concept de métagénomique (**Peric- Concha & Long, 2003**), qui consiste à l'extraction de l'ADN d'un échantillon de l'environnement, le métagénome, qui sera cloné dans des vecteurs artificiels qui sont transformés dans des hôtes de substitution. Ces banques d'ADN environnemental sont ensuite screenées pour leurs activités biologiques (**Zhang, 2005**).
- Isolement de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés, et l'analyse de leurs produits de fermentation.

Notre travail s'inscrit dans la dernière voie à savoir la recherche des actinomycètes qui sont les acteurs les plus prometteurs pour la production des métabolites à activité antimicrobienne ; on les retrouve presque dans tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile tel que le sol de la sebkha (**Boussaber & al, 2012**). En particulier le genre *Streptomyces* qui est à l'origine d'environ 70 % des molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Mais d'après certains auteurs, les

Introduction

ressources en molécules d'intérêts pharmaceutiques à partir des *Streptomyces* ont été largement exploitées, et actuellement parmi les métabolites du genre *Streptomyces* découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs (**Berdy, 2005**). Ces auteurs affirment qu'il faut s'orienter vers l'isolement des actinomycètes rares afin de s'alimenter en substances nouvelles. L'une des stratégies suivie pour l'isolement des genres rares est la recherche dans les environnements peu ou pas exploités, comme le sol de sebkha du Sahara Algérienne qui se caractérise par un taux de matière organique faible, une salinité élevée, une température basse la nuit, et élevée le jour. Ces conditions explosent la compétition entre les microorganismes sur les sources nutritionnelles, et réduits par ce fait, le taux des microorganismes organotrophes aussi bien en quantité qu'en qualité. Les actinomycètes, comme ce sont producteurs des antibiotiques ils vont utiliser cette propriété à leur profit pour qu'ils puissent persister dans le sol. Donc la chance de tomber dans des espèces rarement isolées par le monde est élevée.

Plusieurs travaux confirment que les actinomycètes isolés à partir des écosystèmes extrêmes, sécrètent des molécules utiles. *Salinispora tropica* est un actinomycète isolé à partir de sédiments marin, secrète le SALINOSPORAMIDE A doué d'une activité anticancéreuse (**Ma & al, 2011**).

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons suivi la démarche suivante :

- Isolements des actinomycètes à partir des échantillons du sol prélevés de différents endroits de la sebkha de Kenadsa (Bechar).
- Criblage du pouvoir antimicrobien des souches isolées.
- Extraction et étude préliminaire des substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat sélectionné, en utilisant des techniques chromatographiques et spectroscopiques (UV-VISIBLE et Infrarouge).
- Identification de l'isolat sélectionné sur la base des critères chimio-taxonomiques morphologiques, physiologiques ainsi que biochimiques.

 **Synthèse Bibliographique** 

1. Définition et principaux caractéristiques

Les Actinomycètes sont des Bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Rastogi & Kishore, 1997**). Cela explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fungi*) et aussi en allemand et en russe.

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote) (**Otto, 1998**), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoïdes (**Lefebvre, 2008**). Mais actuellement ils sont classés définitivement parmi les bactéries (procaryote), du fait que leurs matériels génétiques et dépourvus de noyau, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Les principales différences entre les champignons et les actinomycètes peuvent être résumées dans les points suivants:

- Leurs parois qui ne renferment ni cellulose ni chitin, se retrouvent respectivement chez les plantes et les champignons (**Shukla, 2010**),
- Le diamètre de leurs mycéliums est approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8 μm),
- Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysozymes (**Hawker & Linton, 1971**).
- Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens (**Rangaswami & al, 2004**. **Winn & Koneman, 2006**).

Les actinomycètes sont des bactéries de coloration de Gram positifs (**Dgigal, 2003**), à taux élevés de (G+C) compris entre 60-70 % (**Pelmont, 2005**), formant des filaments minces et ramifiés qui, lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme la gélose, ils se développent à la fois sur la surface et à l'intérieur de celui-ci (**Prescott, 2010**).

Ils ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyenne est environ 2 à 3 heures (**Beckers & al, 1982**).

2. Historique

Waksman (1959) divise en quatre grandes périodes l'histoire des actinomycètes.

- **La première (1874-1900)**, est celle de la découverte de leurs rôles dans la pathologie : **Cohn en 1875** découvre le premier actinomycète qu'il appela *Streptothrix foersteri*; **Harz en 1877**, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*.

- **Seconde période (1900-1919)** se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol : avec les travaux d'**Orla Yensen (1909)** qui créa la famille des Actinomycétacées qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrit, **Buchanan (1917)** créa l'ordre des Actinomycétales.

Les espèces qui composent le genre *Actinomyces*, étaient très différentes, certains auteurs ont commencé par scinder ce genre en plusieurs autres.

- **Troisième période (1919-1940)** : au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise, grâce aux recherches de **Orskov (1923)** qui créa le genre *Micromonospora*. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. **Jensen (1932)** regroupe dans le genre *Paraactinomyces* (actuellement *Nocardia*) les actinomycètes dont le mycélium de substrat se fragmente.
- **Quatrième période** : commence en 1940, et correspond à l'époque des antibiotiques produits par les actinomycètes, avec la création du genre *Streptomyces* (en combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) par **Waksman et Henrici en 1943** qui regroupe les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores, En **1958 Pridham et al**, proposa un système de classification des *Streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien ; **Ettling et al (1958)** introduit un critère important dans la différenciation des espèces : la production des pigments mélanoides.

3. Morphologie des actinomycètes

Morphologiquement on peut rencontrer, en plus des filaments ramifiés, des bacilles et aussi des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (**Avril & al, 1992**).

Dans certains cas, seul le mycélium de substrat est formé, tandis que dans le cas le plus extrême il y a formation uniquement de mycélium aérien, comme chez les *Sporichthya* (**Falkow, 2006**).

Les filaments mycéliens peuvent produire des spores, soit uniques (exp : *Micromonospora*), soit en chaînes (exp : *Streptomyces*), soit groupées dans des sporanges (exp : *Actinoplan*)

D'autres structures morphologiques sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir: des sclérotés sont formés dans le genre *Chainia*, des synnemas (ou

corémies) par les *Actinosynnema* et des vésicules, différentes des sporanges, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (Neyra, 1992).

L'analyse des hyphes des actinomycètes par imagerie révèle la présence de deux catégories de filaments (**figure 1**), pellet et les hyphes dispersés.

Les hyphes dispersés sont divisés en deux formes « freely dispersed » et « mycélium clumps ou aggregate » (Cox & al, 1998).

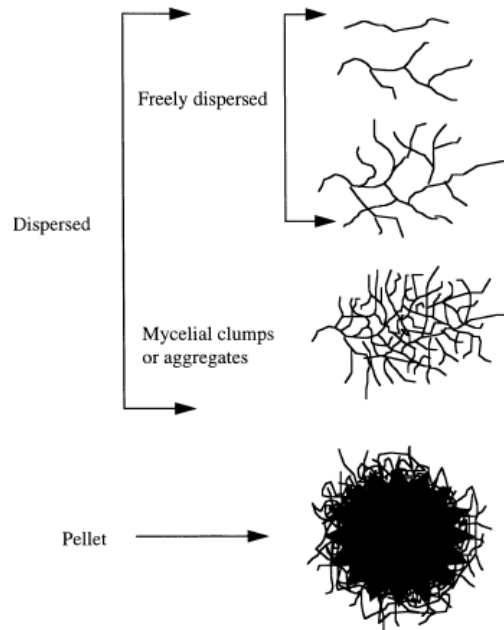


Figure1 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

La première forme (pellet), est un agrégat de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres ; la seconde forme c'est des hyphes indépendants dispersés (Cox & al, 1998).

Au cours d'un processus de fermentation, la forme pellet pose problème, à cause de limitation de diffusion des nutriments et de l'oxygène à traverses les hyphes, ce qui conduit à une autolyse, mais heureusement au cours de la fermentation industrielle, c'est la forme des hyphes indépendant dispersés qui dominant (90% des cas) (Cox & al, 1998).

4. Physiologie de développement

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

4.1. L'oxygène

On peut deviser les actinomycètes selon leurs types respiratoires en deux groupes.

- Les formes fermentatives anaérobies, représentées par le genre type *Actinomyces*, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, Ils font partie de la flore de Veillons (Avril & al, 1992).
- Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol (Avril & al, 1992).

4.2 Le pH

Pour le pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7-8, mais on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieures à 4 (McKinney, 2004), telle est le cas pour les souches acidophile comme le genre *Streptacidiphilus* (Wang & al, 2006)

4.3 La température

La température optimale de croissance est entre 25 à 30 C°, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures de 55 à 65 C° (Rangaswami & al, 2004).

4.4 L'activité de l'eau (Aw)

La germination des spores de la pluparts des actinomycètes, peut-être observée à des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0.67, l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égal à 0,98 (Zvyagintsev & al, 2005).

4.5 Tolérance en NaCl

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

- Les halophiles : ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.
- Les halotolérants acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V)) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) ; et les extrêmement tolérants (se développe de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (Nanjani, 2011).

Différentes stratégies sont suivies par les microorganismes halophiliques pour assurer l'osmo-régulation de leurs cytoplasmes tout en gardant une concentration faible en ions de sodium (Na⁺) (Oren, 2002).

- La première consiste à l'accumulation des ions de K⁺ et Cl⁻ dans leur cytoplasme sous forme de KCl (Sandhya & al, 2011), à des concentrations plus élevées que

la concentration de NaCl présente tout au tour du milieu. Ce mode d'adaptation est énergétiquement moins coûteux (**Oren, 1999**_(a). **Oren, 2006**).

- La seconde agit par exclusion des différents ions présents dans le cytoplasme, par des pompes, tout en accumulant des solutés organiques pour maintenir l'équilibre osmotique. Les différents solutés organiques utilisés sont : glycérol, betaine, ectoine, les sucres comme le saccharose et trehalose (**Galinski, 1995**). Ce mode est énergétiquement coûteux à cause du coût de la synthèse des molécules organiques (**Oren, 1999** _(b)).

5. Cycle de vie

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores (**Figure2**), processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (**O'Gara & al, 2008**).

Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment la que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriment). Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinomycètes sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*....etc.) (**Prescott & al, 2010**).

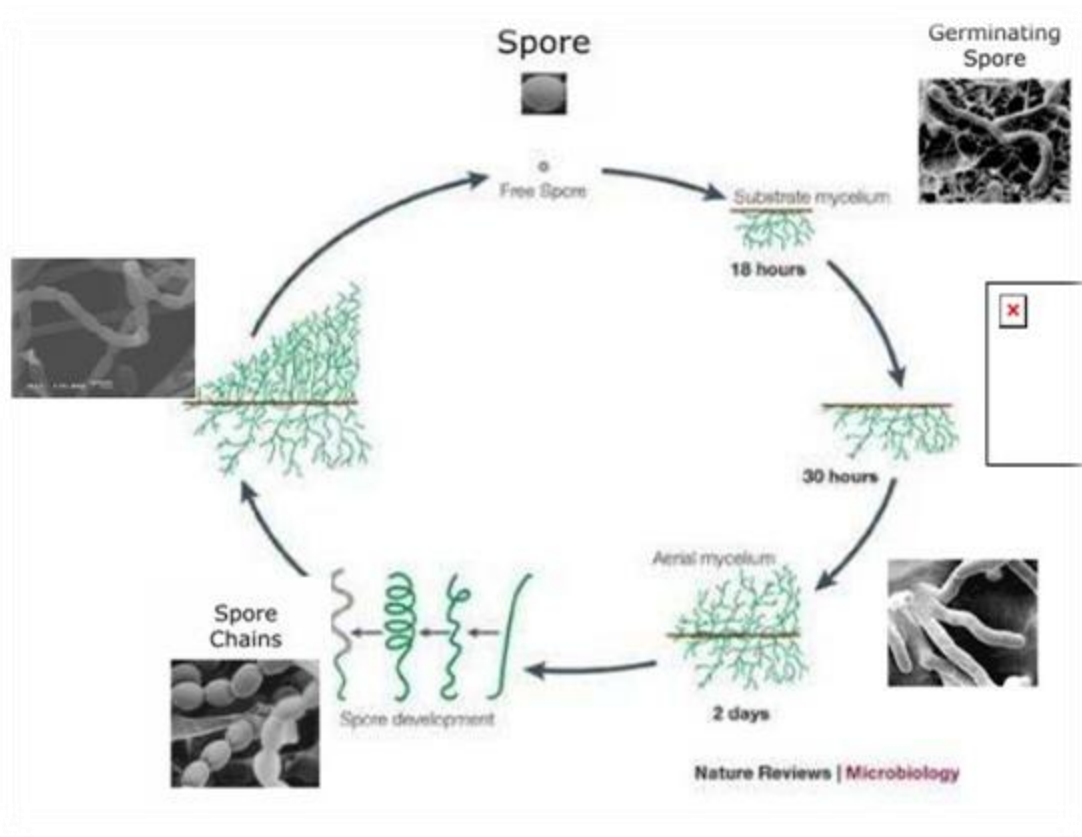


Figure 2: Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton & al, 1989).

6. Distribution des actinomycètes et fonction écologique

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (Goodfellow & Williams 1983). Ainsi, ils peuvent être dans les sols, dans les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, ils sont particulièrement abondants dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où ils constituent une part importante de la population microbienne (Loqman, 2009).

Certains genres d'actinomycètes préfèrent des habitats spécifiques, comme les *Micromonospora* qui sont abondants dans les lacs, les *Actinomyces* et les *Nocardia* préfèrent les cavités des hommes et des animaux, et les *Thermoactinomyces* qui se retrouvent généralement dans les sources hydrothermales où la température est élevée. Les *Streptomyces* sont très abondants et se retrouvent presque partout, Enghusen (1956) explique l'abondance de ce genre par la résistance à la dessiccation de leurs spores (plus de trois ans) (Waksman, 1959).

Le premier dénombrement des actinomycètes dans le sol est réalisé par Hiltner & Stormer (1903) qui ont indiqué que le pourcentage des actinomycètes représente (13 à 30) % de la totalité microbienne du sol. Cette variation dépend de plusieurs paramètres, tels que:

- La saison : au printemps les actinomycètes représentent 20 % de la population microbienne, ce pourcentage chute jusqu'à 13 % en été tandis qu'en hiver le pourcentage des actinomycètes atteint sa valeur maximale (30 %) (**Waksman, 1959**).
- La profondeur : D'après **Waksman (1967)**, le rapport microorganisme totaux/ Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (**Breton & al. 1989**).

La fonction écologique principale des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (**Prescott & al, 2010**), grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases ...etc (**Prakash & al, 2012**), ainsi que les enzymes pour l'hydrolyse des sucres complexes comme : la cellulose, hémicellulose et certaines d'entre eux attaquent même la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (**Maier & al, 2009**).

Au niveau de la rhizosphère, les actinomycètes forment des relations symbiotiques avec les racines des plantes, en contribuant à la promotion de leurs croissances par des effets directs et indirects (**Barreto & al, 2008**). Les effets directs comprennent la solubilisation du phosphate, la fixation d'azote, la production de phytohormones, (**El-Mehalawy & al, 2004**), tandis que les effets indirects peuvent être dus au contrôle des agents pathogènes par la production des métabolites secondaires, tel que les antibiotiques (**Barreto & al, 2008**), ou par la compétition nutritionnelle vis-à-vis des agents pathogènes, comme par exemple la synthèse des sidérophores, qui sont des chélateurs du fer (**Getha & al, 2005**).

7. Taxonomie des actinomycètes

En se basant sur le système de classification de Murray (*Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology*, Murray *et al.*, 1989), les actinomycètes ont été classés dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), classe des Thallobacteria (bactéries Gram-positives ramifiées), dans laquelle on trouve l'ordre des Actinomycétales (**Ouhdouch, 2003. Alauzet, 2009**).

La taxonomie des actinomycètes a évolué en fonction du développement des connaissances, durant ces 30 dernières années elle fut marquée par quatre périodes dont chaque une à porter des nouveaux critères de classification :

7.1 Premier période

C'est la période classique, où seuls les critères macro et micromorphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux. Les caractères morphologiques décrits dans

la clé d'identification par **Nonomura (1974)** sont beaucoup utiles dans l'identification des streptomycètes (**Thenmozhi & Kannabiran 2010**). Ils sont comme suit :

- la couleur de mycélium aérien : Les *streptomyces* sont divisés en sept groupes selon la couleur du mycélium aérien « grise, rouge, jaune, blanc, bleu, vert, et violet ».
- les pigments mélanoïdes.
- Fragmentation du mycélium de substrat
- La couleur de mycélium de substrat
- Les pigments solubles : les actinomycètes sont divisés en deux groupes selon leurs pouvoirs de production des pigments outre que les pigments mélanoïdes : productrice et non.
- La morphologie des chaînes de spores : les chaînes de spores peuvent être simples ; droit à flexueuses (type « rectus-flexibilis= RF), en crochet ou en boucles (type « rectinaculum-opertum » = RA), ou en spirales (type « spira » = S), comme elles peuvent être verticillées, Biverticillus (BIV), Biverticillus-Spira (BIV-S). Monoverticillus (MV), Monoverticillus - Spira (MV-S) (**Figure 3**).
- L'ornementation de la surface des spores : les spores peuvent avoir une surface lisse (type smooth), rugueuses (type warty), épineuse (type spiny) ou chevelue (type hairy) (**Figure4 et 5**).

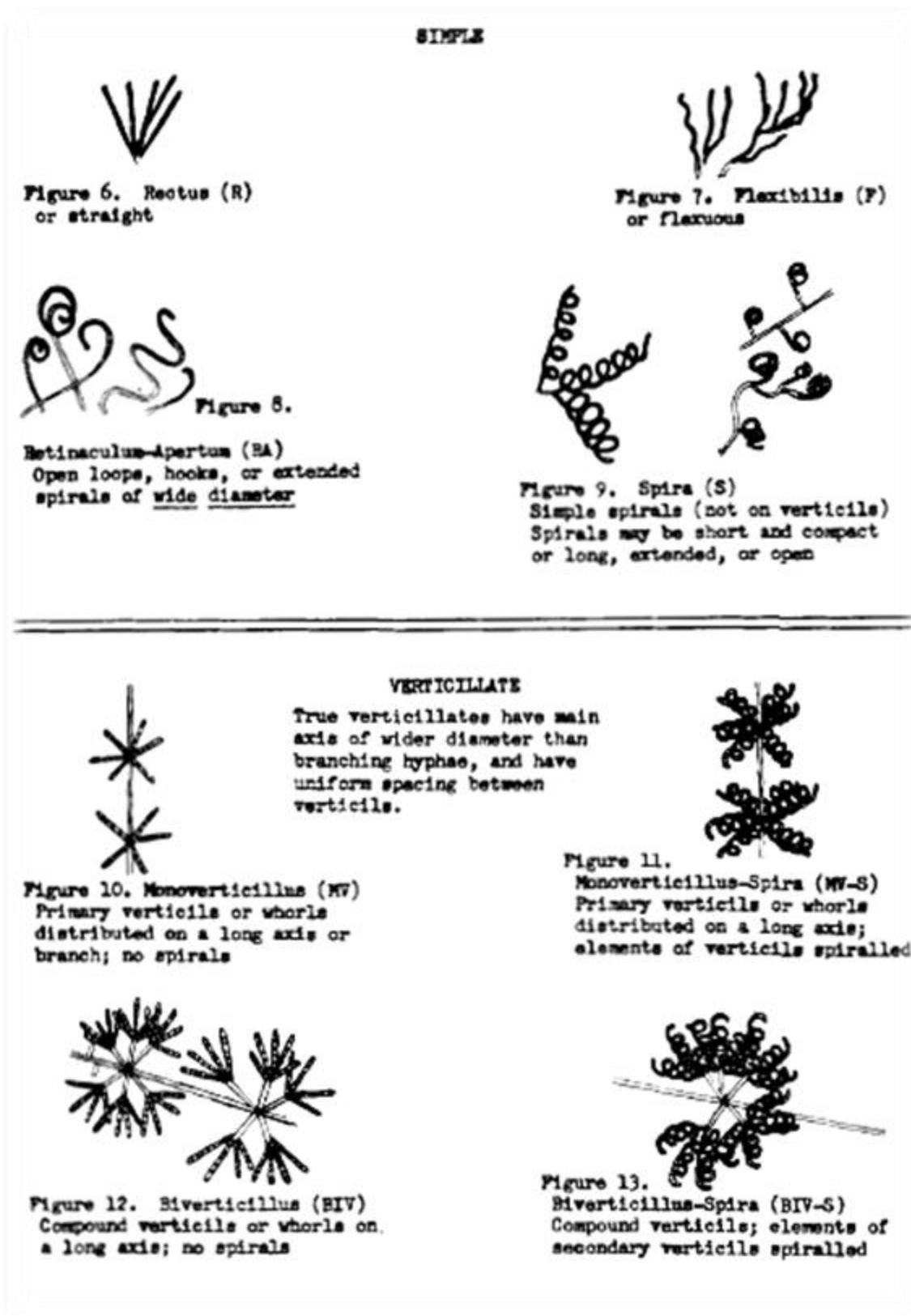


Figure3 : Morphologie des chaines de spores des actinomycètes
(Shirling & Gottlieb, 1966).



Figure 4: Morphologie des spores des actinomycètes (Shirling & Gottlieb, 1966).

