

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Abbès Laghrou-Khenchela-
Faculté de Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de :
Master en Microbiologie

Option :
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème



**Isolement et sélection des souches actinomycétales
productrices de substances bioactives**



Présenté par :
DALLI Youcef

Devant le jury : **Président :** DARBOUCHE Abdelhak (Professeur) U.A. Laghrou -Khenchela-
Examineur : LABAANI F.Z. Kenza (M.A.A) U.A. Laghrou -Khenchela-
Promoteur : LEULMI Nassima (M.A.A) U. A. Laghrou -Khenchela-

Promotion : Juin, 2014

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

À mes très chers parents que dieu me les garde, à qui je dois mon éducation, et ma réussite.

À mes frères et sœur Salah, Nazim, Mounia

À toute ma famille

À tous mes amis Hacene, Abd'essamie, Mahmoud, Zakaria

À tous mes Enseignants

À tous mes collègues de la promotion

Youcef

Remerciement

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Microbiologie à l'institut de Biologie, département de Biologie de l'université Abbès Laghrour Khenchela.

Je tiens à remercier vivement Mlle LEULMIN (Maître assistante à l'université Abbès Laghrour Khenchela) qui a bien voulu diriger ce travail, pour ses précieux conseils, sa patience, et sa tolérance.

Je tiens à remercier également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger et de corriger ce travail. Que Mr. DARBOUCHE Abdelhak (Professeur à l'Université Abbès Laghrour Khenchela) et Mme LABAANI F.Z. Kenza (Maîtres assistantes à l'Université Abbès Laghrour Khenchela) trouvent ici toute ma reconnaissance pour en avoir été les examinateurs.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu dans la réalisation de ce travail.

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Revue Bibliographique

Chapitre I : Les Actinomycètes

1. Historique.....	04
2. Définition et caractéristiques principales.....	04
3. Morphologie.....	05
4. Ecologie et distribution dans la nature.....	06
5. Physiologie et métabolisme des <i>Actinomycètes</i>	07
6. Biologie.....	08
7. Thermorésistance des spores.....	09
8. Structure pariétale.....	10
9. Génétique et structure de l'ADN.....	11

Chapitre II : Substances bioactives produites par les Actinomycètes

1. Substances bioactives produites par les <i>Actinomycètes</i>	13
1.1. Les antibiotiques.....	13
1.2. Les extremozymes.....	15
1.3. Bio insecticides et bio pesticides.....	17
2. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques.....	17
2.1. Influence des sources nutritionnelles.....	18
2.1.1. Influence des sources carbonées.....	18
2.1.2. Influence des sources azotées.....	18
2.1.3. Influence des sources de phosphate.....	18
2.2. Effet du pH, de la température et du temps d'incubation.....	19

Chapitre III : Activités antifongique et antiphytopathogène

1. Les agents phytopathogènes.....	21
2. La lutte biologique.....	21
2.1. L'antibiocose et la production d'antibiotique antiphytopathogène.....	21
3. L'action antagoniste et antiphytopathogène des <i>Actinomycètes</i> adoptée pour la lutte biologique.....	22

Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Isolement des <i>Actinomycètes</i>	27
1.1. Prélèvement et traitement des échantillons.....	27
1.2. Préparation du milieu d'isolement.....	27

1.3. Dilution et mise en culture.....	27
1.4. Prélèvements des colonies d'actinomycètes.....	27
1.4.1. Préidentification des actinomycètes.....	27
2. Repiquage et purification des souches.....	28
3. Conservation des souches.....	28
3.1. Conservation sur gélose inclinée.....	29
4. Etude de potentialité antagoniste des isolats d'actinomycètes.....	29
4.1. Recherche de l'activité antibactérienne.....	29
4.1.1. Technique des cylindres d'Agar.....	29
4.2. Recherche de l'activité antifongique.....	30
5. Extraction des antibiotiques et bioautographie.....	31
5.1. Extraction des antibiotiques.....	31
5.1.1. Culture sur milieu solide.....	31
5.1.2. Récupération de filtrat de culture.....	31
5.1.3. Extraction à partir des filtrats de culture.....	31
5.2. Test de l'extrait brut.....	31
5.2.1. Séparation des molécules bioactives.....	32
5.2.1.1. Chromatographie sur couche mince CCM.....	32
5.2.1.2. Bioautographie des molécules bioactives.....	32

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Isolement et purification des <i>Actinomycètes</i> rhizosphériques.....	34
1.1. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes actinomycétales.....	35
1.2. Etude de l'aspect microscopique des isolats d' <i>Actinomycètes</i>	36
2. Étude préliminaire des activités antimicrobiennes (Méthode de cylindres d'agar).....	37
2.1. Activité antibactérienne.....	37
2.2. Activité antifongique.....	38
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits organiques.....	39
3.1. Comparaison entre les extraits bruts et antibiotiques tests.....	41
4. CCM analytique unidimensionnel.....	42
Conclusion.....	43

Annexe

Bibliographie

Résumé

Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
01	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i>	09
02	Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses	15
03	Secteur angulaire montrant la répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les <i>Streptomyces</i> et autres genres apparentés, et autres genres actinomycétales	17
04	Aspect macroscopique caractéristique d' <i>Actinomycètes</i>	36
05	Aspect microscopique colonies circulaires d' <i>Actinomycètes</i> ×10	36
06	Colonie entière est placée sur une lame et lamelle ×40	36
07	Étapes relatives à l'isolement des <i>Actinomycètes</i> du sol	28
08	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches actinomycétales	30
09	Extraction et caractérisation des antibiotiques des isolats (CVF, LAC ₁)	33
10	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des Isolats d' <i>Actinomycètes</i>	49
11	Mise en évidence de l'activité antibactérienne (Suite)	50
12	Test de sensibilité négatif	51
13	Mise en évidence de l'activité antifongique des Isolats d' <i>Actinomycètes</i>	52
14	Mise en évidence de l'activité antifongique (Suite)	53
15	Test de l'effet antimicrobien de l'extrait LAC ₁	54
16	Test de l'effet antibactérien de l'extrait CVF	55
17	Test de l'effet antifongique de l'extrait CVF	56
18	Chromatographie sur couche mince (CCM)	42
19	Bioautographie du chromatogramme	57
20	Dilutions décimales des échantillons	58

21	Mise en évidence de l'activité antibactérienne par les deux techniques, cylindre d'agar et disque en papier.	40
22	Comparaison entre l'extrait CVF et LAC1	41

Liste des tableaux

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
01	Répartition de quelques genres d' <i>Actinomycètes</i> par type d'habitat	07
02	Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires	10
03	Composition de la paroi en sucres caractéristiques de quelques genres d' <i>Actinomycètes</i>	11
04	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe d' <i>Actinomycètes</i>	12
05	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les <i>Actinomycètes</i>	13
06	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les <i>Actinomycètes</i>	14
07	Quelques exemples d'extrémozymes produites par les <i>Actinomycètes</i>	16
08	Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques	20
09	Production d'antibiotiques chez les <i>Actinomycètes</i> favorisée par les acides aminés	20
10	Le biocontrôle des maladies fongiques par les actinomycètes non- <i>Streptomyces</i>	24
11	Les antibiotiques produits par les actinomycètes utilisés en biocontrôle	25
12	le nombre d'isolats d'actinomycètes obtenus à partir de différents échantillons	34
13	Activité antibactérienne des isolats actinomycétales (Méthode des cylindres d'agar)	37
14	Activité antifongique des isolats actinomycétales (Méthodes des cylindres d'agar)	38

15	Activité antimicrobienne des différents extraits organiques (Méthode des disques en papier)	39
16	Bioautographie des extraits CVF et LAC1	42

Introduction

Introduction

Découvert par hasard au début du vingtième siècle, les antibiotiques ont révolutionné l'histoire de la médecine en permettant de traiter des millions de vie humaine contre des maladies bactériennes mortelles comme la tuberculose, la pneumonie, la syphilis ou le tétanos. Les premiers anti-infectieux furent les sulfamides et la pénicilline G, ensuite il y a eu toute une gamme d'antibiotiques (Levy S B., 1992).

Jusqu'à une période récente, les antibiotiques étaient désignés comme « remède miracle », leur usage a augmenté l'espérance de vie moyenne d'une quinzaine d'années. La découverte des antibiotiques constitue donc un événement majeur dans l'histoire de la médecine (Levy S B, 1992).

Malheureusement, leur introduction en médecine humaine fut rapidement suivie par l'apparition de bactéries devenues résistantes (Courvalin et Philippon, 1990). Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Ces résistances aux antibiotiques à doses thérapeutiques apparaissent plus au moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes à part quelque exception comme la souche de *streptococcus pyogènes* qui reste toujours sensible à la pénicilline G (Genné et Siegrist, 2003).

L'apparition de nouvelles souches pathogènes multi résistantes cause un taux de morbidité et de mortalité importante en particulier chez les personnes âgées et les immunodéprimés.

En effet, ces dernières années ont été marquées par la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées ainsi par l'émergence de nouveaux pathogènes et ceci particulièrement dans les pays en voie de développement. Pour remédier à cette situation, il y a un grand intérêt à améliorer ou à découvrir de nouveaux antibiotiques à différents mode d'action (Barsby *et al.*, 2001 ; Parungao *et al.*, 2007 ; OMS, 1997).

Pour ces raisons, ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules antimicrobienne capables de jouer un rôle important dans le domaine de la santé publique. Ces molécules sont souvent recherchées à partir des microorganismes isolés d'échantillons prélevés de différents écosystèmes, dans le but de découvrir des taxons originaux et par-là de nouvelles molécules biologiquement actives. Les *Actinomycètes* (bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées de filaments), sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs de molécules à activités biologiques (Challis et Hopwood, 2003).

En effet, 70 à 80% des métabolites secondaires disponibles dans le marché ont été isolées et caractérisées à partir de plusieurs espèces d'*Actinomycètes* (Khanna *et al.*, 2011). Ces métabolites secondaires représentent une riche source de composés bioactifs tels que des antibiotiques, des produits agrochimiques, enzymes, immunosuppresseurs, antiparasitaires et agents anticancéreux, qui sont considérées comme le paradigme de ces microorganismes capables de les synthétisées par le biais de leur métabolisme secondaire (Iwai et Takahashi, 1992).

L'isolement d'*Actinomycètes* actifs à partir d'écosystèmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou des souches pouvant avoir un potentiel de productivité élevé inexploité. Comme la fréquence de découvertes de composés bioactifs à partir d'*Actinomycètes* a diminué avec le temps, beaucoup d'attentions ont été portées sur le dépistage d'*Actinomycètes* dans des environnements variés (Thenmozhi et Krishnan, 2011).

La diversité des *Actinomycètes* dans les écosystèmes semi-arides, n'a pas été largement explorée. Ainsi, peu d'information sur le potentiel antimicrobien des *Actinomycètes* isolés à partir d'échantillon du sol ont été reportés (Kitouni *et al.*, 2005 ; Boughachiche *et al.*, 2005).

L'objectif principal de notre étude consiste à :

- Isoler et sélectionner, à partir d'écosystème rhizosphérique, des souches d'*Actinomycètes* rares de différentes régions d'est algérien caractérisé par un sol semi-arides (Khenchela), sol risosphérique (Batna) et d'un écosystème extrême (sebkha GuerrahGuellif, Oum elbouaghi).

- Sélectionner des souches d'*Actinomycètes* les plus productrices d'antibactériens par la mise en évidence de leurs activités antibactériennes par la technique des cylindres d'agar envers 11 bactéries-tests.
- Evaluer l'activité antifongique vis à vis quelques champignons phytopathogènes.
- Extraire les molécules bioactives, par un solvant organique, produites par les souches sélectionnées hautement actives.
- Test d'activité de l'extrait organique de l'antibiotique contre des souches tests hautement sensibles.
- Séparation partielles des molécules bioactives par chromatographie sur couche mince (CCM).
- Détection des molécules bioactives séparées par une technique de la bioautographie.

Chapitre I :

Les Actinomycètes

1. Historique

Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des *Actinomycètes*. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1900. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des *Actinomycètes* du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilnikov entre autre. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les *Actinomycètes*. Elle commence en 1940 et le nom de Selman Waksman lui est indissolublement lié (Leminor et Veron, 1989).

2. Définition et caractéristiques principales

Les *Actinomycètes* constituent un groupe de microorganismes fascinant. Ils sont la source de la plupart des antibiotiques utilisés en médecine aujourd'hui (Linda *et al.*, 2010). Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les *Actinomycètes* sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols par la décomposition de la matière organique (humus) ainsi que le cycle du carbone (Woznicka, 1964 ; Larpent et Sanglier, 1989).

Les *Actinomycètes* ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs ou comme étant des microorganismes intermédiaires entre le règne des champignons et celui des bactéries, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombre d'entre eux (Williams et Wihs, 1986 ; Haslay et Leclerc, 1993 ; Horinouchi, 2002). Aujourd'hui, il est bien connu que ce sont des bactéries dépourvues de membrane nucléaire, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est compris dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire (Williams et Wihs, 1986). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (Mariat et Sebald, 1990). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes (Haslay et Leclerc, 1993).

Les *Actinomycètes* sont des bactéries à Gram positifs, dont le coefficient de chargaff (G+C%) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (Abebe *et al.*, 2013 ; Gonzalez et Robles, 2009 ; Ogunmwonyi *et al.*, 2010 ; Usha, 2011 ; Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun *et al.*, 1997 ; Williams *et al.*, 1993 ; Hogan, 2010).

La plupart d'entre eux sont toujours immobiles (Larpen et Sanglier, 1989). Toutefois, certains types produisent des spores flagellées, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques (Djaballah, 2010). Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0,5-1,0 μm de diamètre) (Eunice et Prosser, 1983), le diamètre des hyphes est plus petit que celui des champignons (Gottlieb, 1973). Leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Gottlieb, 1973 ; Larpen et Sanglier, 1989) elles donnent lieu à des colonies circulaires 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 « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs « Actino » et « Mycete » et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973).

3. Morphologie

La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes (la plus part des mycobactéries) à des formes mycéliennes complexes (comme le genre *Streptomyces*) (Gottlieb, 1973). Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridée, soit isolées soit groupées en chaînes. Certains Actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires (Mariat et Sebland, 1990 ; Lacey, 1997) L'analyse morphologique des Actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes : Les hyphes dispersés et les hyphes en pellets. Dans les hyphes dispersés, la forme "Freely dispersed" et les "mycelial clumps" sont rencontrées. La première forme c'est des hyphes indépendants dispersés, la seconde est une masse ou agrégats de mycélium. Les Actinomycètes donnant des hyphes en pellets, posent en fermentation des problèmes de limitation de diffusion de l'oxygène et des nutriments à travers l'hyphe. Ceci engendre une diminution de la croissance et peut conduire à une autolyse. Ce point doit être pris en considération, pour éviter ce genre de problème l'ors des fermentations industrielles. Heureusement, pour plusieurs souches productrices de

métabolites secondaire, la forme "Clups" ou masse est la prédominante dans les fermenteurs (90% des cas) (Perry *et al.*, 2004).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc (Perry *et al.*, 2004).

4. Ecologie et distribution dans la nature

Les *Actinomycètes* sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (tableau 1). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après (Goodfellow *et al.*, 2004) généralement les 10^6 germes par gramme de sol séché. D'après (Waksman, 1967), le rapport Microorganisme totaux / *Actinomycètes*, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16 %. Les *Actinomycètes* sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les *Actinomycètes* préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Goodfellow et Williams, 1983).

La majorité des *Actinomycètes* croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (a_w) est très basse (Davies et Williams, 1983 ; Goodfellow et Williams, 1983). Les sols sahariens sont caractérisés par une teneur minimale en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ont prouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée (Killian et Feher, 1939). Parmi les bactéries isolées, les *Actinomycètes* font partie essentielle de cette microflore, leurs présence est considérable dans ce type d'écosystème extrême (Killian et Feher, 1939).

