



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement et de la recherche scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR-KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT de la Biologie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FLIERE : Science Biologie

OPTION : Microbiologie

Thème

**Isolement de souches actinomycetales à partir
de sols rhizosphériques et de sebkha : mise en
évidence de l'activité antimicrobienne**

Présenter par

MOUMENI Soumia

HANNECHE Ahlem

ENCADRER PAR

LEULMI Nassima

Soutenu le : juin 2015

Jury de soutenance :

| | | | |
|----------------|-------------------|-------|----------------------------|
| Présidente : | MERABTI Rima | M.A.A | U.Abbes laghrour-khenchela |
| Encadreur : | LEULMI Nassima | M.A.A | U.Abbes laghrour-khenchela |
| Examinatrice : | CHORFI Khelthoume | M.A.A | U.Abbes laghrour-khenchela |

Promotion : 2014/2015

Laboratoire où entreprise le travail : Laboratoire de la Microbiologie Appliquée de l'Université de Mentouri-Constantine et Laboratoire de la Microbiologie de l'Université d'Abbes LAGHROUR-Khenchela.

Remerciements

Avant toute chose, on tient à remercier « Allah » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce travail.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le laboratoire de la Microbiologie Appliquée de l'Université de Mentouri-Constantine et le laboratoire de la microbiologie de l'université d'Abbes LAGHROUR Khanchela.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par M^{elle} LEULMI Nassima maître assistante classe A à l'université d'Abbes LAGHROUR Khenchela. On tient de la remercier très chaleureusement parcequ'elle a accepté de superviser ce travail pour toute l'aide qui nous a porté et que sans elle ce travail n'aurait pas vu le jour.

On tient vivement à l'exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre travail. On la remercie de nous avoir fait confiance et d'avoir été présente aussi toujours que possible malgré ses tâches pédagogiques. Sa soutienne permanente et sa dynamisme nous a permis d'avancer plus loin dans notre travail.

Nos remerciements vont aussi à madame CHORFI.K et M^{elle} MERABTI.R d'avoir ménagé le temps pour juger et critiquer ce travail.

On tient à exprimer nos profondes gratitudes à Monsieur HAMLIA Athmene et son épouse l'enseignante ADADE pour ses encouragements et ses conseils.

Nous adressons nos remerciements aussi aux ingénieures de Laboratoire de la Microbiologie de l'Université d' Abbes LAGHROUR-Khenchela.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents pour leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles. Qu'ils trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour

Ma très chère sœur Amira ;

Mon frère Zinou ;

Toute ma famille ;

Ahlem ;

et

Toute la promotion master2 microbiologie (2015).

Soumia M

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon père, pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les gages de réussite.

Mon adorable mère, qui est toujours présent et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. que dieu la protège et lui donne bonne santé.

Mes frères : Hamdi et Toufik

Mes sœurs : Nassima, Dounia, Meryem.

A tout ceux et toutes celles qui m ont encouragé et m ont souhaité du bien de près ou loin.

Ahlem H.

Résumés

Résumé: Isolement de souches actinomycétales à partir de sols rhizosphériques et de sebkha: mise en évidence de l'activité antimicrobienne.

Un total de 99 isolats se rapprochant par leurs aspects macroscopiques des Actinomycètes a été isolé à partir de 3 échantillons de sols de différentes régions, dont deux échantillons ont été prélevés à partir de la wilaya de Khenchela à partir du sol forestier rhizosphérique d'Al Hamma et de sol montagneux de l'Aurès, la troisième échantillon a été prélevé à partir de la Sebkha de Gureat Guellif situé dans la wilaya d'Oum El Bouaghie, en utilisant la méthode d'isolement suspension-dilution. Parmi ces isolats, **65** ont été isolés à partir de sol forestier rhizosphérique, **23** ont été isolés à partir de la Sebkha et **11** ont été prélevés à partir du sol montagneux. Dans le but de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques, l'activité antimicrobienne des 65 isolats du sol forestier rhizosphérique et les 23 isolats de la Sebkha a été mise en évidence envers quatre bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus ATCC 25923*, *Staphylococcus MRSA 43300* et *Enterococcus faecalis*) et quatre bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp* et *Acinetobacter sp*) et deux champignons pathogènes (*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*) par la technique des cylindres d'agar. **41,54%** des isolats de sol forestier rhizosphérique et **30,43%** des isolats de la sebkha ont montré une activité antibactérienne au moins vis-à-vis une bactérie test. Ces isolats semblent être plus actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif dont *E. Coli* (**0%**) a été considéré comme la bactérie la plus résistante à tous les isolats. En ce qui concerne l'activité antifongique, 17 isolats (**26,15%**) parmi les 65 isolats du sol forestier rhizosphérique ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis au moins un des champignons test, dont l'*Aspergillus niger* a été plus sensible (**84,21%**) aux isolats du sol forestier rhizosphérique que *Fusarium oxysporum* (**62,5%**), alors qu'aucune souche isolée à partir de la Sebkha n'a montré un effet antagoniste vis-à-vis les deux champignons test. Il apparaît donc nécessaire de s'orienter vers la lutte contre les bactéries multi-résistantes et les champignons pathogènes à l'aide des bactéries actinomycétales isolées à partir du sol forestier rhizosphérique.

Mots clés : Actinomycètes, Antibiotique, Activité antibactérienne, Activité antifongique.

Abstract: Isolation of actinomycetes strains from rhizosphere soil and sebkha: evidence of antimicrobial activity.

A total of 99 isolates approaching for their macroscopic aspects to actinomycetes were isolated from three soil samples from different areas, two samples were taken from the wilaya of Khenchela from forest rhizosphere soil of Al Hamma and the Aures mountain soil, the third sample was taken from the Sebkha Gureat Guellif located in the wilaya of Oum El Bouaghie, using the isolation suspension dilution method. Among these isolates, **65** were isolated from rhizosphere forest soil, **23** were isolated from Sebkha and **11** were taken from the mountainous soil. In order to discover new antibiotic molecules, the antimicrobial activity of 65 isolate of rhizosphere soil forestry and 23 isolate of Sebkha has been demonstrated against four Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus ATCC 25923*, *Staphylococcus MRSA 43300* and *Enterococcus faecalis*) and four Gram-negative bacteria (*E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter* and *Acinetobacter sp*) and two pathogenic fungi (*Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*) by the technique of agar cylinder. **41.54%** of forest soil rhizosphere isolates and **30.43%** of isolates sebkha showed antibacterial activity at least against a test bacteria. These isolates appear to be more active against Gram positive bacteria than Gram-negative bacteria including *E. coli* (**0%**) has been considered as the most resistant bacteria for all isolates. Regarding the antifungal activity, 17 isolates (**26.15%**) of the 65 isolates of forest rhizosphere soil showed inhibitory effect against at least one of the test fungi including *Aspergillus Niger* was more sensitive (**84,21%**) than *Fusarium oxysporum* (**62.5%**), while no strain isolated from Sebkha showed an antagonist effect against both test fungi. It therefore appears necessary to move towards the fight against multi-resistant bacteria and pathogenic fungi using the Actinomycetales bacteria isolated from the rhizosphere forest soil.

Key words: Actinomycets, Antibiotic, Antibacterial activity, Antifungal activity.

ملخص: عزل سلالات الاكتينومييسات من تربات الجذور و السبخة : دراسة الفعالية ضد الميكروبية

تم عزل ما مجموعه **99** سلالة تقترب من الجوانب الظاهرية الى الاكتينومييسات من ثلاث عينات تربة أخذت من ثلاث مناطق مختلفة، حيث تم أخذ عينتين منهما من ولاية خنشلة من تربة غابة الحامة والتربة الجبلية للأوراس أما العينة الثالثة تم أخذها من سبخة قرعة قليف المتواجدة بولاية أم البواقي ، وذلك باستخدام طريقة العزل تخفيف المعلق. من بين هذه السلالات **65** عزلت من تربة الغابة، **23** من السبخة و **11** من التربة الجبلية للأوراس. وفي اطار اكتشاف مضادات حيوية جديدة، قد تم اختبار الفعالية ضد ميكروبية للسلالات المعزولة من تربة الغابة و تربة السبخة ضد أربع سلالات بكتيرية موجبة الغرام (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus ATTC 25923*, *Staphylococcus MRSA 43300* et *Enterococcus faecalis* وأربعة سلالات بكتيرية سالبة الغرام (*E.Coli*, *Klebseilla pneumonie*, *Enterobacter sp*, *Acinetobacter sp*) ونوعين من الفطريات (*Aspergillus niger*, *Fusarium*) بواسطة تقنية اسطوانات الاغار. قد تبين من خلال هذا الاختبار أن **41,54%** من السلالات المعزولة من التربة الغابية و **30,43%** من السلالات المعزولة من السبخة قد ابدت فعالية ضد ميكروبية على الأقل ضد احد الانواع البكتيرية المختبرة قد تبين ان هذه السلالات المعزولة قد كانت ذات فعالية كبيرة ضد البكتيرية موجبة الغرام من البكتيرية سالبة الغرام حيث كانت (**0%**) *E.coli* البكتيرية الاكثر مقاومة لجميع السلالات المعزولة . أما فيما يخص الفعالية ضد الفطرية **17(26,15%)** سلالة معزولة من بين **65** المعزولة من التربة الغابية قد بينت فعالية على الأقل ضد احد الفطرين حيث كان (*Aspergillus niger*) اكثر حساسية (**84,21%**) للسلالات لهذه السلالات المعزولة من (*Fusarium*) اما السلالات المعزولة من السبخة فإنها لم تبدي اي فعالية ضد كلا الفطرين. ولذلك فانه يبدو من الضروري الاتجاه نحو استغلال الاكتينومييسات من اجل مكافحة البكتيرية متعددة المقاومة من جهة و محاربة الفطريات الممرضة من جهة اخرى.

كلمات مفتاحية: اكتينومييسات، مضاد حيوي، فعالية ضد ميكروبية، فعالية ضد فطرية.

Liste des figures

| Figure | Titre | page |
|--------|---|------|
| 1 | Cycle biologique d'un Streptomyces (Tighidet, 2011) | 4 |
| 2 | Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre Nocardia qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre Streptomyces en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm (Belyagoubi, 2014) | 5 |
| 3 | une colonie d'actinomycète ; la coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleu-vert) et morts (blancs).la figure montre le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaines de conidiospores (Prescott et al., 2008) | 6 |
| 4 | Les classes morphologiques de Streptomyces cultivé en milieu liquide (Amanullah et al., 2000). | 6 |
| 5 | Différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008) | 7 |
| 6 | Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN 16S (Prescott et al., 2008) | 10 |
| 7 | Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Samaoui, 2010) | 13 |
| 8 | Forêt de Foug Tifist (Al Hamma) | 19 |
| 9 | Arbuste du pin d'Alep (zone du prélèvement) | 19 |
| 10 | Montagne de l'Aurès | 20 |
| 11 | Arbre de chêne vert (zone du prélèvement) | 20 |
| 12 | Sebkha de Garaet Guellif | 21 |
| 13 | zone du prélèvement à partir de la sebkha | 21 |
| 14 | Aspect macroscopique de 14 isolats actinomycetales du sol forestier rhizosphérique d'Al Hamma après 14 jours d'incubation | 26 |
| 15 | Aspect macroscopique de 12 isolats actinomycetales du sol de la Sebkha après 14 jours d'incubation | 27 |
| 16 | Nombre de souches actinomycetales isolées par chaque échantillon du sol | 28 |
| 17 | Photographie de l'activité antibactérienne d'isolats actinomycetales du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis la bactérie test <i>Bacillus subtilis</i> | 34 |
| 18 | photographie de l'activité antibactérienne des isolats actinomycétales du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis la bactérie test <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 | 35 |
| 19 | La sensibilité des souches microbiennes testées aux isolats actinomycétales du sol forestier rhizosphérique | 35 |
| 20 | La sensibilité des souches microbiennes testées aux isolats actinomycetales de la Sebkha | 36 |
| 21 | photographie de l'activité antifongique des isolats du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis <i>Aspergillus niger</i> | 38 |
| 22 | photographie de l'activité antifongique des isolats du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> | 38 |

Liste de tableaux

| Numéro | titre | page |
|---------------|--|-------------|
| 01 | Souches utilisées dans le test d'activité antibactérienne. | 23 |
| 02 | Nombre d'actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon du sol. | 28 |
| 03 | Résultat de l'activité antimicrobienne des actinomycètes isolés à partir du sol forestier rhizosphérique d'Al Hamma(Khanchela) contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar (en mm). | 30 |
| 04 | Résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes isolés à partir du sol de sebka (Oum El Bouaghie) contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar (en mm). | 33 |

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

| | |
|---|----------|
| Introduction..... | 1 |
| Revue bibliographique..... | 3 |
| I Les actinomycètes..... | 3 |
| I.1 Définition..... | 3 |
| I.2 Caractéristiques générale..... | 3 |
| I.3 Cycle de développement..... | 4 |
| I.4 morphologie..... | 4 |
| I.5 Physiologie..... | 8 |
| I.5.1 le taux d'humidité..... | 8 |
| I.5. La température..... | 8 |
| I.5.3 Le PH..... | 8 |
| I.5.4 Rapport avec l'oxygène..... | 8 |
| I.5.5 Matière organique..... | 9 |
| I.6 Métabolismes..... | 9 |
| 1.7 Habitat des actinomycètes..... | 9 |
| 1.8 Classification des actinomycètes..... | 10 |
| 1.9 Rôle des actinomycètes en biotechnologie..... | 11 |
| I.9.1 La production des enzymes..... | 11 |
| I.9.2 Amélioration de la qualité de sol agricole..... | 11 |

| | |
|--|-----------|
| II Les antibiotiques..... | 12 |
| II.1 Définition..... | 12 |
| II.2 Classification..... | 12 |
| II.3 Mode d'action..... | 13 |
| II.3.1 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane..... | 13 |
| II.3.2 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique..... | 13 |
| II.3.3 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs..... | 13 |
| II.4 Résistance aux antibiotiques..... | 14 |
| II.4.1 La résistance naturelle..... | 14 |
| II.4.2 La résistance acquise..... | 14 |
| II.5 Les mécanismes de résistance..... | 14 |
| II.6 Les antibiotiques produits par les actinomycètes..... | 15 |
| III Les antifongiques..... | 15 |
| III.1 Définition..... | 15 |
| III.2 Origine des antifongiques..... | 15 |
| III.3 Classification des antifongiques selon l'origine et la structure..... | 16 |
| III.3.1 Antifongiques de synthèse chimique..... | 16 |
| III.3.2 Antifongiques naturels..... | 16 |
| III.4 Mode d'action des antifongiques..... | 16 |
| III.5 Mécanismes de résistances..... | 17 |
| III.6 les antifongiques produits par les actinomycètes..... | 17 |
| Matériel et méthodes..... | 19 |
| I Isolement des actinomycètes..... | 19 |
| I.1.Échantillonnage..... | 19 |
| I.2. Isolement des actinomycètes..... | 22 |
| I.3. Examens microscopique et macroscopique..... | 22 |
| I.4. Purification des isolats..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| I.5. Conservation des isolats..... | 22 |
| II Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats..... | 23 |
| II.1 L'activité antibactérienne..... | 23 |
| II.1.1 Préparation des inocula de bactéries-tests..... | 23 |
| II.1.2 Test d'activité antibactérienne..... | 23 |
| II.1.2.1 Technique des cylindres d'Agar..... | 24 |
| II.2 L'activité antifongique | 24 |
| Résultats et discussion..... | 25 |
| I Isolement des Actinomycètes..... | 25 |
| II Mise en évidence de l'activité antimicrobienne..... | 29 |
| II.1 Activité antibactérienne..... | 34 |
| II.2 Activité antifongique..... | 37 |
| Conclusion et perspectives..... | 39 |
| Références bibliographiques..... | 40 |
| Annexe..... | 50 |

Introduction

La reconnaissance de la résistance des microorganismes aux agents physique et chimiques revient au temps lorsque les antibiotiques ont été développés pour la première fois. La résistance aux antibiotiques peut être émergée grâce aux changements génétiques (les mutations) ou à l'acquisition des gènes de résistance par le transfert horizontal des gènes (**Antunes et al., 2014**).