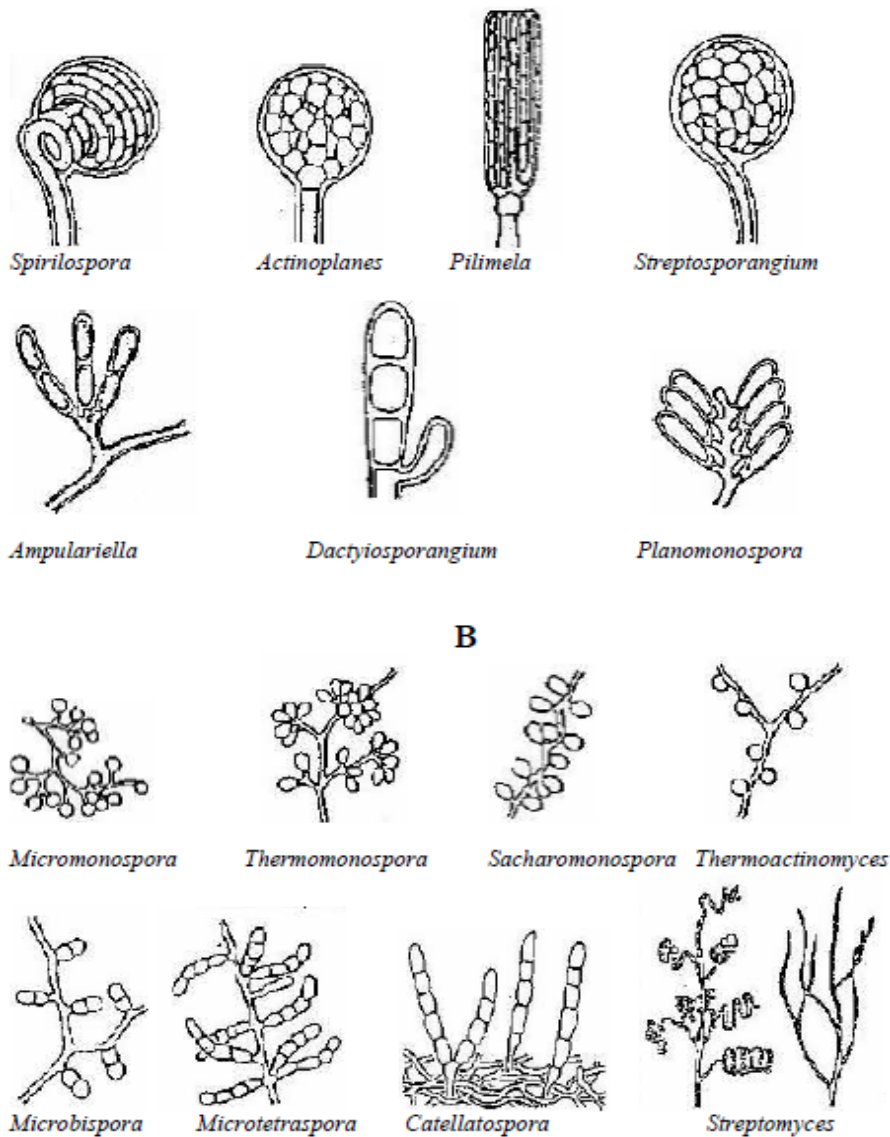


Figure 5 : Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton & al, 1989).

7.2 La seconde période

C'est la période d'utilisation de la chimio-taxonomie. Selon Goodfellow & Minnikin, 1985, la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des

organismes. Selon les travaux de **Becker & al. 1964** ; **Lechevalier et Lechevalier (1970)**, certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinomycètes, ces constituants on les retrouvent généralement soit dans la paroi ou dans la cellule entière (**Sabaou, 1988**).

➤ **Les acides aminés et les sucres**

Chez les bactéries à Gram négatif, la structure chimique des peptidoglycanes est uniforme, à quelque exception près, par contre, chez les bactéries à Gram positifs, la composition en acides aminés et en sucres se révèle un critère taxonomique de poids (**Meyer, & al 2004**).

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée soit d'une :

- Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**).
- Glycoprotéine contenant l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) ; Il est le plus souvent rencontré chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tel que les *Streptomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**), il est présent au niveau des parois de la plupart des actinomycètes sous deux formes isomériques ; la forme LL et la forme meso.

L'analyse des constituants cellulaires est devenue obligatoire pour la classification des actinomycètes qui était auparavant assez ambiguë. Plusieurs espèces de position systématique douteuse ont été reclassées dans d'autres genres et plusieurs genres ont été créés par la suite.

Le tableau1 illustre les principaux types de parois rencontrés chez les actinomycètes aérobies.

Tableau 1: Types de paroi chez les actinomycètes (Prescott & al, 2010)

Type de paroi	Acide diaminopimélique		Acide aminés			Sucres		
	Isomère LL	Isomère DL (méso)	Glycine	Lysine	Arabinose	Galactose	Xylose	Madurose ^a
I C	+	-	+	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	+	-	+	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	+
III C	-	+	-	-	-	-	-	-
IV A	-	+	-	-	+	+	-	-
VI	-	-	-	+	-	V	-	-

a: 3-O-methyl-D-galactose.

+ Présent ; - : absent ; **V**: variable suivant la souche ;

- Les chiffres I ; II ; III ; IV ; VI : définis par **Becker & al. 1964; Lechevalier et Lechevalier (1970a)** sur la base de la forme LL ou méso de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de la glycine et de la lysine.
- Les lettres A ; B ; C ; D : définis par **Lechevalier et Lechevalier (1970b)** sur la base des constituants majeurs en sucres : galactose, xylose, arabinose et madurose.

➤ Les lipides

Les lipides sont aussi importants pour la classification des actinomycètes, tout comme le type de paroi cellulaire, qui fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. Trois sortes de lipides sont étudiées : les acides gras à longues chaînes, les ménaquinones et les phospholipides.

• Les acides gras

Les acides gras les plus trouvés chez les actinomycètes, peuvent être soit des courtes chaînes comportant 12-20 atomes de carbone, ou des longues chaînes qui caractérisent le groupe des acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone (**Minnikin & Goodfellow, 1981**).

• Les quinones

Ce sont des lipides terpéniques, les quinones respiratoires ou isopréniques. Ils ont un potentiel considérable comme marqueurs taxonomiques. Il existe 2 genres majeurs de quinones respiratoires chez les bactéries soient: les ménaquinones (mieux connus sous le nom de vitamine **K2**) et les ubiquinones (aussi appelées coenzyme 4) (**Minnikin & Goodfellow, 1981**).

- **Les lipides polaires** : les plus courants chez les actinomycètes sont les phospholipides (**Minnikin & Goodfellow, 1981**).

7.3 Troisième période

Durant la troisième période naissait la taxonomie numérique, qui a débuté dans les années 70, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles (**Smaoui, 2010**). **Sneath & Sokal** ont défini la taxinomie numérique comme " le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères" (**Prescott & al 2003**).

Le procédé consiste à déterminer la présence ou l'absence des caractères sélectionnés dans le groupe d'organisme étudié. Pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins 50. Et il est également préférable d'inclure de nombreux types de données différents: morphologique, biochimiques et physiologiques. Chacun des caractères est codés **1** pour présence du caractère, ou **0** pour absence du caractère. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables (**Kitouni, 2007. Prescott & al, 2003**).

7.4 La quatrième période

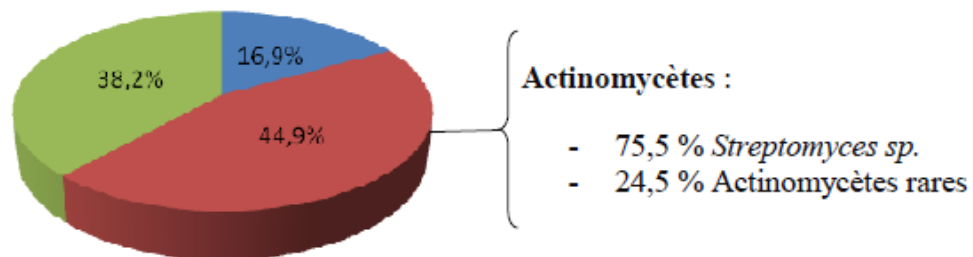
A débuter durant les années 80 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle. Elle consiste à l'application des données basées sur les acides nucléiques, aux problèmes de systématique. Le terme taxonomie moléculaire signifie l'utilisation de l'ADN et de l'ARN pour l'étude des relations entre les organismes (**Judd & al, 2001**).

La structure générale des gènes codants pour l'ARNr 16s est hautement conservée chez tous les êtres vivants, et sa séquence présente des zones qui sont presque invariables appelées séquences signatures oligonucléotidiques. Ces derniers serviront comme outil pour identifier spécifiquement les actinomycètes (**Alauzet, 2009**).

Sur la base de l'analyse de l'ARNr16s l'ordre des actinomycetales est divisé en 14 sub-ordres : *Actinomycineae*, *Actinopolysporineae*, *Catenulisporineae*, *Corynebacterineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae*, *Jiangellineae*, *Kineosporineae*, *Micrococineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae* and *Streptosporangineae* (**Adegboye & Babalola, 2012**).

8. Antibiotiques sécrétés par les actinomycètes

Les actinomycètes tiennent une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques, malgré les progrès de synthèses chimiques. En effet, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces* (Figure 6) (Sibanda & al. 2010). Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques on peut citer : les aminoglycosides, les anthracyclines, les glycopeptides, les beta-lactamines, les tetracyclines, les macrolides, les nucléosides...etc.



- Produits issus de bactéries non actinomycétales,
- Bactéries actinomycétales, ■ Champignons microscopiques

Figure 6 : Origine des antibiotiques (Berdy, 2005)

Outre les antibiotiques, les actinomycètes produisent d'autres molécules qui ont des applications biotechnologiques variées, telles que :

- Anti tumorales : actinomycine, adriamycine, rebeccamycine- (Uyeda, 2004).
- Antivirale, antiparasite ;
- Insecticides : nikkomycine-, miticides herbicides : phosphinothricines.
- Piscicides : antimycine A-

Ainsi que d'autres substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressives, immunostimulantes) (Sanglier & al, 1993).

Materiels et Methodes

1. Echantillonnage

Dix échantillons du sol ont été prélevés à partir de différents endroits de sebkha de Kenadsa, situer dans le sud-ouest de la wilaya de Bechar (**Figure 7 et Planche1**), durant le mois de **Février 2012**.

Chaque échantillon du sol est prélevé à partir d'un mélange de cinq aliquotes récupérer sur un carré de 100 m² de surface par la technique de **Pochon et Tardieux (1962)**. Cette technique consiste à écarter les cinq premiers centimètres du sol à l'aide d'une grande spatule et une quantité de 100 à 150 grammes du sol sont prélevés par une petite spatule puis placée sur une feuille d'aluminium. Les cinq aliquotes sont bien mélangées et à partir du mélange 50 grammes du sol sont prélevés puis placés dans un flacon stérile ce qui constitue un échantillon, les autres échantillons sont prélevés de la même manière.

2. Analyses physico-chimiques du sol

2.1 Mesure de pH

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH- mètre (HANNA pH 209) à électrode, ce dernier est plongé dans une suspension dont le rapport (sol/ eau) est de 2/5 (g/ml) (**Kumar & al, 2012**).

2.2 Dosage d'humidité

Une quantité de 10 grammes de sol de chaque échantillon sont séchée dans un four à moufle jusqu'aux poids constants à la température de 105C°. L'humidité est calculée par la formule (**Smith & al, 1998**)

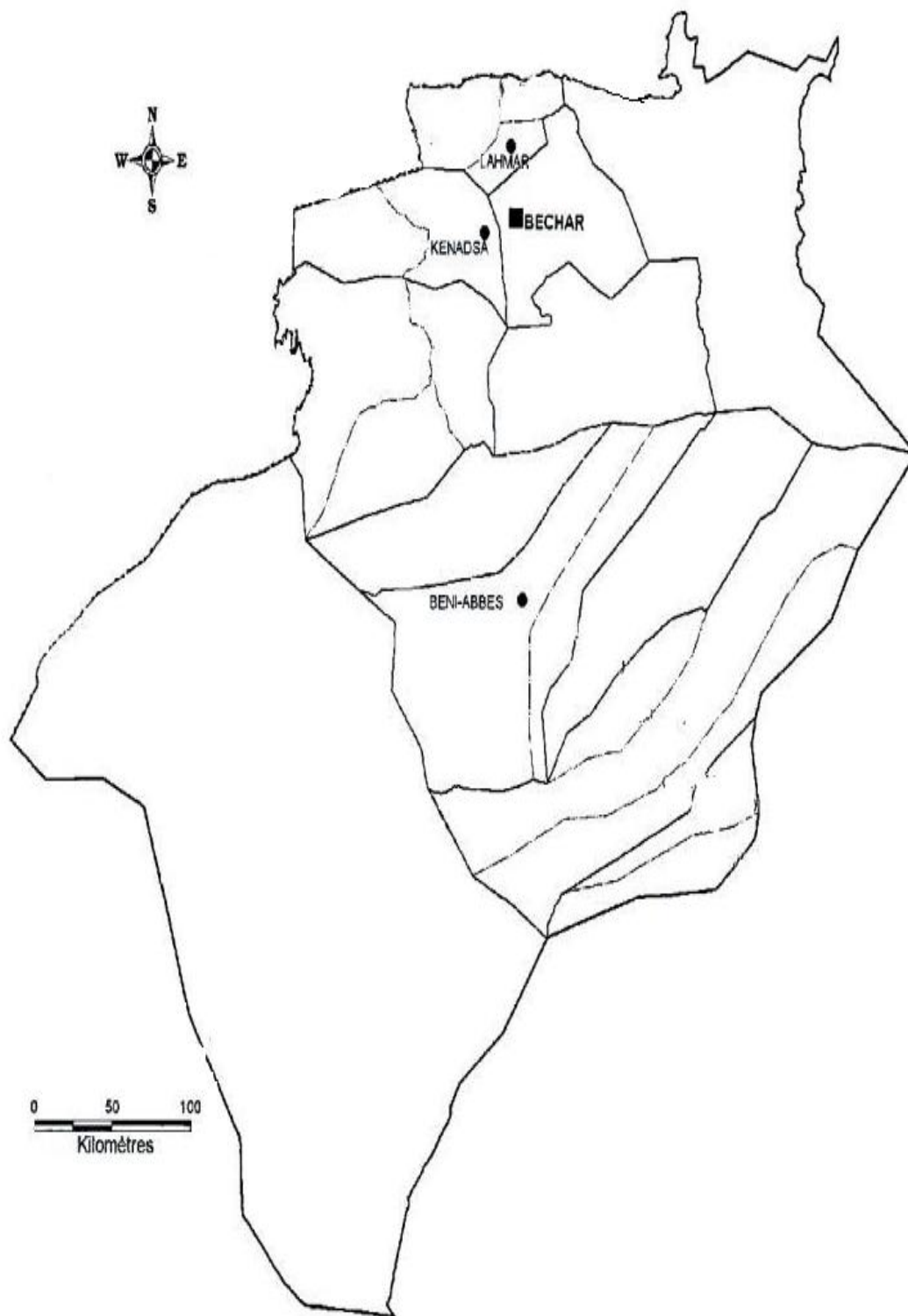
$$\% H = \frac{(P1 - Pt) - (P2 - Pt)}{(P1 - Pt)}.$$

P1: poids de l'échantillon avec la tare avant séchage.

P2 : poids de l'échantillon avec la tare après séchage.

Pt: poids de la tare.

H% : Humidité.



**Figure7 : Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons
(Source : DPAT).**



Photo1 : Vue générale de la sebkha de Kenadsa



Photo2 : Sol de l'échantillon N°2.



Photo3 : Sol de l'échantillon N°4.



Photo4 : Sol de l'échantillon N°3.

Planche1: Prélèvement des échantillons à partir de la sebkha de Kenadsa (Bechar).

2.3 Dosage de la matière organique

La matière organique est caractérisée par sa forte teneur en carbone, qui se transforme par oxydation en gaz carbonique. La détermination de la teneur en matière organique d'un échantillon de sol repose ainsi sur la détermination de la masse de sa fraction organique. Deux méthodes sont disponibles pour effectuer cette détermination: calcination ou par titrage d'une substance réagissant avec le carbone organique.

Nous avons utilisé la première technique : Les échantillons du sol préalablement tamisés à 2mm, sont séchés à l'étuve à la température de 100°C afin d'éliminer l'eau. La calcination du sol est obtenue par incinération de 5 g du sol dans un four à moufle à haute température (475°C) pendant 16 heures (**Lee & Hwang, 2002**). La matière organique est calculée comme suite :

$$\% \text{ Matière organique} = \frac{\text{Poids du sol avant calcination} - \text{Poids du sol après calcination}}{\text{Poids du sol avant calcination}}$$

3. Isolement des actinomycètes

3.1 Prétraitement des échantillons

Avant l'isolement, les échantillons du sol subissent un prétraitement pour améliorer le nombre des actinomycètes, pour cela deux prétraitements ont été appliqués :

➤ Le séchage

Les échantillons du sol sont séchés à la température ambiante pendant sept jours; ce prétraitement a comme effet la réduction de la flore bactérienne dans les échantillons du sol (**Suwan & al, 2012**).

➤ L'enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO₃)

Nous avons utilisé la méthode décrite par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**. 10 g de chaque échantillon du sol a été mélangé avec 1 g de CaCO₃, le tout est incubé pendant 7 à 9 jours à la température ambiante dans une atmosphère saturée d'humidité. Ce prétraitement a pour effet la réduction de la flore fongique ainsi que l'augmentation du nombre d'actinomycètes contenue dans chaque échantillon (**Arshad & al, 2012**).

3.2 Les milieux de cultures

Quatre milieux de cultures recommandées pour l'isolement des actinomycètes, ont été utilisés, qui sont :

- Milieu Bennett (**Lee & al, 2011**);
- Milieu amidon extrait de levure peptone (M2) (**Boughachiche & al, 2005**) ;
- Milieu *International Streptomyces Project 2* (ISP2) (**Ara & al, 2012**).
- Milieu caséine amidon agar (CAA) (**Sharma & al, 2011**).

La composition de chaque milieu de culture est donnée dans l'annexe1. Le pH de chaque milieu de culture est ajusté à raison de 7.4 ± 0.2 avant la stérilisation. Pour favoriser l'isolement des actinomycètes, nous avons supplémenté chaque milieu de culture par 7% (P/V) de NaCl et 25 µg/ml de l'antibiotique oxytétracycline (SAIDAL).

3.3 Préparation de la suspension de dilution et ensemencement

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 10 grammes de terre broyées à 90 ml d'eau physiologique stérile. La suspension subit une agitation pendant 30 minutes par un vortex, ce qui constitue la dilution 10^{-1} . À partir de cette suspension mère on prépare les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} (**Kumar & al, 2010**).

Un volume de 1 ml de chaque dilution est ensemencé par inondation à la surface de milieu de culture coulé sur des boîtes pétries, avec trois répétitions pour chaque dilution.

Les boîtes sont mises dans un incubateur réglé à la température de 28°C, et ils sont vérifiés régulièrement pendant 21 jours (**Rahman & al, 2010**).

4. Observation microscopique

Toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques aux actinomycètes, colonies dures et incrustées dans la gélose, sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple par le bleu de méthylène, ainsi que la coloration de Gram.

L'observation au microscope optique est effectuée avec des grossissements gradués ($\times 10$, $\times 40$, $\times 100$) (**Kalyani. & al. 2012**).

5. Purification des isolats

Les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques et microscopiques, sont purifiées pour obtenir des cultures pures.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un inoculum à partir des colonies de milieu d'isolement, qui sera ensuite ensemencé par épuisement sur le même milieu que celui d'isolement sous forme des stries. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des

cultures pures. La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage (**Boussaber & al, 2012**).

NB : Il est préconisé d'éviter l'excès de repiquage, qui peut être à l'origine des mutations des isolats obtenus (**Guiraud, 2003**).

6. Conservation des isolats

Les isolats obtenus sont conservés pour être utilisés dans des tests ultérieurs. La conservation est réalisée selon deux techniques :

- Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur la gélose de Bennett incliné puis incubé pendant 7 jours à 28 °C. Les tubes sont ensuite conservés à 4°C (**Arifuzzaman & al, 2012**).
- Les isolats sont ensemencés sur le milieu gélosé, puis incubés jusqu'à sporulation. Les spores des isolats sont raclés puis conservés dans le milieu Bennett avec 20% de glycérol à -18°C (**Denis, 2007**).

7. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes est mise en évidence par deux criblages, le premier criblage, réalisé sur le milieu solide, consiste à sélectionner le meilleur isolat qui sera utilisé dans le deuxième criblage réalisé sur le milieu liquide.

7.1 Préparation de l'inoculum

Tous les microorganismes tests utilisés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne sont des souches de références ATCC conservées dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

Pour cela, nous avons utilisé huit bactéries et une levure, dont cinq à Gram positifs : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC25212), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus stérithermophilus* (ATCC 12980), trois à Gram négatifs : *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25522) et une levure *Candida albicans* (ATCC10231).

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur le milieu BHIB, les densités optiques sont ajustés à l'aide d'un densitomètre (Fisher Scientific) fixé à la longueur

d'onde 620 nm de manière à obtenir une absorbance entre 0.08 à 0.1 qui correspond à une charge cellulaire $\approx 10^8$ cellules/ ml. Les souches tests sont ensuite inoculées sur le milieu Muller-Hinton.

7.2 Criblage primaire par la technique des cylindres agar

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en strie serré à la surface du milieu Bennett et incubés à la température de 28 °C pendant 14 jours. Des cylindres de 5 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries tests. Les boîtes pétris sont ensuite placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances et après elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition formée autour des cylindres sont alors mesurées (**Pazhanimurugan & al, 2012**).