Tableau 1. Répartition de quelques genres d'*Actinomycètes* par type d'habitat (Goodfellow et Williams, 1983)

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplana</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol et Eau
<i>Streptosporangium</i>	matière en décomposition et en fermentation

5. Physiologie et métabolisme des *Actinomycètes*

Les *Actinomycètes* sont aérobies plus rarement anaérobies, les premiers à métabolisme oxydatif représentent les espèces telluriques, les seconds à métabolisme fermentatif correspondant aux espèces parasites saprophytes de la cavité buccale éventuellement pathogènes pour l'homme (*Actinomyces*) par exemple. Ce sont généralement des organismes hétérotrophes, qui ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats azotés et carbonés. En conséquence, ils sont très largement distribués dans la nature. De nombreuses espèces sont fortement protéolytiques et agarolytiques (Hsu et Lockwood, 1975).

Les *Actinomycètes* sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés anti microbienne sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotique sont produits lors de leur croissance (Craxford *et al.*, 1993). L'équipement enzymatique des *Actinomycètes* est très diversifiés, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leur variété et leur importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc. Les *Actinomycètes* sont aussi important en milieu hydrique, dans les eaux douces, les rivières et les fleuves, les membres des genres : *Micromonospora*, *Actinoplana* prédominent. Ceux des eaux usées traitées par aération favorisent la multiplication de certains *Actinomycètes* comme les *Nocardia*. En milieu marin de nombreuses espèces ont été isolées mais il est difficile de connaître l'importance de leur rôle dans la décomposition de la matière organique.

Les *Actinomycètes* au cours de leur évolution dans les eaux de surface à usage alimentaire, peuvent produire des substances à forte odeur de terre ou de moisi ces odeurs indésirables qui

caractérisent certaines eaux d'alimentation sont dues à des métabolites produits par les *Actinomycètes* notamment la géosmine (le méthyle isobornéol) (Cross, 1981). La majorité d'*Actinomycètes* sont saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux. Les *Nocardia* sont aussi des agents redoutables des nocardiose humaine ou animale (Goodfellow et Williams, 1983).

6. Biologie

Les *Actinomycètes* possèdent une structure de procaryotes mais un cycle biologique semblable à certains champignons (Floyd *et al.*, 1997 ; Sanglier et Trujillo, 1997). La germination des spores passe par quatre étapes : L'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinale et enfin la croissance (Figure 1). Le degré hygrométrique joue le rôle prépondérant dans la germination des spores. Dans certains cas, un choc thermique induit l'activation, par exemple un traitement de 5 minutes à 50 °C pour les spores de certaines espèces de *Streptomyces*. Le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient intensément. Le mycélium se développe sur et dans le substrat il est dénommé, un mycélium primaire, ou mycélium végétatif ou même quelque fois du mycélium du substrat. La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme de parois transversale isolant les zones les plus âgées. Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, les hyphes sont peu ramifiés et pourvus d'une enveloppe hydrophobe. Le mycélium secondaire est plus épais que celui du primaire, il est généralement pigmenté (Locci, 1976).

Les spores se forment sur le mycélium aérien. Dans le cas de la majorité des *Actinomycètes*, notamment les streptomycètes, il s'agit d'exospores. Des parois transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornementations externes peuvent se former, pour donner l'aspect externe important dans la taxonomie. Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorable à la croissance végétative, certaines spores de *Streptomyces* peuvent survivre plus de 20 ans, elles sont plus ou moins résistantes à la chaleur. La formation et la maturation d'une colonie requière de 3 à 7 jours au laboratoire pour la plupart des espèces du genre *Streptomyces*. Dans la nature ce cycle est de durée variable parfois très brève. Les espèces des autres groupes d'*Actinomycètes* présentent des différences plus ou moins marquées par rapport au cycle biologique des streptomycètes. Elles vont de la fragmentation du mycélium (Nocardioformes) à la formation de sporange (*Actinoplana* et *Streptosporangium*) à des mobiles (*Actinoplana* et

Actinosynemna) ou au développement d'endospores semblables à celles des bacillacea (*Thermoactinomyces*). Ces caractères morphologiques constituent une des bases de la classification des *Actinomycètes* (Pine, 1970 ; Locci et Sharples 1984 ; McBride et Ensign, 1986).

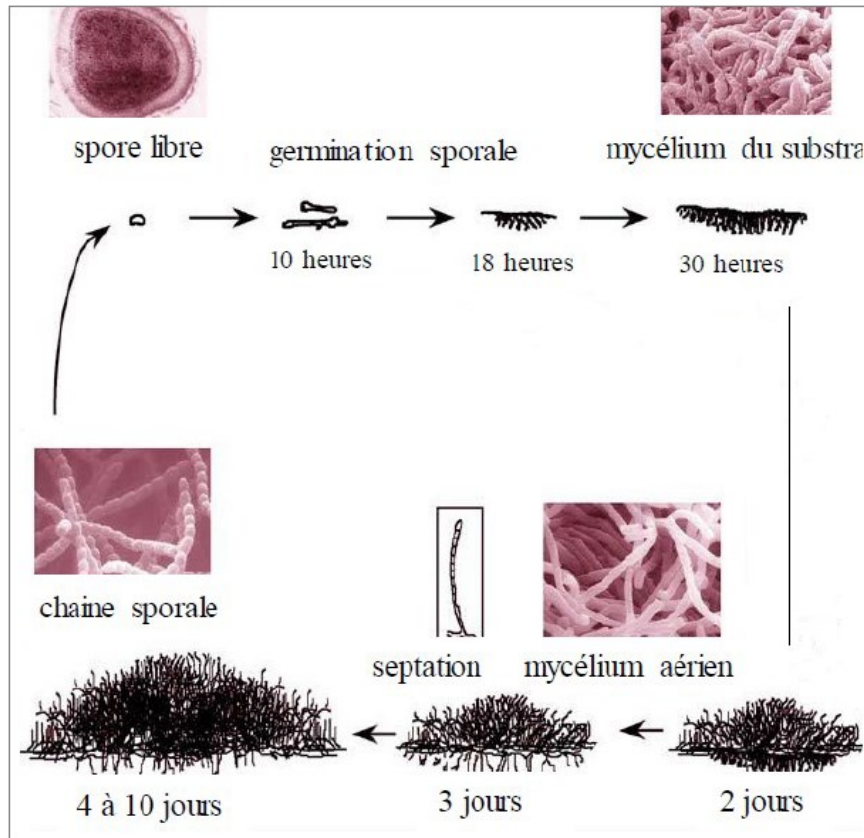


Figure 1. Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002).

7. Thermorésistance des spores

En générale, la plus part des spores d'*Actinomycètes* comme par exemple les *Streptomyces* ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en température sèche (Larpent et Sanglier, 1989). Il existe cependant plusieurs autres espèces qui résistent à des températures plus élevées (El-nakeeb et le chevalier, 1963). C'est le cas de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis*, que les spores ne se détruisent qu'à une température de 130°C, le traitement à 120°C inhibe seulement leur germination. Les spores des genres thermophiles tel que *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, ou thermotolérants tel que *Pseudonocardia*, *Microbispora*, etc., sont également résistantes à des températures élevées (Kitouni *et al.*, 2005).

8. Structure pariétale

Les parois cellulaires des *Actinomycètes* sont extraordinairement variées, cependant parmi les groupes, les parois ont souvent une composition constante conférant un rôle majeur dans la taxonomie de ces bactéries. L'étude de la paroi cellulaire des *Actinomycètes*, montre qu'elle ne renferme ni chitine ni cellulose elle est composée soit de :

- Glycoprotéine contenant de la lysine (ce type de paroi est rencontré chez la forme fermentative).
- Glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide diaminopimélique (DAP), ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives.

Les chaînes des glycanes sont reliées entre elles par des sub-unités peptidiques dont la composition en acides aminés ainsi que les liaisons entre ces derniers sont variables, ce qui explique l'existence de différents peptidoglycanes chez les *Actinomycètes* (Lechevalier et Lechevalier 1985). Les principaux composants pariétaux qui permettent de déterminer les différents types de paroi chez les *Actinomycètes* sont regroupés dans le (tableau 2).

Tableau 2. Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires (Lechevalier et lechevalier, 1970).

Type pariétal	Constituants majeurs	Exemple de genre
I	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP Glycine, Xylose+Arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, Madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, Arabinose+Galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, Omithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, Glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

D.A.P. : Acide 2,6-diaminopimélique. D.A.B. : Acide 2,4-diaminobutyrique.

La composition de la paroi en sucres a permis également de classer les *Actinomycètes* en quatre classes distinctes (tableau 3).

Tableau 3. Composition de la paroi en sucres caractéristiques de quelques genres d'*Actinomycètes* (Prker, 2000).

Type de paroi selon La composition en sucre	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Streptosporangium</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Streptomyces...</i>
D	Arabinose, Xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

9. Génétique et structure de l'ADN

La taille de l'ADN des *Actinomycètes* est de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E.coli*, la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. A la suite de croisements des *Actinomycètes*, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (Larpen et Sanglier, 1989).

Les genres d'*Actinomycètes* peuvent être définies par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % (tableau 4), qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, les espèces ne sont pas identifiées par cette technique. Historiquement, la classification des bactéries était basée sur la similarité des caractères phénotypiques. Bien que cette méthode ait donné toute satisfaction, elle est coûteuse, lente et pas assez précise pour permettre la distinction entre les organismes les plus proches. L'étude des acides nucléiques a apporté des renseignements plus précis (Williams *et al.*, 1989). Des

auteurs insistent cependant, sur la nécessité de jumeler les études phénotypiques et moléculaires pour une identification encore plus précise (Goodfellow *et al.*, 2004).

Tableau 4. Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe d'*Actinomycètes* (Williams *et al.*, 1989).

Genre	G + C % (Moles)
<i>Actinomadura</i>	64 à 69
<i>Nocardia</i>	64 à 72
<i>Streptomyces</i>	69 à 78
<i>Micromonospora</i>	71 à 73
<i>Actinoplanes</i>	72 à 73
<i>Actinopolyspora</i>	64
<i>Agromyces</i>	71 à 77
<i>Frankia</i>	66 à 71
<i>Glycomyces</i>	71 à 73
<i>Nocardiopsis</i>	64 à 69
<i>Rhodococcus</i>	63 à 72
<i>Streptosporangium</i>	69 à 71
<i>Streptoverticillium</i>	69 à 73
<i>Thermoactinomyces</i>	53 à 55

Chapitre II :

*Substances bioactives produites par les
Actinomycètes*

Tableau 5. Quelques exemples d'antibiotiques produits par les *Actinomycètes*.

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

1. Substances bioactives produites par les *Actinomycètes*

Les *Actinomycètes* représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires.

1.1. Les antibiotiques

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part dominante dans l'industrie pharmaceutique, représentant près de 25% de son chiffre d'affaire. Les (tableaux 6 et 7)

illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les *Actinomycètes*.

En ce qui concerne l'activité antifongique des *Actinomycètes*, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (Sanasam et Ningthoujam, 2010), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophyton rubrum* (Lakshmipathy et Krishnan, 2009).

Tableau 6. Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les *Actinomycètes*.

Molécules bioactives	<i>Actinomycète</i> producteur	Références
1/ Les agents anti parasitaires		
Trioxacarcine	<i>Streptomyces sp.</i>	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Prodiginine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Williamson <i>et al.</i> , 2006
2/ Les agents anti viraux		
9-β-Darabinofuranosyladénine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Madigan <i>et al.</i> , 1997
Panosialine	<i>Streptomyces sp</i>	Aoyagi <i>et al.</i> , 2006
3/ L'agent hypocholestérolémique		
Rapamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1999
4/ Les agents anti tumoraux		
Asterobactine	<i>Nocardia asteroides</i>	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Fenical <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmycine	<i>Thermoactinomyces sp</i>	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
Marinomycine	<i>Marinospora sp</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Borrelidine	<i>Streptomyces sp</i>	Vino et Lokesh, 2008
IB-00208	<i>Actinomadura sp</i>	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2009
5/ Les agents immunostimulateurs		
Rubratin	<i>Nocardia rubra</i>	De boer <i>et al.</i> , 2000
Bestatine	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Ikinose <i>et al.</i> , 2003
FR-900494	<i>Kitasatosporia kifunense</i>	Iwami <i>et al.</i> , 2006
6/ Les agents immunosuppresseurs		

Pentalenolactone	<i>Streptomyces filipinensis</i>	Uyeda <i>et al.</i> , 2001
Brasilicardine A	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Komatsu <i>et al.</i> , 2005
7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale)		
L- asparaginase	<i>Streptomyces spp</i>	Saleem Basha <i>et al.</i> , 2009
L- glutaminase	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Balagurunatha <i>et al.</i> , 2010

Les (figures 2, 3) représentent respectivement la répartition de production d'antibiotiques entre les bactéries et les champignons, et celles des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres d'*Actinomycètes* dont la dominance de production est affectée aux bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

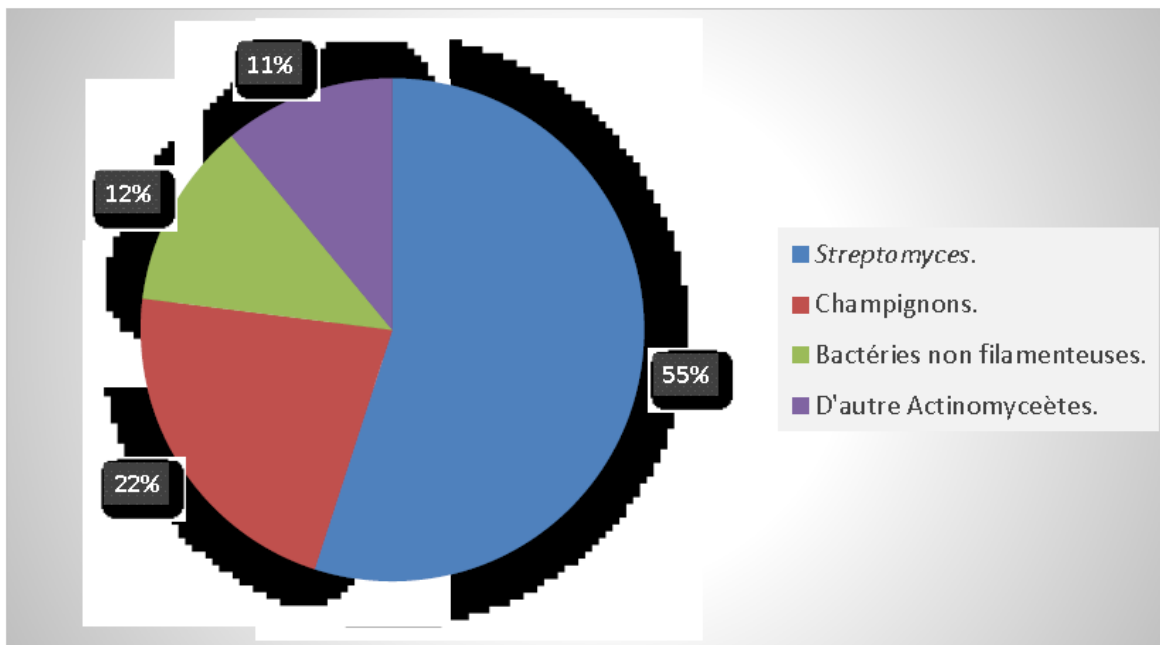


Figure 2. Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les *Actinomycètes*, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005).

1.2. Les extremozymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les plus importants produits des *Actinomycètes*. Ces enzymes peuvent avoir des applications médicales, en Biologie moléculaire, en industrie alimentaire ou celle des détergents, ... etc.

Les enzymes isolées à partir des *Actinomycètes* des environnements extrêmes, dites *Actinomycètes* extrémophiles, sont commercialement très importantes.