Mais reste l'utilisation abusive des antibiotiques la conséquence d'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multirésistance de bactéries pathogènes, ce phénomène universel semble être de plus en plus propagé. À titre d'exemple, la vancomycine était l'antibiotique de choix pour le traitement des infections causées par *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), jusqu'à l'apparition des premières souches résistantes au Japon puis aux USA et en France. Les résultats publiés par l'EARSS (European antimicrobial resistance surveillance system) en 2002, montrent que le pourcentage de sensibilité diminuée à la pénicilline G de pneumocoques était plus élevé en France (53 %), devant la Roumanie (50 %), l'Espagne (33 %) et la Pologne (30 %). Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité (**Boughachiche et al., 2012**).

Et malgré que, dans les années 1990, la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Mais, parmi ces dernières, de nombreux métabolites sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (**Berdy, 2005**). Pourtant de nouveaux besoins émergents, des germes multirésistants (**Sharma et al., 2005**) et de nouveaux virus apparaissent. Face à ces besoins, de nouveaux composés chimiques doivent donc être identifiés et la recherche de nouvelles molécules bioactives évolue. Pour cela et en premier lieu, la biodiversité est exploitée (**Boughachiche, 2012**)

Les sols d'Algérie bien que soumis à un climat aride à subhumide, montrent une biodiversité surprenante d'actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, ubiquitaires, rencontrés sur tous les substrats naturels et jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Belyagoubi,**

2014). Dans leur habitat, ces bactéries vivent en différent association avec les plantes supérieures (Muthu *et al.*, 2014).

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne, avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (Belyagoubi, 2014).

En plus des antibiotiques, les actinomycètes synthétisent différents métabolites actives biologiques secondaires tel que, les herbicides, les pesticides, les antiparasitiques et les enzymes. Ils sont la source principale des antifongiques (Boussaber *et al.*, 2014).

L'objectif principal de ce travail est de chercher à isoler des souches actinomycétales à partir de trois régions différentes : le sol rhizosphérique de la forêt d'Al Hamma, le sol rhizosphérique de montagne de l'Aurès situés dans la wilaya de Khenchela et le sol de la sebkha de Gareat Guellif situé dans la wilaya d'Oum El Bouaghie et à sélectionner les isolats productrice des substances à activité inhibitrice contre 8 bactéries tests *Entérobacter sp*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus ATTCC25923*, *Staphylococcus MRSA43300*, *Klebsiella pneumonie*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp*, *Enterococcus fecalis*, et contre deux champignons pathogènes *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

Revue

bibliographique

I les actinomycètes

I.1 Définition

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif (**Williams *et al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo., 1993**) dont la croissance donne lieu à des colonies circulaire constituées d'hyphes (**Eunice et Prosser., 1983**), c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance(**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier., 1981 ; Eunice et Prosser., 1983**).Cela explique leur dénomination : le mot « Actinomycète » provient de deux substantifs grecs « Aktis » et « mykes » qui signifie « champignons à rayons »(**Silini, 2010**).

Les Actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leur morphologie fongöide : filaments ramifiés, organes de sporulation,... etc. (**Kitouni, 2007**).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques les arrangent parmi les procaryotes ; leur paroi ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine et leur cytologie est celle des bactéries ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des actinophages et à des antibiotiques antibactériens, cela confirment le bien-fondé de la classification des Actinomycètes parmi les bactéries (**Larpen, 1989**).

I.2 Caractéristiques générales

Les Actinomycètes constituent un groupe tout à fait unique de microorganismes procaryotes. Généralement, ils sont Gram positif à structure végétative de type mycélien et le taux de G et C de leur ADN est supérieur à 55%. Ils sont hétérotrophes, leur croissance est plus lente (7 à 28 jours) que celle des autres bactéries (24 heures) (**Andriambololona, 2010**).

La plupart des Actinomycètes aérobies sont saprophytes à développement mycélien significatif parmi lesquels se trouve la majorité des espèces d'intérêt industriel bien qu'il en existe des formes anaérobies ou sans mycélium évident, généralement pathogènes (**Andriambololona, 2010**).

La reproduction des Actinomycètes peut s'opérer suivant trois modes, la fragmentation pseudo bactérienne, la production de conidies et la production de sporanges (**Andriambololona, 2010**).

I.3 Cycle de développement

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (**Danilenko et al., 2005**).

Sur un milieu solide, les spores d'actinomycètes produisent un ou plusieurs mycéliums de substrats, ramifié et non fragmenté, suite à la germination d'une spore et se développent par croissance apicale (Figure 1).

En réponse à certains signaux, le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du mycélium du substrat (**Ou et al., 2008**).

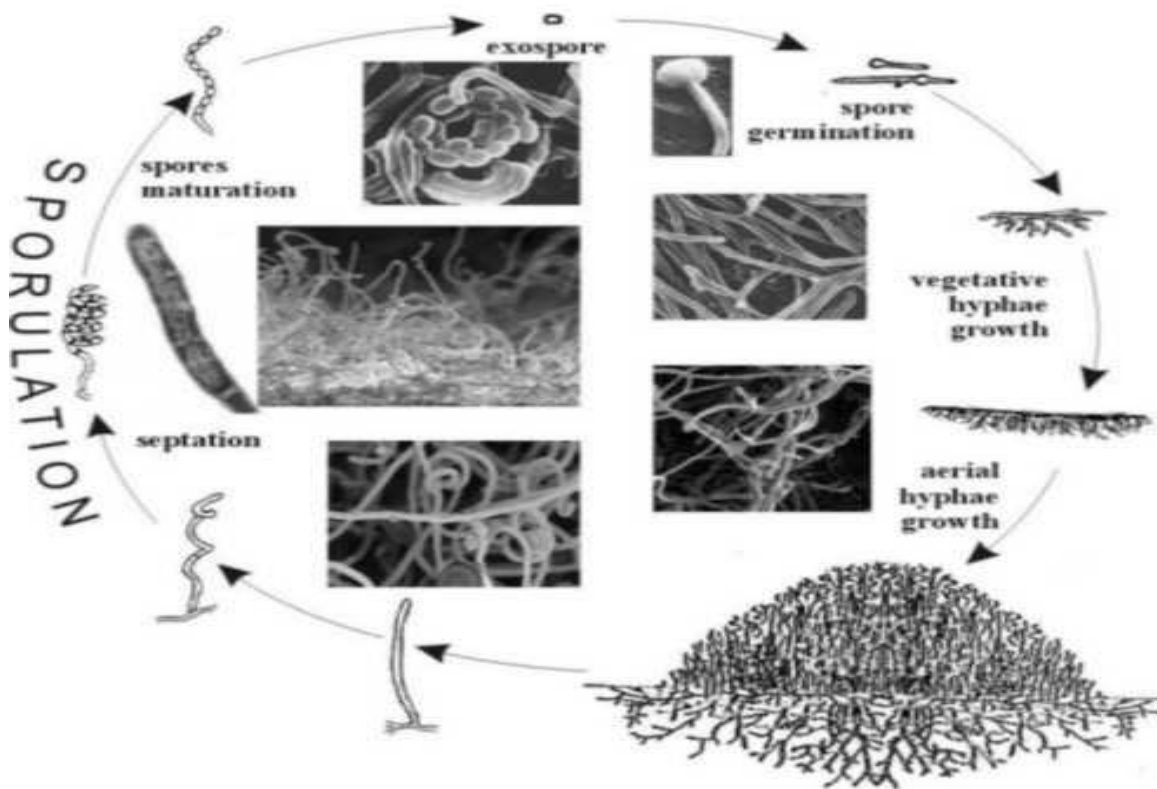
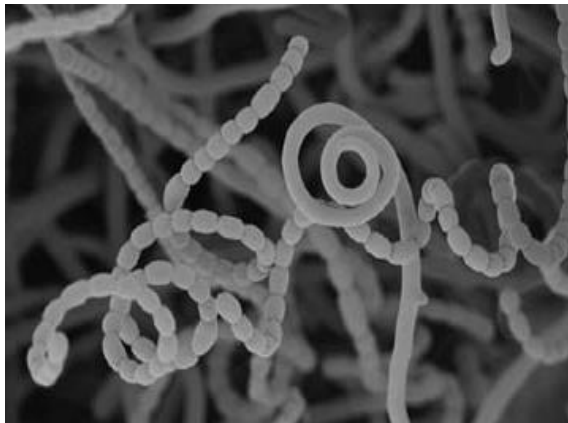


Figure 1: Cycle biologique d'un Streptomyète (**Tighidet, 2011**)

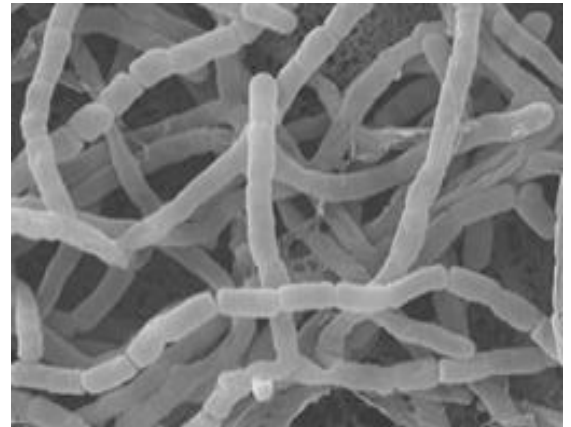
I.4 morphologie

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (**Prescott et al., 1997**). Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 μm (**Eunice, 1983**) est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 μm) (**Gottlieb, 1973**). Le mycélium de ces bactéries présente une grande diversité de morphologies. On rencontre des

espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace qui se fragmente (certains *Nocardia*) et enfin des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Le mycélium fragmentaire et permanent sont illustrés sur la figure 2. Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien. (Djaballah, 2010).



(A) *Nocardia*



(B) *Streptomyces*

Figure 2 : Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 μ m. (Belyagoubi, 2014)

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides (figure 3) présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- ❖ Des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- ❖ Des colonies pâteuses, rugueuses ou lisses et rarement couvertes de mycélium aérien et qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- ❖ Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons (Klakoutsakii et Agre., 1976).

Ces colonies sont généralement de taille moyenne (1 à 4 mm). Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, orange, vert, violet, rose, gris, noir, ... etc. (Leclerc, 1975).

En milieu liquide, selon Amanullah *et al.*, 2000, les *Streptomyces* peuvent présenter trois types morphologiques (figure 4).

- ❖ Les hyphes branchés ou non, sous forme de mycélium dispersé,

- ❖ un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements,
- ❖ des pelotes denses dont la taille peut varier de 0,1 μm à plusieurs millimètres (Bushell, 1988 ; Hobbs *et al.*, 1989 ; Drouin, 1996 ; Amanullah *et al.*, 2000).

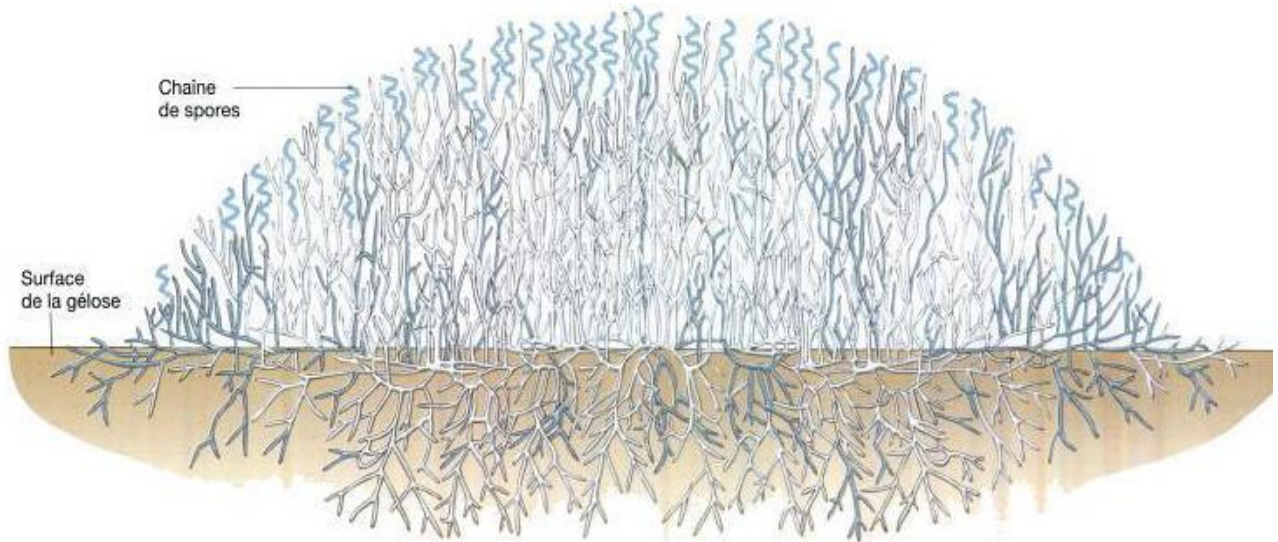


Figure 3 : une colonie d'actinomycète ; la coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleu-vert) et morts (blancs). la figure montre le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores (Prescott *et al.*, 2008).