L'activité antifongique est mise en évidence par la technique décrite ci-dessus, sauf que le milieu PDA est utilisé à la place de Muller-Hinton et l'incubation est faite à 30°C pendant 48 heures.

7.3 Criblage secondaire

➤ **Choix de milieu optimal pour la production des substances antimicrobiennes**

Pour optimiser la production des antibiotiques, cinq milieux de culture préconisés pour la production des antibiotiques ont été testés : PELG ISP2, ISP1, Bennett, GEYA. Le test d'activité antimicrobienne est réalisé par la technique de cylindre agar décrite précédemment. La composition des milieux de cultures utilisées est donnée dans l'annexe 1.

➤ **Extraction des molécules bioactives**

Des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de production des substances antimicrobiennes sont inoculés par les spores de l'isolat actif.

Les Erlenmayer sont incubés sous agitation, à 250 rpm, dans un Bains-Marie (Wise Buth) réglé à la température de 28°C. Après 14 jours d'incubation, la culture subit une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes, afin d'éliminer le mycélium (**Ilić & al, 2005 ; Kamat & Kerkar, 2011 ; Pandey & al, 2011**).

Un volume de 20 ml de surnageant est mélangé avec le même volume des solvants organiques de polarités croissantes: chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. L'extraction des antibiotiques est effectuée sous agitation (250 rpm) à la température de 30 °C pendant une nuit (**Badji & al, 2011**).

L'extrait organique obtenu est évaporé sous vide à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Bucki, R11). Le résidu sec obtenu est repris dans 2 ml du même solvant d'extraction (**Naorungrote & al, 2011**).

L'activité antimicrobienne est évaluée en utilisant des disques de papiers filtres stériles de 6 mm de diamètres imprégnés par 20µl de chaque extrait, ainsi que l'extrait brut. Des disques contiennent les solvants purs sont utilisés comme témoins (**Raja & Prabakaran, 2011**).

Après séchage, les disques sont déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par les souches teste cibles selon la technique NCCLS (**Vimal, 2009**). Les boites sont placées à 4 °C pour permettre une diffusion des substances, puis elles sont incubées à 37 °C; les zones d'inhibitions sont mesurés après 24 heures d'incubation (**Ayari & al, 2012**).

8. Essais de caractérisation des principes actifs

8.1 Révélation chimique

Des plaques de gel de silice (60 F₂₅₄) ont été activées à 110 °C pendant une demi-heure à l'étuve. Vingt microlitres d'un échantillon provenant du meilleur milieu de production extraient par le meilleur solvant sont déposés graduellement sur la plaque de gel de silice. La cuve chromatographique est saturée pendant deux heures par la vapeur de deux systèmes de solvant suivant (**Rakshanya & al, 2011**)

- Acétate d'éthyle-méthanol (100 :15, v/v).
- Ethanol- ammoniaque- eau (8 :1 :1, v/v).

Ensuite les plaques sont introduites dans la cuve. Après développement, les plaques sont séchées pour éliminer les solvants, puis elles sont observées sous lumière UV à 255 et 366 nm (**Boudjella & al. 2006**).

La révélation chimique est réalisée en utilisant différents révélateurs : (**Raja & Prabakaran, 2011, Sherma, 2000**) :

- La ninhydrine,
- Le réactif de Molish
- Le chlorure de fer ferrique (FeCl_3).

Pour chaque tache obtenue en calculent le rapport frontal (Rf),

$$\text{Rapport frontale} = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

8.2 Révélation microbiologique

La révélation microbiologique est réalisée par deux techniques :

- La bio-autographie consiste à préparer des bandes de (20X1) cm de plaque CCM qui reçoit 50 μl de l'extrait active. Une chromatographie est réalisée en utilisant le meilleur système de solvant qui permet une bonne séparation des molécules antimicrobiennes. Les bandes sont alors déposées à la surface des boîtes contenant le milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par une souche test sensible, le tout est placé à 4°C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances, puis les boîtes sont incubées à la température de 37°C pendant 24 heures (**Betina. 1973 ; Hozzein & al. 2011., Irena & Edyta.2011., Gulve & Deshmukh. 2012**).
- Les spots qui apparaissent sont grattés puis solubilisés dans un solvant approprié, après 4 heures de contact, le gel de silice est éliminé par centrifugation et le surnageant subit une évaporation à 45°C. Le résidu final est récupéré dans 50 μl de méthanol qui sera testé contre une souche de référence sensible par la technique de disque. Après pré-diffusion à +4°C puis incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, les Rf des spots présentant une activité sont calculés (**Pazhanimurugan & al. 2010**).

8.3 Etude spectral des molécules bioactives

➤ Spectre UV-VISIBLE des molécules bioactives

Les mesures de l'absorbance des extraits bioactives est réalisées entre 200 et 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre du type Spectronic Unicam UV 500, en utilisant des cuves en quartz avec un trajet optique de 1 cm (**Ouhdouch & al. 2001**).

➤ Spectre infrarouge des molécules bioactives

L'analyse spectrale par infrarouge est déterminée par un Spectrophotomètre de type : Agilent technologie Cary 600 series FTIR spectrometer.

9. Identification de l'isolat

L'isolat intéressant est identifié, sur la base des critères morphologiques, chimio-taxonomiques et physiologiques.

9.1 Etude chimio-taxonomique

Les différents isomères de l'acide diamino-2-6-pemilique (DAP), ainsi que les sucres de la paroi sont déterminés par la technique de **Hasegawa & al (1983)**.

➤ Détermination des acides aminés

Une à deux colonies, d'actinomycètes à identifier, prélevées du milieu ISP2 sont placées dans un tube bien scellé avec 0.1 ml de HCL 6 N, les tubes subissent un autoclavage à la température de 120 °C pendant 20 minutes.

2 µl de l'hydrolysate cellulaire est chromatographie sur couche mince en utilisant le système de solvant : méthanol-eau distillé- HCL 6N- pyridine (80 :26 :4 :10). 1 µl d'une solution de glycine à 1% est utilisée comme témoin. Une souche contrôle de *Streptomyces* LAM1001 isolée est identifiée dans le laboratoire de microbiologie de l'université de Bechar et conservée au laboratoire de LAMAABE, est préparé de la même manière que l'isolat à identifier. Cette souche est utilisée comme témoin pour mise en évidence de la forme LL de l'acide diaminopimelique.

La révélation des taches est réalisée en pulvérisant une solution de ninhydrine 0.2 % dans l'acétone (poids/volume), après séchage du chromatogramme pendant cinq minutes à 100 °C, les taches de l'acide DAP sont de couleur verte pale alors que les autres acides aminés ont une couleur pourpre. Dans ce système la forme LL de l'acide DAP migre plus rapidement que la forme méso, alors que les autres acides aminés migrent plus rapidement que les formes de DAP (**Becker & al, 1964**).

➤ Détermination des sucres

Une à deux colonies sont prélevées puis placées dans un tube scellé avec 0.1 ml de HCL 0.25N. Les tubes subissent un autoclavage pendant 20 minutes.

2 µl de l'hydrolysate cellulaire, ainsi que 1 µl des sucres témoins à 1 % de xylose, arabinose galactose, glucose, rhamnose et mannose sont déposés sur la surface d'une plaque chromatographique qui sera développée dans le système de solvant n-butanol- eau distillé- pyridine- toluène (10: 6: 6:1, v/v).

Les sucres ont été localisés sur le papier en pulvérisant une solution de réactif de Molish et en chauffant dans un four de 100°C durant 5 min (**Boone & Pine, 1968 ; Lechevalier & Lechevalier, 1974**).

Les sucres témoins migrent dans l'ordre (le plus lent vers le plus rapide) : galactose, glucose, arabinose, mannose xylose, ribose, rhamnose. Le madurose migre à la même distance que le xylose, la différence entre les deux ce fait par la couleur (**Staneck & Roberts, 1974**).

➤ Recherche du caractère acido-alcool résistant

La coloration de Ziehl-Neelsen, consiste à préparer un frottis de l'isolat à identifier, qui sera couvert par une solution de fuchsine pendant 10 minutes puis rincé avec de l'eau du robinet, les lames sont ensuite recouvertes par une solution de l'acide sulfurique dilué à ¼ pendant 3 minutes, puis rincées une nouvelle fois avec de l'eau, après ils sont recouvertes par une solution d'alcool à 90° pendant cinq minutes et lavées par l'eau. Les lames sont recolorées une dernière fois par le bleu de méthylène pendant 30 secondes puis rincées avec l'eau.

Une fois séchées, les lames sont observées au microscope optique, les bactéries qui ont dans leurs parois de l'acide mycolique (acido-alcool résistant) apparaissent colorées en rose, tandis que les autres actinomycètes apparaissent colorés en bleu (**Rousset, 1993**).

9.2 Etude morphologique

➤ Aspect microscopique

La culture sur lamelle permet une observation de mycélium aérien et de substrat des isolats sans altérer leurs structures et leurs morphologies. Elle consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé approprié, de manière à former un angle de 45° avec la surface de la gélose, une goutte d'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu (**Figure 8**).

Après 21 jours d'incubation, les lamelles sont retirées délicatement, pour éviter la dénaturation de mycélium aérien et de substrat, puis elles sont placées sur une lame contenant une goutte de lactophénole et sont observées au microscope optique au grossissement X100, avec l'utilisation de quelques gouttes d'huile d'émersion pour éclaircir l'observation (**Shirling et Gottlieb (1966)**).

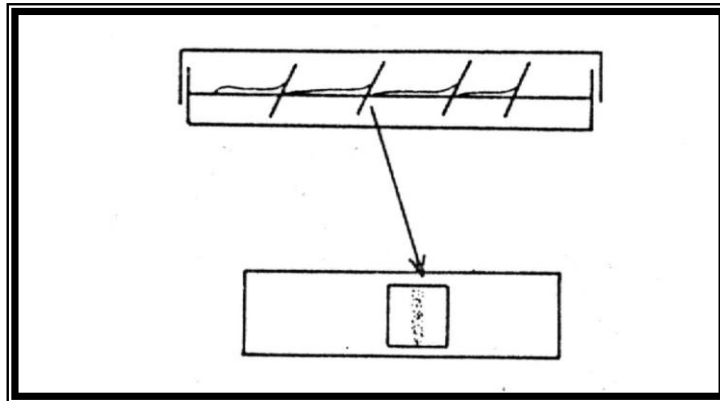


Figure 8: Technique de culture sur lame.

9.3 Caractères cultureux :

Les caractères cultureux sont déterminés sur les milieux préconisés par **Shirling et Gottlieb (1966)** dans *International Streptomyces Project* ou *ISP* :

- ISP 2 : Extrait de levure - Extrait de malt- Glucose- Agar
- ISP 3 : Farine d'avoine - Agar.
- ISP 4 : Amidon- Sels minéraux- Agar.
- ISP 5 : Glycérol- Asparagine- Agar.

La composition de chaque milieu de culture est donnée dans l'annexe 1.

L'isolat à identifier est ensemencé dans les différentes ISP. Les milieux sont ensuite incubés à 28 °C pendant 14 à 21 jours, et les caractères suivants sont notés :

- La couleur de mycélium aérien et de substrat
- La croissance : faible, moyenne, bonne.
- La production de pigment diffusible.

9.4 Caractères physiologiques et biochimiques

➤ Production des pigments mélanoides

Réalisé sur deux milieux recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)** :

- ISP 6 : Peptone- Extrait de levure- Sels ferriques- Agar ;
- ISP 7 : Tyrosine- Agar recommandé

La production des pigments **mélanoïdes** est appréciée après 14 jours d'incubation par comparaison avec des milieux non ensemencés, mais incubés dans les mêmes conditions.

➤ Tolérance au chlorure de sodium

Le milieu ISP2 contenant des concentrations croissantes en NaCl (0 ; 2.5 ; 5 ; 7.5 ; 10 ; 12.5 et 15) % (P/V), est ensemencé par les spores prélevées d'une culture de 14 jours de l'isolat d'actinomycète à identifier.

L'incubation est réalisée à la température de 28 °C pendant 21 jours, et la croissance est notée (faible, moyenne, bonne et très bonne). La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

➤ Détermination de la température optimale de croissance

L'isolat à identifier est incubé à différentes températures : (20 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 et 55) °C. Après 14 jours d'incubation la température qui permet une bonne croissance est notée.

➤ Utilisation des différents substrats carbonés

L'utilisation de 10 substrats carbonés est mise en évidence en utilisant un milieu de base (ISP9) recommandé par **Pridham et Gottlieb (1949)**.

Les différents substrats carbonés utilisés sont : Arabinose, Fructose, Arabinose, Xylose ; Lactose ; Glucose ; Saccharose ; Rhamnose ; Galactose ; Mannitol ; Cellebiose ; Maltose. Ils sont ajoutés au milieu (ISP9) à raison de 1 % (p/v).

Après ensemencement et incubation pendant 14 jours à 28 °C, la croissance des isolats est estimée par comparaison des boîtes contenant les différents substrats carbonés avec celles contenant le milieu ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) ainsi qu'une autre boîte de milieu ISP9 contenant le glucose (témoin positif).

Resultats et Discussions

1. Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons du sol

Les résultats des analyses physicochimiques (pourcentage d'humidité, pourcentage de la matière organique, ainsi que le pH) des dix échantillons du sol, sont répertoriés dans le **tableau 2** :

Tableau2 : Résultats des analyses physicochimiques des dix échantillons de la Sebkhha de Kenadsa.

Echantillons	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
pH	8.83	8.96	9.05	8.71	7.85	8.53	8.15	8.17	8.56	8.33
%MO	0.43	0.36	0.5	8.2	11.4	6.53	6.73	5.40	6.8	5.33
%AH	9.5	8.25	9.5	18.3	20.75	16.00	17.96	20.43	20.66	16.90

pH : potentiel d'hydrogène ; MO : matière organique ; AH : humidité.

Le pH des dix échantillons du sol est basique, les valeurs allant de 7.85 pour l'échantillon cinq (E5), à 9.05 pour l'échantillon trois (E3).

La matière organique présente des pourcentages allant de 0.36% à 11.40% ; selon **Lee et Hwang, 2002** le taux de la matière organique est considéré comme :

- Faible entre 4-7% : observé pour les échantillons : E6 E7 E8 E9 E10,
- Modéré entre 7.1-9% : pour l'échantillon E4,
- Élevée entre 9.1-11% : pour l'échantillon E5.

Les échantillons E1 E2 et E3 ont un taux de matière organique très faible qu'on retrouve en état de trace.

Selon les mêmes auteurs, l'humidité est faible si le pourcentage est compris entre (2-9)% : pour l'échantillon E2. Modéré entre (9.1-13)% : pour les échantillons E1 E3, et elle est élevée entre (13.1-20)% : pour les échantillons E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10.

D'après le **tableau 2**, la plus part des échantillons ont un taux d'humidité élevé (supérieurs à 13.1%), cela peut s'expliquer par la période d'échantillonnage qui a été faite pendant la période pluvieuse.

2. Résultats d'isolements des actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes apparaissent après 14 à 21 jours d'incubation, sur les quatre milieux d'isolements utilisés (Bennette, M2, CAA, ISP2) additionnés d'oxy-tétracycline (25µg/ml) et 7 % de NaCl. Ces colonies sont reconnues par leurs aspects macroscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose) et microscopiques (aspects filamenteux ramifier). Les résultats de l'isolement des colonies d'actinomycètes à partir des dix échantillons du sol, sont présentés dans le **tableau 3** :

Tableau 3: Nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
Nombres de colonies	0	0	0	15	2	0	0	0	1	0

Un totale de 18 colonies d'actinomycètes sont isolées à partir du sol de la sebkha de Kenadsa. Le plus grand nombre d'isolat est obtenue à partir de l'échantillon E4 par 15 colonies, deux colonies sont isolées à partir de l'échantillon E5 et une colonie seulement à partir de l'échantillon E9.

La **figure 9** résume le nombre des isolats d'actinomycètes isolés, en fonction des milieux de cultures :

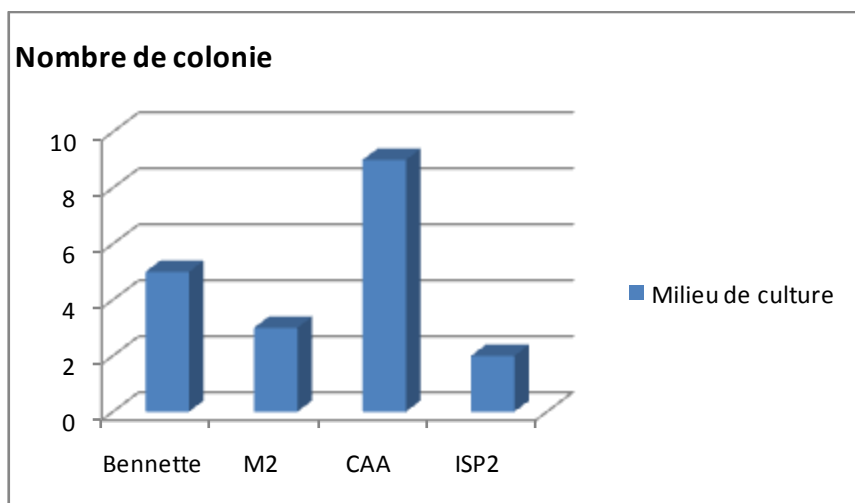


Figure 9 : Nombres de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture.

Selon la **figure** ci-dessus, le milieu caséine amidon agar (CAA) est le meilleur milieu pour l'isolement des actinomycètes, suivis par le milieu Bennett. En effet le premier nous a permis d'isolés 9 colonies, alors que cinq colonies ont été isolées à partir du deuxième milieu. Au contraire les deux milieux ISP2 et M2 nous ont permis d'isolées qu'un nombre faible de colonies (deux colonies à partir du milieu ISP2 et trois à partir du milieu M2).

Discussion

Les travaux d'isollements sélectifs des actinomycètes halophile à partir des milieux extrêmes sahariennes (comme le sol de la sebkha) sont relativement rares en Algérie (**Boughachiche & al, 2012 ; Reghioua & al, 2008**). **Meklat & al, 2011** ont isolés 52 souches d'actinomycètes à partir des échantillons collectés de diverse régions sahariennes salines (conductivité électrique égale à 55mS/cm) : Adrar, Bechar, Djelfa, El Golea, El Oued, Ghardaia, Laghouat, Ouargla et Tolga.

Plusieurs techniques de prétraitement des échantillons du sol, ont été appliquées dans les différents programmes de screening des actinomycètes dans le sol, ils ont tous comme objectifs à faciliter l'isolement sélectif des actinomycètes, qui ont une croissance lente, par rapport aux bactéries et aux champignons, qui gênent par leurs croissances rapides, la multiplication des actinomycètes. Afin d'augmenter le rapport actinomycètes/microorganismes, trois stratégies sont suivies:

- Prétraitement chimique ou physique comme : l'utilisation des agents sporosides (phenol, gluconate de chlorhexidine et le *chlorure de benzéthonium*) (**Thiemann, 2012**) ; le chauffage des échantillons du sol (**Baskaran & al, 2011**), la centrifugation, séchage...etc. (**Yamamura & al, 2012**).
- Utilisation dans le milieu de culture de certaines sources de carbone ou d'azote qui rende le milieu plus sélectif pour l'isolement des actinomycètes, comme : caséine, chitine, amidon, glycérol, asparagine...etc.).
- Utilisation des antibiotiques qui empêchent la croissance des bactéries et les champignons (**Zhang, 2011**).

Dans notre travail nous avons utilisé deux prétraitements, l'un physique c'est le séchage, et l'autre chimique c'est l'enrichissement par le bicarbonate de calcium (CaCO₃).

Le séchage des échantillons du sol à l'air libre pendant sept jours, a pour but la réduction de la flore bactérienne contaminante. En effet les conidiospores des actinomycètes

résistent bien à la dessiccation par rapport aux autres bactéries de coloration de Gram positif et négatif qui vont crever (**Khanna & al, 2011**). Les travaux de **Fan & al, 2010**, indiquent qu'un séchage des échantillons du sol pendant 7 à 21 jours réduise considérablement le nombre des champignons ainsi que les bactéries.

L'enrichissement des échantillons du sol par le bicarbonate de calcium est une technique décrite par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**. Cette technique a permis non seulement une augmentation du nombre des colonies des actinomycètes par un facteur de 100 ou plus par comparaison aux échantillons non traités par le bicarbonate de calcium, mais aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération court et qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinomycètes (**Gurung & al, 2009**).

Les résultats d'isolement indiquent que 18 actinomycètes ont été isolés à partir de 10 échantillons du sol prélevés dans les différents endroits de sebkha de kenadsa. Ce nombre faible d'actinomycètes isolés peut-être expliqué par la période d'échantillonnage réalisé en Hiver (mois de Février). Selon les études de **Hiltner & Stromer (In Loqman, 2009)**, les actinomycètes représentent 20% de la flore microbienne du sol au printemps, alors qu'en automne la densité des actinomycètes dépasse les 30%, cet accroissement est lié à la disponibilité des aliments pour les germes ; tandis qu'en Hiver, période d'échantillonnage, le pourcentage chut à 13% à cause du gel.

Les résultats présents dans le **tableau3**, indiquent une distribution hétérogène des actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon du sol. En effet cela est dû à la différence dans les facteurs physico-chimiques, qui influent considérablement sur le nombre ainsi que le type des actinomycètes qu'abrite le sol (**Hop & al, 2012 ; Adegboye & al, 2012**). Selon **Lee et Hwang. 2002**, les trois facteurs écologiques les plus importants qui influent sur la diversité des actinomycètes dans le sol sont : le pH, la matière organique et l'humidité.