Tableau 7. Quelques exemples d'extrémozymes produites par les Actinomycètes.

<i>Actinomycètes</i> extremophiles	Extremozymes	Topt	pHopt	Références
1/ Actinomycètes Alkali thermophiles				
<i>Streptomyces sp.</i>	Cellulase	60 °C 8	8	Aboul-Enein <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces sp.</i>	Kératinase	50 °C	8,5	Korkmaz <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces sp.</i>	Endocellulase	50 °C	8	Van Soulinger <i>et al.</i> ,
<i>Streptomyces amulatus</i>	Dextranase	50 °C	8	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermomonospora sp.</i>	Endocellulase	50 °C 5 t½ vie : 3 heures à 70 °C	[7 – 10]	George <i>et al.</i> , 2001
2/ Actinomycète thermophile				
<i>Streptomyces sp.</i>	Glucose isomérase	70 °C	6,9	Dhungel <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces sp.</i>	Xylanase	60 °C	6,5	Rawashdeh <i>et al.</i> , 2005
3/ Actinomycète alkaliphile				
<i>Streptomyces fradiae</i>	Aminopéptidase		10	Vitale, 1999
4/ Actinomycète halo-alkaliphile		[NaCl]	pH opt	
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Protéase	5 %	9	Thumar <i>et al.</i> Singh, 2007
5/ Actinomycète psychrotrophe		Topt	Stabilité thermique de l'enzyme	
<i>Streptomyces sp.</i>	Alpha-amylase	15 °C	T= [5 – 20] °C	Cotarlet <i>et al.</i> , 2010

Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les *Actinomycètes* extrémophiles sont résumés dans le (tableau 7).

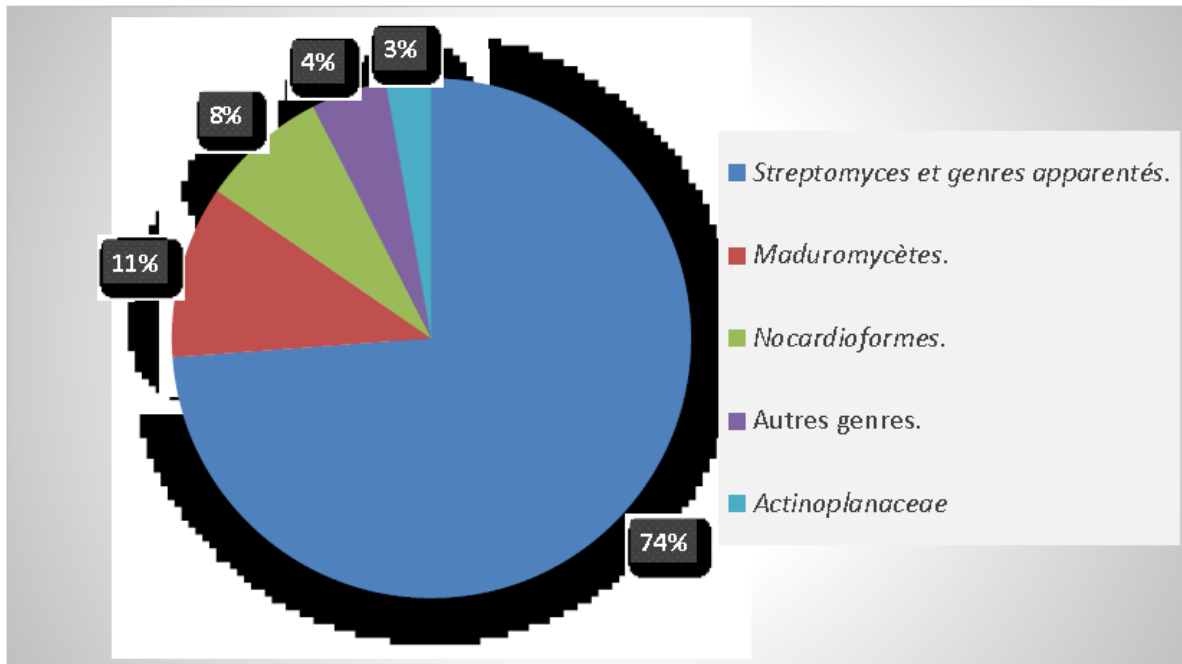


Figure 3. Secteur angulaire montrant la répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres apparentés, et autres genres actinomycétales (sanglier et Trujilo, 1997)

1.3. Bio insecticides et bio pesticides

Les *Actinomycètes* sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (tableau 5)

2. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les *Actinomycètes*

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la synthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les *Actinomycètes*, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponibles et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Ces deux leviers de régulation du métabolisme secondaire sont influencés par de nombreux paramètres, entre autres nutritionnelles et physicochimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (Strub, 2008).

2.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les *Actinomycètes*

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs (Strub, 2008) entre autres chez les *Actinomycètes*.

Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectant fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotiques en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Martin et Demain, 1980).

2.1.1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou « effet glucose») (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi *et al.*, 1988 ; Lounès *et al.*, 1995) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (tableau 8).

2.1.2. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les *Actinomycètes*, cela se traduit par un effet de la concentration d'un substrat naturel approprié ou sous forme d'acides aminés lentement métabolisés (tableau 9).

2.1.3. Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate variant 0,3 et 300 M, la synthèse de très nombreux métabolites secondaires est inhibée par des concentrations trop élevée (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les *Actinomycètes*. Non seulement le phosphate affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (Gersh *et al.*, 1979 ; Dekleva *et al.*; 1985).

2.1.4. Effet du pH, de la température et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectant énormément la production des métabolites secondaires (Smaoui, 2010). Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline et un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (Asanza-Ternuel *et al.*, 1997).

Concernant la température, la souche *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40 °C avec un optimum à 30 °C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide est variable d'une espèce à une autre. En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN 58, la production de biomolécules commence après 60 heures d'incubation pour atteindre un maximum après 72 heures. Elle reste stable jusqu'à 80 heures puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 heures (Mellouli *et al.*, 2004).

Tableau 8. Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques.

Famille chimique	Antibiotiques	Producteurs	Source de carbone ayant un effet négatif sur la production des antibiotiques	Références
Béta- lactamine	Céphamycine C	<i>Streptomyces lactamadurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>	Glucose Glycérol	Cortes <i>et al.</i> , 1986 Lebrihi <i>et al.</i> , 1988
Aminoglycosides	Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	Glucose, Xylose	Escalante <i>et al.</i> , 1992
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Glycérol	Lounès <i>et al.</i> , 1995
Anthracycline	Rétamycine	<i>Streptomyces lindensis</i>	Glucose	Inoue <i>et al.</i> , 2007

Tableau 9. Production d'antibiotiques chez les *Actinomycètes* favorisée par les acides aminés.

Famille chimique	Antibiotiques	Producteurs	Acides aminés	Références
Aminoglycoside	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Proline	Dulaney, 1948
Béta-lactamines	Céphamycine	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Asparagine / Glutamine	Brana <i>et al.</i> , 1985
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Proline	Shapiro <i>et Vining</i> , 1985
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Valine	Untrau <i>et al.</i> , 1994

Chapitre III :

*Activités antifongique et
antiphytopathogène*

1. Les agents phytopathogènes

Les pertes en agriculture due aux phytopathogènes sont énormes, estimées de 25% en Europe, 29% aux USA, 42% en Afrique, et 43% en Asie (Agrios, 1997). Les champignons en sont la principale cause, 83% des maladies des plantes sont dues aux champignons, 17% étant provoquées par des bactéries et des virus. La FAO estime qu'au moins 25% de la récolte mondiale des denrées agricoles est contaminée par les mycotoxines (Manfred et Nicole, 2000).

Au cours de ces dernières années, les Champignons phytopathogènes ont été contrôlés principalement par l'utilisation des fongicides synthétiques d'origine chimique qui permettent de protéger les cultures et les récoltes contre ces organismes nuisibles. Pourtant, leur emploi inconsidéré pourrait faire courir des risques aux consommateurs et déstabiliser dangereusement les écosystèmes (Elarbi *et al.*, 2012).

2. La lutte biologique

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. La lutte biologique a pour principe d'utiliser des agents biologiques capables d'entrer en compétition (antagonisme) avec les agents pathogènes et les ravageurs sans avoir d'activité néfaste pour la plante (Souad, 2009). Plusieurs microorganismes du sol ont été utilisés pour lutter contre les maladies des plantes (Mao *et al.*, 1998, Emmert et handelsma, 1999 ; whipps, 2001; Singh *et al.*, 2003 ; Reys *et al.*, 2004 ; Haas et Defago, 2005 ; Valdebenito *et al.*, 2006 ; Rahman et Shoda, 2007). Ces microorganismes utilisent différents mécanismes pour lutter contre les agents phytopathogènes du sol, à savoir : L'antibiose, la compétition, le parasitisme et/ou l'induction des mécanismes de la résistance de la plante (Paulitz et Bélanger, 2001 ; Spadaro et Gullino, 2004 ; Bouizgarne *et al.*, 2006 ; Prevost *et al.*, 2006 ; Lehr *et al.*, 2008).

2.1. L'antibiose et la production d'antibiotique antiphytopathogène

L'antibiose par définition est l'inhibition de l'agent phytopathogène par la production des métabolites secondaires par un autre micro-organisme (Cook et Baker, 1983). La sécrétion de ces substances est un phénomène fréquent. En général ces métabolites sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire ayant une fonction antifongique et/ou antibactérienne. Ceux-ci offrent aux agents antagonistes un pouvoir d'inhibition des agents phytopathogènes et de colonisation de l'espace rhizosphérique des plantes (Petersen et Simmonds, 2003).

Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakly, 2003). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (Corbaz R, 1990). La production de ces métabolites présente un rôle important dans la lutte contre les maladies phytopathogènes (Spadaro, 2004 ; Cook et Baker, 1983 ; Larkin et Fravel, 1998 ; Thomashow, 1996 ; Schottel *et al.*, 2001 ; Raaijmakers *et al.*, 2002; El tarabily et Sivasithamparam, 2006). Cette production est influencée par des facteurs abiotiques qui correspondent à la composition du sol en matière organique, l'humidité du sol et le pH (Ownley *et al.*, 1992). Les facteurs biotiques qui sont surtout liés à l'interaction de l'agent antagoniste avec la plante et la microflore du sol, peuvent aussi influencer la production d'antibiotique (Duffy et Défago, 1999).

3. L'action antagoniste et antiphytopathogène des Actinomycètes adoptée par la lutte biologique

Les *Actinomycètes* présentent un important potentiel d'agents contre des maladies phytopathogènes. En effet, ces dernières décennies, plusieurs études se sont intéressées aux rôles que pourrait jouer les *Actinomycètes* dans la suppression des phytopathogènes. Le premier produit de lutte biologique commercialisé à base d'*Actinomycètes* a été fabriqué à partir de *Streptomyces griseoviridis* pour contrôler les agents phytopathogènes comme le *Botrytis* et le *Fusarium* (Errakhi, 2008 ; Copping et Menn, 2000).

Les *Actinomycètes* sont des bactéries saprophytes capables de dégrader la matière organique dans le sol et d'utiliser des molécules plus complexes pour leur croissance (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Ceci leur permet de s'adapter et de coloniser différents milieux rhizosphériques. Cette caractéristique est essentielle dans la lutte biologique. Ainsi, les *Actinomycètes* peuvent agir par différents mécanismes d'action comme l'antibiose, la compétition nutritionnelle ou spatiale ou encore le parasitisme (Errakhi, 2008). L'action antagoniste de ce groupe bactérien dans la lutte biologique a été démontrée contre *Fusarium oxysporum* (Sabaou *et al.*, 1998), *Alternaria* sp. (Khamna *et al.*, 2009), *Phytophthora* sp. (Xiao *et al.*, 2002), *Pythium ultimum* (Mahadevan et Crawford, 1997), *Colletotrichum lindemuthianum* (Tu, 1988), *Verticillium dahliae* (Berg *et al.*, 2000), *Rhizoctonia solani* (Trejo *et al.*, 1998). *Pseudomonas fluorescens*, bactérie à Gram-négatif, est aussi un agent de

biocontrôle efficace contre différents phytopathogènes (Raaijmakers et al., 2002 ; Thomashow et al., 1997).

La plupart des études ont utilisé des streptomycètes comme agents potentiels de lutte biologique contre les champignons pathogènes (Xiao et al., 2002 ; Berg et al., 2000 ; Tahvonen et Avikainen, 1987 ; Yuan et Crawford, 1995). Cependant et par rapport aux *Streptomyces* les informations sur le potentiel d'autres genres d'*Actinomycetales* est encore relativement faible (tableau 10).

- Parasitisme

Le parasitisme des mycéliums de champignons par les *Actinomycètes* a été démontré par plusieurs travaux (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006 ; Trejo et al., 1998 ; Yuan et Crawford, 1995). Plusieurs enzymes chitinolytiques ont été identifiées chez certaines espèces d'*Actinomycètes* dont *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans* (Miyashita et al., 1991), *Streptomyces lydicus* (Mahadevan et Crawford, 1997) *Streptomyces plicatus* (Abd-Allah, 2001) et *Streptomyces halsteii* AJ-7 (Joo, 2005).

La compétence rhizosphérique semble être une condition requise pour le succès la lutte biologique. Ainsi, l'incapacité de coloniser les racines peut expliquer l'échec d'un biocontrôle fiable observé dans de nombreuses études (Weller, 1988).

- Antibiose

La capacité des *Actinomycètes* à s'adapter à différentes conditions rhizosphériques, leur capacité à produire des enzymes lytiques et antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999 ; Errakhi, 2008 ; Barakate et al., 2002 ; El-Tarabily, 2006), leur permet d'être parmi les meilleurs agents antagonistes. (Sabaou et al., 1983) ont rapporté qu'une souche de *Nocardiopsis dassonvillei* a montré des activités antibiotique, mycolytique et parasitaires contre le mycélium de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

(Tréjo-Estrada et al., 1998) ont montré qu'il y a une corrélation entre la production d'antibiotiques dans le sol et l'efficacité des *Actinomycètes* dans la lutte contre les phytopathogènes. Par exemple *Streptomyces violaceusniger* YCED9 produits trois antifongiques : l'anigreline, la geltanamycine et laguanidylfingine impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (Tréjo-Estrada et al., 1998). *S. griseus* produit plusieurs antibiotiques antifongiques, comme l'actidione (Whiffen et al., 1946), le candicidine (Campelo et Gil, 2002) et les bafilomycines (Werner et Hagenmaier, 1984). La production

des antifongiques endophénazines A-D de *S. anulatus* a été reportée par (Gebhardt *et al.* 2002). De même, plusieurs antibiotiques produits par les *Actinomycètes* sont actuellement utilisés dans la lutte biologique (tableau 11).

Les *Actinomycètes* comme d'autre microorganisme peuvent également favoriser la croissance de plantes par la production de phytohormones (Harir, 2010), et agir aussi par compétition nutritionnelle et spatiale contre les microorganismes phytopathogènes (Getha *et al.*, 2005).

Tableau 10. Le biocontrôle des maladies fongiques par les *Actinomycètes* non-*Streptomyces* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Antagoniste	Pathogène	Plante	Maladie	Référence
<i>Actinoplanes</i> sp.	<i>Pythium ultimum</i>	betterave	fonte des semis	Khan <i>et al.</i> , 1997
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	soja	pourridié	Sutherland and Lockwood, 1984
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	concombre	fonte des semis	El-Tarabily, 2006a
<i>Micromonospora</i> sp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blé	piétin	Coombs <i>et al.</i> , 2004
<i>Nocardia globerula</i>	<i>Helminthosporium solani</i>	pomme de terre	tache argentée	Elson <i>et al.</i> , 1997
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	blé	piétin	Coombs <i>et al.</i> , 2004
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>	framboise	pourridié	Valois <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptosporangium albidum</i>	<i>Phytophthora coloratum</i>	carottes	cavité pythienne	El-Tarabily <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptoverticillium netropsis</i>	<i>Phytophthora coloratum</i>	carottes	cavité pythienne	El-Tarabily <i>et al.</i> , 1997

Tableau 11. Les antibiotiques produits par les *Actinomycètes* utilisés en biocontrôle
(Errakhi, 2008 ; Copping et Menn, 2000).