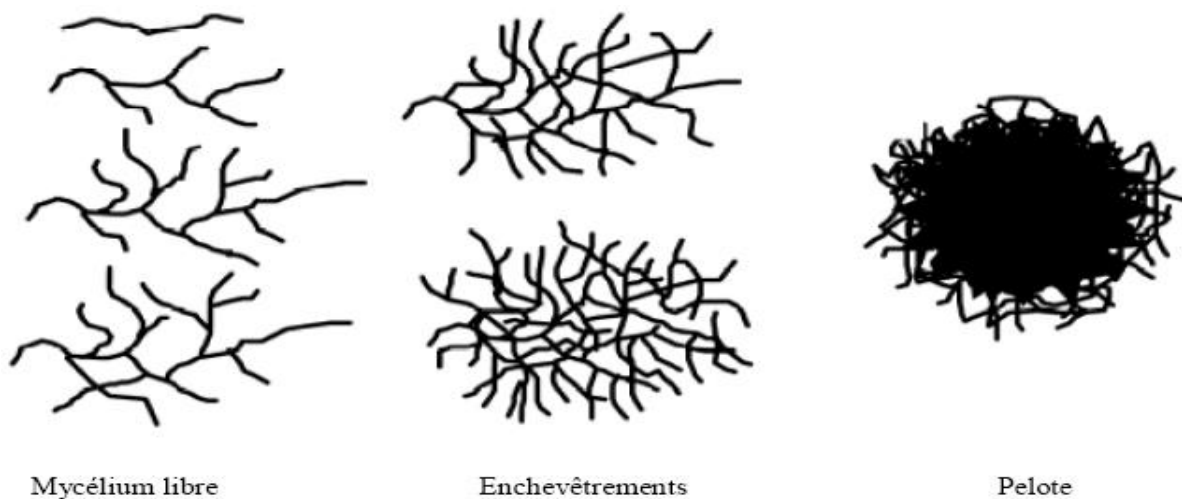


Figure 4 : Les classes morphologiques de *Streptomyces* cultivé en milieu liquide (Amanullah *et al.*, 2000).

Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micrmonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longue chainettes (*Streptomyces*). Les chainettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexible ou en spirales (figure5). De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sposophores (Aouar, 2012).

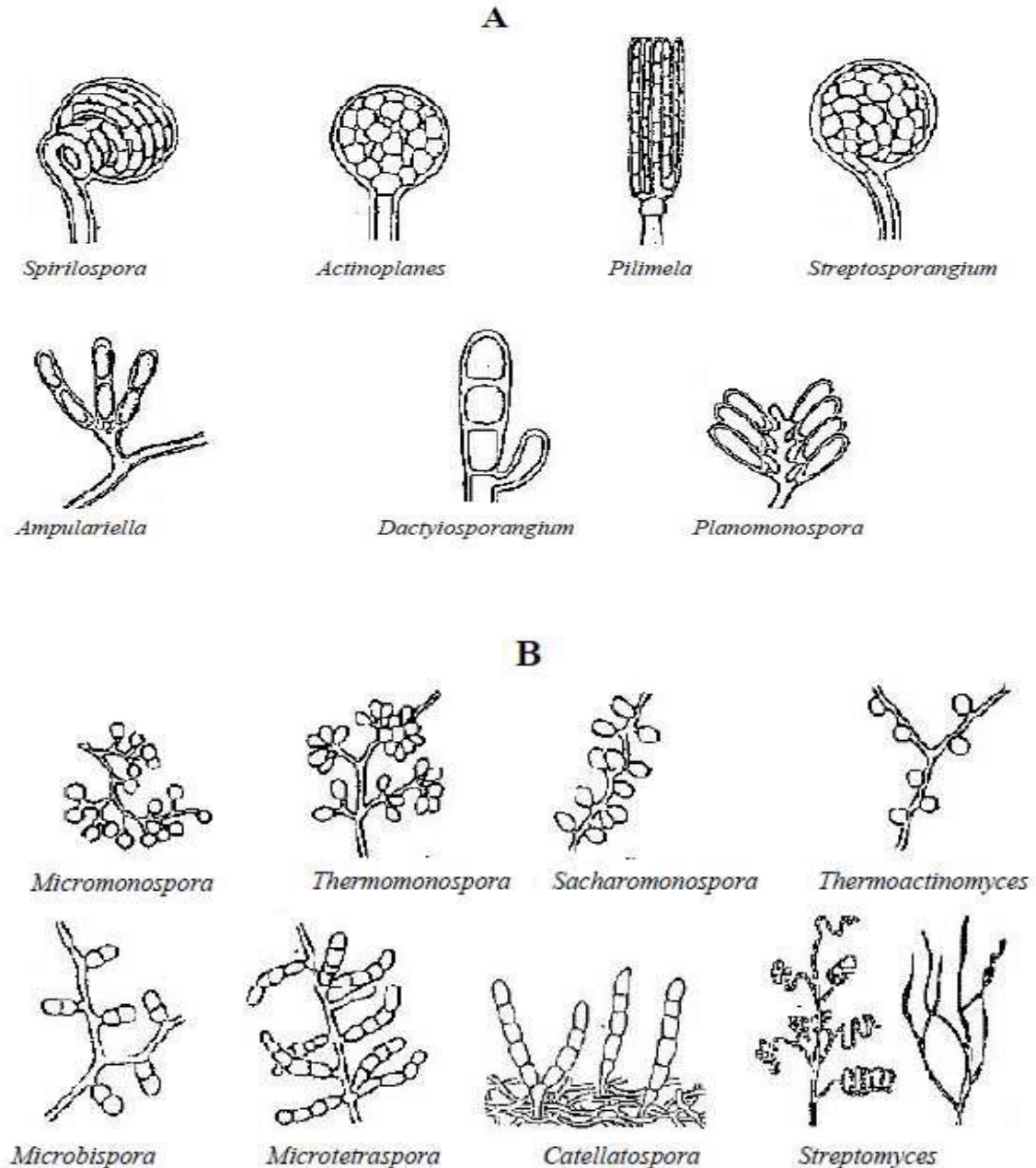


Figure 5 : Différents types de chaînes de spores chez les actinomycètes, (A) spores endogènes; (B) spores exogènes (Errakhi, 2008).

I.5 Physiologie

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'un des principales communautés microbiennes. Leur présence est significativement influencée par les conditions environnantes la température, le PH, l'humidité, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (**Sykes et Skinner., 1973 ; Basilio, 2003**).

I.5.1 le taux d'humidité

En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'au modéré d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas influencés par les conditions semi-arides (**Oskay et al., 2004 ; Prescott et al., 2007**)

I.5.2 La température

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles, cependant il y'a des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50 et 60°C (**Holt et al., 1994**).

I.5.3 Le PH

La plupart des actinomycètes de sol sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de ph y compris 5 à 9 avec une croissance optimale à un ph neutre ou légèrement alcalin (**Lee et Hwang., 2002**).

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des actinomycètes neutrophiles (**Basilio, 2003**). Les souches acidophiles croissent à des valeurs de ph comprises 3,5 à 6,5 avec un ph optimale de croissance compris entre 4,5 à 5,5 tel *Streptacidiphilus jiangxiensis* (**Huang et al., 2004**) et *Streptacidiphilus oryzae* (**Wang et al., 2006**).

I.5.4 Rapport avec l'oxygène

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies strictes comme est le cas d'*Actinomyces* (**Djaballah, 2010**).

I.5.5 Matière organique

En 1986 Henis a montré que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux la matière organique, quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang., 2002).

I.6 Métabolismes

La croissance des actinomycètes est plus lente que celle des autres microorganismes ; le temps de génération moyen est d'environ deux à trois heures (Ottow et Glathe., 1968 ; Larpent et Sanglier., 1989

En générale, les actinomycètes sont des chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, lignine et cellulose). Mais plusieurs espèces sont capable de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebal., 1990).

1.7 Habitat des actinomycètes

Les actinomycètes sont parmi les groupes des micro-organismes les plus largement ubiquitaire dans la nature. Ils se trouvent en abondance dans les sols cultivés et non cultivés dans différentes régions à travers le monde (Ara *et al.*, 2012).

Dans le sol, les actinomycètes représentent 10 à 20% de la population microbienne totale (Chorine, 2009) où elles jouent un rôle majeur dans la décomposition des matières organiques (Wohl et Vaun., 1998 ; Rifaat, 2003 ; Chacko et Ernest., 2012). Mais ils sont présents dans les milieux aquatiques douces et marines tel que les genres *Actinoplanes* et *Micromonospora* (Gérard, 2010) aussi les sources d'eau chaude (Jadoon *et al.*, 2014).

Des actinomycètes ont été isolé à partir d'habitat variés tels que les champs cultivés, les pâturages, les forêts, les rizières, les feuilles fraîches, les résidus végétaux, les sédiments marins ou lacs, les mangroves ou encore les étangs (Chorine, 2009) et les fruits de tomate, de concombre et de haricot saines. (Rakotoarimanga *et al.*, 2014). Certaines espèces ont été isolées à partir des milieux extrêmes : des sols pollués contenant des métaux, des hydrocarbures ou du pétrole, des sols issues des milieux climatiques extrêmes, désertiques ou glacières et de milieux hyper-salés (Chorine, 2009). Les actinomycètes se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on les retrouve au bord des rivières, des lacs et les

champs de riz et les cavernes naturelles, beaucoup sont capables de sporuler ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (Djaballah, 2010).

I.8 Classification des actinomycètes

Dans le volume 4 du « **Bergey's Manual** » (1989) les actinomycètes sont regroupés dans un seul ordre des Actinomycetales, qui est répartie en repartis en 8 groupes, dans lesquels les genres sont rassemblés selon la morphologie et la chimiotaxonomie (Williams *et al.*, 1989; Holt *et al.*, 1994). Dans le volume 5 du « **Bergey's Manual** » (2012) la classification des actinomycètes est basée principalement sur l'analyse de la séquence de l'ARNr16S, alors, les actinomycètes sont classés dans le phylum des Actinobacteria, qui est arrangé en classes, ordres, familles, genres et espèces (Whitman *et al.*, 2012).

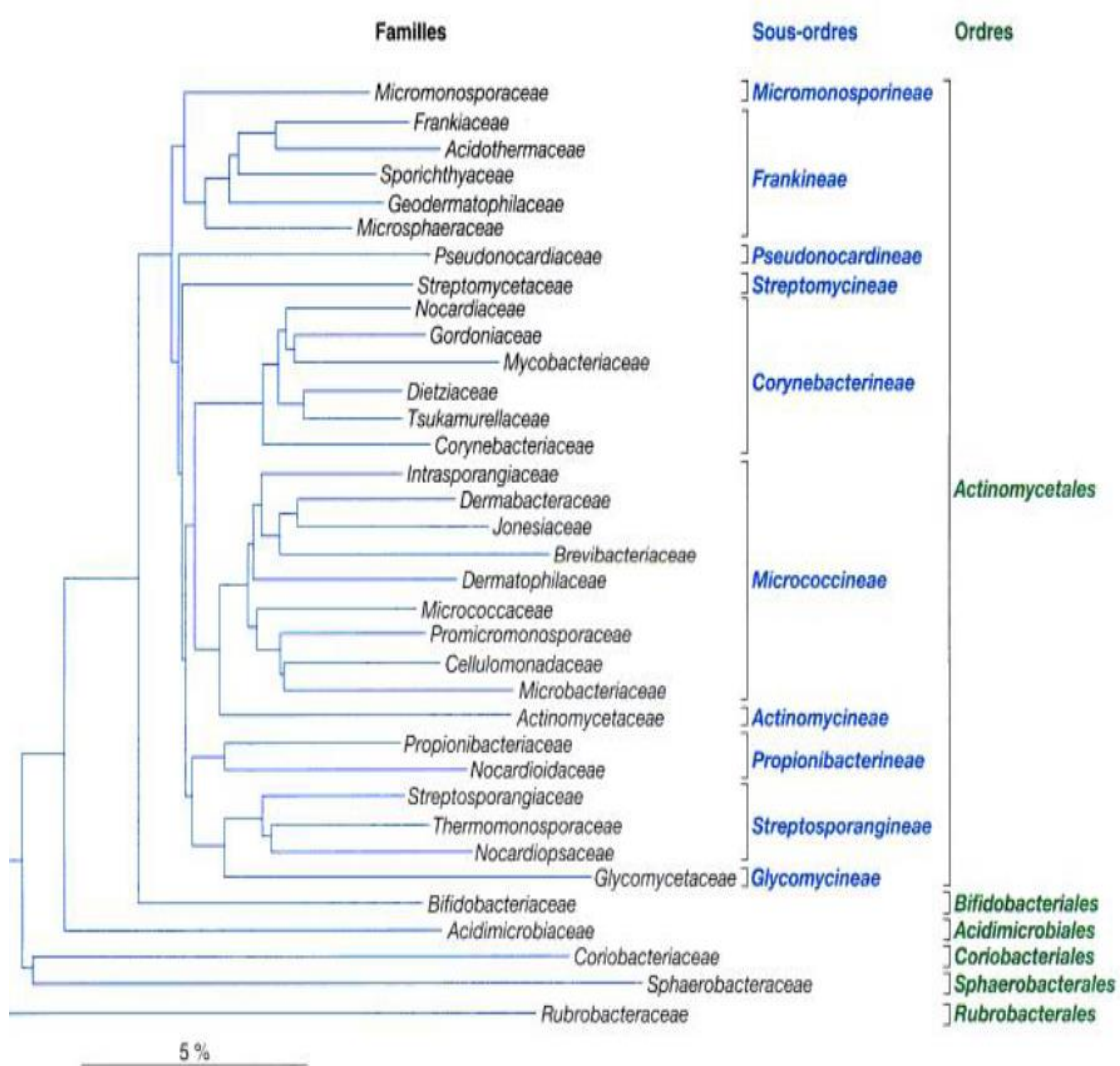


Figure 6. Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN 16S (Prescott *et al.*, 2008).