D'autres facteurs sont aussi importants comme la température du sol, le type du sol, la végétation et l'emplacement géographique....etc. (**Adegboye, & al. 2012**).

Le plus grand nombre des colonies des actinomycètes isolés sont récupérés à partir de l'échantillon E4, avec 15 colonies, cela peut être expliqué par sa richesse en matière organique par rapport aux autres échantillons. Ceci est corroboré avec plusieurs travaux qui affirment que le nombre des actinomycètes est en corrélation positive avec le pourcentage de la matière organique (**Hayakawa & al, 1988. George & al, 2010**).

Les résultats indiquent que les actinomycètes sont absents dans sept échantillons du sol (E1, E2, E3, E6, E7, E8, E10). Ceci peut s'expliquer par le taux de la matière organique faible pour tous ces échantillons, ainsi que par le taux d'humidité élevé qui caractérisent ces échantillons. En effet le nombre des actinomycètes dans le sol est inversement proportionnel au taux d'humidité (**Lee et Hwang, 2002**).

L'échantillon E5 riche en matière organique par rapport aux autres échantillons n'a donné que deux colonies d'actinomycètes, ceci peut être dû au fait que la concentration à 7% de NaCl ajoutée au milieu d'isolement était trop faible et par voie de conséquence défavorise la croissance des actinomycètes de cet échantillon.

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinomycètes n'existe pas. Il faut toujours varier les méthodes et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**Boudemagh, 2007**). C'est la raison pour laquelle nous avons utilisés quatre milieux de cultures (caséine amidon agar, M2, Bennett, ISP2) pour isoler des actinomycètes à partir de la sebkha de Kenadsa. Parmi ces quatre milieux d'isollements, le milieu caséine amidon agar additionné de 7% de NaCl s'est montré efficace en permettant une bonne récupération des actinomycètes (9 colonies) à partir de la sebkha ; alors que les trois milieux Bennett, M2 et ISP2 ont donné respectivement 5, 3 et 2 colonies d'actinomycètes. Cette différence s'expliquerait par la présence, dans le milieu CAA, d'amidon et de caséine, qui stimulent la croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries (**Boughachiche & al, 2005**).

Plusieurs travaux ont confirmé que le milieu CAA est efficace pour l'isolement sélectif des actinomycètes à partir d'écosystème varié. **Sharma & al (2011)** ont isolés 134 actinomycètes par ce milieu, **Gayathri & al (2011)** à utiliser ce milieu pour isolés 20 colonies d'actinomycètes à partir d'un sol salin.

Le milieu Bennett a permis lui aussi la récupération d'un bon nombre de colonies d'actinomycètes à partir de la sebkha. Cette propriété peut être expliquée par la richesse de ce milieu par les substrats carbonés (le glucose) et azotés (casaminoacides, extrait de levure et extrait de viande), ce qui stimule la croissance des actinomycètes et facilite leurs isollements. Les deux milieux, M2 et ISP2, donnent un faible rendement d'isolement d'actinomycètes. Il est important de noter cependant, que plusieurs auteurs emploient autres milieux d'isolement, afin d'augmenter les chances d'obtenir une grande variété de microorganismes.

3. Diversité morphologique des actinomycètes isolés

Après 14 à 21 jours d'incubation, les colonies apparaissent, ils sont repiqués dans le même milieu d'isolement. Les colonies obtenues ont des tailles différentes (petite, moyenne, grande) de forme variable (lisse, bombé, aplatie...etc.) sont tous incrustées dans la gélose, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (jaune, blanche, marron...etc), parfois le mycélium aérien est absent.

L'aspect macroscopique des isolats est différent. Certains forment des colonies de grande taille, d'autres de taille moyenne et certains d'autres forment des colonies de petite taille. La forme des colonies était différente aussi : colonies bombées, aplatie, poudreuse...etc.

L'aspect microscopique, indique que tous les isolats ont un aspect filamenteux ramifié segmenté ou non, parfois il est fragmenté, ce qui les rapproche d'une façon certaine aux actinomycètes.

La technique de culture sur lamelle des différents isolats nous a permis d'obtenir les photos microscopiques du mycélium aérien et végétatif des souches isolées, sur la base des observations microscopiques par la technique de culture sur lamelle trois groupes sont observés:

- Le premier groupe : formé par des isolats possédants des sporanges : LAM142cE1, LAM142cE3, LAM142bH1, LAM142bH3, LAM142bH2, LAM143cG2, LAM153aI2, LAM142aK2, LAM142cE5, LAM142cE4, LAM143cG3, LAM142cE2, LAM143cG1, LAM153aI1. Avec un mycélium aérien sur lequel dressant un sporangiophore portant des sporanges de différentes formes (**Figure 10**).



LAM143CG3



LAM142bH1

Figure 10: Observation microscopique du mycélium aérien des isolats d'actinomycètes (x100).

- Le deuxième groupe ; formé par les isolats qui n'ont pas de structures particulières. Dans ce groupe on trouve trois isolats qui sont : LAM142aK2 ; LAM143dL ; LAM143dF.
 - L'isolat LAM142aK2 : se caractérise par la formation de très longue chaîne de spores, portées par le mycélium aérien, allant de 40 à 50 spores (**Figure11**).

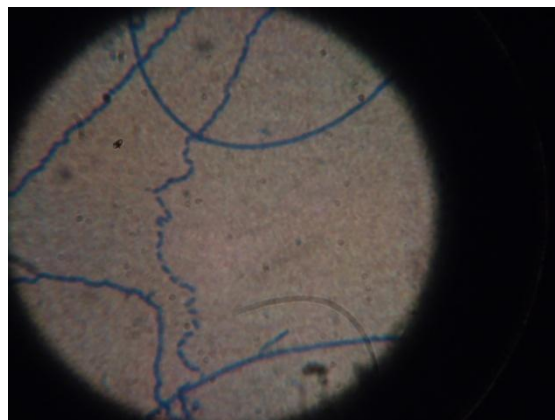


Figure 11: Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM142aK2 (x100).

- L'isolat LAM143dF : se caractérise par l'absence de mycélium aérien, et de courtes chaînes sporales sont portées par le mycélium végétatif.
- L'isolat LAM143dL : se caractérise par un mycélium aérien stable et bien développé, qui porte de courts sporophytes sur laquelle il y'a formation des monospores de forme ovale (**Figure12**).



Figure 12: Observation microscopique de mycélium aérien l'isolat LAM143dL (x100).

- Troisième groupe : formé par un seul isolat qui forme des vésicules.

L'isolat LAM192aM : l'observation microscopique de l'isolat LAM192aM, indique que le mycélium végétatif est très fragmenté, tandis que le mycélium aérien porte des vésicules globuleuses qui libèrent des spores mobiles.



Figure 13: observation microscopique de l'isolat LAM192aM (x100).

4. Résultats de l'activité antimicrobienne

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes par la technique de cylindres d'agar, afin de sélectionner les isolats les plus producteurs de substances antimicrobiennes. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau 4** :

Tableau 4: Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats d'actinomycètes vis-à-vis des souches testées.

	<i>S. aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>C. albicans</i>
LAM142cE1	9.33	8.33	-	15.66	-	13	10	11
LAM143dF	-	-	-	-	-	-	-	23.66
LAM142cE3	-	-	-	-	-	-	7	-
LAM143dL	-	-	-	-	12	19.66	-	-
LAM142bH1	8.33	16	12	10	-	-	-	-
LAM142bH3	11.66	10	9	14	-	-	-	17.33
LAM142bH2	8.5	8	9.16	11	-	-	8.5	11
LAM143cG2	9	8.16	10.5	-	-	-	8.5	11
LAM153aI2	8.16	8	10.5	-	-	-	-	10
LAM192aM	15	9.66	-	-	8	-	8.33	-
LAM142aK2	9.33	9.33	15	-	-	16	-	12
LAM142cE5	9	9.66	9.66	12.33	12.16	11.33	9.33	-
LAM142cE4	8	-	8	-	9	-	-	-
LAM142aK1	8.83	9.66	8.67	10.33	-	14.33	9.33	-
LAM143cG3	12.67	-	12.67	11.67	-	15	16	-
LAM142cE2	9.83	-	10.66	10	-	-	9.33	-
LAM143cG1	9.33	8	-	-	-	-	9.33	-
LAM153aI1	9.33	10.33	11.66	-	8	10.66	-	-

D'après le **tableau4**, tous les isolats ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme testé (bactérie ou levure).

Les deux isolats, LAM142cE3 et LAM143dL, sont actifs uniquement contre des bactéries à coloration de Gram négatifs, tandis que les trois isolats, LAM142bH1, LAM142bH3 et LAM153aI2, agissent sur des bactéries à Gram positifs seulement, alors que les douze isolats restant sont actifs à la fois contre des bactéries à coloration de Gram positifs et négatifs. Par contre sept isolats sont actifs contre la levure *Candida albicans*.

L'isolat LAM142cE5 est actif contre toutes les bactéries testées.

L'isolat LAM143cG3 inhibe toutes les bactéries testées à l'exception des deux souches *E. faecalis* et *K. pneumoniae*, et donnant des zones d'inhibitions importantes (supérieurs à 11 mm).

L'isolat LAM143dF est actif uniquement contre la levure *Candida albican* (activité antifongique).

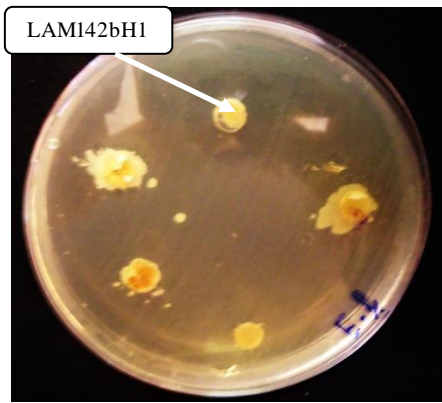
La plus grande zone d'inhibition est obtenue par l'isolat LAM143dF avec 23.66 mm de diamètre contre la levure *Candida albicans*, suivie par l'isolat 43dL contre *Pseudomonas aeruginosa* par une zone d'inhibition de 19.66 mm de diamètre. La plus petite zone d'inhibition est observée par l'isolat LAM143cE3 contre la bactérie *E. coli* avec une zone d'inhibition de 7 mm de diamètre.

La comparaison entre la sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des substances bioactives sécrétées par nos isolats est représentée dans le **tableau 5** :

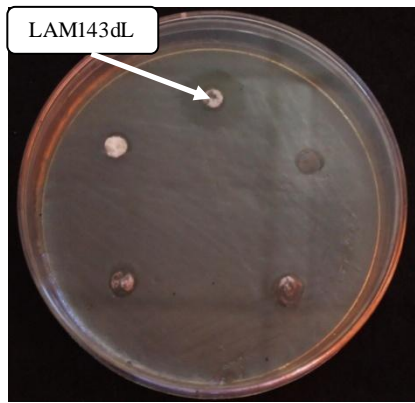
Tableau 5: Sensibilité des différentes souches testées vis-à-vis des substances antimicrobiennes sécrétées par les différents actinomycètes isolés.

Souches testées	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
Isolats actifs	15	12	12	8	7	10	5	7

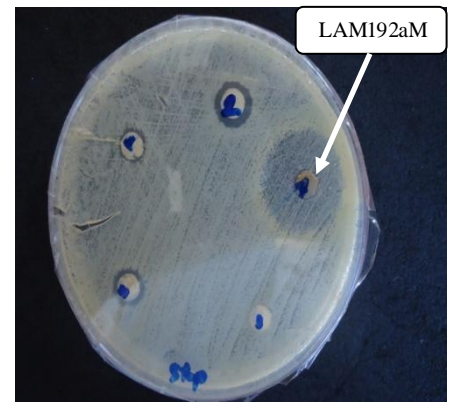
Quinze isolats sont actifs contre la bactérie *S. aureus*, ce qui nous amène à dire que c'est la bactérie la plus sensible, suivie par les bactéries *E. faecalis* et *B. cereus* avec 12 isolats actifs pour chacune. Tandis que la plus résistante est *K. pneumoniae* avec cinq isolats actifs seulement.



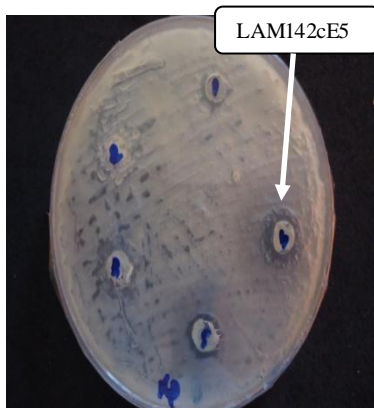
E. faecalis.



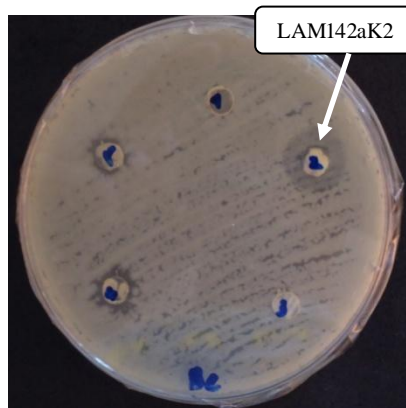
P. aeruginosa.



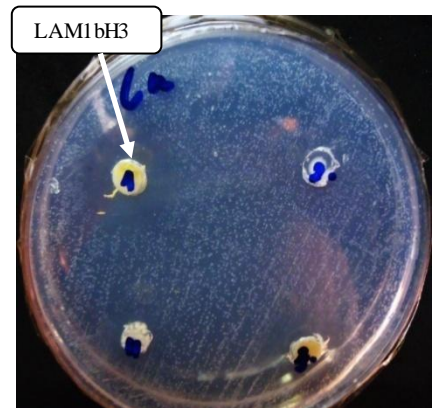
S. aureus.



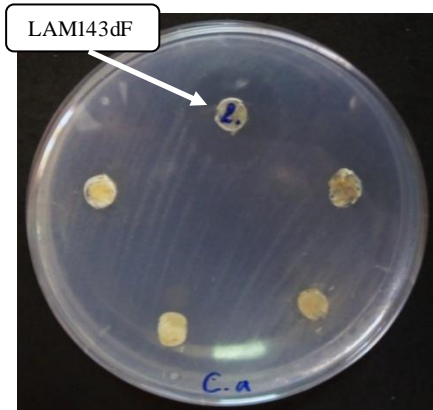
K. pneumoniae.



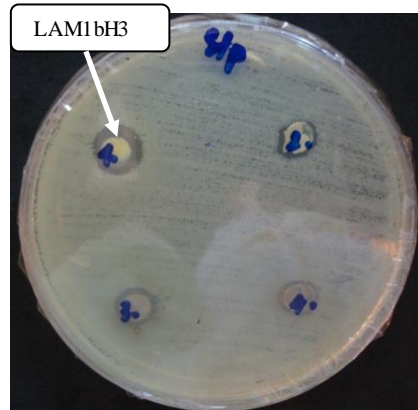
B. cereus.



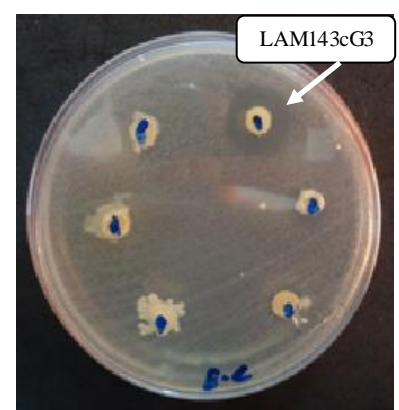
C. albicans.



C. Albicans



S. aureus



B. cereus.

Planche2 : Test d'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes.

Discussion

Tous les actinomycètes isolés au cours de ce travail ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme test utilisé. En effet plusieurs travaux ultérieurs ont corroboré le pouvoir antibactérien remarquable de ces bactéries (**McKenzie & al, 2010 ; Mythili & Ayyappa, 2011 ; Ng & Amsaveni, 2012**).

Valli & al. (2012) ont isolé 21 souches d'actinomycètes à partir d'un échantillon prélevé du bord de la mer (seashores) où tous les isolats étaient capables de produire des substances antimicrobiennes.

Ameur & Ghoul & al (2012) ont isolé sept actinomycètes à partir d'un échantillon du sol de Sétif (Algérie) dont une (appartenant au genre *Streptomyces*) possède une activité antimicrobienne intéressante.

La présence d'activités chez tous les actinomycètes isolés à partir de différents échantillons de sol de la sebkha de Kenadsa confirme que les actinomycètes isolés à partir des milieux extrêmes en un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des milieux naturels normaux (rhizosphère, eau douce, sol floristique...etc.) (**Gayathri & al, 2011**).

Les résultats de l'activité antimicrobienne indiquent que la plupart des isolats sont actifs sur les bactéries à Gram positifs (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis*) que sur les bactéries à Gram négatifs (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). Cela, peut-être attribué à la différence morphologique qui existe entre les deux types bactériens. En effet les bactéries de coloration de Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de natures lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (**Sateesh & al, 2011**).

Plusieurs chercheurs ont observé la résistance remarquable des bactéries à Gram négatifs par rapport à leurs homologues bactéries Gram positif (**Ullah & al, 2012**).

Cwala & al (2011) ont testés l'activité antimicrobienne de l'extrait brut de quatre espèces appartenant à trois genres d'actinomycètes. Les résultats trouvés indiquent que les

extraits sont plus actifs sur des bactéries de coloration de Gram positif que sur des bactéries de coloration de Gram négatif.

L'isolat Lam143cG3 a été sélectionné pour son pouvoir antimicrobien remarquable ainsi que par sa morphologie intéressante.

5. Choix du milieu optimal de production des substances à activité antibactérienne

Les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance, et varient avec la souche utilisée et le métabolite secondaire synthétisé.

Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et pendant la phase de production des métabolites secondaires, des milieux offrant un bon compromis ont dû être développés.

Dans cette optique nous avons testé cinq milieux préconisés pour la production des substances antimicrobiennes qui sont : ISP1 ; ISP2 ; PELG ; GEYA et Benette (**Annexe1**). Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau 6** et illustrés par **les figures 14 et 15**:

Tableau 6: Résultats de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis des souches testées, de l'isolat LAM143cG3 cultivé sur différents milieux de culture.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	Moyenne des zones d'inhibitions
GEYA	12.5	-	10.33	21.66	19	12	-	-	15.10
ISP2	11	-	12.66	21.66	19.66	11.66	-	-	15.33
ISP1	11	-	12	20	16.33	12.33	-	-	14.33
PELG	11	-	9.33	18.66	18.33	9	-	-	13.26
Bennet t	12.67	-	12.67	11.67	15	16	-	-	13.60

* : Le diamètre des zones d'inhibitions est exprimé en (mm).

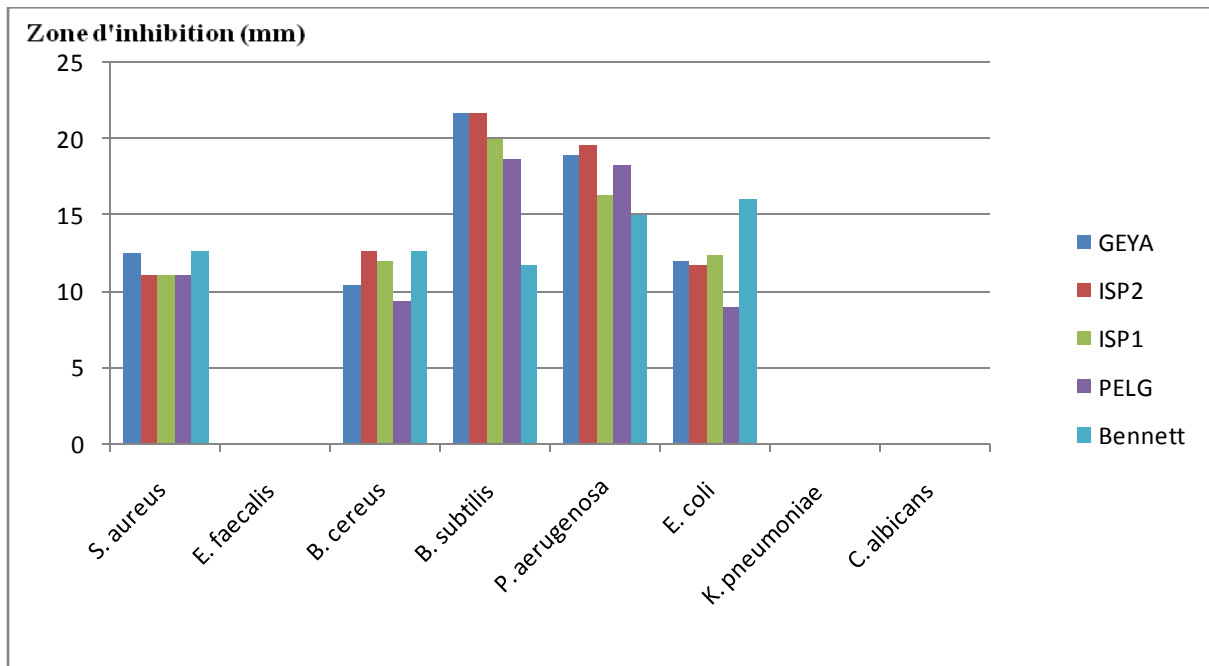


Figure 14: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 en fonction des souches tests utilisées.