Antibiotiques	<i>Actinomycètes</i>	Maladie/agent antagoniste	Mécanisme d'action
Blasticidines S	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	<i>Pyricularia oryzae cavara</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines liées au ribosome 50S et par la suite l'inhibition de l'élongation des chaînes protéiques.
Kasugamycine	<i>Streptomyces Kasugaensis</i>	<i>Falvia fulva</i> <i>Cercospora</i> spp. <i>Venturia</i> spp.	Inhibition de la biosynthèse des protéines en interférant l'association d' amino-acyl-tRN avec mRNA et la sous unité ribosomale mRNA-70S.
Mildiomyicine	<i>Streptoverticillium rimofaciens</i> B-98891	Les mildious <i>Erysiphe</i> sp. <i>Uncinula necator</i> <i>Podosphaera</i> sp.	Inhibition de la biosynthèse des protéines chez les champignons par l'inhibition de la peptidyle-transphérase
Natamycine	<i>Streptomyces natalensis</i> <i>Streptomyces Chattanoogaensis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	
Oxytetracycline		<i>Erwinia amylovora</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp.	Inhibition de la bio-synthèse des protéines en se fixant sur les sous unités 30S et 50S bactériennes et inhibe l'agglutination d' aminoacyl tRNA.
Polyoxine	<i>Streptomyces Cacaoi</i> var <i>asoensis</i>	<i>Alternaria</i> spp. <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (chitine).

Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Xanthomonas Oryzae</i> <i>X. citri</i> <i>Pseudomonas tabaci steven</i> <i>P. lachrymans</i>	Inhibition de la biosynthèse des protéines en se fixant sur la sous unité 30S et il cause une erreur de lecture du gène codant pour la synthèse des protéines
Validamycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition de la trihalase causant un mauvais branchement du mycélium et arrêt de la croissance mycélienne

Chapitre IV :

Matériel et méthodes

1. Isolement des *Actinomycètes*

1.1. Prélèvement et traitement des échantillons

Les souches d'*Actinomycètes* faisant l'objectif de cette étude ont été isolées du sol de quatre sites différents (Sebkha Guerrah Guellif wilaya d'Oum elbouaghi, sol semi-aride rhizosphérique de la commune de L'hamma wilaya de Khenchela, sol rhizosphérique d'un citronnier wilaya de Khenchela, sol rhizosphérique wilaya de Batna), durant les mois de Mars et Avril.

Les quatre échantillons du sol ont été prélevés selon la technique décrite par (Pochon et 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, 100g de terre et les déposer sur une feuille d'aluminium stérile ; puis, après avoir retiré les pierres et racines, 50g de l'échantillon trié sont placés dans un flacon stérile et transportés au laboratoire dans la même journée, ensuite conservés à 4 °C au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

1.2. Préparation du milieu d'isolement

Le milieu sélectif utilisé est le milieu Olson (Olson, 1968) (Annexe 1), additionné de nystatine (antifongique) à une concentration de 50 ug/ml (Cavala et Eberlin, 1994).

Les solutions d'antibiotiques sont préparées puis stérilisées par filtration sur membrane type millipore (de 0,22 µm de porosité) et sont ajoutées stérilement au milieu de base en surfusion à une température de 45 °C.

1.3. Dilution et mise en culture

Une série de dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} dans de l'eau physiologique ($\text{NaCl } 9\text{g.l}^{-1}$) stérile a été préparée à partir de chaque échantillon. Après agitation au vortex pendant 5 min (Hilali *et al.*, 2002), 0,1 ml de chaque dilution estensemencé à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement, l'inoculum déposé est ensuite étalé sur le milieu à l'aide d'un râteau en verre. Les boîtes ainsi préparées ont été incubées à une température de 30 °C pendant 2 à 3 semaines se rapprochant par leur aspect macroscopique aux *Actinomycètes* (Hilali, 2006). Des observations journalières sont effectuées afin de suivre la croissance des colonies.

1.4. Prélèvements des colonies d'*Actinomycètes*

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).

1.4.1. Préidentification des *Actinomycètes*

Dans un premier temps, les colonies d'*Actinomycètes* sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose, présentant un aspect farineux corné au bord frangé au centre proéminent) (Girard et Rougieux, 1967).

Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (grossissement $\times 10$) (Williams et Cross, 1971).

Pour une observation plus claire, une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'Agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (grossissement $\times 40$) (Suzuki, 2001).

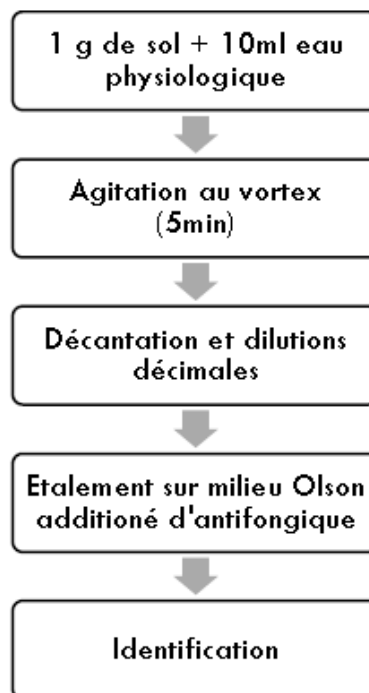


Figure 7. Etapes relatives à l'isolement des *Actinomycètes* du sol.

2. Repiquage et purification des souches

Les colonies d'*Actinomycètes* obtenues subissent une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires sur milieu YMEA (Yeast Malt Extract Agar) (Annexe 1) additionné au CaCO_3 incubé par la suite dans 30°C pendant 7 jours. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquage possible pour conserver la stabilité génétique de la souche.

3. Conservation des souches

Les isolats d'*Actinomycètes* purifiés, sont conservés jusqu'à utilisation.

3.1. Conservation sur gélose inclinée

Les isolats sont ensemencés par la méthode des stries sur le milieu YMEA + CaCO₃ en gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 21 jours, les cultures sont conservées à 4°C.

Un repiquage est réalisé tous les deux mois.

4. Etude de potentialité antagoniste des isolats d'*Actinomycètes*

4.1. Recherche de l'activité antibactérienne

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar. Cette activité a été testée vis-à-vis de bactéries tests provenant des établissements hospitaliers de Khenchela et de Constantine. Il s'agit des bactéries à coloration de Gram positif (*Staphylococcus aureus* 25, *Staphylococcus aureus* 43, *Bacillus* sp.) et des bactéries à coloration de Gram négative (*Morganella morganii*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Pseudomonas* sp.) *Acénitobacter* sp. provenant du CHU Batna.

Pour chaque souche, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive (Annexe 1). La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile, et en comparaison avec la solution Mc Farland (Annexe 1) de façon à obtenir une concentration finale de 10⁶ UFC / ml. Après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Annexe 1) (Isu et Onyeagba, 2002). L'activité inhibitrice se traduisant par l'apparition d'une zone d'inhibition a été appréciée après 24 heures d'incubation à 37 °C.

4.1.1. Technique des cylindres d'Agar

La recherche des métabolites antibactériens est effectuée par la technique des cylindres d'agar qui consiste à prélever à l'aide d'emporte-pièce des cylindres de gélose (6mm de diamètre) de cultures d'*Actinomycètes* de sept jours ensemencées en stries serrées à la surface du milieu YMEA et de les déposer à la surface du milieu Muller- Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage selon la technique de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) avec les bactéries tests.

Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une pré diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures (Gungi *et al.*, 1983).

Les zones d'inhibition sont mesurées, plus cette zone est grande (\emptyset), plus l'activité antibactérienne est grande (Tortorano *et al.*, 1979 ; Saadoun et Almoumni, 1997 ; Peterson *et al.*, 2003 ; Lemriss *et al.*, 2003).

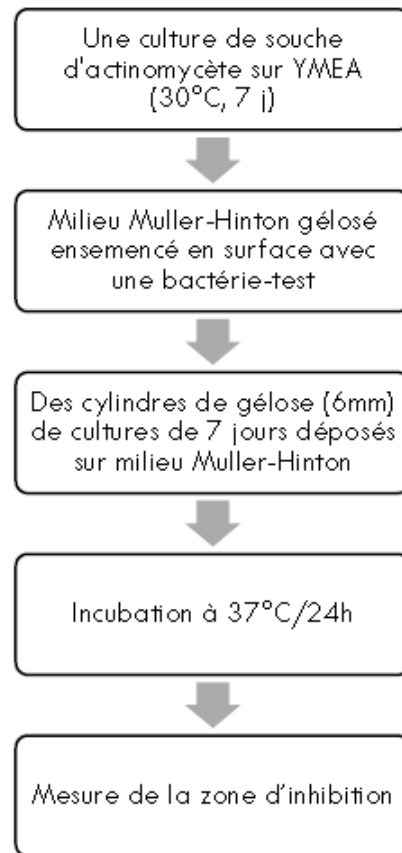


Figure 8. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches actinomycétales.

4.2. Recherche de l'activité antifongique

L'activité antifongique des *Actinomycètes* isolés est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux phytopathogènes obtenus de l'ATGC, Alkhroub, Constantine. (*Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium sp.*, *Cylindrosporium sp.*, *Trichophyton sp.*)

Un milieu gélosé, Potato Dextrose Agar (PDA) fraîchement préparé, est ensemencé une fois refroidi avec les spores de champignons dont on veut évaluer la résistance au centre de la boîte de Pétri de 145 mm de diamètre par touche. Les disques de 6 mm de diamètre de culture d'*Actinomycètes* âgée de 7 jours dans YMEA sont déposés à l'aide d'emporte-pièce.

Après une pré diffusion à 4°C pendant 4 heures et par la suite une incubation de 48 à 72 heures, on note s'il y a eu lieu ou non croissance du champignon (Thibodeau *et al.*, 2002).

Le diamètre des zones d'inhibition sont mesurés en millimètre du bord de la souche actinomycétale ou du cylindre d'agar à la limite de la zone où il n'y a pas inhibition du microorganisme cible (Badji *et al.*, 2005 ; Boughachiche *et al.*, 2005).

5. Extraction des antibiotiques et bioautographie

5.1. Extraction des antibiotiques

5.1.1. Culture sur milieu solide

06 boîtes de pétri contenant le milieu YMEA (pH 7,3) sontensemencées avec la souche d'*Actinomycètes* à effet antagoniste (productrice d'antibiotique). Les cultures sont incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours jusqu'à obtention d'une bonne sporulation.

5.1.2. Récupération de filtrat de culture

Les deux souches sélectionnées (CVF et LAC₁) sontensemencées en stries serrées sur milieu YMEA + CACO₃. Après incubation à 28°C pendant sept jours. La gélose est fragmentée puis reparti dans cinq flacons contenant chacun 40 ml d'acétate d'éthyle puis ils sont placés dans un bain marie agitateur pendant 24h. Les extraits sont assemblés, puis filtrés avec papier Watman N°1.

5.1.3. Extraction à partir des filtrats de culture

Les filtrats de culture sont récupérés puis évaporés sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (INGOS) jusqu'à sédimentation du résidu sur la paroi du ballon.

Le résidu obtenu sédimenté est récupéré par une agitation avec 15ml de méthanol qui sera mis dans un petit flacon ambré en verre et conservé à 4°C.

5.2. Test de l'extrait brut

Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture sont testés contre les souches sélectionnés selon leur sensibilité vis à vis à chacune des souches (CVF et LAC₁).

Pour cela, nous avons utilisé la technique des disques stériles en papier de 6mm de diamètre. Ces disques sont imbibés par différents volumes (100 µl, 50 et 25µl) d'extraits organiques 1 et 2, puis séchés au courant d'air chaud. Les disques sont ensuite déposés stérilement

- À la surface des géloses PDA, préalablementensemencée par les champignons tests.
- À la surface Mueller-Hintonensemencé par écouvillon selon la technique de la NCCLS pour les souches bactériennes test.

Les boîtes sont ensuite mises 2h à 4°C pour permettre une pré diffusion des substances bioactives (Tortoreno *et al.*, 1979), puis incubées à 37°C pour les bactéries, à 30°C pour les champignons.

Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

5.2.1. Séparation des molécules bioactives

5.2.1.1. Chromatographie sur couche mince CCM

Afin d'identifier quelles étaient les molécules responsables de l'activité antibactérienne dans l'extrait méthanolique de nos souches sélectionnées CVF, LAC₁, nous avons adaptée une méthode de bioautographie après séparation sur CCM.

- Six microlitres de chaque extrait méthanolique des souches actinomycétales sont déposés au bas de la plaque CCM (5cm X 20 cm) sur une bande de 1 cm située à 1,5 cm du bord de la plaque.
- La plaque a ensuite été développée dans une cuve qui contient le système d'éluant (Toluène, Acétone, Ether de pétrole) ayant les proportions 4 /4 /3 respectivement, jusqu'à ce que le front de solvant soit à 1 cm du haut de la plaque de CCM.
- L'atmosphère de la cuve est saturée pendant 2 heures avec la vapeur du solvant choisi avant d'y introduire la plaque.
- Après 10 à 15 cm de distance parcourue par le solvant à partir du départ, la chromatographie est arrêtée.
- le solvant est éliminé soit par simple évaporation à température ambiante soit sous courant d'air chaud.
- Le rapport frontal est calculé selon la formule (RF), après la séparation et la révélation qui s'effectuera sous lampe UV.

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par les molécules bioactives}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

5.2.1.2. Bioautographie des molécules bioactives

A l'inverse des méthodes chimiques particulière à chaque classe d'antibiotique et qui ne peuvent être mises en œuvre qu'une fois connues leurs réactions colorées, la révélation des antibiotiques par voie microbiologique présente un caractère absolument général, puisqu'il

consiste à mettre en contact le chromatogramme dans une boîte de pétri avec le milieu préalable pour chaque type de microorganisme (bactéries, champignons).

Les chromatogrammes sont alors récupérés par grattage de la couche puis déposés délicatement à la surface de la gélose. Après 2 heures à 4°C les boîtes sont incubées. Les zones d'inhibition ont été notées après écoulement de la durés d'incubation.



Figure 9. Extraction et caractérisation des antibiotiques des isolats (CVF, LAC₁).

Chapitre V :

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des *Actinomycètes* rhizosphériques

L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles molécules antibiotiques consiste à explorer des écosystèmes peu ou pas étudiés. L'isolement des bactéries actinomycétales a été effectué à partir de quatre échantillons rhizosphérique. Ce biotope a été choisi car il se caractérise par un accroissement considérable des populations microbiennes suite à l'abondance des substrats énergétiques, ainsi les *Actinomycètes* sont plus abondantes dans la rhizosphère que dans le sol avoisinant. C'est ce qui a été rapportés par (Cooper *et al.*, 1949 ; Sirry *et al.* 1981 ; Mohamed, 1982 et Davet, 1996) dans leur travaux.

Plusieurs techniques ont été utilisées par des chercheurs pour l'isolement sélectif des *Actinomycètes*. Elles reposent essentiellement sur l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (Larpent et Sanglier, 1989 ; Hilali *et al.*, 2002). C'est cette méthode que nous avons adoptée au cours de notre travail en utilisant la nystatine à une concentration de 50 ug/ml comme antifongique dans le milieu sélectif Olson.