I.9 Rôle des actinomycètes en biotechnologie

Les actinomycètes sont parmi les groupes des procaryotes les plus utilisés dans le domaine de la biotechnologie et l'économie. Ils sont responsables de la production de la moitié des métabolites secondaires bioactifs découverts, notamment les antibiotiques, les anti-tumeurs, les agents immunosuppresseurs et les enzymes (**Muthu, 2013**). Ils sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs de molécules à activités biologiques (**Boussaber et al., 2012**).

Parmi les rôles des actinomycètes dans la biotechnologie, en plus de la production des antibiotiques et des antifongiques aussi des substances anti-tumorales (**karbab, 2010**), en peut citer :

I.9.1 La production des enzymes

Dans leur environnement naturel, les actinomycètes sont des bactéries saprophytes, ils participent à la dégradation par la production d'enzymes extracellulaires de la matière organique, donc au recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignine, la lignocellulose, la kératine, la chitine, la pectine et le xylène (**Zerizer, 2014**). De ce fait, un large éventail d'enzymes et de leurs produits appliqués dans les industries biotechnologiques et les champs biomédicaux a été rapporté à partir de différents genres d'actinomycètes.

Les actinomycètes ont été continuellement employés dans la production de protéases, cellulases, chitinases, les amylases, les xylanases, glucose oxydase, lipoxygénase, phytase et peroxydases (**Prakash et al., 2013**) et d'autres enzymes tel les mannases (**Seng Hung et al., 2014**).

I.9.2 Amélioration de la qualité de sol agricole

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole. En effet, ils contribuent à la fertilisation du sol, contribuent aux processus de recyclage et de la biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux (**Goodfellow et al., 1984**). Les Actinomycètes ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement dégradables ou non, par les autres microorganismes, comme les polymères complexes: les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine (**Goodfellow et Williams., 1983**).

Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbioses des plantes (**Larpen et Larpen., 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines avec plus de 200 espèces des angiospermes, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi et al., 1992; Thirupl et al., 2001; Pawlowski et Sirrenberg., 2003**).

Ces bactéries contribuent également au maintien d'une bonne structure du sol. En effet, leur structure filamenteuse ainsi que la production des polysaccharides permettent le maintien entre les particules du sol (**Kennedy, 1999**). Ils améliorent aussi l'infiltration de l'eau dans le sol et permettent ainsi une bonne aération du sol (**Mckenna et al., 2002**).

Outre la structure et la fertilité du sol, les actinomycètes augmentent le pouvoir suppressif du sol. **Mazzola (2002)** a montré qu'un sol riche en actinomycètes est suppressif aux maladies phytopathogènes qu'un sol pauvre de ces bactéries.

II Les antibiotiques

II.1 Définition

Les antibiotiques sont des substances chimiques organiques, produit par un petit nombre de microorganismes ou issues de la synthèse chimique et exerçant à faible dose, une action toxique envers d'autre microorganismes (**Boussaboua, 2004**), en inhibant la croissance bactérienne de manière réversible (effet bactériostatique) ou irréversible (effet bactéricide) .

II.2 Classification

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification (**Samaoui, 2010**). Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques (**Samaoui, 2010 ; Yala et al., 2001**). En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs classes, elles même divisées en plusieurs familles à savoir, les β -lactamines, les aminoglycosides, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicetopiperazines, les peptides cycliques, etc. (**Samaoui, 2010**). Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les microorganismes sans détruire nos cellules (**Samaoui, 2010**). Les principaux cibles et modes d'action des antibiotiques sont représentés dans la figure au-dessous.

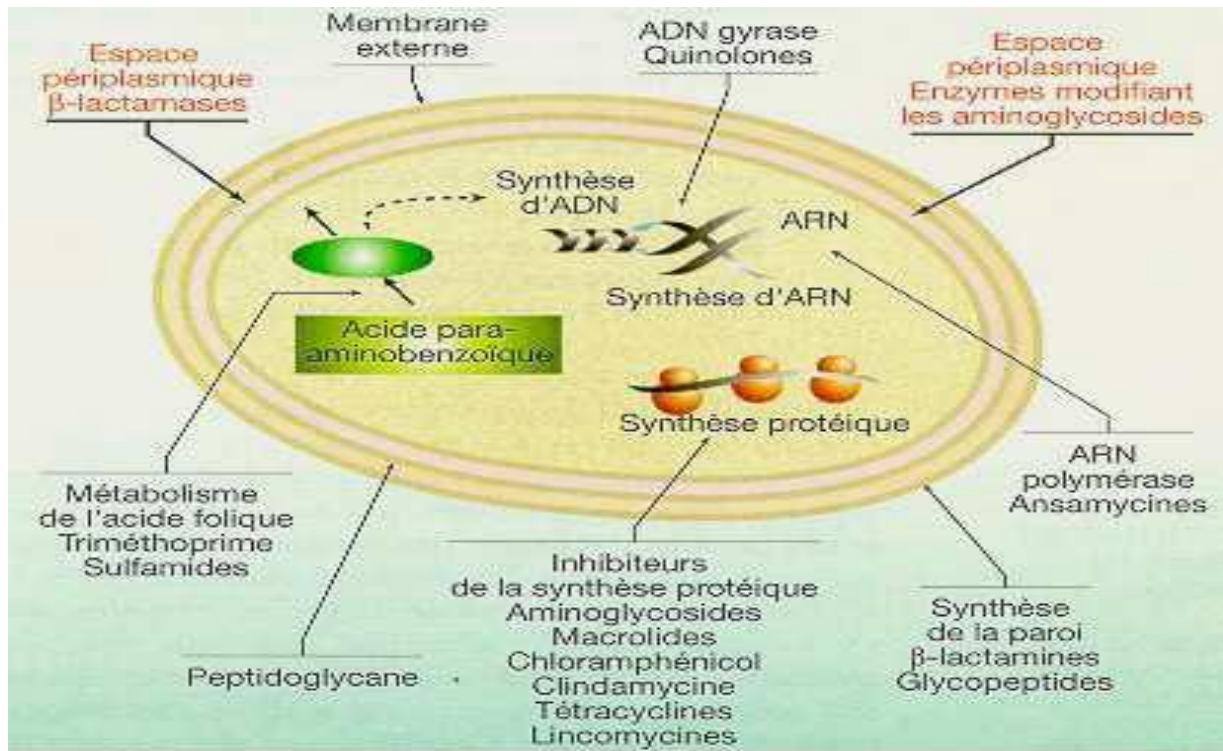


Figure 7 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Samaoui, 2010).

II.3 Mode d'action

Le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre. On distingue :

II.3.1 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram(+) et à Gram(-). La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives. Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les β -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (Samaoui, 2010 ; Kitouni, 2007).

II.3.2 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique

Plusieurs antibiotiques agissent au niveau des ribosomes en bloquant la biosynthèse des protéines des microorganismes (Samaoui, 2010). Les antibiotiques les plus importants sont les macrolides, les aminoglycosides, les tétracyclines et les phénicolés (Boughachiche, 2012).

II.3.3 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier groupe agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, qui ont les folates, en particulier l'acide tetrahydrofolique qui joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Le deuxième groupe intervient au niveau des précurseurs de synthèse. Nous citons à titre exemple les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN tel que les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN (**Samaoui, 2010 ; Locif, 2010**).

II.4 Résistance aux antibiotiques

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à une cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Si l'antibiotique ne parvient pas à pénétrer dans la bactérie ou à se fixer sur une cible, il devient inefficace. Ce phénomène appelé résistance est lourd de conséquences. Ainsi, de nombreux microorganismes pathogènes classiques développent des résistances multiples aux antibiotiques (**Strub, 2008**).

Il existe deux types de résistance aux antibiotiques (**Thierry, 1997**) :

II.4.1 La résistance naturelle

Il s'agit d'une propriété naturelle, intrinsèque au germe. Cela se produit par exemple, lorsque le germe ne possède pas la cible de l'antibiotique.

II.4.2 La résistance acquise

Ce type de résistance n'affecte au départ qu'une seule souche. La modification de la souche provient d'une mutation ou d'une série de mutation.

II.5 Les mécanismes de résistance

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques :

- En se rendant imperméable à leur pénétration
- En produisant des enzymes capables de les inactiver
- En modifiant la structure de leurs cibles (**Caroline, 2008**).

II.6 Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Historiquement, **Waksman** fut le premier à démontrer la richesse des actinomycètes dans ce domaine, il a isolé quatre des premiers antibiotiques utiles : l'actinomycine (1940), anti-tumorale, la streptomycine antibactérienne et antituberculeuse(1944), la néomycine antibactérienne(1949) et la candidine (1953) (**Karbab, 2010**).

Les actinomycètes sont largement reconnus par leur capacité de produire des métabolites secondaires bioactives, spécialement des composés menus d'activité antimicrobienne. Ces bactéries sont responsables de produire deux tiers d'antibiotiques commercialement valable (**Thais et al., 2013**), dont environ 80% sont isolés du genre *Streptomyces*. Même si on inclut les autres métabolites secondaires, ces bactéries restent les plus grands fournisseurs avec environ 60% (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec 80%) (**Boughachiche, 2012**), la plupart de ces bactéries ont été isolé à partir du sol (**Thais et al., 2013**).

Environ 75% des antibiotiques découverts entre 1971 et 1980 appartiennent aux actinomycètes (**Boussaber et al., 2012**). Parmi les antibiotiques produits par les *Streptomyces* on peut citer β -lactamines, tétracyclines, anthracyclines, ansamycines, la fosfomycine (**Boughachiche, 2012**). Les antibiotiques des actinomycètes sont utilisés aussi dans le traitement de certaines maladies des plantes. La blasticidine, par exemple, est active sur *Piricularia oryzae*, un pathogène du riz (**karbab, 2010**).

Des études ont montré l'activité antimicrobienne significative des isolats d'actinomycètes vis-à-vis 90% de *Staphylococcus sp* et *Enterococcus sp* cliniques (**Antunes et al., 2014**), de même une activité antimicrobienne vis à vis trois espèces de *Vibrio* (**Bernal et al., 2015**).

III Les antifongiques

III.1 Définition

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ces organismes forment un groupe phylogénétique homogène constitué de champignons macroscopiques et de champignons microscopiques (mycètes) à savoir les levures et les moisissures qui peuvent être saprophytes ou parasites. Dans ce dernier cas, ils peuvent attaquer soit l'être humain et on parle de mycose, soit les plantes causant ainsi des maladies cryptogamiques (**Samaoui, 2010**).

III.2 Origine des antifongiques

Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits dumétabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de

synthèse. Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (**Bastide *et al.*, 1986**).

III.3 Classification des antifongiques selon l'origine et la structure

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (**Vandeputte, 2008**).

III.3.1 Antifongiques de synthèse chimique

Dans cette classe on peut citer :

- **Les azolés** qui sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (**Vandeputte, 2008**).

- **Les fluoropyrimidines** Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (**Vandeputte, 2008**).

III.3.2 Antifongiques naturels

- **Les polyènes** sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement D-mycosamine.

- **Les échinocandines** Parmi les échinocandines, on peut citer la caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*. Cette molécule est le premier d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs de la synthèse du β _(1,3) D-glucan, composant essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes (**Carle *et al.*, 2003**). Trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de développement : la caspofungine, anidulafungine et micafungine (**Rautemaa *et al.*, 2008**).

- **Les antifongiques non polyéniques** ont des structures assez variées. Ils sont moins importants en thérapie que les polyènes sauf pour quelques-uns comme les aminoglycosides (kasugamycine), les quinones (anthracyclines), les hétérocycles azolés (blasticidine), les aromatiques (griséofulvine), les composés alicycliques (cycloheximide). Leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans l'agriculture est parfois courante (**Zitouni, 1995**).

III.4 Mode d'action des antifongiques

Le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre. On distingue :

- Les antifongiques qui Inhibent la synthèse de l'ergostérol
- Les antifongiques qui ruptures la membrane et la paroi exemple Ciclipirox olamine
- Les antifongiques qui Inhibent la synthèse de thymidylate, exemple Flucytosine
- Les antifongiques qui Inhibent la synthèse du glucane, exemple Caspofungine, Anidulafungine
- Les antifongiques antimitotiques, et qui ruptures le fuseau cellulaire, exemple Griséofulvine (**Tighidet, 2011**).

III.5 Mécanismes de résistances

Tout comme chez les bactéries, il existe deux types de résistances chez les champignons: les résistances naturelles et les résistances acquises. Ces résistances acquises surviennent rarement, mais principalement après l'exposition à un antifongique, et peuvent correspondre à un état d'adaptation transitoire ou définitif.

En tous cas, les champignons se défendre contre l'action des antifongiques par les actions suivantes :

- Des modifications structurelles du contenu en stérols de la paroi cellulaire ou la diminution de l'ergostérol membranaire.
- Augmentation de la synthèse des chitines.
- Polymorphisme chez cératines levures.
- Modification de la cible (**Tighidet, 2011**).

III.6 les antifongiques produits par les actinomycètes

En plus de grand nombre des métabolites agro-actif produits par les actinomycètes, ils peuvent aussi jouer un rôle important dans l'agriculture comme des agents biocontrôleurs, un antagonisme contre une grande variété des plantes pathogènes (**Ara et al., 2012**).

Plusieurs espèces des actinomycètes, on particuliers celle qu'appartiennent au genre *Streptomyces* sont bien connus comme des agents biocontrôleurs antifongiques dont ils inhibent le développement des champignons phytopathogènes. Cette activité antagonistique contre les champignons pathogènes est liée à la production des composés antifongiques (**Ara et al., 2012**).