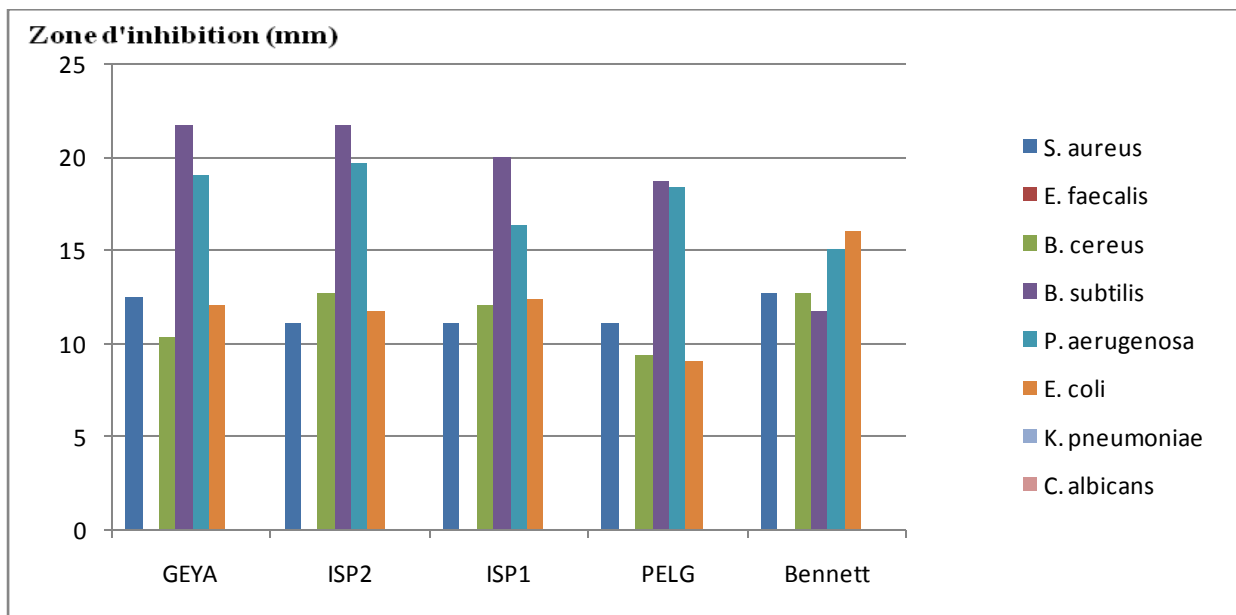
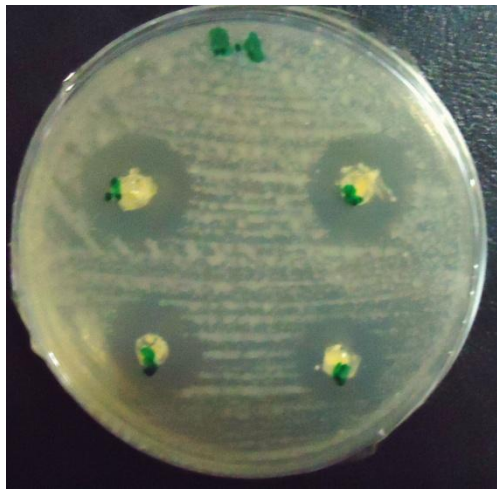


Figure 15: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 en fonction des milieux de cultures.



: *B. cereus*



S. aureus



P. aeruginosa



B. cereus.

Planche 3: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 sur des milieux de culture différents.

D'après les résultats des moyennes des zones d'inhibition présentés dans le **tableau 6**, on peut remarquer que le milieu ISP2 donne la plus grande moyenne des zones d'inhibition (15.33 mm), ce qui nous amène à retenir ce milieu pour la production des substances bioactives. Ces résultats s'accordent parfaitement avec les travaux de **Badji & al, 2005** et **Badji & al, 2006**.

Les résultats trouvés confirment que la composition des milieux de culture, en particulier la nature et la concentration des sources de carbone et de nitrogène, influent considérablement sur la quantité ainsi que la qualité des substances antimicrobiennes sécrétées par les actinomycètes (**Arasu & al, 2009 ; Song & al, 2012**).

Une faible modification de la composition du milieu de culture peut favoriser ou inhiber cette production. En effet **Kauffmann, 1962** indique qu'une production intense d'un

antibiotique par une souche d'actinomycète est observée sur un milieu renfermant de l'extrait de malt et 1 % de farine de soja. Cette production n'a pas lieu sur le même milieu avec 0.5 % de farine de soja, bien que la croissance de la souche soit identique sur les deux concentrations de farine de soja.

Ripa & al, 2009, ont indiqués que la production maximale des molécules antimicrobiennes par une nouvelle souche de *Streptomyce sp. RUPA-08PR*, est observée quand le milieu est supplémenté avec 2% de glucose.

En plus des facteurs nutritionnels, d'autres facteurs, influents sur la production des molécules antimicrobiennes, en particulier le pH, la température, et l'inoculum (**Muiru & al, 2007 ; Atta & al, 2010**).

6. Résultats d'activités antimicrobiennes sur le milieu liquide

Trois solvants de polarité croissante (butanol, chloroforme, acétate d'éthyle) ont été utilisés pour l'extraction des molécules bioactives à partir d'une culture de 14 jours de l'isolat LAM143cG3 dans le milieu ISP2 liquide. L'activité antimicrobienne des trois extraits organiques préparés est évaluée en utilisant la technique de disque de papier contre des bactéries testées. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau 7** et illustré dans la **figure 16**:

Tableau7 : Activité antimicrobienne des différents extraits organiques de l'isolat LAM143cG3 par la méthode de disque de papier

Souches tests	E. AC	E.B	E.C	E. Br
<i>S. aureus</i>	15	14,33	0	0
<i>B. cereus</i>	8	9	0	0
<i>B. subtilis</i>	16,33	15,33	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	15	12	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>B. stériorthermophilus</i>	30	25	0	27

E.AC : extrait d'acétate d'éthyle ; **E.B** : extrait butanolique ; **E.C** : extrait chloroformique ; **E.Br** : extrait brut.

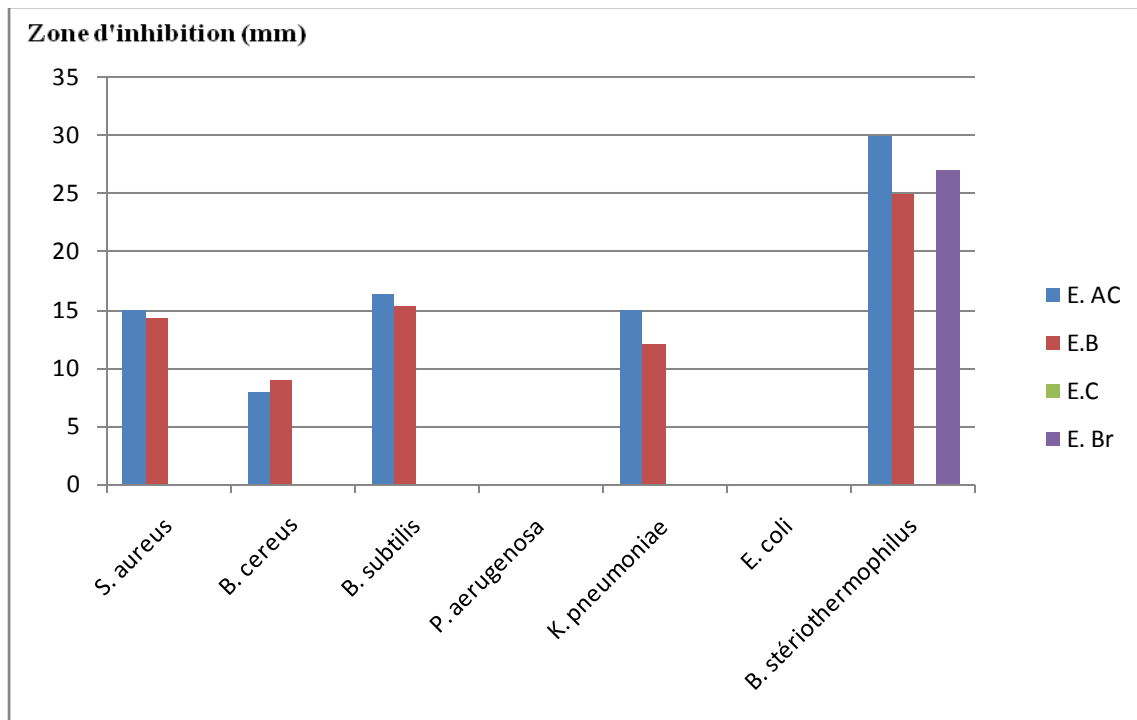
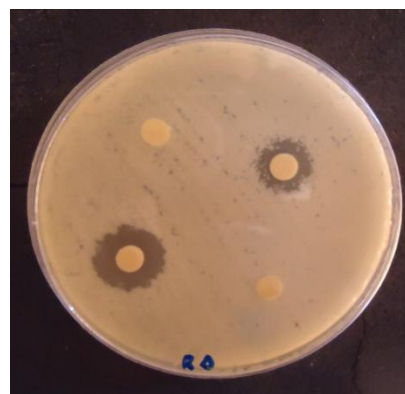


Figure 16 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis des différents extraits organiques de l'isolat LAM143cG3.

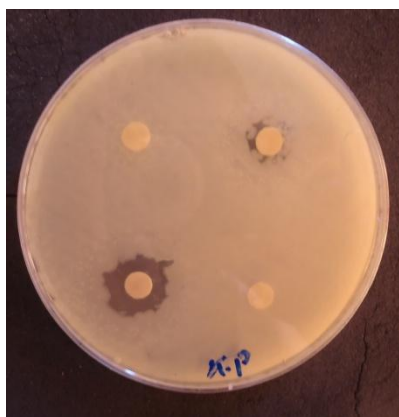
Les résultats indiquent que l'extrait chloroformique n'a pas montré d'activité contre les bactéries testées, tandis que l'extrait brut a été actif uniquement contre *B. stériorthermophilus*, alors que les extraits, acétate d'éthyle et butanolique sont actifs contre cinq bactéries testées dont quatre à Gram positifs (*S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. stériorthermophilus*) et une à Gram négatifs (*K. pneumoniae*) (**Planche4**).



S. aureus



B. subtilis



K. pneumoniae,



B. steriothermophilus.

Planche 4: Activité antimicrobienne de l'isolat LAM143cG3 sur milieu liquide.

La plus petite zone d'inhibition est obtenue par des disques imprégnés par l'extrait d'acétate d'éthyle contre la souche *B. cereus* (8 mm), tandis que la plus grande zone d'inhibition est obtenue par des disques imprégnés par le même extrait (acétate d'éthyle) contre la souche test (*B. stréiothermophilus*) (30 mm).

La moyenne des zones d'inhibition des deux extraits organiques (butanolique et d'acétate d'éthyle) contre les bactéries test utilisées est égale à 16.86 mm pour l'acétate d'éthyle et 15.13 mm pour l'extrait butanolique, donc on peut dire le premier extrait a permis l'extraction d'une quantité plus importante de molécules antimicrobiennes par rapport au deuxième.

Discussion

L'apparition de l'activité antibactérienne dans l'extrait d'acétate d'éthyle, qui est un solvant de polarité intermédiaire, et dans le butanol, qui est un solvant polaire, nous laisse supposer qu'il s'agit soit d'une ou de plusieurs molécules, chacune est solubles dans un solvant différents (butanol et acétate d'éthyle), ou bien d'une ou de plusieurs molécules

soluble dans des solvants variés. L'absence d'activité antimicrobienne apparente pour l'extrait chloroformique (solvant apolaire), peut-être expliqué soit par la faible concentration d'antibiotique extraite par le chloroforme qui est inférieur à la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les sept souches de références utilisées, ou bien parce que le chloroforme n'a pas permis l'extraction d'antibiotique à partir de surnageant de culture de l'isolat LAM143cG3, à cause probablement de la polarité des molécules sécrétés par notre isolat qui sont différentes que celle du chloroforme.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'acétate d'éthyle et le butanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction des substances bioactives produites par la souche LAM143cG3 dans le milieu liquide.

Par comparaison entre les résultats de l'activité antimicrobienne du premier screening (milieu solide) et le deuxième screening (milieu liquide) on remarque une différence dans la sensibilité des germes test vis-à-vis des substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3.

Plusieurs auteurs on remarquait que la production des antibiotiques ne se fait que sur les milieux solides et le passage au milieu liquide pose quelques problèmes, soit par l'arrêt de la synthèse des antibiotiques ou bien par une diminution de leur production (**Radhika & al, 2011 ; Sharma, & al, 2011 ; Singh & al, 2006**), ils expliquent cela soit par :

- la variation de la répartition des nutriments avec le temps de la fermentation alors que la distribution de ceci autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie que très peu (**Badji & al. 2005**),
- ou par la différence de la morphologie des actinomycètes lorsqu'ils évoluent respectivement dans le milieu liquide et solide (**Bushell. 1993**) ; Généralement la production des antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments de mycélium. En effet en milieu liquide et à cause de l'agitation, les filaments mycéliens se fragmentent, et les petits fragments se trouvent incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques (**Reghioua & al, 2008**), contrairement au milieu solide où la fragmentation de mycéliums peut être évitée ce qui favorise la production importante d'antibiotique (**Gurung & al, 2009**).

7. Caractérisation préliminaire de substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3

➤ Révélation chimique des substances produites par l'isolat LAM143cG 3 :

La caractérisation chimique des molécules bioactives sécrétées par l'isolat est faite par chromatographie sur couche mince, en utilisant deux systèmes de solvant : acétate d'éthyle-méthanol (AC-M), et éthano- ammoniaque- eau (Et-AM-E). Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 8** :

Tableau 8: Récapitulatif des résultats de la caractérisation chimique des substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3.

	Nature des produits révélés	Couleurs des spots	Système de solvant	
			AC-M	Et-AM-E
Ninhydrine	Groupement amine libre	Rose	Tache restée dans l'emplacement du dépôt.	0.73
Chlorure de fer ferrique	Groupement phénol	Grise à noire	0.93	0.73
Molish	Les sucres	Violet	-	-

AC-M : Acétate d'Ethyle-Méthanol. Et-AM-E : Ethano- Ammoniaque- Eau.

Deux taches obtenues pour le système de solvant (AC-M) (**Figure 17**), l'une migre rapidement et se caractérise par un $R_f = 0.93$, et l'autre reste dans l'emplacement du dépôt. La révélation chimique à donnée, pour la première tache, une réaction positive pour le chlorure de fer ferrique, et pour la deuxième la révélation était positive uniquement pour la ninhydrine, tandis que la révélation par le réactif de Molish était négative pour les deux taches.

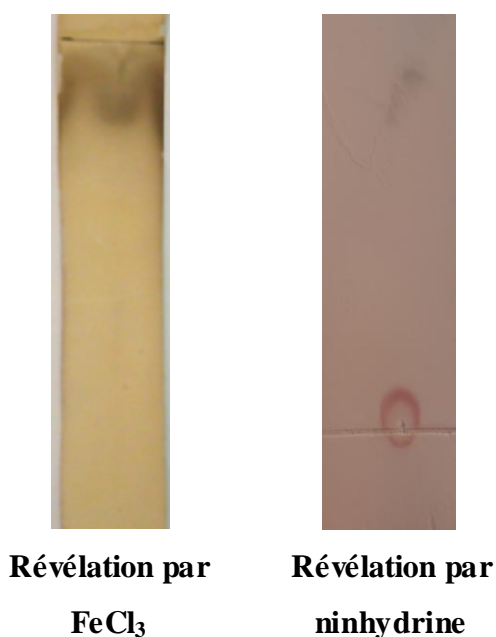


Figure 17: Résultat de révélation des taches obtenues par le système de solvant AC-M.

Une seule tache est obtenue par le système de solvant Et-AM-E (**Figure18**). Cette tache a une couleur brune à l'œil nu, bleu claire à 256 nm tandis qu'elle est sombre à 355 nm. Son rapport frontal est 0.73. Les testes des réactions chromogéniques sont positives pour la ninhydrine, et le chlorure de fer ferrique, tandis que la révélation était négative pour le réactif de Molish.

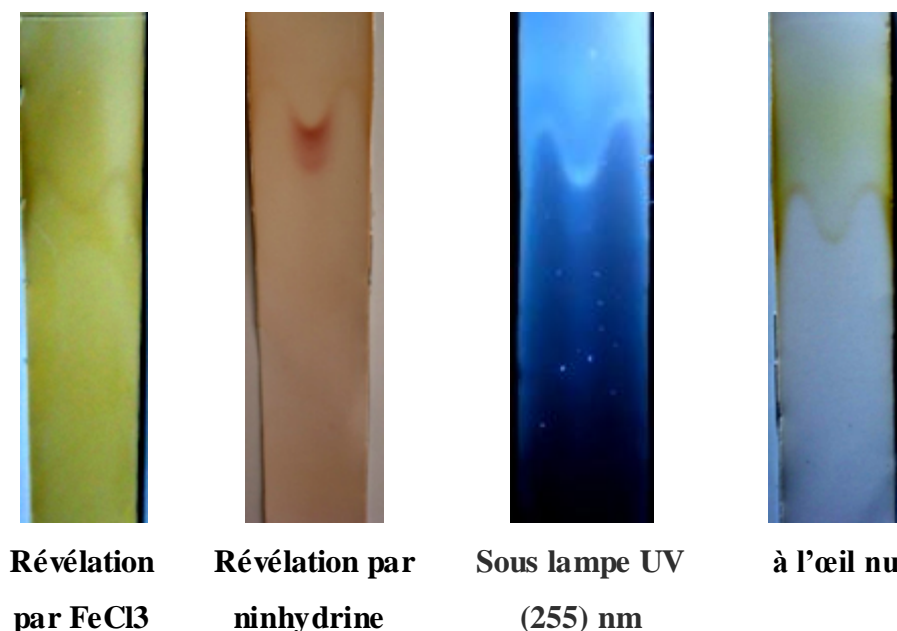


Figure 18: Résultat de révélation de la tache obtenue par le système de solvant Et-AM-E.

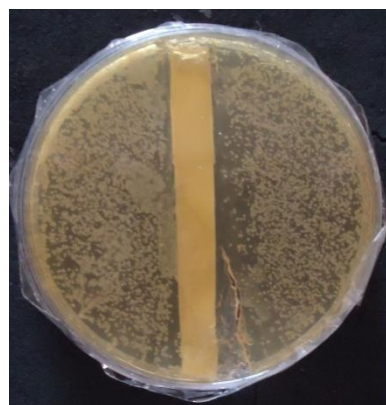
Les résultats de la révélation chimique, nous permettent de choisir le système Et-AM-E comme le meilleur système pour la séparation des molécules antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3.

➤ Révélation microbiologique

Les deux techniques utilisées pour la révélation microbiologique indiquent que la tache obtenue par le système de solvant Et-AM-E est active (**Figure 19**). En effet, la technique de disque, donne une zone d'inhibition de 15 mm contre la souche test *Bacillus streothermophilus*, tandis que par bio-autographie il y'a formation d'une zone claire autour de la tache.



Technique de disque



Bio-autographie

Figure 19 : Résultats de révélation microbiologique de la tache obtenue par le système de solvant (Et-AM-E) en utilisant la souche teste *Bacillus streothermophilus*.

D'après les résultats obtenus, on peut dire que l'isolat LAM143cG3 produit une seule molécule et/ou plusieurs molécules qui sont caractérisées par la présence des amines et phénols. En plus, les substances bioactives sécrétées par l'isolat LAM143cG3 ont un caractère polaire, puisqu'elles migrent dans des systèmes de solvants polaires : **Et-AM-E** et **AC-M**.

➤ Spectre UV-VISIBLE de l'extrait actif butanolique

L'intérêt d'étudier le spectre UV-VISIBLE, est de rechercher si notre isolat produit des antibiotiques de structures polynéniques ou non. En effet les antibiotiques d'origines microbiennes utilisés en clinique sont essentiellement de structures polyéniques (**Aparicio, 2005**), tel que l'amphotéricien B et la nystatine (**Grijalba & al, 2006 ; Silva & al, 2007**). Ces

substances ont plusieurs inconvénients: problème de solubilité et de toxicité, instabilité à la lumière, thèrmosensibilité (**Bastide & al, 1986 ; Lemriss & al, 2003**).

La figure 20 montre le spectre UV-VISIBLE de l'extrait butanolique récupéré à partir d'une culture de 14 jours de l'isolat LAM43cG3 dans le milieu ISP2 liquide.