Un total de 16 *Actinomycètes* a été isolé. Les isolats obtenus sont purifiés après plusieurs repiquages sur milieu YMEA, conservés sur YMEA inclinée à +4 °C. (Le tableau 12) présente le nombre d'isolats d'*Actinomycètes* obtenus à partir de différents échantillons.

Tableau 12. Criblage des souches d'*Actinomycètes* antagonistes

Echantillons	Lieu de prélèvement	Nombre de souche d' <i>Actinomycètes</i> isolés	Nombre d' <i>Actinomycètes</i> à activité antibactériennes		Nombre d' <i>Actinomycètes</i> à activité antifongiques
			G+	G-	
1	Sol de sebkha (Oum elbouaghi)	02	00	00	01
2	Sol rhizosphérique (El hamma Khenchela)	08	08	03	08
3	sol rhizosphérique d'un citronnier (Khenchela)	05	04	01	05
4	sol rhizosphérique (Batna)	01	01	01	01
Total		16	13	05	15

Depuis un total de 4 prélèvements de sol, 16 différents isolats d'*Actinomycètes* ont été obtenues, deux 12,5% ont été isolés de Sebkha Guerrah Guellif wilaya d'Oum elbouaghi, huit 50% ont été isolés du sol semi-aride rhizosphérique de la commune de L'hamma wilaya de Khenchela, cinq 31,25% ont été isolés du sol rhizosphérique d'un citronnier dans la même wilaya et une souche a été isolée du sol rhizosphérique wilaya de Batna 6,25%.

On constate que le nombre d'isolats d'*Actinomycètes* obtenu dans cette étude est inférieur à celui isolé par (Abebe *et al.* 2013) (30 isolats) en Ethiopie et (Silambarasan *et al.*, 2012) (27 isolats) en Inde . Mais supérieur à celui obtenu par (Smriti *et al.*,2012) en Inde (07 isolats). Il existe peu d'informations publiées sur le dépistage des *Actinomycètes* antimicrobiens de la rhizosphère des sols semi-arides de l'Est Algérien. (Kitouni *et al.*,2005) a exploré le sol non rhizosphérique de zone semi-aride et a obtenu un faible nombre d'isolats *Actinomycètes* (8 isolats).

Cette étude a permis de remarquer que le nombre d'*Actinomycète* varie d'une région a une autre et cela, probablement due à l'influence des différents facteurs environnementale et de la composition chimique du sol (Tian *et al.*, 2004 ; Zitouni *et al.*, 2005). (Lo *et al.*, 2002) ont suggéré que la diversité des *Actinomycètes* peut être influencée par la diversité des plantes d'où leur sol rhizosphérique a été collecté, ainsi que l'usage des fertilisants et pesticides qui peuvent affectés la distribution des microorganismes.

Les sols rhizosphériques (El hamma et du citronnier) semblent être les plus riches en germes d'*Actinomycètes* par rapport au reste de la région cela indique qu'il constitue un environnement favorable à leur développement.

1.1. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes actinomycétales

Ces dernières sont généralement rondes aux contours irréguliers, opaque qui adhèrent à la surface de la gélose, leur couleur est blanche. Ces colonies ressemblent à l'aspect caractéristique des *Actinomycètes* (Figure 4).



Figure 4. Aspect macroscopique caractéristique d'*Actinomycètes* (colonies dures incrustées dans la gélose).

1.2. Etude de l'aspect microscopique des isolats d'*Actinomycètes*

Toutes les souches d'*Actinomycètes* purifiées se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certaines ou pas pour d'autres en éléments bacillaires ou ovoïdes. Ils sont regroupés quelques fois en masse pour former des thalles denses (Figure 5, 6).

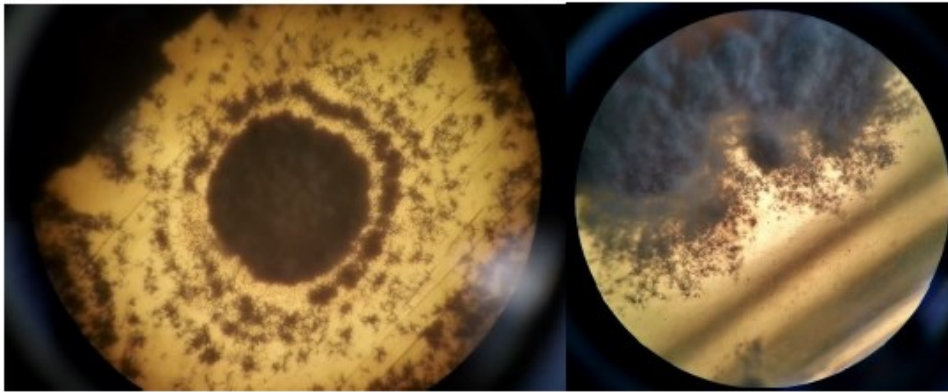


Figure 5. a- Aspect microscopique colonies circulaires d'*Actinomycètes* constituées d'hyphes $\times 10$.

b- Bord de la colonie sous microscope photonique $\times 10$.

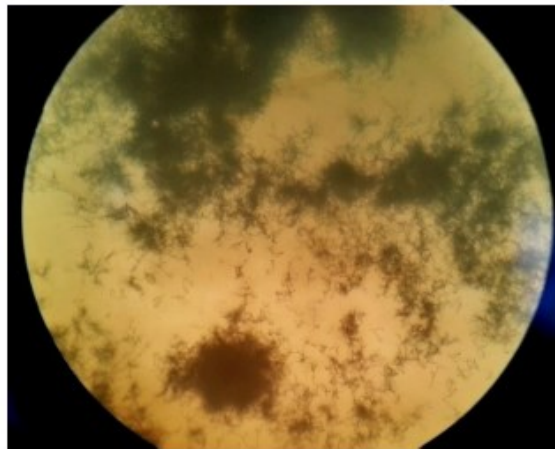


Figure 6. Colonie entière est placée sur une lame et lamelle $\times 40$.

2. Étude préliminaire des activités antimicrobiennes (Méthode de cylindres d'agar)

L'activité antibactérienne et antifongique des souches actinomycétales isolée et purifiée a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Les résultats obtenus sont résumés dans le (tableau 13 et 14) d'où il en ressort que sur les 16 isolats, seules 13 souches d'*Actinomycètes* sont actives sur au moins une des bactéries tests étudiées, et presque toutes sauf une ont une activité antifongique.

Le taux d'isolement des *Actinomycètes* à activité antibactériennes était alors de 81,25% tandis que celui des *Actinomycètes* à activité antifongique était de 93%. Ces résultats semblent être considérablement supérieurs à ceux déjà établis par (Thakur D *et al.*, 2007) 59,09% et (Abebe B *et al.*, 2013) 26,7% (Figure 10, 11, 12, 13, 14) dans annexe 2.

2.1. Activité antibactérienne

En ce qui concerne les germes tests, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des *Actinomycètes* en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, cela s'observe essentiellement dans le cas d'activité de CVF contre *S.aureus* 43 qui a enregistré le plus gros diamètre d'inhibition 32mm, en plus presque tous les isolats ont une action sur les Gram positif et seulement 38,46 % d'entre eux présentent une activité sur les Gram négatif des bactéries tests. Ceci a été également constaté dans les travaux de (Valli S *et al.* 2012 ; Hasavada *et al.* 2006 et Atta *et al.* 2009).

Cette différence de sensibilité des deux types bactériens peut être expliquée par la différence morphologique, les Gram négatif possèdent une membrane de nature lipopolysaccharidique qui rend la paroi imperméable aux substances hydrosolubles (polaires). Tandis que les Gram positif plus susceptibles disposent d'une couche externe de peptidoglycane qui n'est qu'une barrière imperméable efficace contre ce genre de molécules (Scherrer *et al.*, 1971).

Mis à part les souches tests *Proteus sp.*, *Providencia sp.* et *Pseudomonas sp.* insensibles à tous les isolats, la souche SH1 a montré une activité sur toutes les bactéries testées à l'exception d'*Acinetobacter sp.* et *M.morganii*, ainsi que la souche SH4 qui inhibe toutes les bactéries tests étudiés sauf *Enterobacter sp.* et *K.pneumoniae*.

Les trois souches CB1, CB2 et CV se révèlent être actifs seulement sur une seule souche test *S.aureus* 43, il en est de même pour SH3 qui présentait une activité sur *S.aureus* 25 uniquement. Aucun des 3 isolats SG1, SG2 et CR ne présentait une activité sur quelconques des souches tests. Les *Actinomycètes* ont montrés une activité importante vis-à-vis *staphylococcus aureus* ce qui a été confirmé avec les travaux de (Devi NKA *et al.*, 2006) et

Tableau 13. Activité antibactérienne des isolats actinomycétales (Méthode des cylindres d'agar).

Isolats	Gram négatif										Gram positif		
	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>M.morganii</i>	<i>Proteus</i> sp.	<i>Providencia</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>S.aureus</i> 25	<i>S.aureus</i> 43		
CR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13		
CB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12		
CV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12		
CVF	15	24	-	-	-	-	-	-	26	28	32		
SG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LAC1	21	19	-	-	-	-	-	-	23	20	25		
SG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SH1	-	16	17	19	-	-	-	-	8	13	18		
SH2	-	-	11	15	-	-	-	-	-	-	20		
SH3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-		
SH4	19	-	10	-	14	-	-	-	23	30	30		
SH5	-	-	-	-	-	-	-	-	11	15	15		
SH6	-	-	-	-	-	-	-	-	11	10	10		
SH7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	15		
SH8	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	10		

Diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm, (-) aucune activité.

(Valli S *et al.*, 2012) mais les contredisait lorsqu'il s'agisse de *Pseudomonas aeruginosa* car ils se sont tous avérés inactifs contre cette espèce bactérienne.

Par comparaison des zones d'inhibition, celles obtenues avec les souches CVF, LAC1 et SH4 (32, 30 et 25 mm respectivement) sont les plus importantes chez les Gram positif, et de (24, 21,19 mm) chez les Gram négatif. Cela est dû à une forte concentration des molécules bioactives libérées qui diffuse plus rapidement que la croissance de la souche-test ce qui a conduit à une zone d'inhibition importante (Koch, 1999).

2.2. Activité antifongique

Dans le (tableau 14), sont rapportés les résultats d'antagonisme des 16 isolats d'*Actinomycètes* contre les six champignons phytopathogènes, leur croissance a été inhibée par les cultures d'*Actinomycètes*, lorsqu'elles sont cultivées conjointement sur milieu PDA.

Les isolats provenant de sols rhizosphériques de la région d'Elhamma, présentent une activité antagoniste significative par comparaison avec celles des autres isolats. L'isolat SH4 est actif sur toutes les souches test mis à part *Trichophyton sp.* Les deux souches SH6, SH7 sont avérés les plus efficaces pour le contrôle d'*Alternaria sp.* avec un diamètre d'inhibition de 23mm. L'isolat SH4 était efficace sur la réduction de la croissance du mycélium d'*Aspergillus niger* avec une zone d'inhibition de 18mm. La souche SH2 était le meilleur isolat pour le contrôle de la croissance de *Cladosporium herbarum* avec 24mm. Tandis que la souche SH8 présente une activité sur uniquement *Cladosporium herbarum*.

Les deux souches SG2 CB2 enregistrent les plus gros diamètres d'inhibition 30 mm sur *Trichophyton sp.* Alors que SG1 ne présente aucune activité sur les six souches fongiques tests.

Les pourcentages des isolats actifs contre *Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Cylindrosporium sp.*, *Fusarium*, *Trichophyton sp.*, sont respectivement, de 87,5%, 18,75%, 50%, 37,5%, 31,25%, 31,25%.

Tableau 14. Activité antifongique des isolats actinomycétales (Méthodes des cylindres d'agar).

Isolats	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cylindrosporium sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
CR	16	-	-	-	12	-
CB1	12	-	-	23	-	-
CB2	13	-	-	18	-	30
CV	13	-	-	21	-	14
CVF	16	-	-	-	13	20
SG1	-	-	-	-	-	-
LAC1	18	-	-	-	-	24
SG2	15	16	-	-	14	30
SH1	14	15	20	-	-	-
SH2	18	-	24	-	-	-
SH3	17	-	22	21	-	-
SH4	17	18	21	20	20	-
SH5	17	-	22	20	19	-
SH6	23	-	15	-	-	-
SH7	23	-	21	-	-	-
SH8	-	-	10	-	-	-

Diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm, (-) aucune activité.

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits organiques (Méthode des disques en papier)

Parmi les 16 souches d'*Actinomycètes* étudiées et d'après la diversité de bactéries cliniques et souches fongiques phytopathogènes envers les quelles sont actives, les souches CVF et LAC1 sont sélectionnées comme les plus productrices de molécules bioactifs.

Plusieurs chercheurs ont utilisés les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Actinomycètes*. (Bussari *et al.*, 2008 ; Shomura *et al.*, 1979 ; Stocks *et al.*, 2001) démontrent que l'extraction à partir d'un milieu solide est largement plus rentable que celle à partir d'un milieu liquide. Et comme les solvants organiques de polarité différente ont été largement utilisés pour l'extraction de composés antimicrobien (Selvameenal *et al.*, 2009), on a adopté ce type d'extraction avec de l'acétate d'éthyle.

En effet, l'étape d'extraction permet de concentrer les molécules bioactives et est considérée comme une première purification (Chaubal *et al.*, 1995 ; Burianek et Yousef, 2000), ainsi un disque contenant des molécules pré purifiées est supposé donner des valeurs de diamètres d'inhibition plus nettes que celles données par un cylindre d'Agar.

Le test des extraits sur les souches bactériennes hautement sensible (*Acénitobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *S.aureus* 25, *S.aureus* 43) a été réalisé par la technique des disques en papier. Les résultats obtenus sont présentés dans le (tableau 15). L'activité antibactérienne mise en évidence par disques est illustrée sur les (figure 15, 16, 17) dans (annexe 2).

Toutes les souches testes hautement sensible (bactéries et champignons) par la technique des cylindres d'agar se révèlent l'être aussi par la technique de disque en papier sauf *Alternaria sp.* et *T.rubrum* qui se montraient avoir une résistance vis-à-vis l'extrait LAC1, on constate aussi que pour l'isolat CVF les valeurs des zones d'inhibitions provoquées par le cylindre d'agar sont supérieurs à ceux obtenu par disques en papier notamment pour les Gram positifs (Figure 21). Cela peut être expliqué par une désintégration partielle des molécules bioactives lors du processus d'extraction. Par contre pour l'isolat LAC1 les valeurs obtenus par les disques en papier sont supérieur à ceux du disque d'agar ce qui confirme les résultats de (Chaubal *et al.*, 1995 ; Burianek et Yousef, 2000).

Tableau 15. Activité antimicrobienne des différents extraits organiques (Méthode des disques en papier).

Souches tests	Extrait 1 (CVF)			Extrait 2 (LACI)			Amikacine 30µg	Ciprofloxacine 5µg
	100µl	50µl	25µl	100µl	50µl	25µl		
G+	<i>Acinetobacter sp.</i>	21	20	19	20	18	31	35
	<i>Enterobacter sp.</i>	24	23	22	26	24	-	28
	<i>Bacillus sp.</i>	25	23	21	22	20	24	29
G-	<i>S.aureus 25</i>	22	21	20	26	23	26	37
	<i>S.aureus 43</i>	23	21	20	25	23	10	35
	<i>Alternaria sp</i>	14	13	10	-	-		
Ch	<i>Fusarium oxysporum</i>	20	15	14				
	<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-		

Diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm, (-) aucune activité, (G+, G-, Ch) (Gram positif, Gram négatif, Champignons).