Parmi les antifongiques produits par les actinomycètes, on peut citer les pramicidines qui sont des antifongiques synthétisés par une souche d'*Actinomadura bibisca* (**karbab, 2010**). Elles sont très actives contre des infections systémiques fongiques malgré leur activité modérée in vitro (**karbab, 2012**).

Selon **Rakotoarimanga et al., 2014**, des isolats d'actinomycètes ont montré une activité antifongique contre le champignon *Fusarium sp* in vitro. De même contre les

champignons *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, et *Aspergillus flavus* in vitro (Ara *et al.*, 2012), aussi contre le champignon *Rhizopus stolonifer* (Boussaber *et al.*, 2012).

Matériel

et

méthodes

I Isolement des actinomycètes

I.1. Échantillonnage

Le prélèvement des échantillons a été effectué durant le mois de Décembre 2014 à partir de trois sites différents : sol rhizosphérique (figure 9) situé dans la forêt d'Al Hamma (figure8), le sol rhizosphérique (figure11) situés dans Djebel Aurès (figure10), ces deux régions sont situées dans la wilaya de kenchela, la troisième échantillon a été prélevé à partir de la Sebka (figure12, 13) située dans la wilaya d'Oum El Bouaghie.



Figure 8: forêt Al Hamma- Khanchela



Figure 9 : zone du prélèvement



Figure 10 : montagne de l'Aurès (Khanchela)



Figure 11 : zone du prélèvement (montagne d'Aurès)



Figure 12 : Sebka Oum El Bouaghie



Figure 13 : zone du prélèvement(Sebka)

Les trois échantillons de sol ont été prélevés selon la technique de **Pochon Tardieux (1962)** qui consiste à prélever à l'aide d'une grande spatule stérile, après avoir écarté les cinq à dix premiers centimètres de la couche superficielle du sol, une quantité de sol de chaque région et la déposer sur une feuille d'aluminium stérile ; puis, après avoir retiré les pierres et racines, chaque échantillon trié est placé dans un flacon stérile et transporté au laboratoire (**Boussaber, 2012**), les échantillons sont tamisés puis laissés à sécher à l'air libre et à température ambiante pendant une semaine (**Karbab, 2011**).

I.2 Isolement des actinomycètes

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions. On met en suspension 10g du sol sec de chaque échantillon dans 100 ml d'eau physiologique stérile (Na Cl 9 g.L⁻¹). Après homogénéisation au vortex, des dilutions décimales dans l'eau physiologique stérile de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁵ sont effectuées (**Hang et al., 2014**). Puis on prélève 100 µl de chaque dilution par une micropipette et on l'étale à la surface des boîtes pétries contenant le milieu de culture Olson (annexe 1) additionné de l'antifongique la nystatine par des pipettes pasteur stériles. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 28±1°C pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement (**Boussaber et al., 2012**).

I.3 Examens microscopique et macroscopique

L'aspect des colonies sur milieu solide (forme et pigmentation) est un critère important d'identification. L'allure des contours (réguliers, irréguliers...), la surface (colonie lisse et brillante, rugueuse...) et la consistance (colonie crémeuse, sèche...) sont des éléments à relever. L'odeur apporte également une information précieuse pour quelques souches (**Guiraud et Galzy., 1980**).

Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes sont observées au microscope (x 100) à l'état frais.

I.4 Purification des isolats

Afin d'obtenir des cultures pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries dans des boîtes pétri contenant le milieu de culture YMEA (annexe 1), puis incubées pendant 2 à 3 semaines à 28°C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possible, pour conserver la stabilité génétique des souches (**Djaballah, 2010**).

I.5 Conservation des isolats

Après purification, seules les colonies représentant l'aspect filamenteux d'actinomycète sont prélevées à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, puis conservées dans le milieu YMEA (annexe 1) liquide additionné du glycérol coulé dans des tubes eppendorfs stériles. Après agitation par vortex, ces tubes sont conservés dans un congélateur à -20 °C.

II Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

II.1 Activité antibactérienne

II.1.1. Préparation des inocula de bactéries-tests

Pour chaque souche test, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive (annexe 1). Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure de chaque souche test sont prélevées et transférées dans des tubes à essais contenant l'eau physiologie stérile (9ml). Après agitation par vortex et assurance que la turbidité de ces tubes équivalente à 0,5 Mc Ferland (annexe 1). Un prélèvement à partir de chaque tube est réalisé par un écouvillon et sert à ensemençer les boîtes de Pétrie contenant le milieu Muller-Hinton (annexe 1) par la technique d'écouvillonnage.

L'activité antibactérienne a été testé vis-à-vis quatre bactéries à Gram positif et quatre bactéries à Gram négatif qui sont discutées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Souches utilisées dans le test d'activité antibactérienne

| Bactérie test | Gram | Origine |
|--|---------|----------------------------|
| <i>Bacillus aureus</i> | Positif | Hôpital CHU de Constantine |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 | Positif | Hôpital de kenchela |
| <i>Staphylococcus aureus MRSA</i> ATCC43300 | Positif | Hôpital de kenchela |
| <i>Streptococcus fecalis</i> | Positif | Hôpital CHU de Constantine |
| <i>Klebsiella pneumonie</i> | Négatif | Hôpital CHU de Constantine |
| <i>Enterobacter sp</i> | Négatif | Hôpital CHU de Constantine |
| <i>Acinetobacter sp</i> | Négatif | Hôpital CHU de Constantine |
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | Hôpital de kenchela |

II.1.2 Mise en évidence d'activité antibactérienne

II.1.2.1 Technique des cylindres d'Agar

Les différents isolats actinomycétales obtenue sont ensemencés par stries serrées à la surface de milieu YMEA (annexe1) coulées dans des boites pétri. Après 14 jours d'incubation à 28°C, des cylindres de 6 mm de diamètre sont prélevés à partir de ces boites par un emporte-pièce stérile et sont déposés à la surface des boites de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton (annexe 1) et ensemencées préalablement par les bactéries-tests. Puis ces boites sont placées deux heures dans le réfrigérateur à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives, ensuite, ces boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures (**Boughachiche, 2012**). Les zones d'inhibition sont mesurées après l'incubation.

II.2 Activité antifongique

L'antagonisme des actinomycètes vis-à-vis *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* se manifeste par l'inhibition de la croissance mycélienne de ces champignons lorsqu'ils sont cultivés ensembles avec ces bactéries dans une même boite de Pétri (**Rakotoarimanga et al., 2014**).

L'activité antifongique des actinomycètes isolés vis-à-vis deux champignons concernés, (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*), qui ont été fourni par le laboratoire de Mycologie, université de Constantine 1, a été effectué sur le milieu PDA (annexe 1) par la techniques des cylindres d'agar (**Boussaber, 2012**).

Un cylindre de chaque isolats actinomycétale est prélevé à l'aide d'une pince stérile et mise en culture sur milieu de culture PDA, puis on ensemence chaque champignons par touche sur la même boite de pétri (**Rakotoarimanga et al., 2014**) par une anse stérile. Les boites portant les cylindres sont maintenues à 4°C pendant 24h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 heures d'incubation 30°C (**Tighidet, 2011**).

Résultats

et

discussion

I Isolement des Actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité de produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance,..... etc. De ce fait, les actinomycètes peuvent représenter un moyen de lutte efficace, persistant et sans effets négatifs vis-à-vis de l'environnement en comparaison avec les traitements chimiques et remplacer ainsi l'utilisation des antibiotiques systémiques (**Loqman, 2009**).

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rigoureuses, colorés ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien. Certains actinomycètes montrent seulement un mycélium du substrat (**Boudemagh, 2007**). Dans notre travail, toutes les colonies ont été isolées dans le milieu Olsen additionné d'un antifongique la nystatine par la méthode de suspension-dilution, puis purifiés par repiquage dans le milieu YMEA et incubées à 28°C pendant 7 à 15 jours.

À partir de ces deux milieux sélectifs utilisés, **99** isolats actinomycétales ont été isolées, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose) (figures 14, 15). Il est à signaler que les zones rhizosphériques sont 10 fois plus peuplées par les actinomycètes, que les zones profondes et non rhizosphériques (**Chelli, 2010**).

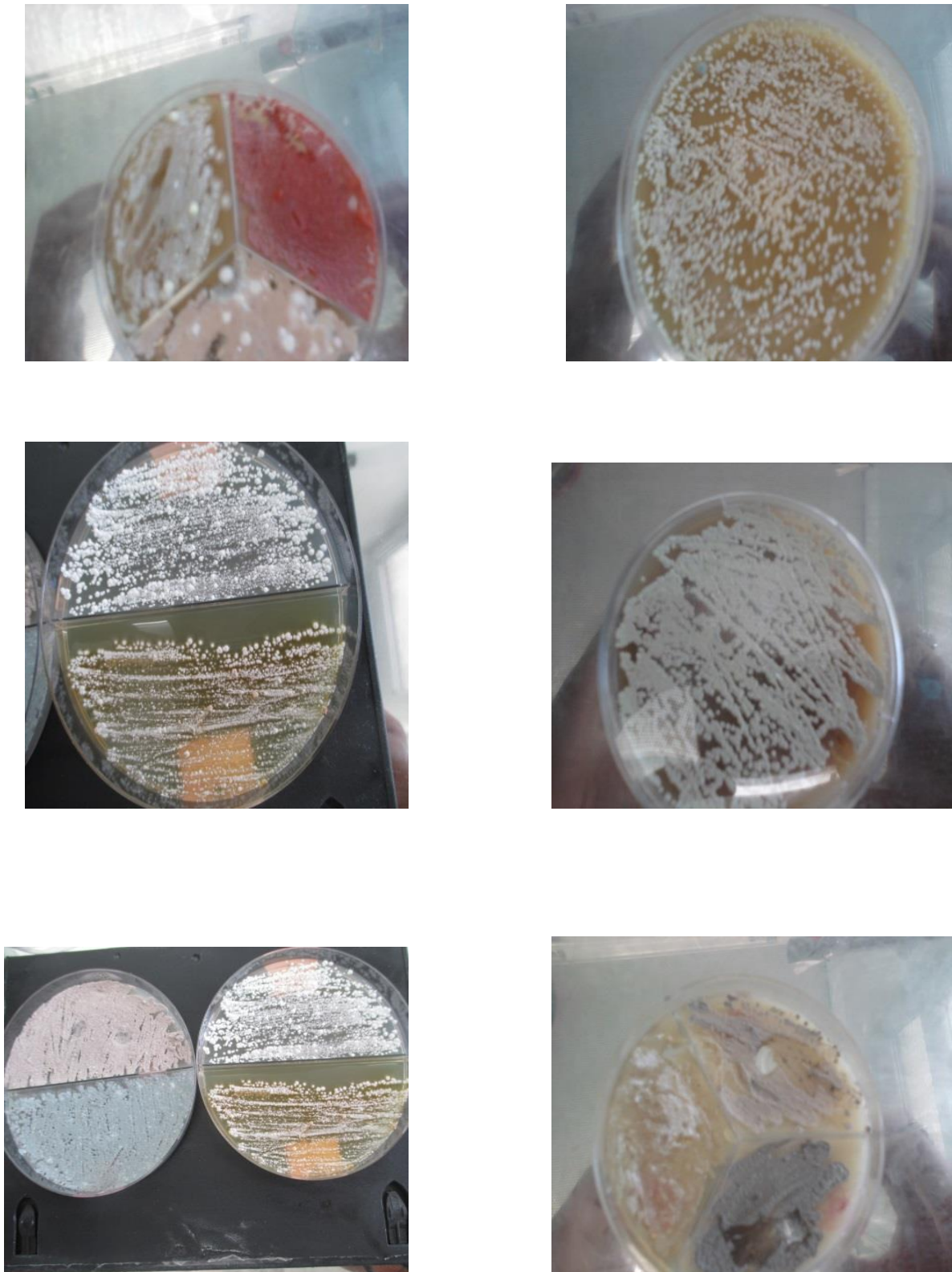


Figure 14 : Aspect macroscopique de 14 isolats actinomycetales du sol forestier rhizosphérique d'Al Hamma après 14 jours d'incubation