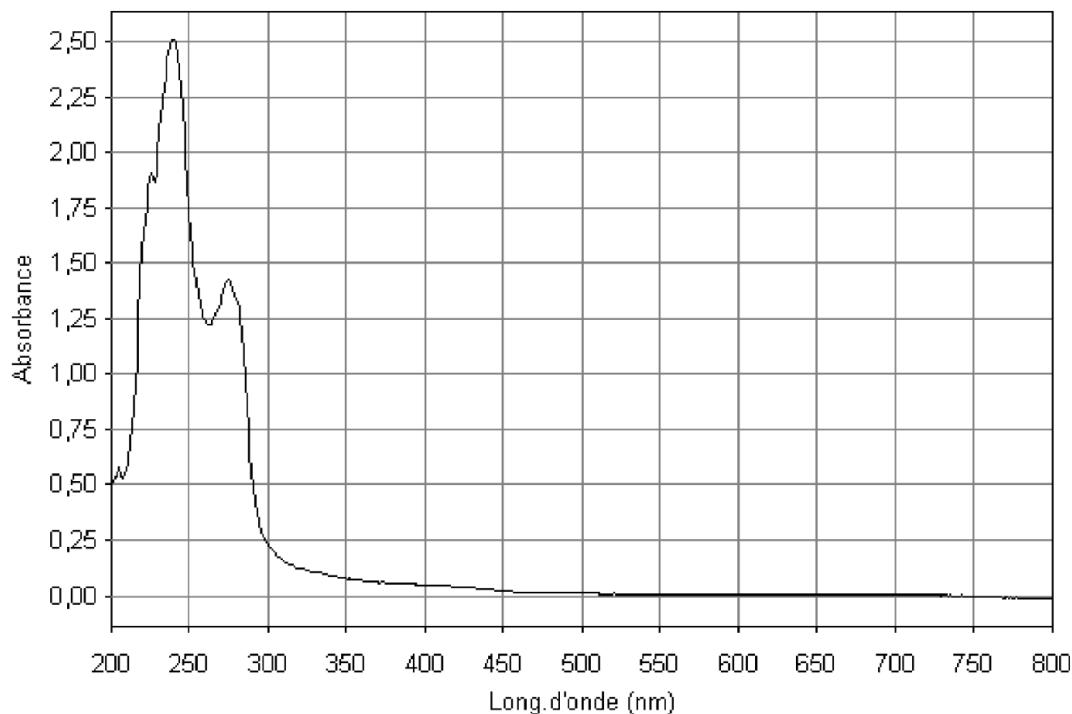


Figure20 : Spectre UV-VISIBL de l'extrait butanolique de l'isolat LAM143cG3.

D'après le spectre, le maximum d'absorption pour l'extrait butanolique de l'isolat LAM143cG3 est obtenu à 240 nm et à 276 nm. Selon **Lindenfelser & al (1964)**, les antibiotiques de structures polyéniques se caractérisent par trois pics d'absorptions entre (260 et 405) nm (**tableau9**) :

Tableau 9: Spectre d'absorption des antibiotiques de structures polyéniques (Lindenfelser & al, 1964)

Structure des antibiotiques	Absorption maximal
Tétraènes	290 à 291, 303 à 306, et 318 à 320.
Pentaènes	318 à 324, 333 à 338, et 346 à 358.
Héxaènes	339 à 341, 356 à 358, 377 à 380.
Héptaènes	358 à 365, 376 à 380, 399 à 405.

Par comparaison entre le spectre de notre isolat, et ceux des antibiotiques polyéniques, nous pouvons conclure que notre isolat ne produit pas d'antibiotiques polyéniques.

➤ Résultat d'analyses par Infrarouge

Dans la portion du spectre qui se situe entre 4000 et 1300 cm^{-1} se trouve les fréquences d'élongations caractéristiques des groupements fonctionnels importants (OH, NH et CO) (Silverstein et al. 2007).

La **figure 21** montre le spectre infrarouge de l'extrait butanolique de l'isolat LAM43cG3 :

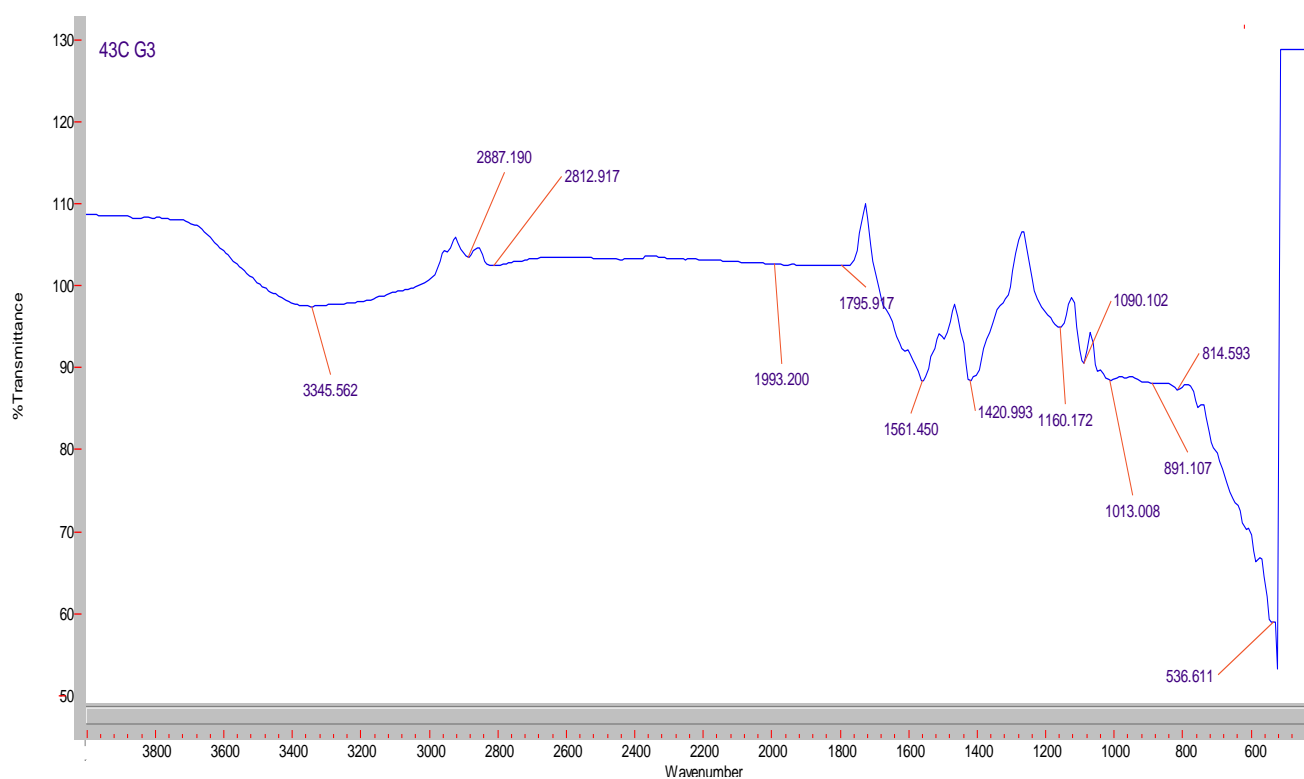


Figure 21: Spectre infrarouge de l'extrait butanolique de l'isolat LAM143cG3.

La qualité du spectre obtenu est loin de donner une image exacte des fonctions vues l'interférence du butanol. Cependant, on peut voir une bande moyenne à 3345.562 cm^{-1} qui correspondent aux amines secondaires (NH) qui sont caractérisés par une large bande d'intensité moyenne entre $(3250-3400)\text{ cm}^{-1}$. La fonction amine est confirmée par la bande 1561 cm^{-1} .

8. Identification de l'isolat LAM143cG3

8.1 Etude chimio-taxonomique

Les résultats de la révélation des sucres et des acides aminés de l'isolat LAM143cG3 par la chromatographie ascendante sont résumés dans le **tableau 10** :

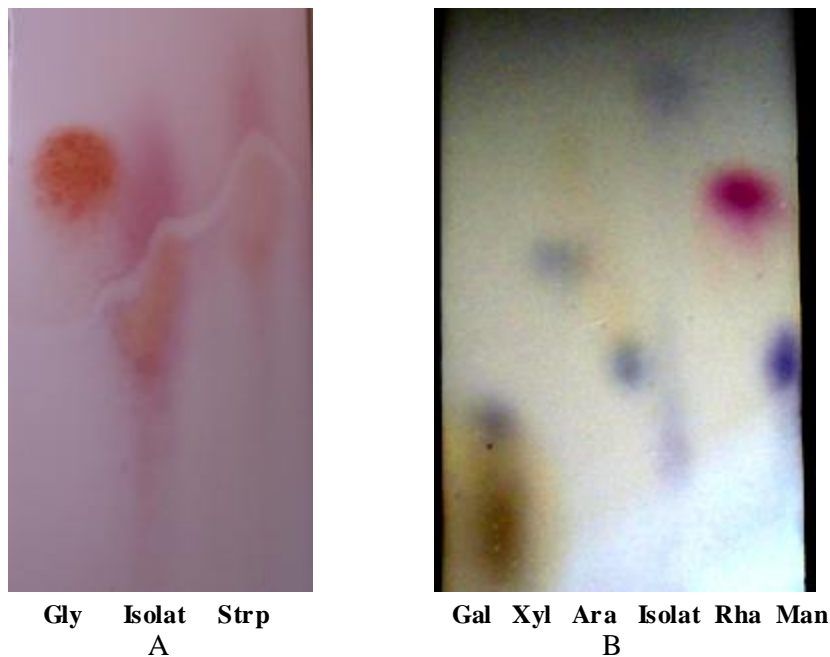
Tableau 10 : Caractéristiques chimio-taxonomiques de l'isolat LAM143cG3

Caractéristiques	L'isolat LAM143cG3
Méso- DAP	+
LL-DAP	-
Glycine	-
Galactose	-
Arabinose	-
Xylose	-
Madurose	-
Glucose	+
Rhamnose	-
Mannose	-

+ : présence ; - : absence.

- La révélation des acides aminés, indique que l'isolat LAM143cG3 se caractérise par la présence de la forme méso de l'acide aminé DAP, tandis que la glycine est absente (**Figure22**).
- La révélation des sucres indique la présence de deux taches l'une en bas, qui correspond au glucose, et l'autre en haut, qui ne correspond à aucun sucre rencontré dans la paroi des actinomycètes, tel que : Rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, madurose et ribose (**Figure22**).

La présence de la forme méso-DAP et l'absence des sucres caractéristiques, nous permet de classer notre isolat avec la paroi de type III, d'après la classification de **Lechevalier et Lechevalier, 1970** (voire **tableau1** page 12 de la partie bibliographique).



Gly : glycine ; **Strp** : *SpteptomycetesLAM1001*; **Gal** : galactose ; **Xyl** : xylose ; **Ara** : arabinose; **Rha**: rhamnose; **Man**: mannose ; **Isolat**: LAM143cG3

Figure 22: Caractérisation chimio-taxonomique de l'isolat LAM143cG3 ; A : acides aminés ; B : sucres.

8.2 Etude morphologiques

La **figure 23** montre l'aspect microscopique de l'isolat LAM143cG3 :

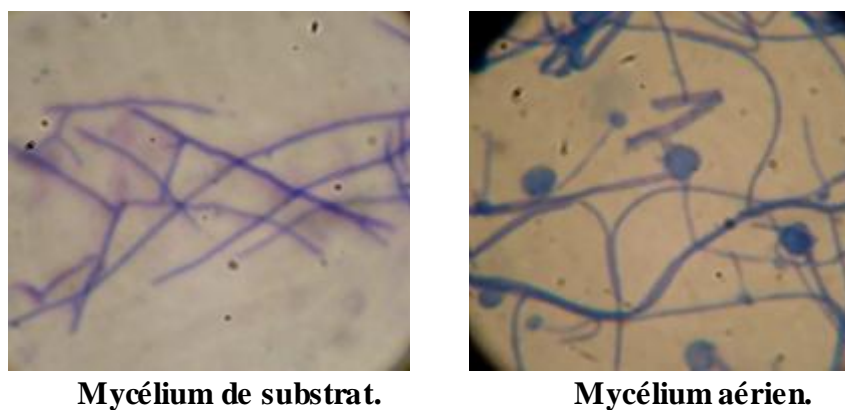


Figure 23 : Observation microscopique de l'isolat LAM143cG3 (X100).

L'aspect microscopique de l'isolat LAM143cG3 se caractérise par un mycélium de substrat non fragmenté et stérile, le mycélium aérien est stable et qui porte des sporanges globuleux renfermant des spores arrangées en spirale. Les spores sont mobiles et ont une forme en bâtonnets droits, incurvés ou légèrement spiralés.

Discussion

Selon la dernière édition de **Bergy's manuel of systématique (2^oédition-5^oVolume ; 2012)**, les actinomycètes ayant des parois de type III peuvent appartenir aux genres suivants : *Actinomadura* ; *Acrocarpospora* ; *Herbidospora* ; *Nonomuraea* ; *Sphaerisporangium* ; *Microbispora* ; *Microtetraspora* ; *Planomonospora* ; *Planobispora* ; *Spirillospora* ; *Streptosporangium* ; *Actinosynnema* ; *Frankia*,, *Geodermatophilus* ; *Nocardiopsis* ; *Streptoalloteichus* ; *Thermoactinomyces* (**Yoon & Park, 2006. Kroppenstedt & Evtushenko, 2006. Labeda, 2006**).

L'isolat LAM143cG3 se caractérise par la formation des sporanges portés par le mycélium aérien, ce qui nous a permis d'exclure les genres (*Actinomadura*, *Actinosynnema*, *Frankia*, *Geodermatophilus*, *Thermoactinomyces*, *Nonomuraea* ; *Herbidospora* ; *Acrocarpospora*, *Microbispora* *Microtetraspora*, *Nocardiopsis*), car ils ne renferment pas de sporanges.

Le nombre de spores inclus dans les sporanges de l'isolat LAM143cG3 est nettement supérieur à quatre spores, ce qui nous permet d'exclure les genres suivants :

- Le genre *Planomonospora*, est caractérisé par une seule spore (**Mertz, 1994**).
- Le genre *Planobispora*, est caractérisé par deux spores (**Ngaemthao, 2013**).
- Le genre *Planotetraspora* est caractérisé par quatre spores (**Suriyachadkun & al, 2010**).

Selon la description des genres donnés dans la deuxième édition de **Bergy's manuel of systématique (volume 5. 2012)**, notre isolat peut appartenir aux genres suivants : *Spirillospora*, *Streptosporangium* ou à *Sphaerisporangium*.

La différence entre les genres (*Spirillospora* ; *Streptosporangium* et *Sphaerisporangium*) se fait par la mobilité des spores. En effet le premier se caractérise par des spores mobiles tandis que les deux derniers libèrent des spores immobiles (**Zhang & al, 2011**), et d'après la description morphologique de notre isolat (spores mobiles en forme de bâtonnets ou incurvées), le genre le plus proche c'est *Spirillospora*.

Le genre *Spirillospora* se caractérise par la présence du madurose dans leur paroi. Cependant l'étude chimio-taxonomique de notre isolat indique l'absence totale des sucres

caractéristiques. Pour expliquer l'absence du madurose dans la paroi de notre isolat nous avons évoqué deux hypothèses :

- Nous sommes en présence d'un cas à part dans le genre *Spirillospora* qui se caractérise par l'absence du madurose comme sucres caractéristiques. En effet le manque du madurose peut être expliqué par la température optimale requise par notre isolat (42-45) °C et qui peut inhiber la synthèse du madurose, cette remarque a été déjà faite pour le genre *Actinomadura* qui se caractérise par la présence du madurose dans leur paroi mais chez les espèces thermophiliques le madurose existe en état de trace (**Kroppenstedt & Goodfellow, 2006**).
- Ou bien nous sommes en présence d'un nouveau genre.

8.3 Caractères cultureux

Après ensemencement sur différents milieux de cultures, les caractères cultureux de l'isolat LAM143cG3 sont notés (croissance, couleur de mycélium aérien et de substrat, et production des pigments mélanoïde ainsi que les pigments diffusibles). Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 11** :

Tableau 11: Caractères cultureux de l'isolat LAM143cG3 sur les différents ISP

	Couleur MA	Couleur MS	Croissance	Pigments
ISP2	Blanc	Jaune impérial	Abondante	-
ISP3	Blanc	Blanc cassé	Abondante	-
ISP4	Blanc	Jaune citron	Abondante	-
ISP5	Blanc	Incolore	Faible	-
ISP6	Blanc	Jaune cobalt	Abondante	-
ISP7	Blanc	Incolore	Faible	-

MA: Mycélium aérien; **MS:** Mycélium de substrat ; - : Pas de production.

Sur les milieux (ISP2, ISP3, ISP4 et ISP6) la croissance est abondante avec formation d'un mycélium de substrat surmonté d'un mycélium aérien, alors que sur les milieux ISP5 et ISP7, seul le mycélium de substrat est formé. Les pigments mélanoïde ainsi que les pigments solubles ne sont pas produits.

8.4 Caractères physiologiques et biochimiques

➤ Tolérance au chlorure de sodium

Le **tableau 12** présente les résultats de la croissance de l'isolat LAM143cG3 sur différentes concentrations de NaCl.

Tableau 12 : Croissance de l'isolat LAM143cG3 sur le milieu Bennett à différentes concentrations de NaCl

% NaCl	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17
Croissance	+	+	++	+++	++	+	+/-	-

- : pas de croissance ; +/- : croissance faible ; + : croissance moyenne ; ++ : bonne croissance ; +++ : très bonne croissance.

L'isolat LAM143cG3 tolère jusqu'à la concentration de 15% en NaCl, l'optimum de croissance est observé à la concentration de 7.5% (P/V).

Une croissance est observée à la concentration de 0% après une durée prolongée d'incubation. Selon les définitions données dans la partie bibliographique on peut dire que notre isolat est halotolérant.

Il faut noter qu'une production des pigments solubles de couleurs jaunes est observée uniquement à la concentration de 15%.

➤ Croissance à différente température

Le **tableau 13** présente les résultats de la croissance de l'isolat LAM143cG3 à différentes températures :

Tableau 13: Croissance de l'isolat LAM143cG3 à différentes températures

Température	20	30	35	40	45	50	55
Croissance	-	++	++	+++	+++	++	-

- : pas de croissance ; ++ : croissance moyenne ; +++ : bonne croissance ;

La température optimale de croissance de l'isolat LAM143cG3 est observée dans l'intervalle 40-45 °C.

➤ **Utilisation des différentes sources de carbones**

Les résultats de la croissance de l'isolat LAM143cG sur le milieu ISP9 contenant différents sources de carbone sont représentés sur le **tableau14** :

Tableau 14: Utilisation des différentes sources de carbones par l'isolat LAM143cG3

Sources de carbones	Croissances
Fructose	++
Arabinose	++
Xylose	+
Lactose	++
Glucose	+++
Saccharose	++
Rhamnose	++
Galactose	++
Mannitol	++
Cellebiose	++
Maltose	+++

+ : croissance faible ; ++ : croissance moyenne ; +++ : bonne croissance ;

L'isolat LAM143cG3 utilise les différentes sources de carbone étudiées. En effet la croissance est bonne pour le glucose (témoins positifs) et le maltose, tandis qu'elle est moyenne pour les autres sources de carbone sauf pour le xylose où la croissance est faible.

8.6 Comparaison entre la souche LAM143cG3 et les espèces du genre *Spirillospora*

On part du point de vue que notre isolat appartient au genre *Spirillospora*, la comparaison entre les caractères de la souche LAM143cG3 et les espèces du genre suspect *Spirillospora* sont représentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15: Comparaison des caractères chimio-taxonomiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques de notre isolat LAM143cG3 avec les espèces du genre *Spirillospora*.

Caractéristiques	Isolat LAM143cG3	<i>Spirillospora albida</i>	<i>Spirillospora rubra</i>
Chimio-taxonomique			
LL-DAP	-	-	-
Méso-DAP	+	+	+
Glycine	-	-	-
Galactose	-	-	-
Xylose	-	-	-
Glucose	+	-	-
Arabinose	-	-	-
Madurose	-	+	+
Acide mycolique	-	-	-
Morphologie			
Mycélium aérien	Stable	Stable	Généralement non produit
Mycélium de substrat	Non fragmenté	Non fragmenté	Non fragmenté
Sporanges	Globuleux	Globuleux à légèrement allongés	Globuleux
Forme des spores	Bâtonnet droit ou incurvé	Bâtonnet droit ou incurvé	Bâtonnet droit ou incurvé
Mobilité des spores	+	+	+
Tolérance en NaCl	15%	2.5%	2.5%
Température optimale de croissance	42°C	30°C	30°C
Croissance sur différente source de carbone			
Fructose	+	+	ND
Arabinose	+	+	ND
Xylose	+	-	ND
Lactose	+	-	ND
Glucose	+	+	
Saccharose	+	+	ND
Rhamnose	+	-	ND
Galactose	+	-	ND
Mannitol	+	+	ND
Cellebiose	+		
Maltose	+		
Couleur de mycélium aérien	Blanc	Blanc	Blanc
Couleur de mycélium de substrat			
ISP2	Jaune impérial	Beige	
ISP3	Blanc casé	Beige	Rouge à rouge marron
ISP4	Jaune citron	Beige	
ISP5	Incolore	Beige	
Production des pigments mélanoides et les pigments solubles			
ISP6	-	-	-
ISP7	-	-	-

+ : Présence ; - : Absence; ND : Non déterminé.

Selon la deuxième édition de **Bergey's manuel of systématique, 2012**, le genre *Spirillospora* est représenté par deux espèces qui sont *S. albida* et *S. rubra*, la comparaison entre les espèces de ce genre et notre isolat, indique l'existence de plusieurs différences. En effet pour les caractères physiologiques, notre isolat tolère jusqu'à 15% en NaCl et a une température optimale de croissance entre 42-45 C° tandis que les espèces *S. albida* et *S. rubra* tolèrent 2.5% de NaCl et ont une température de croissance optimal à 30°C (**Kroppenstedt & Evtushenko, 2006**).

Les caractères biochimiques indiquent que l'isolat LAM143cG3 montre une croissance sur les différentes sources de carbone utilisées, alors que l'espèce *S. rubra* n'utilise pas le xylose, le lactose, le galactose et le rhamnose (**Kroppenstedt & Evtushenko, 2006**).

Les caractères cultureux suggèrent que notre isolat à un mycélium aérien blanc, tandis que le mycélium de substrat est jaune impérial sur le ISP2, blanc cassé sur ISP3, jaune citron sur ISP4 et incolore sur ISP5, par contre le mycélium de substrat des deux espèces (*S. alba*, *S. rubra*) est beige pour la première et rouge marron pour la deuxième.