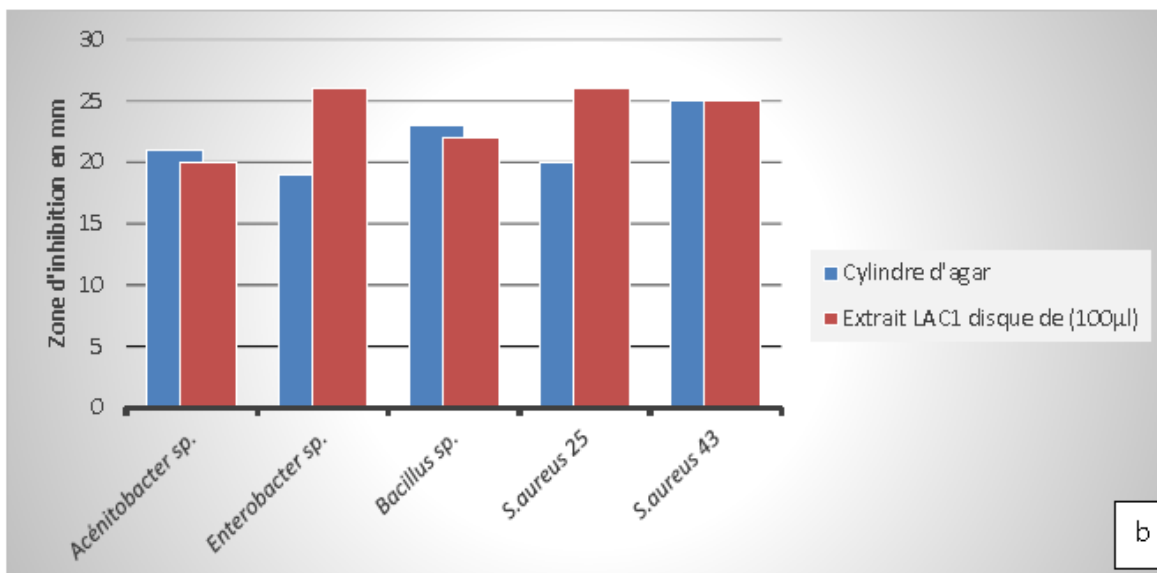
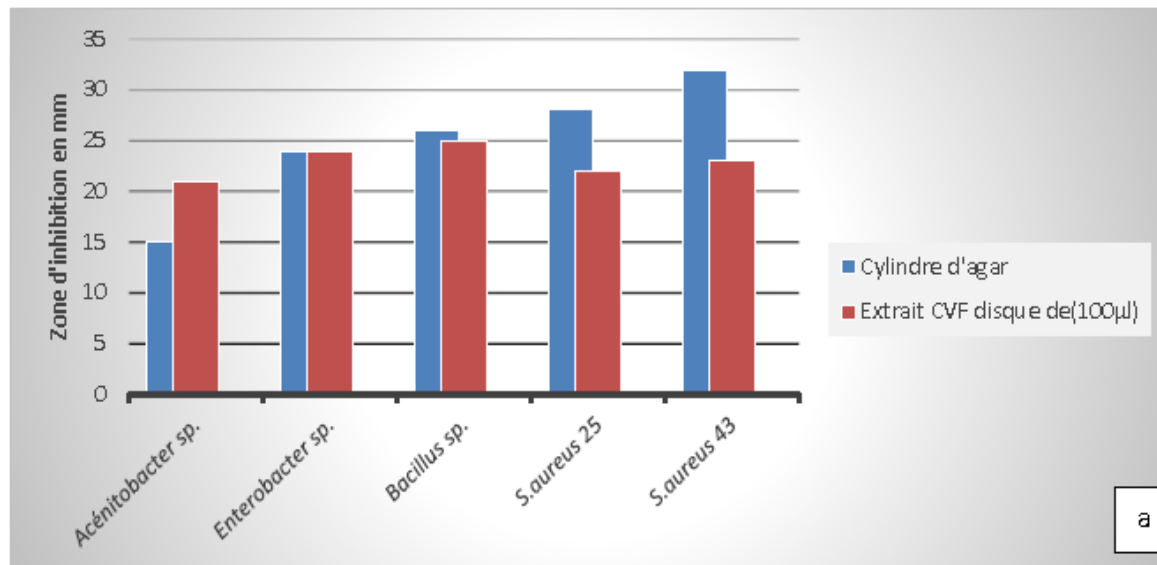


Figure 21. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par les deux techniques, cylindre d'agar et disque en papier.

a - Isolat CVF

b - Isolat LAC1

3.1. Comparaison entre les extraits bruts et antibiotiques tests

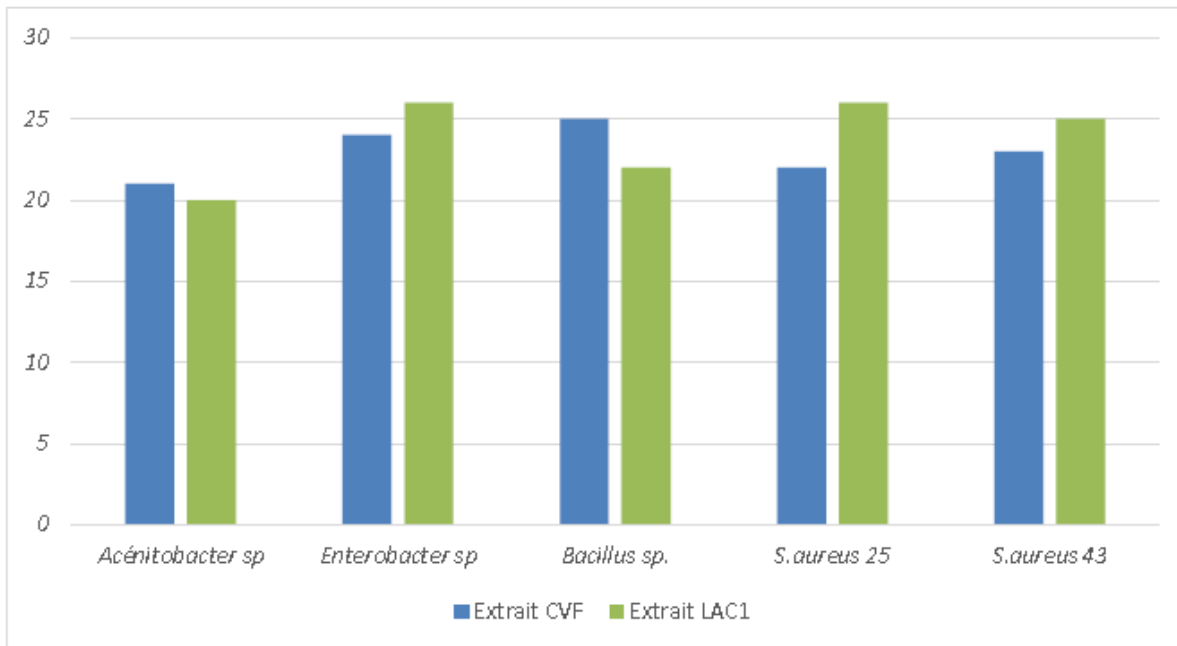


Figure 22. Comparaison entre l'extrait CVF et LAC1.

On constate que l'extrait CVF a pu atteindre 25mm comme diamètre le plus large envers *Bacillus sp.* alors que LAC1 26mm envers *Enterobacter sp.* et *S.aureus 25*. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenu par (Gurung *et al.*, 2009) 18mm et inférieur à ceux obtenu par (Abebe *et al.*, 2013) 40mm.

L'extrait CVF semble être le plus efficace contre *Acénitobacter sp.* et *Bacillus sp.* tandis que LAC1 est efficace contre *S.aureus* et *Enterobacter sp.*

Il existe une différence considérable entre les extraits brutes (non purifiés) et les antibiotiques tests pure (Amikacine 30 μ g et ciprofloxacine 5 μ g) car ces derniers ont montrés une activité significativement importante vis-à-vis aux extraits brutes (non purifiés) (Figure 15) voir annexe 2, Rex *et al* ont rapportés que cette différence non négligeable été normale de l'extrait non purifié comparé avec l'antibiotique purifié et conditionné pour usage clinique (Rex *et al.*, 2001).

Mais les deux extraits ont montrés quelque fois de bonne zone d'inhibition pareille à celle obtenue avec l'antibiotique pure. Voilà pourquoi il serait d'avantage indispensable à entamer les processus de purification des deux extraits.

4. CCM analytique unidimensionnel

Une tentative de séparation des molécules à activité antibactériennes a été réalisée par la technique de chromatographie ascendante sur couche mince (Figure 18). Le développement des chromatogrammes dans le système éluant (Toluène, Acétone, Ether de pétrole) 4/4/3 saturé fait apparaître deux taches (T1 et T2) dont les rapports frontaux sont calculés et sont réunis dans le (tableau 16).

Pour les deux extraits on observe la présence de deux taches qui sont visible a l'œil nu et a activité antibactérienne importante (grand diamètre d'inhibition) (Figure 19) dans annexe 2, ce qui explique que les souches CVF et LAC1 produisent donc au moins deux molécules antibactériennes sur milieu YMEA. Généralement les *Streptomyces* ont la capacité de produire plusieurs antibiotiques sur le même milieu ou sur des milieux différents (Davelos *et al.*, 2004) ;

Par contre on constate une absence totale d'activité antifongique des taches ; ceci peut être expliqué par une diminution de la concentration des molécules bioactives sur le chromatogramme après migration et séparation.



Figure 18. Chromatographie des extraits CVF et LAC1 sur couche mince (CCM).

Tableau 16. Bioautographie des extraits CVF et LACI.

		Rapport frontal (Rf)	Bioautographie				
			Gram négatif		Gram positif		
			<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>S.aureus</i>	
Extrait méthanolique de la souche CVF	Tache 1	0,40	9	25	18	18	25
	Tache 2	0,44	8	25	16	19	25
Extrait méthanolique de la souche LACI	Tache 1	0,38	12	24	17	18	26
	Tache 2	0,42	12	24	18	20	26

Diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm.

Conclusion

Les *Actinomycètes* sont considérés comme les procaryotes les plus précieux et les plus utilisés en biotechnologie, responsables de la production de la moitié des métabolites secondaire découverts à ce jour, ils constituent la source naturelle la plus prometteuse pour le développement des molécules d'antibiotiques futurs ; si complexes pour être synthétisés par la chimie combinatoire.

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la mise en évidence du phénomène d'antagonisme *in vitro* des *Actinomycètes* isolés d'un écosystème semi-aride de l'est Algérien envers des bactéries d'importance médicale et champignons phytopathogènes, et de pouvoir extraire les molécules bioactifs.

Au bilan, les résultats obtenus dans la présente étude montrent que :

D'une part, l'activité antimicrobienne diffère d'un isolat actinomycétal à l'autre, et d'autre part, pour le même isolat, l'activité antimicrobienne diffère d'une souche test (bactérie, champignons) à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes et antifongiques en même temps.

Les *Actinomycètes* sont caractérisés par un large spectre d'activité, sur les 16 souches actinomycétales testées, 13 souches sont actives envers au moins une bactérie test et 15 le sont envers une souche fongique phytopathogène test.

Les deux souches d'*Actinomycètes* CVF et LAC1 sont sélectionnées comme les souches les plus productrices d'antibactériens et antifongiques et qui présentent une activité dirigée beaucoup plus contre les bactéries Gram positif.

L'extraction des molécules bioactives par l'acétate d'éthyle a été choisi comme solvant organique pour les deux souches et la chromatographie sur couche mince nous a permis d'identifier d'une manière préliminaire les molécules bioactives. En se basant sur le chromatogramme obtenu, on a pu conclure que les antimicrobiens produits par les souches CVF et LAC1 sont constitués d'au moins de deux molécules (tache ou spot, de couleur jaune, sur la CCM après séparation visible à l'œil nu) qui ont démontrés leur activités sur toutes les

bactéries hautement sensibles mais pas toutes les souches fongiques car uniquement *Alternaria sp* et *Fusarium oxysporum* se révèlent être sensible à l'extrait CVF.

Les perspectives de nos recherches futures sont les suivants :

- Nous comptons élaborer un protocole étudié de prétraitement des échantillons afin de récupérer un maximum d'espèces actinomycétales viables et cultivable ainsi d'optimiser leur criblage.
- Complémenter l'identification d'*Actinomycètes* sélectionnées, par études physiologiques, chimio taxonomiques, phylogénétiques et moléculaire.
- Une piste très intéressante à suivre serait l'optimisation des paramètres cultureux par plan d'expérience afin d'améliorer la production d'antibiotiques.
- Nous projetons à compléter l'identification de la structure chimique de chacune de ces molécules bioactives après avoir procédé à la purification complète des extraits et de pouvoir les testés *in vivo*.
- Suivre la stratégie de screening développée par (Deshayes *et al.*, 1989), afin de vérifier s'il s'agit de molécules antibiotiques déjà existantes.
- Réaliser des études moléculaires au sein de ce groupe bactérien afin d'élucider non seulement l'organisation des gènes de biosynthèses des métabolites secondaire mais également les mécanismes de régulation qui sont probablement étroitement liés à la différenciation cellulaire afin de développer de nouvelles molécules.
- Parvenir à estimer la diversité phylogénétique de la population actinomycétale dans la région semi-aride de Khenchela par le biais d'approches culturelles biochimiques et moléculaires.

Ainsi les résultats de la présente investigation a décelé que les *Actinomycètes* d'un environnement semi-aride constitue une source importante pour la découverte de nouveaux antibiotiques.

L'originalité de ce travail a été, d'une part, la capacité à isoler des souches actinomycétales qui ont un spectre d'action sur des bactéries pathogènes pour l'homme et spécifiquement sur des bactéries à coloration de Gram positifs et négatifs. Pour ce dernier, il s'agit d'un résultat important puisque la majorité des antibiotiques commerciaux ont un spectre d'action plus large sur les bactéries Gram positifs. D'autre part, l'activité inhibitrice de ces souches vis-à-vis des champignons pathogènes et phytopathogènes. Ce qui indique l'intérêt de ces souches isolées dans le domaine de la santé publique et le domaine d'agriculture.

Au final est-ce qu'on peut dire que les actinomycètes vont tenir leurs promesses face à l'émergence d'acquisition de résistance bactérienne de plus en plus intense dans les années à venir ?