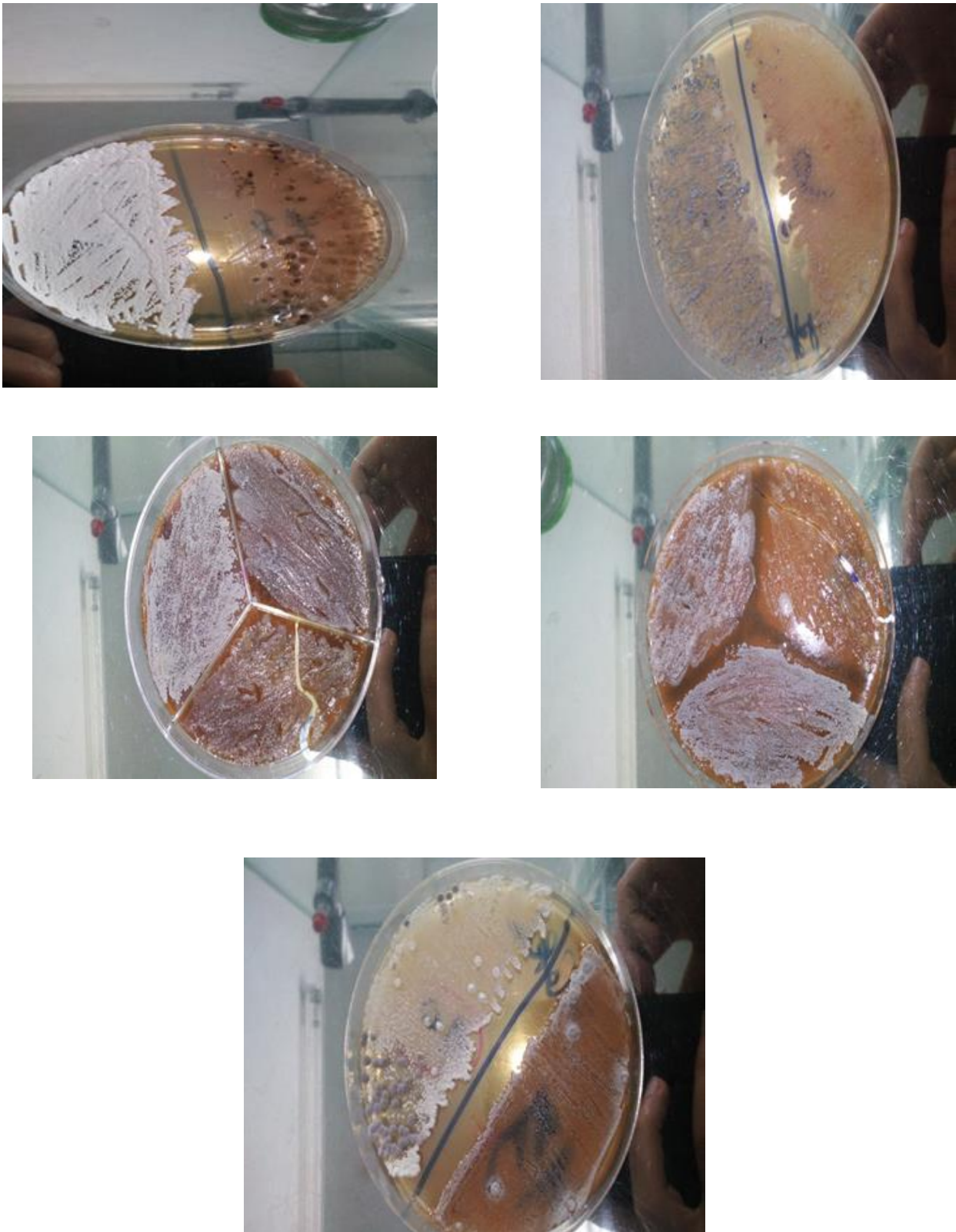


Figure 15 : Aspect macroscopique de 12 isolats actinomycetales du sol de la Sebkha après 14 jours d'incubation

Tableau 2: Nombre des isolats actinomycetales de chaque échantillon de sol

| Code de l'échantillon | Origine | Nombre des isolats |
|-----------------------|--|--------------------|
| E1 S.F.R | Sol Forestier Rhizosphérique d'Al Hamma (Khanchela) | 65 |
| E2 S.S.G | Sol de Sebkha (Oum Al Bouaghie) | 23 |
| E3 S.M.A | Sol Montagneux | 11 |

Selon les résultats présentés dans le tableau 2, il apparait clairement que le nombre d'actinomycètes isolées de l'échantillon E1 (sol rhizosphérique forestier) est nettement supérieur à celui obtenu à partir des autres échantillons avec un pourcentage qui égale **65,6%** suivie de l'échantillon E2 (**23,2%**) et à moins importance l'échantillon E3 (**11,1%**) (**figure 16**). Même résultats ont été rapporté par **Boussaber et al., 2014** dont ils ont isolé (30,30%) de souches actinomycétales à partir du sol rhizosphérique. Ceci peut s'expliquer par le fait que le sol forestier rhizosphérique est riche en matière organique ceci est corroboré par la bibliographie des actinomycètes qui affirme que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de la matière organique (**Lee et Hwang., 2002**).

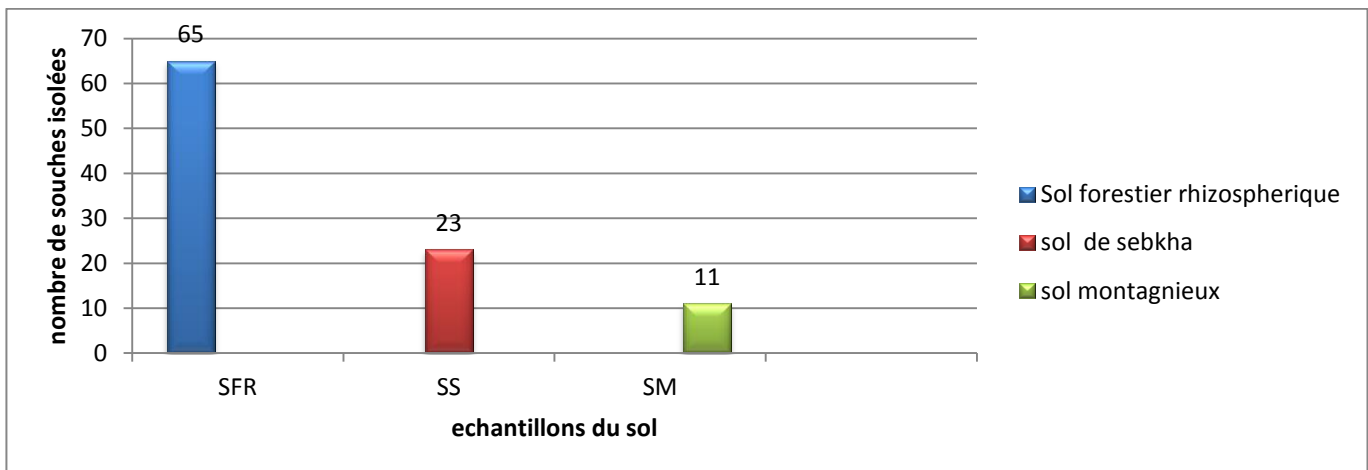


Figure 16: nombre des isolats actinomycetales de chaque échantillon du sol

Ce lui la pourrait être expliqué par le fait que le sol rhizosphérique qui est en contacte directe avec l'espèce végétarienne favorise la croissance des actinomycètes.

L'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose un problème. En effet, trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait la facilité d'isolement des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (**Williams et al., 1982; Crawford et al., 1993**).

Pour cela, le milieu Olson avec sa composition en sodium caséinate et l'asparagine favorable pour la sélection des actinomycètes à partir du sol. Le deuxième milieu sélectif qui a été utilisé pour la purification est le milieu YMEA parce qu'il contient le Ca CO_3 qui favorise la sporulation des actinomycètes. **Hilali *et al.*, 2002** a prouvé l'importance de ce milieu dans l'isolement des actinomycètes.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement sélectif des actinomycètes et l'une de ces techniques est l'addition au milieu d'isolement des substances inhibitrices stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpen et Sanglier., 1989; Ouhdouche *et al.*, 2001; Hilali *et al.*, 2002; Jung et Byung., 2002**).

C'est cette méthode qu'on a adopté dans notre travail. La nystatine à une concentration respectivement de 10 et 50 $\mu\text{g/mL}$ est l'un des antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isolements des actinomycètes (**Dulaney *et al.*, 1955 ; Porter *et al.*, 1960**). La nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davies., 1965**) ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, en plus cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur croissance même en augmentant sa concentration à 100 $\mu\text{g/mL}$.

II. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Le spectre d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes retenues a été recherché par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis de quatre bactéries à Gram positif et quatre bactéries à Gram négatif (tableau 1). Les résultats obtenus de chaque échantillon de sol sont illustrés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau N°3 : Résultat de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées à partir du sol forestier rhizosphérique contre les microorganismes cibles (en mm).

| Numéro des isolats | Bactéries à Gram positif Diamètre d'inhibition (mm) | | | | Bactéries à Gram négatif Diamètre d'inhibition (mm) | | | | Champignons pourcentage d'inhibition (%) | |
|--------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|------------------------|-------------------------|----------------|---|--------------------------|
| | <i>Bacillus Subtilis</i> | <i>Staphylococcus ATCC 25923</i> | <i>Staphylococcus MRSA 43300</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Enterobacter sp</i> | <i>Acinetobacter sp</i> | <i>E. coli</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| 1 | 16 | 26 | 25 | 21 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | 32,43% | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - |
| 9 | 8 | 25 | 26 | 25 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 20 | 17 | 16 | - | - | 21 | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - |
| 13 | 21 | 20 | 20 | - | - | - | 25 | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - | - | - | 32,43% | 44,44% |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | - | - | 15 | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | 32 | 25 | - | 21 | 30 | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | 22 | - | - | - | - |
| 20 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Suite du tableau N 3

| Numéro des isolats | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus MRSA43300</i> | <i>Staphylococcus ATCC25923</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae sp</i> | <i>Enterobacter sp</i> | <i>Acinetobacter sp</i> | <i>E.coli</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
|--------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | 40,54% | - |
| 22 | 22 | 21 | 20 | 10 | - | - | 30 | - | 29,72% | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | 19 | 29 | 30 | 23 | 26 | 25 | - | - | - | - |
| 26 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 48,88% |
| 27 | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | 57,77% |
| 28 | 20 | 28 | 26 | - | - | 20 | - | - | 54,05% | 66,66% |
| 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 55,55% |
| 34 | - | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 35 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 36 | 30 | 15 | - | - | - | 15 | - | - | 43,24% | 55,55% |
| 37 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 | 25 | 20 | 26 | - | - | - | 15 | - | 45,94% | 66,66% |
| 39 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 55,55% |
| 40 | 10 | 20 | 15 | - | - | - | 18 | - | - | - |
| 41 | 22 | 22 | 14 | - | - | 14 | 30 | - | - | - |
| 42 | 20 | 23 | 11 | - | - | - | 10 | - | - | - |
| 43 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Suite du tableau N 3

| Numéro des isolats | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus ATCC 25923</i> | <i>Staphylococcus MRSA 43300</i> | <i>Enterococcus Faecalis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Enterobacter sp</i> | <i>Acinetobacter sp</i> | <i>E. coli</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
|--------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|
| 44 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 45 | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | 21 | 24 | 19 | - | - | - | 21 | - | 48,64% | 75,55% |
| 47 | - | - | - | - | - | - | - | - | 32,43% | 51,11% |
| 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | 17 | 22 | 19 | - | - | - | 15 | - | 48,64% | 66,66% |
| 50 | 10 | 22 | 15 | 10 | - | 20 | 20 | - | - | 44,44% |
| 51 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 55 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 46,66% |
| 56 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 57 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 58 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 59 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 60 | - | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - |
| 61 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 57,77% |
| 62 | - | - | - | - | - | 25 | - | - | 37,83% | 44,44% |
| 63 | 19 | 15 | 15 | - | - | 10 | - | - | 40,54% | 51,11% |
| 64 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 65 | - | - | - | - | - | 17 | - | - | - | - |

(-) : absence d'activité

Tableau N°4 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats actinomycetales de l'échantillon de sebkha (Oum El Bouaghie) contre les microorganismes cibles (mm).

| Numéro des isolats | Bactéries à Gram positif Diamètre d'inhibition (mm) | | | | Bactéries à Gram négatif Diamètre d'inhibition (mm) | | | Champignons Pourcentage d'inhibition (%) | |
|--------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|------------------------|-------------------------|---|---------------------------|
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus ATCC 25923</i> | <i>Staphylococcus ATCC 43300</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Enterobacter sp</i> | <i>Acinetobacter sp</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| 1 | 29 | 23 | - | - | - | 30 | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | 10 | 16 | 20 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 29 | - | - | - | - | - | 14 | - | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | 16 | 13 | 20 | - | - | 15 | - | - | - |
| 18 | - | 15 | 20 | - | - | 18 | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | 16 | 14 | - | - | - | 15 | - | - | - |
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | - | 20 | - | - | - | - | 30 | - | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(SS):Sol de la Sebkha.

(-) : absence d'activité.

1 Test d'activité antibactérienne

Échantillon n°1 : sol forestier rhizosphérique

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que le diamètre de zone d'inhibition se diffère entre les isolats d'une part et d'une bactérie teste à l'autre à d'autre part, dont il y'a des isolats qui ont présenté une activité contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif à la fois comme les isolats suivantes (10,13,22,25,28,36,38,41,42,46,49,50 et 63), par contre d'autres isolats ont présenté une activité contre un seul type de bactéries soit à Gram positif ou à Gram négatif en citant comme exemple les isolats (1, 9,17, 20, 34, 45) qui sont actives seulement contre les bactéries à Gram positif. Tandis que les isolats (4, 8, 11,12, 14,19, 60 et 65) sont actifs seulement contre les bactéries à Gram négatif. En outre le reste des isolats n'ont montré aucune activité antibactérienne.

Un pourcentage de **41,54%** d'actinomycètes isolés par rapport au total (65 souches) souches, ont montré une activité antibactérienne contre au moins un des germe cibles testés.

Il apparait clairement que l'activité contre les bactéries à Gram positif a été plus importante que celle contre les bactéries à Gram négatif, essentiellement dans le cas de l'activité contre *Bacillus subtilis* (**74,07%**) qui était la souche test la plus sensible avec la plus grande zone d'inhibition figure (17) et qui a été obtenue avec l'isolat 18 contre *Acinetobacter* avec un diamètre d'inhibition égale à 32mm.

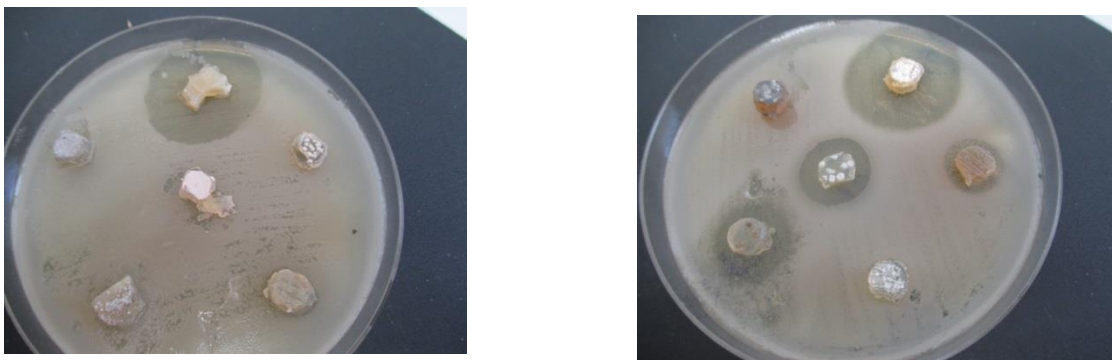


Figure 17 : photographie de l'activité antibactérienne d'isolats actinomycetales du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis la bactérie test *Bacillus subtilis*

Et à moindre degré le reste des bactéries teste à Gram positif respectivement *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (**66,66%**) figure 18, *Staphylococcus aureus* 43300 (**59,26%**) puis *Streptococcus fecalis* (**22,22%**).