D'après les résultats de la comparaison entre les espèces du genre *Spirillospora* et l'isolat LAM143cG3 représentés dans le **tableau 15**, nous remarquons l'existence de différences considérables entre notre isolat et les espèces du genre *Spirillospora* donc nous pouvons dire que notre isolat peut être un nouveau membre de ce genre. Ces résultats doivent être confirmés ultérieurement par un séquençage de ARN 16s.

☞ Conclusion ☞

L'accroissement incontrôlable de la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques, ne cesse d'augmenter, et la recherche de nouvelles molécules d'antibiotiques, devient une nécessité. Par contre, la chance pour l'isolement des nouvelles souches d'actinomycètes qui fourniront de nouveaux antibiotiques à partir des environnements ordinaires, tel que les rhizosphères, sol des forêts ; rivière...etc., est très faible, donc le recours aux environnements extrêmes inexploités, comme le sol de sebkha, devient une nécessité.

C'est dans cette optique, que l'objectif principal de ce travail, est la recherche des actinomycètes dits rares, présent en faibles quantités dans la nature, afin de mettre en évidence leurs activités antimicrobiennes, et sélectionner le meilleur isolat pour être identifié et étudier leurs substances antimicrobiennes sécrétées. Pour atteindre ce but nous avons divisé le travail en trois parties :

1. Les analyses physico-chimiques effectuées sur les dix échantillons du sol prélevés à partir de la sebkha de Kenadsa, indiquent que l'échantillon 4 est le meilleur pour l'isolement des actinomycètes grâce à son pH alcalin, et son taux de matière organique moyen. En effet 15 isolats, parmi les 18 isolés, ont été récupérés à partir de cet échantillon. Ce nombre plus ou moins faible d'actinomycètes isolés (18 isolats) peut s'expliquer par la période d'échantillonnage qui a été effectué pendant une saison pluvieuse (mois de Février 2012).

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement des actinomycètes, le milieu caséine amidon agar, qui s'est avéré efficace, pour la récupération des actinomycètes à partir des milieux extrêmes, grâce à sa composition, à base d'amidon et de caséine, qui sélectionne les actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries.

La technique de culture sur lamelle, nous a permis de mettre en évidence la diversité morphologique des 18 isolats d'actinomycètes isolés. Sur ces isolats ont retrouvé trois types de structures :

- Des isolats formants des sporanges
- Des isolats caractérisés par la présence de vésicules
- Des isolats Formant des chaînes de spores de longueur moyenne et importante.

Toutes ces structures sont des caractéristiques des genres rares d'actinomycètes selon la description de **Bergy's manuel of systématique (2012)**.

L'activité antimicrobienne indique que tous les isolats ont montré une activité antimicrobienne envers les microorganismes tests utilisés.

Nous avons sélectionné l'isolat LAM143cG3 pour son activité antimicrobienne intéressante pour le reste du travail.

2. L'optimisation de la sécrétion des substances antimicrobiennes par l'isolat LAM143cG3, indique que le meilleur milieu qui fournit les éléments nutritifs nécessaires pour la production des substances bioactives en quantités est le milieu ISP2 solide.

L'activité antimicrobienne sur le milieu ISP2 liquide indique qu'il n'influe pas sur la sécrétion des substances antimicrobiennes par l'isolat LAM143cG3, contrairement à ce que la bibliographie indique.

Le n-butanol et l'acétate d'éthyle étant les meilleurs solvants pour extraire des molécules bioactives à partir d'une culture de 14 jours de l'isolat LAM143cG3 dans le milieu ISP2 liquide. La caractérisation primaire des substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3 indique la présence de deux taches dans le système de solvant (acétate d'éthyle-méthanol), l'une migre rapidement et se caractérise par un $R_f = 0.93$, et l'autre reste dans l'emplacement du dépôt, tandis qu'une seule tache active est obtenue dans le système de solvant éthanol- ammoniac- eau, son rapport frontal est 0.73. L'activité de cette tache est confirmée par bio-autographie contre la souche de référence *Bacillus stréothermophilus*. Les réactions des tests chromogéniques suggèrent la présence d'un groupement amine, phénol. L'étude spectrale par UV-VISIBLE des molécules bioactives, indique que l'isolat LAM143cG3 ne produit pas d'antibiotiques polyéniques, alors que le spectre infrarouge à confirmer la présence du groupement amine.

3. L'étude chimio-taxonomique de l'isolat LAM143cG3 indiquent l'existence de la forme méso de l'acide aminé DAP, tandis que la glycine est absente. La révélation des sucres indique la présence de deux taches l'une en bas, qui correspond au glucose, et l'autre en haut, qui ne correspond à aucun sucre rencontré dans la paroi des actinomycètes, tel que : Rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, maduros et ribose. La présence de la forme méso-DAP et l'absence des sucres caractéristiques, nous a permis de classer notre isolat avec la paroi de type III, d'après la classification de **Lechevalier et Lechevalier, 1970**. L'aspect microscopique de l'isolat LAM143cG3 se caractérise par un mycélium de substrat non fragmenté et stérile, le mycélium aérien est stable et porte des sporanges globuleux renfermant des spores arrangées en spirale. Les spores sont mobiles et ils ont une forme en bâtonnets droits, incurvés ou légèrement spiralés. Sur la

base des critères morphologiques et chimio-taxonomiques, nous avons rapproché notre isolat au genre *Spirillospora*, et on a évoqué deux hypothèses pour expliquer l'absence de madurose dans la paroi de notre isolat, la première est l'effet de température de croissance optimale requise par notre isolat, (42-45) °C, et qui exerce un effet inhibiteur vis-à-vis de synthèse de la madurose, ou bien nous sommes en présence d'un nouveau genre.

Pour poursuivre l'identification de notre isolat, on est parti du point de vue que notre isolat appartient au genre *Spirillospora*, et on a comparé les deux espèces de ce genre (*S. albida* et *S. rubra*) avec notre isolat. Les résultats suggèrent l'existence de différences considérables, donc nous pouvons dire que notre isolat peut être un nouveau membre de ce genre. Ces résultats doivent être confirmés ultérieurement par un séquençage d'ADN 16s.

Les principales perspectives de ce travail :

- Poursuivre l'identification moléculaire de l'isolat LAM143cG3, et confirmer leur apparenté phylogénique.
- Tester l'activité antifongique de l'isolat LAM143cG3, afin de profiter des molécules de nature non polyénique sécrétées par cet isolat.
- Compléter l'étude des molécules antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3 par d'autres techniques, afin d'élucider leurs structures chimiques exactes (HPLC, spectre de masse, RMN).
- Optimiser la synthèse des molécules bioactives sécrétées par l'isolat LAM143cG3 vis-à-vis de la température, du pH, et l'agitation ainsi que les différentes sources nutritionnelles.
- Etudier la stabilité des antibiotiques sécrétés envers la température et la lumière.
- Tester *in vivo*, la toxicité des antibiotiques sécrétés sur des rats.

Références bibliographiques



1. Adegboye. M. F & Babalola. O. O. 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. African Journal of Agricultural Research. Vol 7. N° 15. Pp: 2255-2261.
2. Alauzet. C. 2009. Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification a la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse doc : université Nancy. Pp : 348.
3. Ameer. H & Ghoul. M & al. 2012. Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in *Streptomyces* sp. SF5. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Vol 3(3). Pp :545-551.
4. Almaris N. Alonso. 2007. Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytique actinomycetes *Thermobifida fusca*. UMI. Pp: 134.
5. Aparicio. J. F. 2005. Generating Novel Polyene Antifungal Drugs. Chemistry & Biology, Vol: 12. Pp: 509-510.
6. Ara. I, Bukhari. N. A, Wijayanti. D. R. & Bakir. M. A. 2012. M. A. Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. African Journal of Biotechnology. Vol. 11(16). Pp: 3849-3857.
7. Arasu. M. V, Duraipandiyam. V, Agastian. P, Ignacimuthu. S. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Médicale. Vol: 19. N° 1. Pp: 22-28.
8. Arifuzzaman. M, Khatun. M. R and Rahman. H. 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activeity. African Journal of Biotechnology Vol: 9. N° 29. Pp: 4615-4619.
9. Arshad I. U. M, Chuadhry M. J. I, Noureen. U, Jadoon. W. A, Jadoon. M. A. 2012. Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. Rec. Zool. Surv. Pakistan. Vol 21. Pp: 10-13.
10. Atta. H. M. Bayoumi R. El-Sehrawi. M, Aboshady. A and Al-Humiany. A. 2010. Biotechnological Application for Producing Some Antimicrobial Agents by Actinomycetes Isolates from Al-khurmah Governorate. European Journal of Applied Sciences. Vol: 2. N°: 3. Pp: 98-107.
11. Avril, J, L., & al. 1992. Bactériologie clinique. 2 éd. Paris : ellipses. Pp. 511.

12. Ayari. A, Morakchi. H & Gacemi.K. D. 2012. Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. African Journal of Biotechnology Vol: 11. N°: 2. Pp 305-311.

B

13. Badji, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi, and N. Sabaou. 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. Can. J. Microbiol. Vol 52. Pp : 373–382.
14. Badji. B , Riba. A , Mathieu. F , Lebrihi. A , Sabaou. N. 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale. Vol 15. Pp : 211–219.
15. Badji. B, Mostefaoui. A, Sabaou. N & Mathieu. F. Lebrihi. A. 2011. Identification of a new strain of *Actinomadura* isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. African Journal of Biotechnology. Vol 10. N° 63. Pp: 13878-13886.
16. Barreto, T, R. & al. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of theobroma cacao. Brazilian Journal of Microbiology. Vol: 39.N: °3. Pp. 464-465.
17. Baskaran, R. Vijayakumar, R. & Mohan, P. M. 2011. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 7. N°1. Pp. 26-32.
18. Bastide. A, de Méo. M, Andriantsoa. M, Laget. M, Duménil. G. 1986. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology. Vol 12, N° 4. Pp: 453-466
19. Beckers.h. J. A. Van Der Hoeven. J. S. 1982. Growth Rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* During Early Colonization of Tooth Surfaces in Gnotobiotic Rats. Infection and immunity. Vol. 35. N°. 2. Pp: 583-587.
20. Becker. B, Lechevalier. M. P, Gordon. R. E & Lechevalier. H. A. 1964. Rapid Differentiation Between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole-Cell Hydrolysates. Applied microbiology. Vol 12, N ° 5. Pp: 421-423.
21. Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58. Pp: 1-26.
22. Boone. C. J & Pine. 1968. L. Rapid method for characterization of actinomycetes by cell wall composition. Applied microbiology. Vol. 16, No. 2. Pp: 279-284.

23. Betina, V., 1973. Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.* Vol: 78. Pp : 41–51.
24. Boudemagh. A. 2007. Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse doc en microbiologie appliquée: Université Mentouri Constantine. Pp : 144.
25. Boudemagh. A; Kitouni. M; Boughachiche. F; Hamdiken. H; Oulmi. L; Reghioua. S; Zerizer. H; Couble. A; Mouniee. D ; Boulahrouf.D ; 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.* Vol : 15. Pp: 39–44.
26. Boudjella. H. Boutia. K, Zitounia. A. Mathieu. F, Lebrihi. A, Sabaou. N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *International Journal of Systematic Bacteriology.* Pp:1-11.
27. Boughachiche. F, Reghioua. S, Oulmi. I, Zerizer. H, Kitouni. M, Boudemagh. A, Boulahrouf. A. 2005. Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkha de Ain Mlila. *Sciences & Technologie.* N :23. Pp : 5-10.
28. Boughachiche. F. 2012. Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkha. Thèse doc : Université Mentouri-Constantine. Pp : 150.
29. Boussaber. E , Kadmiri. I. M , Hilal. L. 2012. Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques. *Science Lib Editions Mersenne: Vol. 4.* Pp : 2111-4706.
30. Boussaber. E, Kadmiri. I. M, Hilali. L, Hilali. A. 2012. Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *ScienceLib Editions Mersenne. Vol 4. N ° 121203.* Pp : 1-21
31. Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. 1989. Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In "Biotechnologie des Antibiotiques". Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson : Paris. Pp: 33-70.
32. Bushell, M.E. 1993. A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering.* Vol: 76. N°:2. Pp: 89-93.
33. Briand. Y. M. 2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. *L'Harmattan : Paris.* Pp : 360.

C

34. Cox.P. W, Paul. G. C & Thomas. C. R. 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*. Vol 144. Pp: 817–827.
35. Cwala Z., Igbinosa E. O. and Okoh A. I. 2011. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol. 5. N°: 2. Pp118-124.

D

36. Denis. D. 2007. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Elsevier Masson : Paris. Pp : 573.
37. Dgigal. D. 2003. Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp : 157.

E

38. El-Mehalawy, A. & al. 2004. Influence of Maize Root Colonization by the Rhizosphere Actinomycetes and Yeast Fungi on Plant Growth and on the Biological Control of Late Wilt Disease. *International journal of agriculture and biology*. Vol 6. N°:4. Pp: 599–605.
39. El-Nakeeb, M., Lechevalier, H. 1963. Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl Microbiol*. Vol: 11. N°:2. Pp. 75-77.

F

40. Falkow. S, Rosenberg. E, Schleifer. K. H, Stackebrandt. E. 2006. *The Prokaryotes*: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer. Pp: 1146.
41. Fan. L, Zheng J, Yang. X. 2010. The effect of natural air-dry time on actinomycetes Isolation from sample soil. *Journal of Hainan Medical University*.

G

42. Galinski. E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*. Vol: 37. Pp: 273–328.
43. Gayathri A; Madhanraj P; and Panneerselvam A. 2011. Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. *Asian J. Pharm. Tech*. Vol: 1. N° 3. Pp: 79-81.

44. George. M, George. G and Hatha. M. A. A. 2010. Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences. Vol:28. Pp: 52-57.
45. Getha K., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A., Goodfellow M. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Vol:32. Pp: 24-32.
46. Goodfellow. M & Quintana. E. T. 2006. The Family *Streptosporangiaceae* In: Prokaryotes. Springer: New York. III edition. Pp:725–753.
47. Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of Actinomycetes. Ann Rev Microbiol. Vol: 37. Pp: 189-216.
48. Grijalba. M. T; Chéron. M; Borowski. E; Bolard. J; Schreier. S. 2006. Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. Biochimica et Biophysica Acta. Vol: 1760. Pp:973–979.
49. Guiraud, J, P. 2003. Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod. Pp. 696.
50. Gulve. R.M & Deshmukh. A.M. 2012. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. International Multidisciplinary Research Journal. Vol: 2. N°: 3. Pp: 16-22.
51. Gurung. T. D. Sherpa. C. Agrawal. V. P. & Lekhak.. B. 2009. Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology. Vol 10. Pp:173-182.

H

52. Hasegawa. T, Takizawa. M, & Tanida. S. 1983. Arapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J. Gen. Appl. Microbiol. Vol: 29. Pp: 319-322.
53. Hayakawa. M. 2008. Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. The Society for Actinomycetes Japan. Vol: 22. N°: 1. Pp: 12-19.
54. Hayakawa, M., Ishizawa, K., and Nonomura, H. 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. J. Ferment. Technol. Vol: 66. Pp: 367–373.
55. Hawker. L.E. & Linton A.H. 1971. Mico-organismes. Pp: 325-333.
56. Hop. D. V, Sakiyama. Y, Binh. C. T. T, Otoguro. M, Hang. D. T. Miyadoh. S, Luong. D. T & Ando. K. 2012. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. The Journal of Antibiotics. Vol: 64. Pp: 599–606.

57. Hozzein W. Rabie. W & Ali. M. I. 2011. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. African Journal of Biotechnology Vol: 10. N°: 12. Pp : 2295-2301.

I

58. Ilić. S. B, Konstantinović. S. S, Todorović. Z. B. 2005. UV/VIS analysis and antimicrobial activity of streptomyces isolates. Facta universitatis, Series: Medicine and Biology Vol: 12. N°: 1. Pp. 44 – 46.

59. Irena Choma, M. and Edyta Grzelak. M. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography A. Pp: 2684–2691.

J

60. Judd. S. W, Campbell. C.S , Kellogg. E. A, Stevens. P. 2001. Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck : Bruxelles. Pp : 467.

K

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

62. Kamat. T. K & Kerkar. S. 2011. pharmaceutical potentials of bacteria from saltpans of goa, india. International Journal of Pharmaceutical Applications. Vol: 2. N° : 3. Pp 150-154.

63. Kauffmann. 1962. sur les antibiotiques d'origine microbienne. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Vol : 255. Pp : 599-601.

64. Khanna. M, Solanki. R & Lal. R. 2011. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. Vol: 2. N° : 3. Pp: 357-375.

65. 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. Thèse doc: université Mentouri-Constantine. Pp : 176.

66. Kroppenstedt. R. M & Goodfellow. M. 2006. The Family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Spirillospora* and *Thermomonospora*. In the prokaryotes 3rd édition. Springer: New York. Pp: 682–724.

67. Kroppenstedt. R. M & Evtushenko. L. I. The Family *Nocardiopsaceae*. In the prokaryotes 3rd edition. Springer: New York. Pp: 754–795.

68. Kumar. V, Bharti. A, Negi. Y. K. Gusain. O. Pandey. P. Bisht. G. S. 2012. Screening of actinomycetes from earthworm castings for their antimicrobial activity and industrial enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 205-214.
69. Kumar. N, Singh. R. K, Mishra S. K., Singh A. K., Pachouri U. C. 2010. Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*. Vol: 2. Pp: 12-16.

L

70. Labeda. D. P. 2006. The Family *Actinosynnemataceae*. In the prokaryotes 3rd edition. Springer: New York. Pp: 654–668.
71. Lechevalier & Lechevalier, 1970(a). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Vol : 20. N°: 4. Pp. 435-443.
72. Lechevalier & Lechevalier, 1970(b). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In : the actinomycetes. Prauser H.Fisher Verlag, Jena. Pp : 393-405.
73. Lee. E. J, Hwang. K. Y, Lee. H. S & Chung. N. 2011. Characterization of a New *Streptomyces* sp. A1022 as a Potential Biocontrol Agent. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. Vol: 54. N°: 3. Pp:488-493
74. Lee. J. Y & Hwang. B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol*. Vol : 48. Pp : 407–417.
75. Lefebvre. T. 2008. Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutitermes* et leur microflore actinomycétale: spécificité et évolution. Thèse doc : Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé : Paris. Pp : 168.
76. Lemriss. S, Laurent. F, Couble. A, Casoli. E, Lancelin. J. M, D. Saintpierre-Bonaccio. D, S. Rifai, A. Fassouane, and P. Boiron. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol*. Vol: 49. Pp: 669–674.
77. Lindenfelser L. A., Shotwell O. L., Bachler M. J., Shanon G. M., Pridham T. G. 1964. Antibiotics against plant disease VIII. Screening for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by streptomycetes. *Applied Microbiology*. Vol: 12. Pp: 508-512.
78. Loqman. S. 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.

M

79. Ma. Y, Qu. L, Liu. Z, Zhang. L, Yang. Z. Zhang L. 2011. Synthesis of salinosporamide A and its analogs as 20S proteasome inhibitors and SAR summarization. *Curr Top Med Chem*. Dec. Vol: 11. N°: 23. Pp: 2906-22.
80. Meklat. A, Sabaou. N, Zitouni. A, Mathieu. F. Lebrihi. A. 2011. Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria: Isolation, Taxonomy and Antagonistic Properties. *Appl Environ Microbiol*. 77(18) Pp : 6710-4.
81. Maier. R. M. Pepper. I. L, Gerba. C. P. 2009. *Environmental microbiology*. Academic Press: London. Pp: 598.
82. McKinney. R.E. 2004. *Environmental Pollution Control Microbiology*. CRC Press : New York. Pp: 448.
83. McKenzie. N. L ; Thaker. M; Koteva. K; Hughes.D. W; Wright. G. D; and Nodwell.J. N. 2010. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA*. *The Journal of Antibiotics*. Pp: 1– 6
84. Mertz. F. P. 1994. *Planomonospora alba* sp. nov. and *Planomonospora sphaerica* sp. nov., Two New Species Isolated from Soil by Baiting Techniques. *International journal of systematic bacteriology*. Vol: 44. No: 2. Pp: 274-281
85. Meyer. A, Deiana. J, Bernard. A. 2004. Doin : France. 2eme édition. Pp : 430.
86. Minnikin D.E. & Goodfellow M. 1981. Lipids in the classification of actinomycetes. *Zbl. Bakteriol. Hyg. Suppl*. Vol: 11. Pp: 99-109.
87. Muiru. W. M, Mutitu. E. W & Mukunya. D. M. 2007. Characterization of antibiotic metabolites from actinomycete isolates. *African Crop Science Conference Proceedings*. Vol: 8. Pp: 2103-2107.
88. Mythili. B and Ayyappa Das. M. A. 2011. Studies on Antimicrobial Activity of *Streptomyces* spp. Isolates from Tea Plantation Soil. *Research Journal of Agricultural Sciences*. Vol: 2. N°: 1. Pp: 104-106.

N

89. Nanjani. S. G & Soni. H. P. 2011. Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. *Bioinformatica* .Vol: 1. N°: 1. Pp: 1-15.
90. Naorungrote. S, Chunglok. W. Lertcanawanichakul. M & Bangrak. P. 2011. *Actinomycetes* Producing Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Soil Samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak J Sci & Tech*. Vol : 8. N° :2. Pp: 131- 138.