Annexes

Annexe 1 :

Composition des milieux de culture

Milieu Olson

Composition en g/l d'eau :

- Sodium caséine.....2g
- L-Asparagine.....0,1g
- Sodium propionate4g
- K₂HPO₄.....0,5g
- FeSO₄.....0,01g
- Agar.....20g
- pH = 7,2

Milieu YMEA + Ca CO₃

Composition en g/l d'eau :

- Extrait de levure.....4g
- Extrait de malt.....10g
- Glucose.....4g
- CaCO₃.....1g
- Agar.....20g
- pH = 7,3

Milieu PDA (potato dextrose agar)

Composition en g/l d'eau :

- Glucose20g
- Pomme de terre.....200g
- Agar.....15g
- pH = 6,5

Gélose nutritive

Composition en g/l d'eau :

- Extrait de viande..... 1g
- Extrait de levure..... 2,5g
- Peptone..... 5g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Gélose.....15g
- pH = 7,0

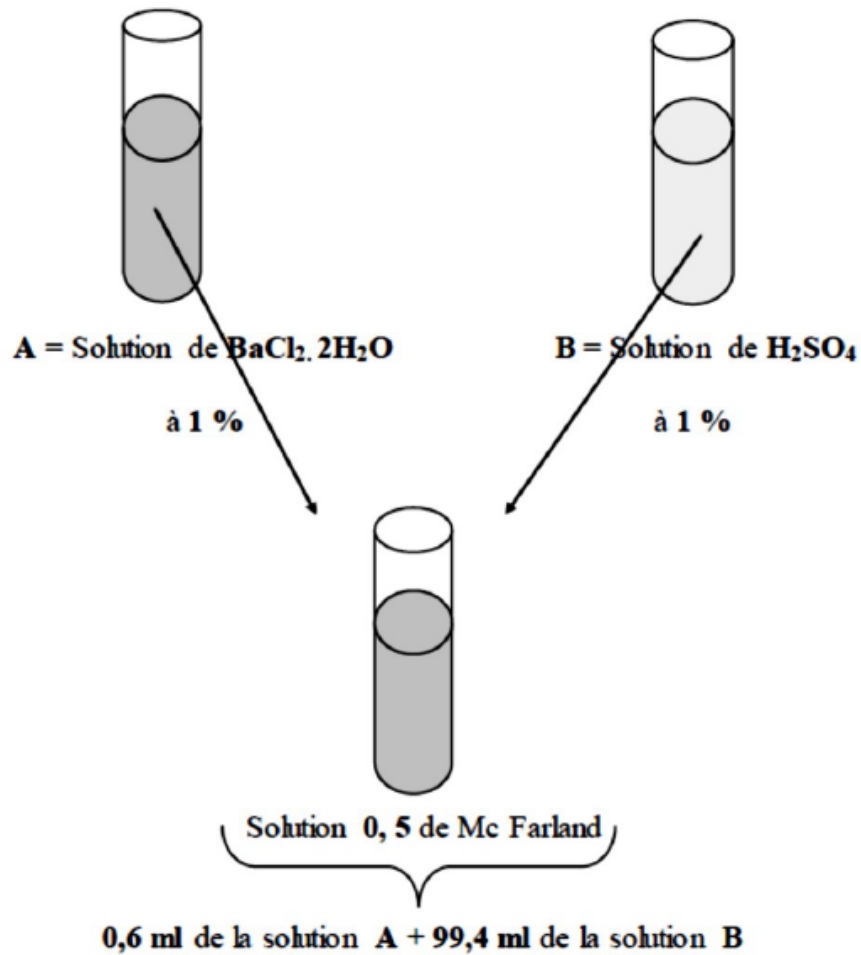
Mueller Hinton

Composition en g/l d'eau :

- Infusion de viande de bœuf.....300g
- Peptone de caséine.....17,5g
- Amidon.....1,5g
- Agar 17g
- pH = 7,4

Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland

1 / Préparation de la solution de 0,5 de Mc Farland (Chessbrough, 2000)



2/ Conditions de conservation de la solution 0,5 de Mc Farland (Smibert et Kreig, 1994)

Conditions de conservation de la solution 0,5 de Mc Farland

1/ à l'obscurité

2/ Température de conservation : 20-25 °C

3/ Durée de conservation : 6 mois

Annexe 2 :

Description du lieu de prélèvement :



Guerrah Guellif est une sebkha : sel incrusté dans une plaine plate exposée aux inondations périodique ou des grandes marées d'une superficie de 24000 ha situé au nord de la ville de Ain Zitoun, et à 12 Km de la ville d'Oum El Bouagui ; et accessible à partir de la route reliant Oum El Bouagui à Khenchela. Les coordonnées géographiques sont 35°46'33" Nord et 6°58'23" Est en DMS (degrés, minutes, secondes).



Photo prise du site de prélèvement.

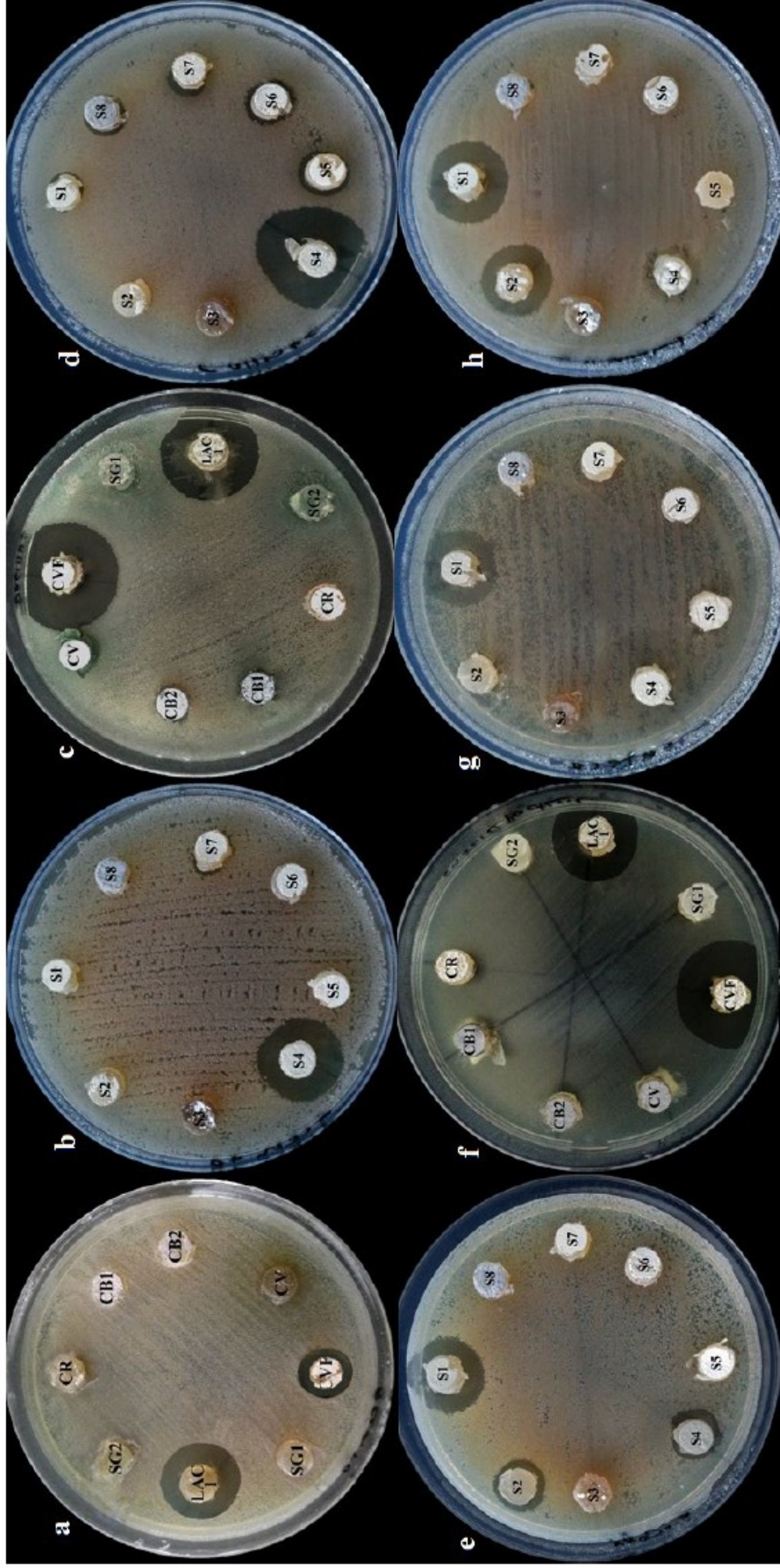


Figure 10. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.

a-b- *Acénitobacter* sp. **c-d-** *Bacillus* sp. **e- E.coli** **f-g- Enterobacter** sp. **H- K.pneumoniae.**

(CR, CBI, CB2, CV, CVF) Sol rhizosphérique du citronnier, (SG1, SG2) Sol rhizosphérique chott Guerrah Guellif, (LAC1) Sol rhizosphérique Batna, (S1, S2,...S8) Sol rhizosphérique Elhamma Khenchela.

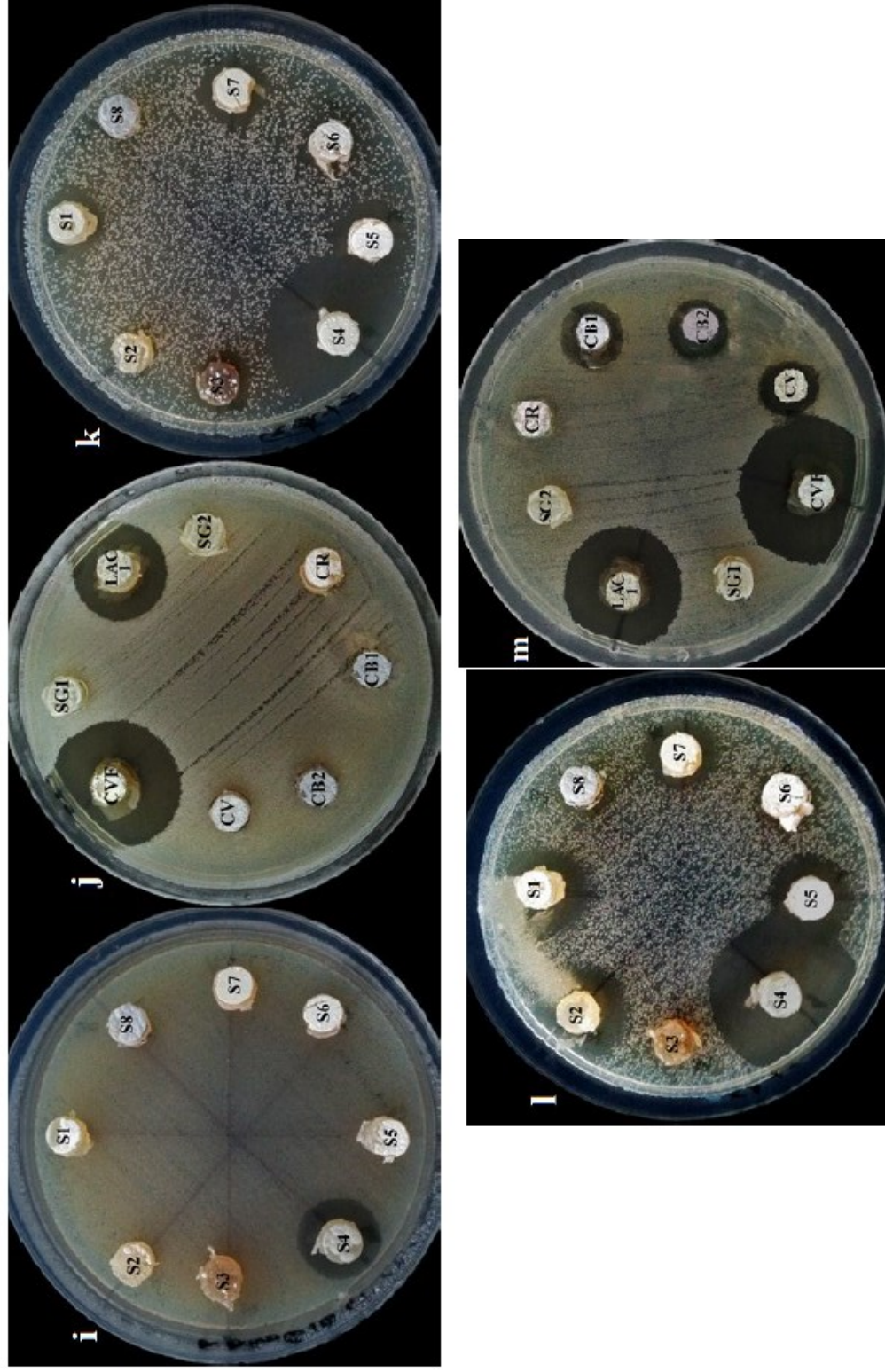


Figure 11. Mise en évidence de l'activité antibactérienne (Suite).

i- *M.morganii* **j-k-** *S.aureus* 25 **l-m-** *S.aureus* 43

(CR, CBI, CB2, CV, CVF) Sol rhizosphérique du citronnier, (SG1, SG2) Sol rhizosphérique chott Guerrah Guellif, (LAC1) Sol rhizosphérique Batna, (S1, S2,...S8) Sol rhizosphérique Elhamma Khenchela.

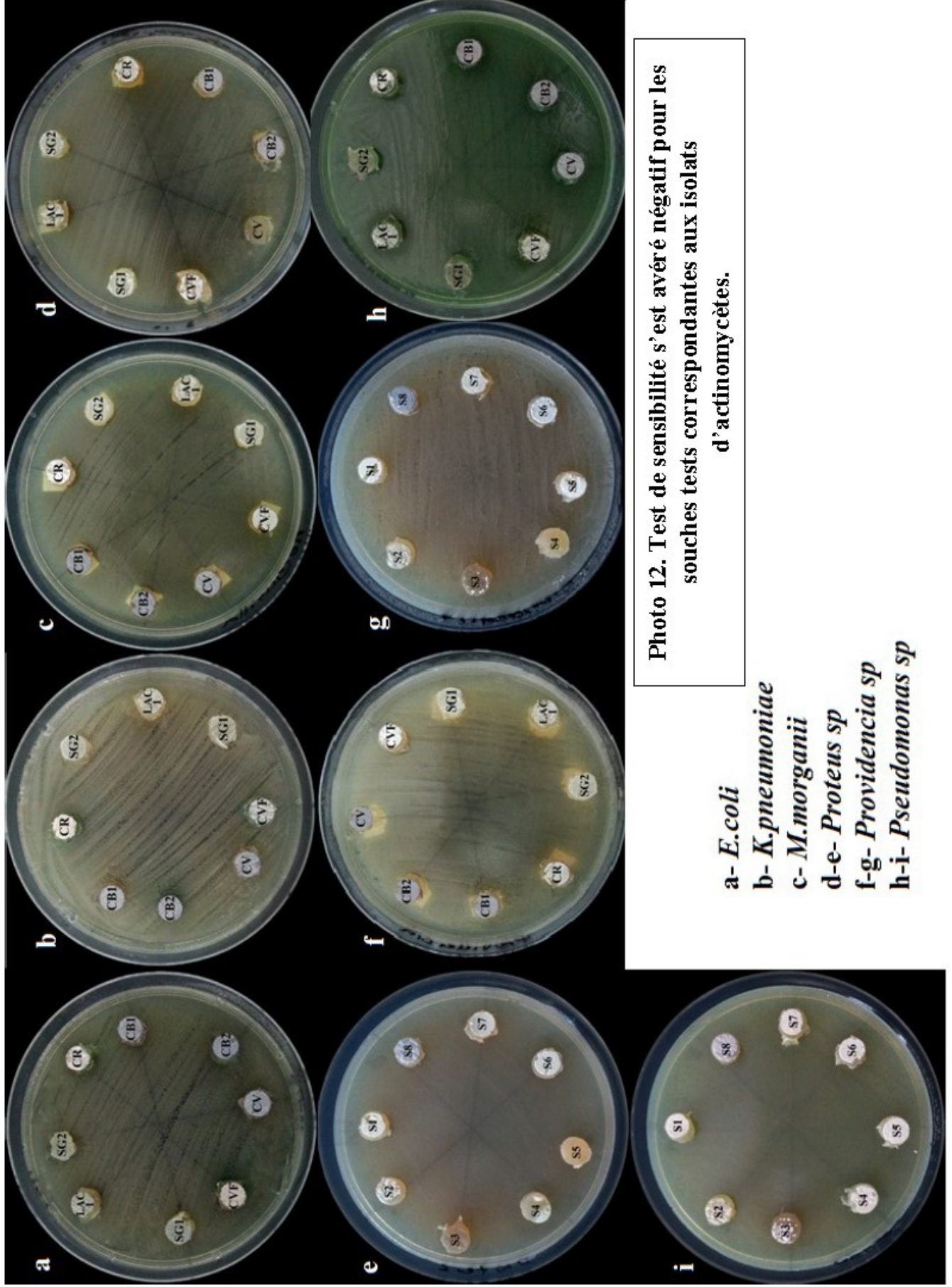


Photo 12. Test de sensibilité s'est avéré négatif pour les souches tests correspondantes aux isolats d'actinomycètes.