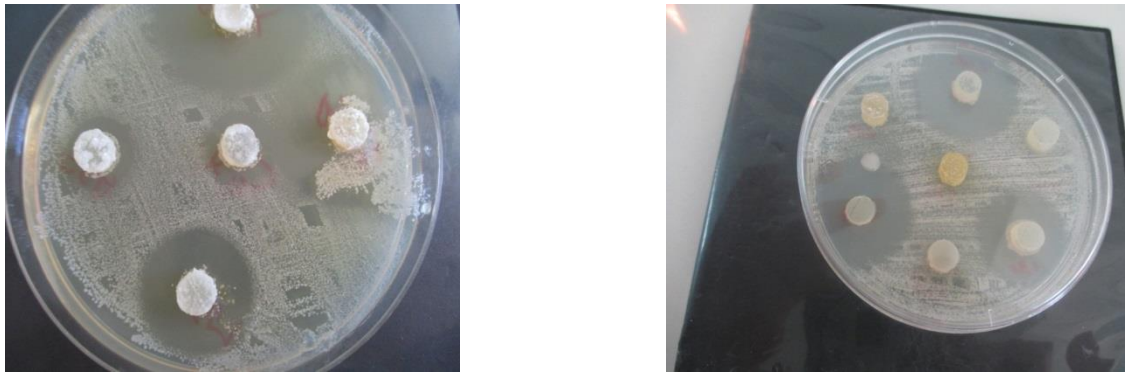


Figure 18 : photographie de l'activité antibactérienne des isolats actinomycétales du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis la bactérie test *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

En outre, les résultats montrent que parmi les huit bactéries testées exploitées, la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (0%) apparaît comme la souche la plus résistante dont aucune des isolats a été active vis-à-vis d'elle aussi la souche teste *Klebsiella pneumoniae* (7,41%) a présenté une résistance à l'exception de deux isolats d'actinomycètes qui sont l'isolat 18 et l'isolat 25 avec un diamètre d'inhibition égale à 30, 26 mm respectivement. Tandis que les deux autres souches Gram négatif *Enterobacter* (48,14%) et *Acinetobacter* (37,03%) ont été les plus sensibles.

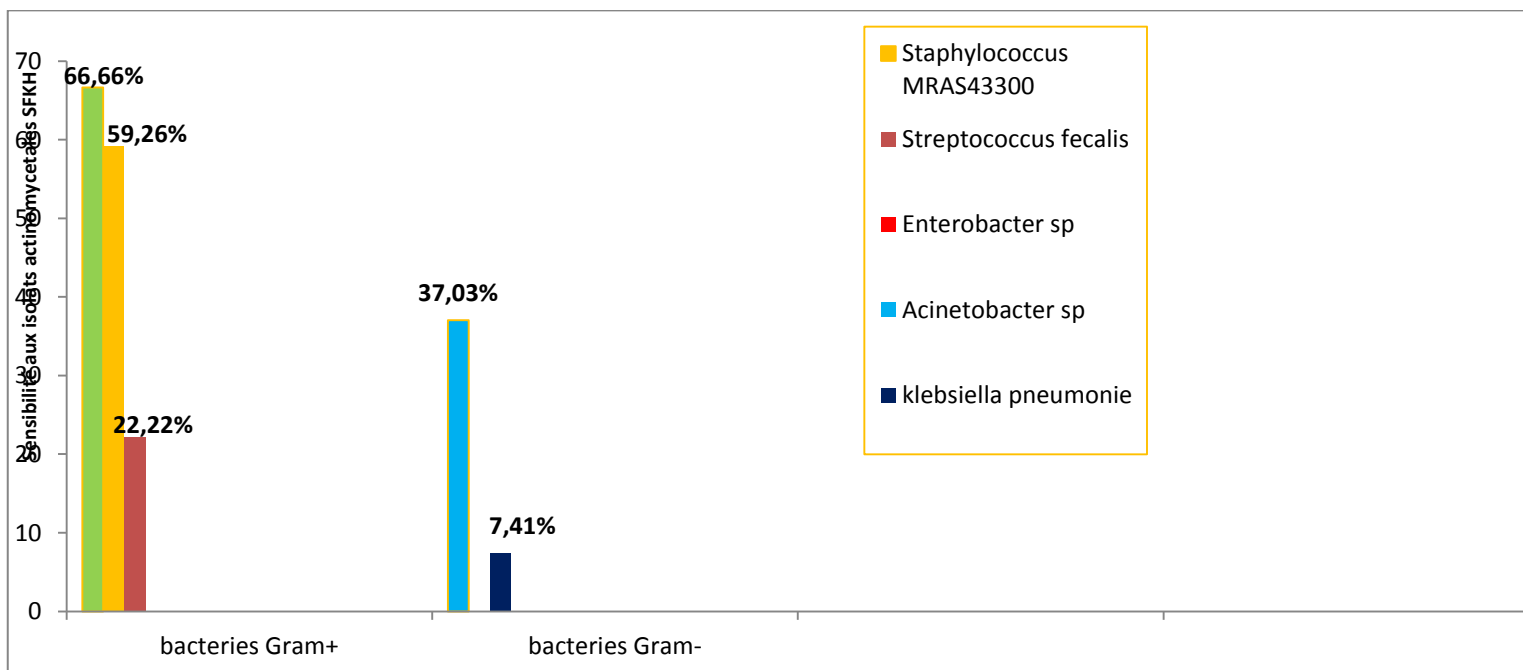


Figure 19: La sensibilité des souches microbiennes testées aux isolats actinomycétales du sol forestier rhizosphérique.

Échantillon N°2 : le sol de la sebkha

Les résultats présentés dans le tableau 4 illustrent que 7souches (30,43%) parmi les 23 isolats actinomycétales ont une activité inhibitrice contre au moins une souche microbienne teste dont *Klebsiella pneumonie* et *Enterococcus fecalis* ont été les souches testes les plus résistantes aux isolats d'actinomycètes.

Il ressort du tableau 4 que l'activité contre les bactéries à Gram positif a été plus importante que celle des bactéries à Gram négatif figure 20. L'isolat 4 a montré une activité plus importante vis-à-vis la bactérie teste à Gram positif *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition égale à 29mm, même vis-à-vis la bactérie à Gram négatif *Enterobacter sp* avec un diamètre d'inhibition égale à 30mm. D'autre part l'isolat 22 a montré une activité importante contre la bactérie *Acinetobacter sp* avec une zone d'inhibition égale à 30mm, Alors que les isolats (2,3,, à 23) n'ont montré aucune activité. Le reste des isolats ont montré une activité qui se diffère entre faible avec l'isolat 13 vis-à-vis *Bacillus subtilis* à modéré avec une zone d'inhibition qui se diffère entre 15 à 23mm vis-à-vis au moins une souche teste.

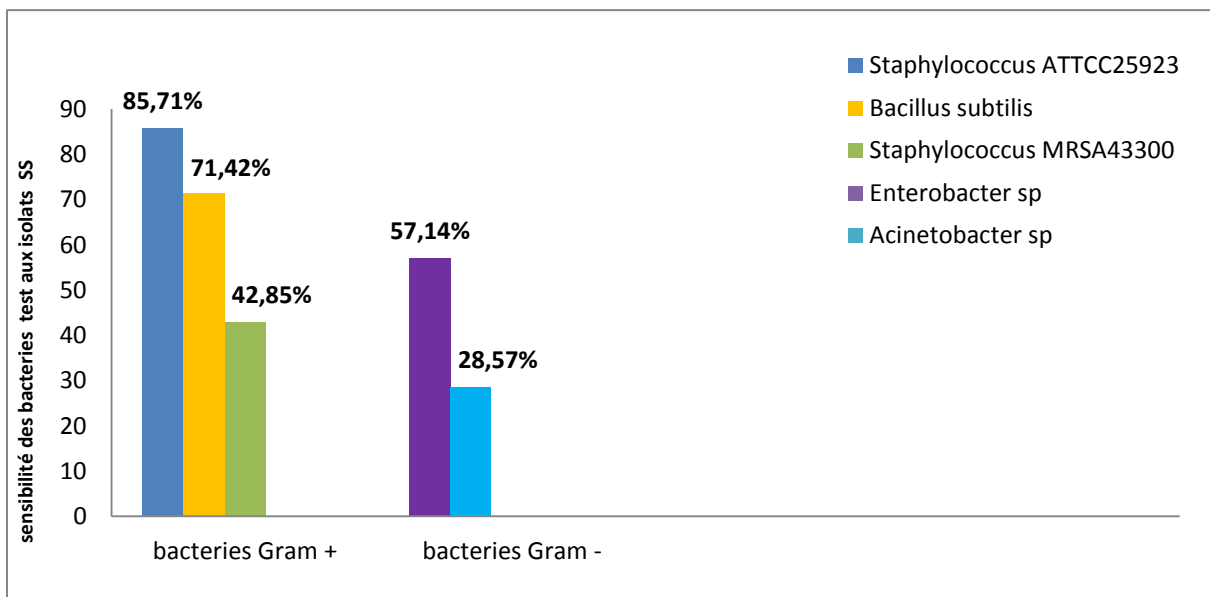


Figure 20 : La sensibilité des souches microbiennes testées aux isolats actinomycetales de la Sebkha.

En ce qui concerne les germes testes, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des isolats actinomycetales en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, ceci a été également constaté par **Hasavada et al. (2006)** et **Atta et al., (2009)**. C'est probablement la structure de leur paroi cellulaire, constituée préalablement

de peptidoglycane, qui rend ce groupe de bactéries plus sensible. Par contre la paroi des bactéries à Gram négatif est formée d'une couche externe composée d'un complexe lipopolysaccharides, des phospholipides et des protéines.

Au bilan, les résultats figurés dans les tableaux N° 3,4 nous permettant de conclure que, d'une part, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie teste à l'autre et d'autre part pour la même souche actinomycétale, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie teste à l'autre.

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

II Test d'activité antifongique

L'activité antifongiques des isolats actinomycetales a été mise en évidence sur le milieu de culture PDA par la technique des cylindres d'agar, selon laquelle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des isolats envers les champignons phytopathogènes tests utilisé par la relation $I\% = (C-T)/C \times 100$.

I %: pourcentage d'inhibition.

C : Diamètre de croissance de champignons dans la boîte contrôle (*Aspergillus niger* (**45mm**), *Fusarium oxysporum* (**37 mm**)).

T : Diamètre de croissance de champignons dans la boîte testée.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 3,4, d'où on constate que plusieurs souches montrent des activités intéressantes vis-à-vis les deux champignons à la fois notamment les isolats 14, 28, 36, 38, 46, 47, 49, 62 et 63. D'autres isolats au contraire n'ont montré aucun antagonisme vis à vis les champignons utilisés notamment les isolats de la Sebka. Les résultats indiquent aussi que le champignon *Aspergillus Niger* (**84,21%**) a été le plus sensible que *Fusarium oxysporum* (**62,5%**) par rapport aux isolats de la rhizosphère figure 21,22. Ces résultats corroborent avec ceux d'**Augustine et al., (2005)** qui ont montré que les souches testes filamenteuses appartenant au genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives produites par les actinomycètes.



Figure 21 : photographie de l'activité antifongique des isolats du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis *Aspergillus niger*

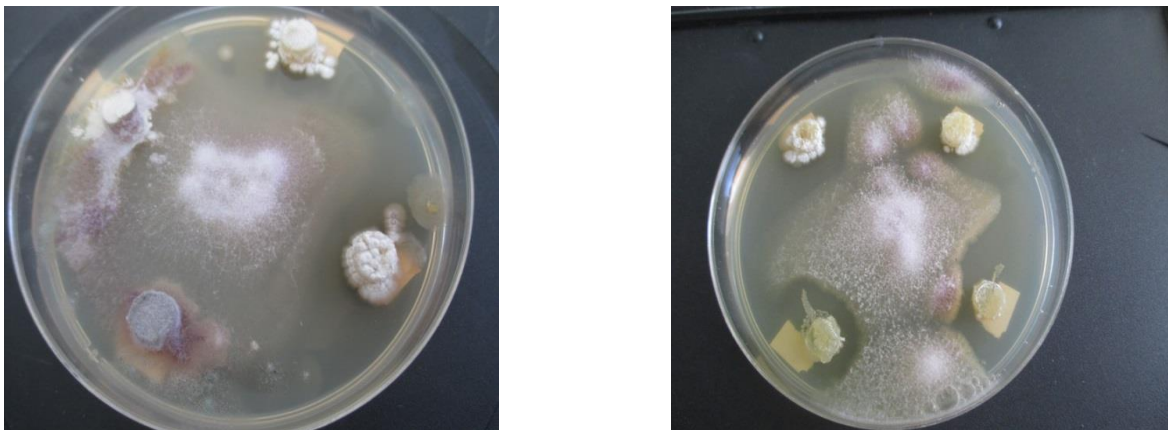


Figure 22 : photographie de l'activité antifongique des isolats du sol forestier rhizosphérique vis-à-vis *Fusarium oxysporum*

En outre les résultats présentées dans le tableau 3 montre que la zone d'inhibition la plus importante a été obtenue avec l'isolat 46 vis-à-vis *Aspergillus niger* avec un pourcentage d'inhibition égale à 75,55%.

Par contre la plus faible a été obtenue avec l'isolat 22 avec un pourcentage égale à 29,72% vis-à-vis *Fusarium oxysporum*.

Conclusion

et

perspectives

Conclusion et perspectives

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible ; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressive pour l'hôte semble toujours indispensable.

Les Actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par le genre *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers de quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les Actinomycètes (**Belyagoubi, 2014**).