91. Neyra, M. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/rhizobium. 1992. Food & Agriculture Org. Pp: 200.
 92. Ngaemthao. W, Suriyachadkun. C. Chunhametha. S, Tamura. T, and Sanglier. J. J. 2013. *Planobispora siamensis* sp. nov., isolated from soil in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol ijs.
 93. Ng. Z. Y and Amsaveni. S. 2012. Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. Journal of Advanced Biomedical & Pathobiology Vol: 2 N°: 3. Pp: 96-107
- O**
94. O'Gara. F. Dowling. D. N, Boesten. B. 2008. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs. John Wiley & Sons: Weinheim. Pp: 192.
 95. Oren. A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol : 28. Pp : 56–63.
 96. Oren A. 2006. Life at high salt concentrations. In: Dworkin M, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer and E Stackebrandt (Eds.). The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 3rd ed. Springer – Verlag: New York. Saline Systems. Pp: 262-283.
 97. Oren A. 1999 (a). Bioenergetic aspects of halophilism. Microbiol Mol Biol Rev. Vol: 63. Pp: 334–348.
 98. Oren A. 1999 (b). The enigma of square and triangular bacteria. In: Seckbach J (Ed.), Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environmental Habitats. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Pp : 337– 355.
 99. Ouhdouch. Y. Barakate. M. Finance. C. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Biology. Vol: 37. N°: 2. Pp: 69–74.
 100. Ouhdouch. Y. 2003. Aperçu bibliographique sur la taxonomie des actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC. Pp : 18-70.
 101. Otto. H. J. Écologie forestière. 1998. institue pour le développement forestier : Paris. Pp : 397.

P

102. 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*. Vol: 2. N°: 4. Pp: 384-392.
103. Pazhanimurugan. R., Gopikrishnan. V, Shanmuga. S. T, Radhakrishnan. M and R. Balagurunathan. R. 2012. Bioactive potential of actinobacteria against drug resistant pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol: 2. N°: 5. Pp: 167-173.
104. Pazhanimurugan, R. Radhakrishnan. M & Balagurunathan. R. 2010. Bioactive sugar molecule from *Streptomyces aureocirculatus* (Y10) against MRSA, VRSA and ESBL pathogens. *Journal of Pharmacy Research*. Vol: 3. N°: 9. Pp: 2180-2181.
105. Peric-Concha, N. and Long, P.F. 2003. Mining the microbial metabolome: a new frontier for natural product lead discovery. *Drug Discov Today*. Vol: 8. Pp: 1078-1084.
106. Pochon. J, Tardieux. P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Éditions : Tourelle. Pp : 111.
107. Prakash. A .Satyanarayana. T, , Johri. B. N. 2012. *Microorganisms in Environmental Management*. Springer. Pp: 819.
108. Pelmont. J. 2005. Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences : Grenoble. Pp : 798 pages.
109. Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2010. *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088.
110. Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2003. *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164.
111. Pridham. T. G & Gottlieb. D. 1949. The utilisation of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol*. Vol 56. Pp: 107-114.

R

112. Radhika. S, Bharathi. S, Radhakrishnan. M & Balagurunathan. R. 2011. Bioprospecting of Fresh Water Actinobacteria : Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *Journal of Pharmacy Research*. Vol 4. N° 8. Pp: 2584-2586.
113. Rahman. M. A, Islam. M. Z & Ul Islam. M. A. 2011. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnology Research International*. Vol 2011. Pp: 1-6.

114. Raja. A & Prabakaran. P. 2011. Preliminary screening of antimycobacterial effect of psychrophilic Actinomycetes isolated from Manali ice point: Himachal Pradesh. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. Vol. 3. N° 2. Pp:41-46.
115. Rakshanya. J. U; Hemashenpagam. N. and Devi. D. K. 2011. Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes. *International Journal of Microbiology Research*. Vol: 3; N° 3. Pp: 148-156.
116. Rangaswami. G. Bagyaraj. D. J. Bagyaraj D.G. 2004. *Agricultural Microbiology*. PHI : New Delhi. Pp : 440.
117. Rastogi, V, B. Kishore, B. 2006. *A complete course in ISC biology*. New Delhi: Pitambar publishing company (P) Ltd. Pp. 592.
118. Rastogi. B. V, Kishore. B. 1997. *A Complete Course in ISC Biology*. Pitambar Publishing: New Delhi. Pp: 592.
119. Reghioa. S. Boughachiche . F. Oulmi. L. Zerizer. H. Kitouni. M. Boudemagh. A. Boulahfrouf. A. 2008. Separation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolées de sol aride de la région de Biskra. *Sciences & Technologie*. N°28. Pp.59-64.
120. Ripa. F. A , F. Nikkon. F, S. Zaman. S and P. Khondkar. P. 2009. Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. *Mycobiology*. The Korean Society of Mycology. Vol: 37. N° 3. Pp: 211-214.
121. Rousset. J. J. 1993. *Copro-parasitologie pratique: Intérêt et méthodologie, notions sur les parasites du tube digestif*. ESTEM/AUPELF : Paris. Pp : 91.

S

122. Sabaou. N. 1988. Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et écologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.
123. Sanglier. J. J, Haag. H, Huck. T.A, Fehr. T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res Microbiol*. Vol: 144. Pp: 633-642.
124. Sandhya. G. Nanjani & Harsha P. Soni. 2011. Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from Dwarka and Veraval. *Bioinformatica*. Vol:1. N°1. Pp: 1-15.
125. Sateesh V. Naikpatil & Rathod. J. L. 2011. Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. 3(10). Pp :48-53.

126. Sharma. D, Kaur. T, Chadha. BS & Manhas. R. K. 2011. Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant Staphylococcus aureus, E. coli and Various Other Pathogens. Tropical Journal of Pharmaceutical Research December. Vol 10. N°: 6. Pp: 801-808.
127. Sherma. J. 2000. Review Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. Journal of Chromatography A. N° 880. Pp: 129–147
128. Shirling. E. B and Gottlieb. D. 1966. Methods for characterization of streptomyces species. International journal of systematic bacteriology. Vol. 16. N° 3. Pp : 313-340.
129. Shukla. G. Soil Enzymology. 2010. Springer: Berlin. Pp: 384.
130. Sibanda. T, Leonard. V. Mabinya. L. V, Mazomba. N, Akinpelu. D. A, Bernard. K, Olaniran. A. O, and Okoh. A. I. 2010. Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. Int J MolSci. Vol : 11. N° 7. Pp: 2612–2623.
131. Singh. S, Baruah. I and Bora. T. C , 2006. Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. Biotechnology. Vol5: 217-221.
132. Silva. L, Coutinho. A, Fedorov. A, Prieto. M. Nystatin-induced lipid vesicles permeabilization is strongly dependent on sterol structure. Biochimica et Biophysica Acta. Vol : 1758. Pp : 452–459
133. Silverstein R.M., Webster F.X. et Kiemle D.J. 2007. Identification spectrometrique de composes organiques. *De Boeck & Larcier Edition, Bruxelles*: 70-110.
134. Smaoui. S. 2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doc : Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). Pp : 207.
135. Smith, D.W., Sims, B.G., O'Neill, D.H., FAO (Roma). 1998. Essai et évaluation des équipements et machines agricoles: principes et applications. FAO. Pp :328.
136. Song. Q, Huang. Y & Yang. H. 2012. Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by Actinomycetes YJ1 Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Agricultural Science; Vol. 4, No. 7. Pp : 95-102.
137. Stanek. J.S & Roberts. G. D. 1974. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. Applied Microbiology. Vol. 28. N°2. Pp: 226-231.
138. Suriyachadkun. C. Chunhametha. S ; Thawai. C; Tamura. T; Potacharoen. W; Kirtikara. K; Sanglier. J. J; Kitpreechavanich. V. Planotetraspora kaengkrachanensis sp.

nov. and *Planotetraspora phitsanulokensis* sp. nov., isolated from soil. 2010. *Int J Syst Evol Microbiol.* Vol : 60. N°:9. Pp: 2076-2081

139. Suwan. N , Boonying. W, & Nalumpang. S. 2012. Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Technology.* Vol. 8. N°: 2. Pp:725-737.

T

140. Thenmozhi. M and Kannabiran. K 2010. Studies on Isolation, Classification and Phylogenetic Characterization of Novel Antifungal *Streptomyces* sp. VITSTK7 in India. Vol:2. N°: 5:306-312.

141. Thiemann J. E. 2012. A direct screening method for the investigation of microbial biodiversity. *International Research Journal of Microbiology.* Vol. 3(1). Pp. 36-38.

U

142. Ullah. I, Masood Arshad. M, Chuadhry. I. J. M, Noureen. U, Jadoon. W. A; Jadoon. M. A. 2012. *Actinomycetes* screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec. Zool. Surv. Pakistan.* Vol :21. Pp: 10-13.

143. Uyeda M. 2004. Metabolites produced by actinomycetes--antiviral antibiotics and enzyme inhibitors. *Yakugaku Zasshi.* Vol: 124. Pp: 469-479.

V

144. Valli S. Sugasini. S. S, Aysha O. S, Nirmala. P, Vinoth Kumar P, Reena. 2012. A. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* Pp: 469-473.

145. Vimal. V, Rajan. B. M & Kannabiran. K. 2009. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian Journal of Medical Sciences.* Vol:1. N°: 2. Pp: 57-63.

W

146. Waksman. S. A. 1961. *The actinomycetes.* vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC : Baltimore. Pp : 327.

147. William B. Whitman, Peter Kämpfer, Michael Goodfellow, George M. Garrity, Wolfgang Ludwig. 2012. *Bergey's manuel of systématique.* 2rd. volum 5. Springer, New York. Pp: 1750.

148. Wang L; Huang. Y; Liu. Z; Goodfellow. M & Rodriguez. C. 2006. *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. *J. Sys. Ev. Microbiol.* Vol56. Pp: 1257-1261.

149. Winn. W. C, Koneman. E. W. 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Williams & Wilkins: Washington. Pp: 1565.

Y

150. Yamamura. H, Shimizu. A, Nakagawa. Y, Hamada. M, Ootoguro .M , Tamura. T & Hayakawa. M. 2012. *Actinoplanes rishiriensis* sp. nov., a novel motile actinomycete isolated by rehydration and centrifugation method. *J Antibiot (Tokyo)*. Vol 6. N°: 5. Pp :249-53.
151. Yoon. J.H & Park. Y. H. 2006. The genus *Nocardioides*. In the prokaryotes 3rd édition. Springer: New Yourk. Pp: 1099–1113.

Z

152. Zhang. J. 2011. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science*. Vol 5 (2). Pp : 124-215.
153. Zhang, L. and Demain, A.L., 2005. Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural products. In: *Natural products, drug discovery and therapeutic medicine*. Humana press. Totawa, New Jersey. Pp: 382.
154. Zhang. Y. Q ; Hong-Yu Liu. H. Y ; Li-Yan Yu. L. Y ; Lee. J. C ; Park. D. J ; Kim. J. C ; Xu. L. H ; Jiang. C. L and Li. W. J. 2011. *Sinosporangium album* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Streptosporangineae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 61. Pp: 592–597.
155. Zvyagintsev. D. G; Zenova. G. M ; Sudnizin. I. I ; Doroshenko. E. A. 2005. The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.

Annexes

Annexes 1 : Milieux de cultures

ISP1

- Tryptone.....5g
- Extrait de levure.....3g
- Agar.....20g
- Eau distillée.....1L
- pH.....7,3

ISP 2

- Extrait de levure.....4 g
- Extrait de malt.....10 g
- Glucose4 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,3

ISP 3

- Solution d'avoine1 L (**Annexes 2**)
- Solution d'oligo-éléments.....1 ml (**Annexes 2**)
- Agar20g
- Ph.....7,2

ISP 4

- Amidon soluble.....10g
- K_2HPO_41g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$1 g
- NaCl.....1 g
- $(NH_4)_2SO_4$2 g
- $CaCO_3$2 g
- Solution d'oligo-éléments.....1 ml (**Annexes 2**)
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....1L
- pH.....7,4

ISP 5

- Glycérol.....10 g
- L-Asparagine.....1 g
- Solution d'oligo-éléments.....1 ml (**Annexes 2**)
- Eau distillée1 L

- Agar20 g
- Ph.....7,4

ISP 6

- Peptone.....15 g
- Proteose-Peptone.....5 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0,5 g
- Thiosulfate de sodium.....0,08 g
- Extrait de levure1 g
- K_2HPO_41 g
- Eau distillée.....1 L
- Agar20 g
- pH.....7,4

ISP 7

- Glycérol.....15 g
- L-Tyrosine.....0,5 g
- L-Asparagine1 g
- K_2HPO_4 0,5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$0,8 g
- NaCl0,5 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g
- Solution d'oligo-éléments1 ml (**Annexes 2**)
- Eau distillée1 L
- Agar20 g
- pH7,4

ISP9

- $(NH_4)_2 SO_4$ 2.64 g
- KH_2PO_45.38 g
- K_2HPO_45.65 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$1 g
- Solution saline.....1 ml
- Eau distillée1L
- Agar20 g
- pH.....7,4

Milieu PELG

- Peptone5 g
- Glucose10g
- Extrait de levure2g
- Agar20g
- Eau distillée 1L
- pH = 6,8 – 7.

Milieu GYEA

- extrait de levure10 g/l
- glucose.....10 g/l.
- Agar.....20 g/l
- Eau distillée 1 L
- pH7.4

Milieu Muller-Hinton

- Infusion de viande.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17,5 g
- Amidon..... 1,5 g
- Agar.....17 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,4

Bouillon cœur-cerveille

- protéose-peptone10g
- infusion de cerveau de veau.....12,5g
- infusion de cœur de bœuf5g
- glucose2g
- chlorure de sodium.....5g
- hydrogénophosphate de sodium2,5g
- pH = 7,4.

Milieu de Bennett

- D-Glucose anhydre..... 10g

- Casaminoacides.....2g
- Extrait de levure.....1g
- Extrait de viande.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- pH.....7,3

Caséine amidon agar :

- Amidon.....10g
- Caseine0,3 g
- KNO₃..... .2 g
- K₂HPO₄2 g
- NaCl.....2 g
- MgSO₄.7H₂O.....0,05 g
- CaCO₃0,02 g
- FeSO₄.7H₂O..... 0,01 g
- Agar.....18 g
- Eau distillée1 L
- pH = 7.3.

Milieu amidon extrait de levure peptone (M2) :

- Amidon10g
- Extrait de levure4g
- Peptone2g
- Agar18 g

Milieu PELG

- Peptone.....5g
- Glucose10g
- Extrait de levure..... 2g
- Agar20g
- Eau distillée1L

Annexes 2 : Solutions et révélateurs

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

- Phénol pur cristallisé.....10g
- Acide lactique10g
- Glycérol pur20g
- Eau distillé10g

Solution d'oligo-éléments

- FeSO₄ 7H₂O..... 0,1g
- MnCl₂ 4H₂O0,1g
- ZnSO₄ 7H₂O..... 0,1g
- Eau distillée.....100 ml

Solution saline

- CuSO₄ 5H₂O..... 0,64 g
- FeSO₄ 7H₂O..... 0,11 g
- MnCl₂ 4H₂O..... 0,79 g
- ZnSO₄ 7H₂O..... 0,15 g
- Eau distillée..... 100 ml

Solution d'avoine

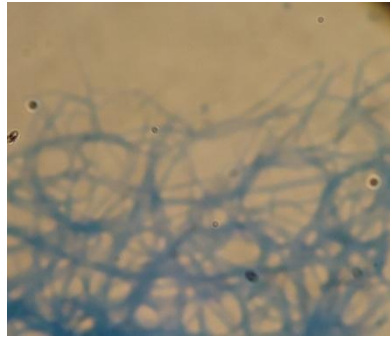
- Grains d'avoine.....* 20 g
- Eau distillée1 L

*Faire bouillir pendant 20 minutes, filtrer sur gaz et réajuster le volume à 1000ml.

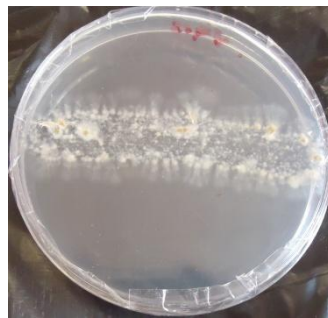
Préparation des révélateurs pour plaque CCM :

- **Ninhydrin** : 0.2 gramme de ninhydrine est mélangé avec 100 ml d'acétone (0.2% P/V)
- **Réactif de Molish** : Après une attaque acide par l'acide sulfurique à 20%. Une solution de 2% de l'alpha-naphtol dans le méthanol est pulvérisée sur les plaques CCM.
- **Chlorure de fer ferrique (FeCl₃)** : 1% de FeCl₃ est ajoutée au méthanol-eau (1 :1). Après séchage à 100 °C pendant 5 minutes, les taches apparaissent de couleur grise à noire.

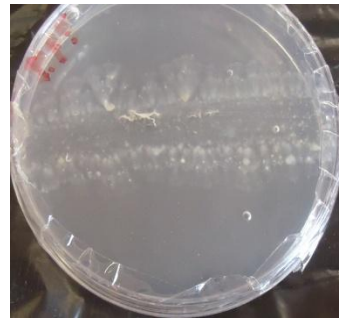
Annexes 3 : photos des résultats obtenus.



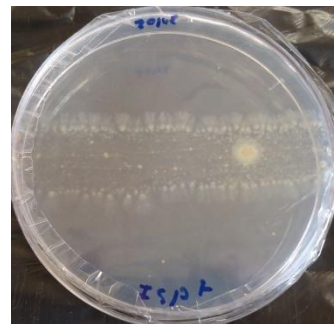
Résultats de la coloration de Zeihl-Nielsen de l'isolat LAM143cG3.



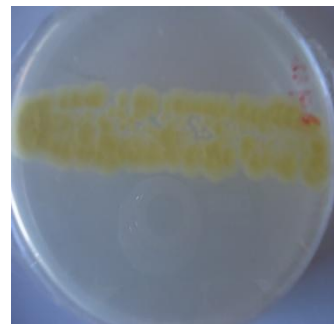
ISP3



ISP5



ISP7



ISP6

Aspect de l'isolat LAM143cG3 sur les différents ISP

المخلص:

تم عزل 18 عزلة من الفطريات الشعاعية من عينات مختلفة من تربة سبخة القنادسة. أظهرت جميع العزلات قدرة على إنتاج مضادات حيوية ضد واحدة على الأقل من الكائنات الحية الدقيقة المستعملة، ثم إختيار عزلة واحدة (LAM143cG3) لنشاطها الحيوي المتميز.

التوصيف الأولي للجزيئات الفعالة المفروزة من قبل العزلة LAM143cG3 يدل على وجود بقعة نشطة واحدة في نظام المذيب

(ماء أمونياك ميثانول)، في حين تم الحصول على بقتين في نظام (أسيتات إيثيل، ميثانول).

الكشف الكيميائي للبقع أكد وجود نوعين من المركبات: أمينية و فينولية. أظهرت الدراسة الطيفية UV-VISIBL غياب القمم المميزة

للمركبات الغير مشبعة في حين أكد التحليل بالأشعة تحت الحمراء وجود المركبات الأمنية

بالاعتماد على مميزات مورفولوجية و كيميوطاكسونمية، تم تقرب العزلة LAM143cG3 الى الجنس *Spirillospora*.

أفرزة المقارنة بين أنواع هذا الجنس وعزلتنا على وجود أوجه اختلاف عديدة، وهو ما يقودنا إلى إفتراء أن تكون عزلتنا نوع جديد في هذا الجنس

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية؛ سبخة؛ القنادسة؛ عزل؛ نشاط حيوي.

Résumé:

18 actinomycètes ont été isolés à partir de différents échantillons du sol de la sebkha de Kenadsa (Bechar). Tous les isolats ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme test utilisé. Un isolat (LAM143cG3) a été sélectionné pour son pouvoir antimicrobien intéressant.

La caractérisation préliminaire des substances antimicrobiennes sécrétées par l'isolat LAM143cG3 indique la présence d'une seule tache active ($R_f = 0.73$) dans le système de solvant éthanol-ammoniaque-eau tandis que deux taches sont obtenues dans le système (acétate d'éthyle-méthanol). Les réactions des tests chromogéniques suggèrent la présence des groupements amines et phénols. L'analyse spectrale par UV-VISIBLE indique l'absence des pics polyéniques, tandis que l'infrarouge à confirmer la présence des groupements amines.

Sur la base des critères morphologiques et chimio-taxonomiques, l'isolat LAM143cG3 peut être rapproché au genre *Spirillospora*. Cependant, l'existence de plusieurs différences physiologiques et biochimiques entre notre isolat et les espèces du genre *Spirillospora* (*S. rubra* et *S. albida*) nous laisse à supposer qu'il s'agit d'un nouveau membre dans ce genre.

Mots clés : Actinomycètes ; Sebkha, Kenadsa ; Isolement ; Activité antimicrobienne.

Abstract:

18 actinomycetes were isolated from different soil samples of sebkha of Kenadsa (Bechar). All isolates showed antimicrobial activity against at least one test microorganism used. One isolate LAM143cG3 was selected for its broad spectrum and high antimicrobial activity.

Primary characterization of antimicrobial substance of the isolate LAM143cG indicates the presence of single spot ($R_f = 0.73$) in the solvent system (water-ethanol-ammonia), while two spots are obtained in the system (ethyl acetate-methanol). Tests chromogenic reactions suggest the presence of amines and phenols. The spectral analysis by UV-VISIBLE indicates the absence of polyene peaks, while the infrared confirm the presence of amine groups.

Based on morphological and chemotaxonomic criteria, the isolate LAM143cG3 can be related to the genus *Spirillospora*. The comparison between the species of this genus, *S. rubra* and *S. albida*, and our isolate, indicating the existence of several differences, which leads us to suppose that this is a new member in this genre.

Keys words: Actinomycètes ; Sebkha; Kenadsa; Isolation; Antimicrobial activity.