L'objectif de ce travail est la sélection des isolats actinomycétales à activité antibactérienne et antifongique à partir d'une collection de souches à partir de différentes régions. Nous avons procédé à l'isolement et l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des isolats vis-à-vis huit bactéries multi-résistantes et deux champignons pathogènes par la méthode des cylindres d'agar. Concernant l'activité antibactérienne, il est à souligner que sur **88** isolats du sol forestier rhizosphérique et de sol de la Sebkhah, seul **34** souches (**38,63%**) sont actives. La majorité des isolats actives agissent sélectivement contre les bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus MRSA 43300*. D'après les résultats obtenus dans le test d'activité antifongique, on peut conclure que les actinomycètes provenant de la rhizosphère peuvent inhiber efficacement l'action pathogène de l'*Aspergillus niger* et à moindre degré le *Fusarium oxysporum*. Pour cette raison, ce travail est une étape essentielle pour l'efficacité d'une technique de lutte contre les bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques et de champignons pathogènes (*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*) en exploitant le biofonctionnement des microorganismes du sol.

Cependant, cette étude est loin d'être finie. Dans l'avenir, nous envisageons d'entreprendre des travaux de recherche sur :

- L'identification moléculaire des souches actinomycétales isolées.
- L'élargissement des études des activités de ces isolats sur d'autres microorganismes pathogènes comme les champignons phytopathogènes.
- L'extraction des composés bioactifs élaborés par les souches actives.

Références

bibliographique

A

_Aouar L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri-Constantine, Algérie. P (9), (19).

_Amanullah A, Justen P, Davies A, Paul G.C, Nienow A.W et Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng. J.* 5 (2): 109–114.

_Andriambololona T. (2010). Étude biologique et chimique des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques Cas de la forêt d'ANKAFBE. Mémoire de Recherche pour l'obtention du Diplôme d'études Approfondies. Université d'Antananarivo. P (6).

_Ara I. N. A, Bukhari K, Perveen et Bakir M. A. (2012). Antifungal activity of some actinomycetes isolated from Riyadh soil, Saudi Arabia: An evaluation for their ability to control *Alternaria* caused tomato blight in green house pot trial, *African.J. Agric Res.* Vol. 7(13), pp. 2042-2050.

_Atta H.M, Dabour S.M et Desoukey S.G. (2009). Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. *J Agric & Environ Sci.* 5(3): 368-377.

_Augustine S. K, Bhavsar S. P et Kapadnis B. P. (2005) A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus*. *PU 23. J. Bio.sci.* 30(2): 201-211.

B

_Basilio A, Gonza Lez I, Vicente M.F, Guorochategui J, Cabello A, Gonza lez A and Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different condition of PH and salinity. *J. Appl. Microbiol* 95. 814-823.

_Bastide A, Méo M, Andriantsoa M, Laget M and Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.

_Belyagoubi M. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse Doctorat. Université d'Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie. p (2_17).

_Bernal M.G, Córdova Á.I.C, Saucedo P.E, González M.C, Marrero R.M et Suástegui J.M.M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *VeterinaryWorld*. Vol 8. 170-176.

Available at www.veterinaryworld.org/Vol.8/February-2015/7.pdf

_Boudemagh A. (2007). Isolement à partir des sols Sahariens des bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri-Constantine, Algérie. p (23).

_Boughachiche F, Reghioua S, Zerizer H et Boulahrouf A. (2012). Activité antibactérienne d'espèces rares de streptomyces contre des isolats cliniques multirésistants, *Ann Biol Clin*; 70 (2) : 169-74.

_Boughachiche F. (2012). Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka. Thèse Doctorat. Université de Mentouri-Constantine, Algérie p (20-25).

_Boussaber E, Kadmiri I.M.L, Hilali L et Hilal A. (2012). Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques, *Sci. Lib. Éditions Mersenne*: Vol 4, N ° 120801 ISSN 2111-4706.

_Boussaber L, EL Idrissi S. B. S, Meftah K. I, Hilali L et Hilali A. (2014). Screening of actinomycete bacteria producing antifungal metabolites which could be used in biological control against a phytopathogenic fungus (*Rhizopus stolonifer*), *American. J. Biol.Life.Sci*: 2(4): 84-89

_Bousseboua H. (2004). Cours de microbiologie générale. Edition de l'université Mentouri-Constantine, Algérie. P (21-24).

C

_Carle S. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 36 (1), 25-41.

_Caroline S. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine Chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse Doctorat. Université de Toulouse, France. p (8).

_Chelli R. (2010). Étude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes autres que Streptomyces. Thèse de Magistère en Biologie. Université Mentouri Constantine. Algérie. 93 p.

_Crawford D. L, Lynch J. M et Ousley M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. Appl Environ Microbiol. 59(11): 3899-3905.

D

_Danilenko V.N, Mironov V.A and Elizarov S.M. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. App. Biochem.Microbiol. 1(4)319–329.

_Djaballah C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'Lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri-Constantine. p (4), (8-9).

_Dulaney E.L, Larsen A.H et Stapley E.O. (1955). A note on the isolation of microorganisms from natural sources. Mycologia, 47(3) : 420–422.

E

_Errakhi R. (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc. P (60) (67).

_Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3 (2) on solid medium. J. gen. Microbiol. 129, 2029-2036.

G

_Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 37, 189-216.

_Goodfellow M. and Cross T. (1984). Classification In: The Biology of Actinomycetes. Goodfellow M.M., Williams S.T. (Eds). Academic Press, London. 7-164.

_Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the Actinomycetales. In: Actinomycetale characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F.A.Skinner. Academic Press, London, New York.

_Gottlieb D. (1974). Actinomycetales. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds: R.E. Buchanan et N.E. Gibbons, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. P 657, 881.

H

_Hasavada S. H ,Thumar J. T. et Singh S. P. (2006). Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. Current Science. 91(10): 1393-1397.

_Hilali L, Khattabi A, Nssarlah N, Malki A et Finance C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. Rev Biol Biotech, 2(1): 49–53.

_Holt G.J, Kerieg N.R, Sneath P.H.A, Staley J.T and Williams S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wikins.

_Huang Y, Cui Q, Wang L, Rodriguez C, Quintana E, Goodfellow M and Liu Z. (2004). *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. Novo. a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in china. Antonie Van Leeuwenhoek .86, 159-165.

J

_ Jadoon M.A, Tauseef A, Mujadd M, Rehman U, Khan A et Abdul M. (2014). Isolation and Identification of Thermophilic Actinomycetes from Hot Water Springs from Azad Jammu and Kashmir Pakistan for the Production of Thermophilic Amylase.pp.350-354. World.Appl.Sci. J.30 (3): 350-354.

_Jung Y.L et Byung K.H. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol*, 48(5): 407–417.

K

_Kalakoutskii L. V. and Agre N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* 40 (2), 469–524.

_Kennedy A.C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems agriculture. *Ecosys. Environ.* 74, 65-76.

_Karbab S. (2011). Les actinomycètes d'un sol salé: Rôle des osmoprotecteurs naturels. Mémoire de Magistère. Université Ferhat Abbas de Sétif, Algérie. P (9-10).

_Kitouni M. (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université de Mantouri Constantine, Algérie (39-54).

L

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

_Larpent J.P and Larpent G M. (1985). Éléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264.

_ Lechevalier H.A et Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: *The prokaryotes*. Vol.2 (Star M.P., H. Stolp, H.G. Truper A. Ballows and H.G. Schlegel. Eds), Springer-Verlag, Berlin. P 1915-1922.

_Lee J. Y and Hwang B.K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes of various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48.407-414.

_ Le Minor L, Veron M. (1989). Bactériologie médicale. 2ème édition. Médecine. Sciences Flammarion

_Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire de Magistère. Université de Constantine. Algérie. p(5)

_Loqman S. (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycetales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Université de Reims de Champagne-Ardenne. France. P 216.

M

_Mariat F, Sebald M. (1990). Les actinomycètes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

_McKenna F, El-Tarabili K.A, Petrie S and Dell B. (2002). Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. Lett. Appl. Microbiol. 35, 107-112.

_Mazzola M. (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soil borne diseases. Antonie van Leeuw. 81, 557–564.

O

_Oskaye M, Tamer A.U et Azeri C. (2003). Antibacterial Activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African. Journal of Biotechnology. Vol 3(9) p 441-446.

_Ottow J.C.G et Glathe H. (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. Appl Microbiol, 16(1): 170–171.

_Ouhdouch Y, Barakate M et Finance C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. Eur J Biol, 37(2): 69–74.

_Ou X, Zhang B, Zhang L, Dong K, Liu C, Zhao G and Ding X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. Acta. Biochim. Biophys Sin, 40 (10) 877-882.

P

_Pawlowski K and Sirrenberg A. (2003). Symbiosis between Frankia and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. Indian J. Exp. Biol. 41, 1165-83.

_Porter J.N, Wilhem J.J et Tresner H.D. (1960). Method for the preferential isolation of actinomycets from soil. Appl Microbiol, 8(3): 174–178.

_Prescott L, Harley J.P et Klein D.A. (1995). Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. P 506–517

_Prescott L, Harley J.P et Klein D.A. (2007). Microbiologie tome II. De Boeck & Larcier. Bruxelles. P 805–825.

_Prescott L, Harley J.P, Wiley S et Woolverton. (2008). Microbiologie. 2eme Edition. De Boeck. P (591-592).

_Prakash D, Nawani N, Prakash M, Bodas M, Mandal A, Khetmalas M and Kapadnis B.(2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. BioMed. Res. Inter. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>

R

_Rautemaa R, Richardson M, Michael A, Faller P, Perheentupa J et Saxen H. (2008). Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconazole and Voriconazole against *Candida albicans*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 62 :182-185

_Rajesh M, Subbaiya R, Balasubramanian M, Ponmurugan P et Masilamani S et (2013). Isolation and Identification of Actinomycetes *Isophtericola variabilis* From Cauvery River Soil Sample, Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2(6): 236-245

_Rakotoarimanga N, Zananirina J, Ramamonjisoa D et Ramanankierana H (2014). Lutte biologique antifongique : actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri, Afrique SCI 10(3) 243 – 255.

_Reponen T.A, Gazenko S.V, Grinshpun S.A, Willeke K, Cole E.C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl. Environ Microbiol.* 64 (10): 3807-3812.

S

_Samaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France. P (5-8), (13).

_Sanglier J.J et Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes, Stratégies de sélection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol.* 12(3) . 269-276.

_Sardi P, Saracchi M, Petrolini B, Borgonovi G.E. and Merli S. (1992). Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized roots. *Appl. Env. Microbiol.* 58(8), 2691-2693.

_Seng Heng L.M et Halizah. H (2014). Biological active compounds from Actinomycetes isolated from soil of Langkawi Island, Malaysia, African. *J. Bio.* Vol 13(49) p 4523-4529.

_Silini S. (2012). Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania. Mémoire de Magister. Edition Université de Mantouri Constantine, Algérie. P (22).

_Sykes G and Skinner F.A. (1973). Actinomycetales. Characteristics and practical Importance. Academic Press. London. New York.

T

_Thais D, Mendes. Warley S, Borges, Andre R, Scott E. Solomon, Paulo C, Vieira, Marta C. T, Duarte, Fernando C and Pagnocca. (2013). Anti-Candida Properties of Urauchimycins from Actinobacteria Associated with Trachymyrmex Ants. *BioMed .Res.Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/835081>

_Themis C.A et al (2014). Screening of actinomycetes with activity against clinical isolates of gram positive cocci with multiresistant profile, *J Adv Sci Res,* 5(1): 13-17

_Thirupl L, Johsen K and Winding A. (2001). Succession of indigenus *Pseudomonas* spp. and Actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Env. Microbiol.* 67(3), 1147-1153.

_Tighidet S. (2011). Caractérisation d'antifongiques non polyéniques produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production. Mémoire de Magistère. Edition Université d'Abderrahmane Mira Bejaia, Algérie. P (6), (11-15).

V

_Vandeputte V. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.

W

_Wang L, Huang L, Liu Z, Goodfellow M and Rodrriguez C (2006). *Streptaciphidilus oryzae* sp. novo., an actinomycete isolated from rice field soil in Thailand. *Int. J. Sys. Env. Microbiol.* p 56.1257-1261.

_Williams S.Tet Davies F.L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol*, 38(2): 251–261.

_Williams S. T, Locci R, Beswick A, Kurtboke D. I, Kuznetsov V. D, Le Monnier F. J, Long P. F, Maycroft K. A, Palma R. A, Petrolini B, Quaroni S, Todd J.I. and West M.(1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* 144, 653-656.

_Williams S.T et Wellington E.M.H. (1982). Principals and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9-26.

_Whitman W.B, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H.J, Trujillo M.E, Ludwig W and Suzuki K.I. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria Part A.* Vol.5. 2nd Edition. Springer New York. Dordrecht Heidelberg London.

Y

_Yala D, Merad A.S, Mohamedi D et Ouar Korich M.N (2001). Resistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb N°91.

Z

_ZERIZER H. (2014) : Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine, Thèse de Doctorat. Université Constantine 1, p (4)

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

Annexes

Eau physiologique

| | |
|---------------------------------|---------|
| Chlorure de sodium (Na cl)..... | 9 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

Mc Farland

| | |
|--|---------|
| Dihydrate de chlorure de baryum (BaCL ₂ 2H ₂ O)..... | 0,5 ml |
| Acide sulfurique..... | 99,5 ml |

YMEA + CaCO₃

| | |
|-------------------------|---------|
| Extrait de levure | 4 g |
| Extrait de malt..... | 10 g |
| Glucose..... | 4 g |
| CaCO ₃ | 1 g |
| Agar..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH = 7,3

Milieu de conservation

| | |
|-------------------------|--------|
| Extrait de levure | 0.4 g |
| Extrait de malt..... | 1 g |
| Glucose..... | 0.4 g |
| Eau distillée..... | 100 ml |

pH = 7,3

Muller Hinton

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Extrait de viande..... | 2 g |
| Hydrolysate acide de caséine..... | 17,5 g |
| Amidon..... | 1, 5 g |
| Agar..... | 10 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

PH = 7,4

Gélose nutritif

| | |
|--------------------|---------|
| Agar..... | 15 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

PH = 7,0

Olson

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Sodium casein..... | 2 g |
| L-asparagine..... | 0,1 g |
| Sodium propionate..... | 4 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 |
| FeSO ₄ | 0,01g |
| Agar..... | 10 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH = 7,2

PDA (Potato Dextrose Agar)

| | |
|---------------------|---------|
| Glucose..... | 20 g |
| Pomme de terre..... | 200 g |
| Agar..... | 15 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

PH 6,5