a- *E.coli*

b- *K.pneumoniae*

c- *M.morganii*

d-e- *Proteus sp*

f-g- *Providencia sp*

h-i- *Pseudomonas sp*

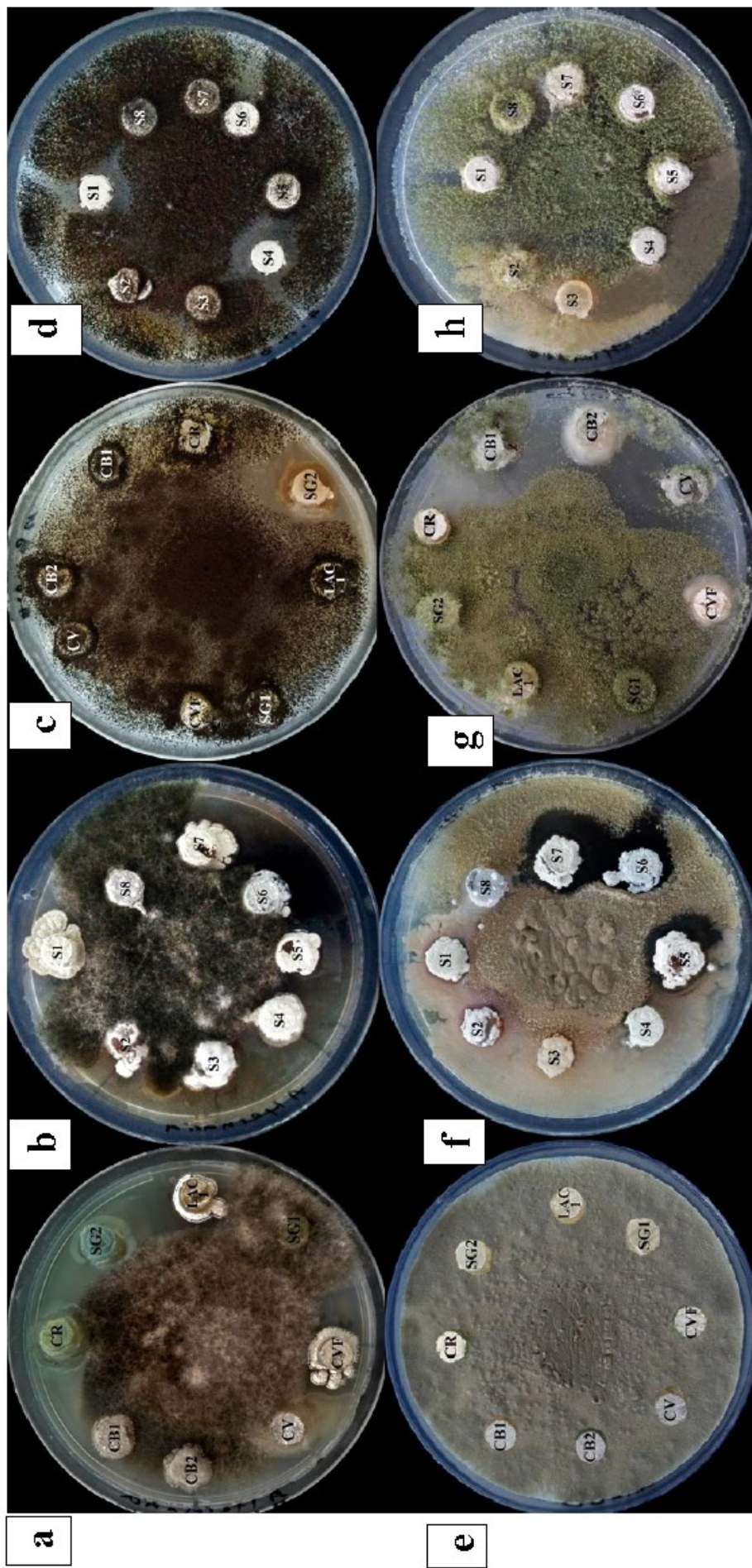


Figure 13. Mise en évidence de l'activité antifongique.

a-b- *Alternaria* sp **c-d-** *Aspergillus niger* **e-f-** *Cladosporium herbarum* **g-h-** *Cylindrosporium* sp.

(CR, CB1, CB2, CV, CVF) Sol rhizosphérique du citronnier, (SG1, SG2) Sol rhizosphérique chott Guerrah Guellif, (LAC1) Sol rhizosphérique Batna,

(S1, S2,...S8) Sol rhizosphérique Elhamma Khenchela.

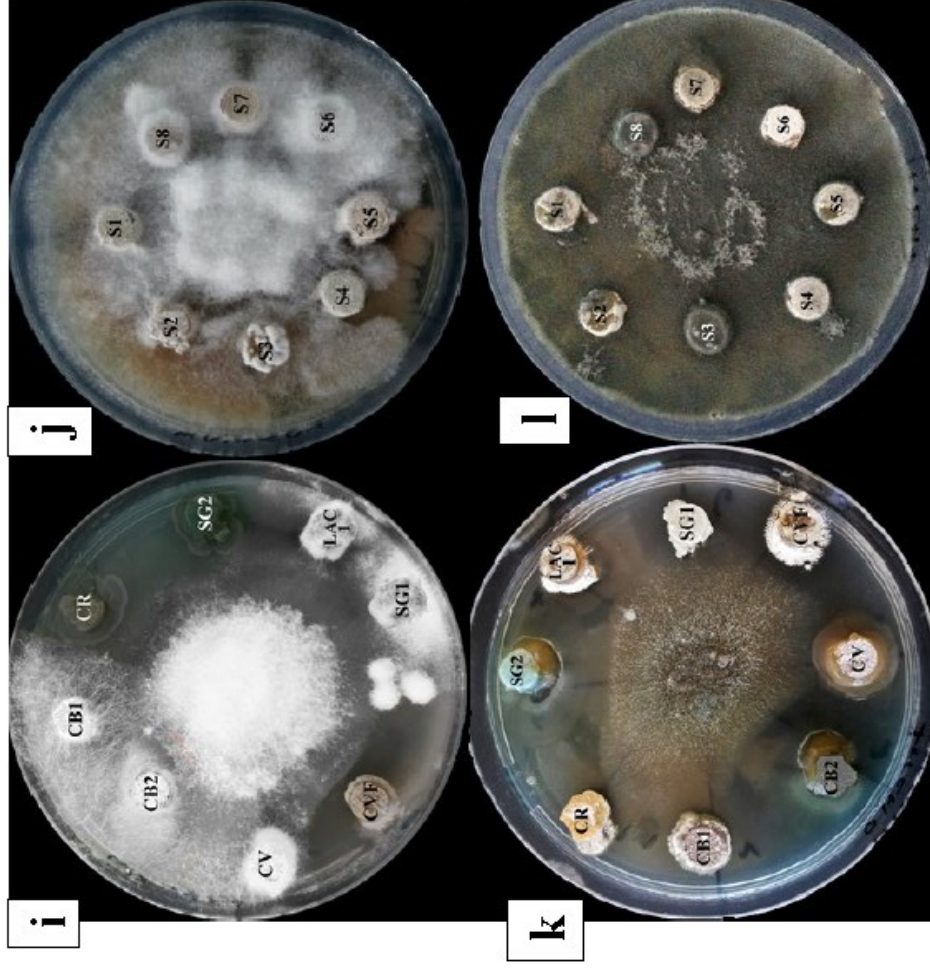


Figure 14. Mise en évidence de l'activité antifongique (Suite).

i-j- *Fusarium oxysporum* **k-l- *Trichophyton rubrum***

(CR, CB1, CB2, CV, CVF) Sol rhizosphérique du citronnier, (SG1, SG2) Sol rhizosphérique chott Guerrah Guellif, (LAC1) Sol rhizosphérique Batna, (S1, S2, ... S8) Sol rhizosphérique Elhamma Khenchela.

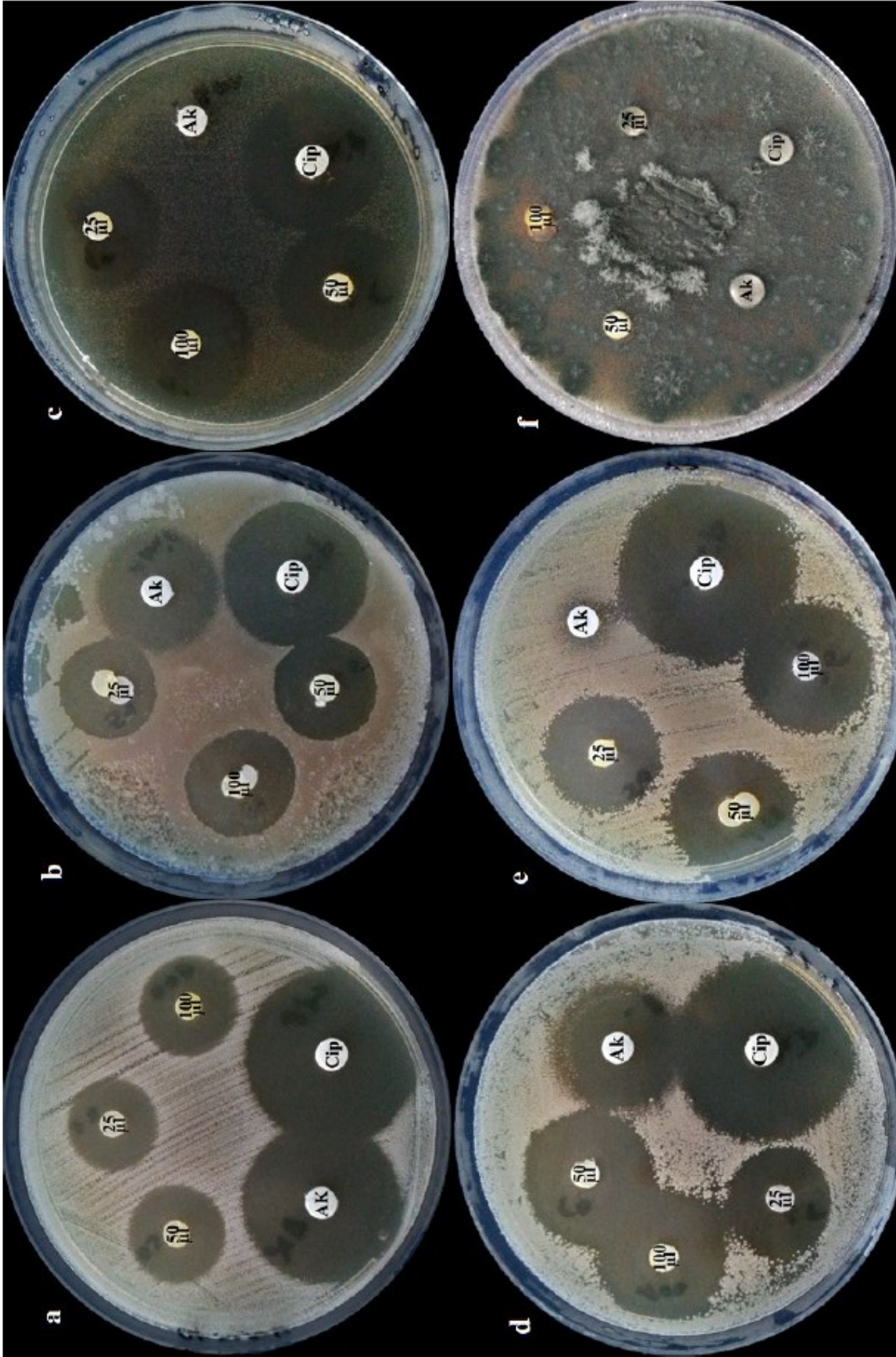


Figure 15. Test de l'effet antimicrobien de l'extrait LA C1 a (100µl, 50µl, 25µl).

a- *Acénitobacter sp.* **b-** *Bacillus sp.* **c-** *Enterobacter sp.* **d-** *S.aureus 25* **e-** *S.aureus 43* **f-** *Trichophyton rubrum*
 (AK) Amikacine, (Cip) Ciprofloxacine.

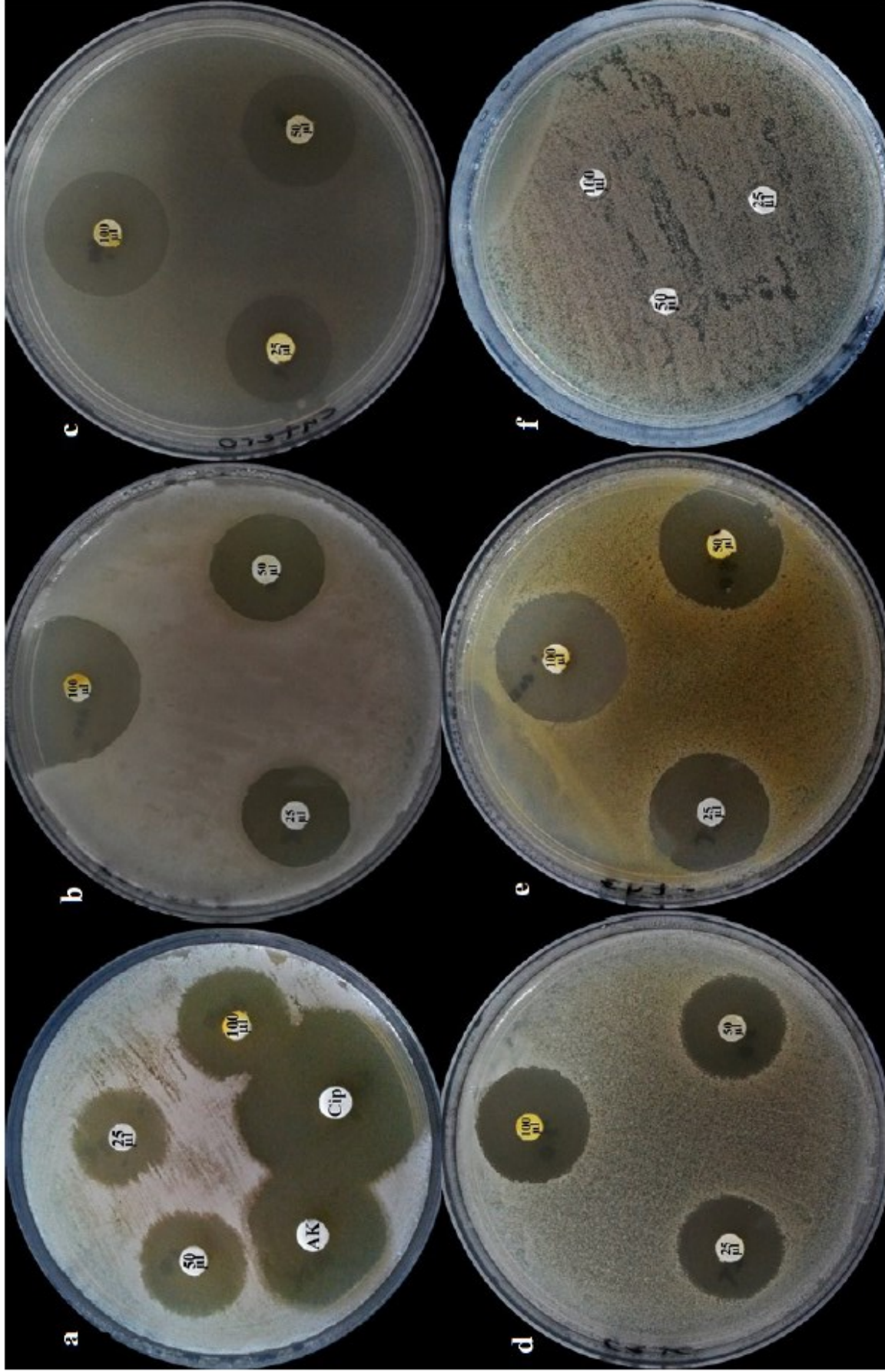


Figure 16. Test de l'effet antibactérien de l'extrait CVF a (100µl, 50µl, 25µl).

a- *Acinetobacter* sp. **b-** *Bacillus* sp. **c-** *Enterobacter* sp. **d-** *S.aureus* 25 **e-** *S.aureus* 43 **f-** test du solvant (Méthanol)

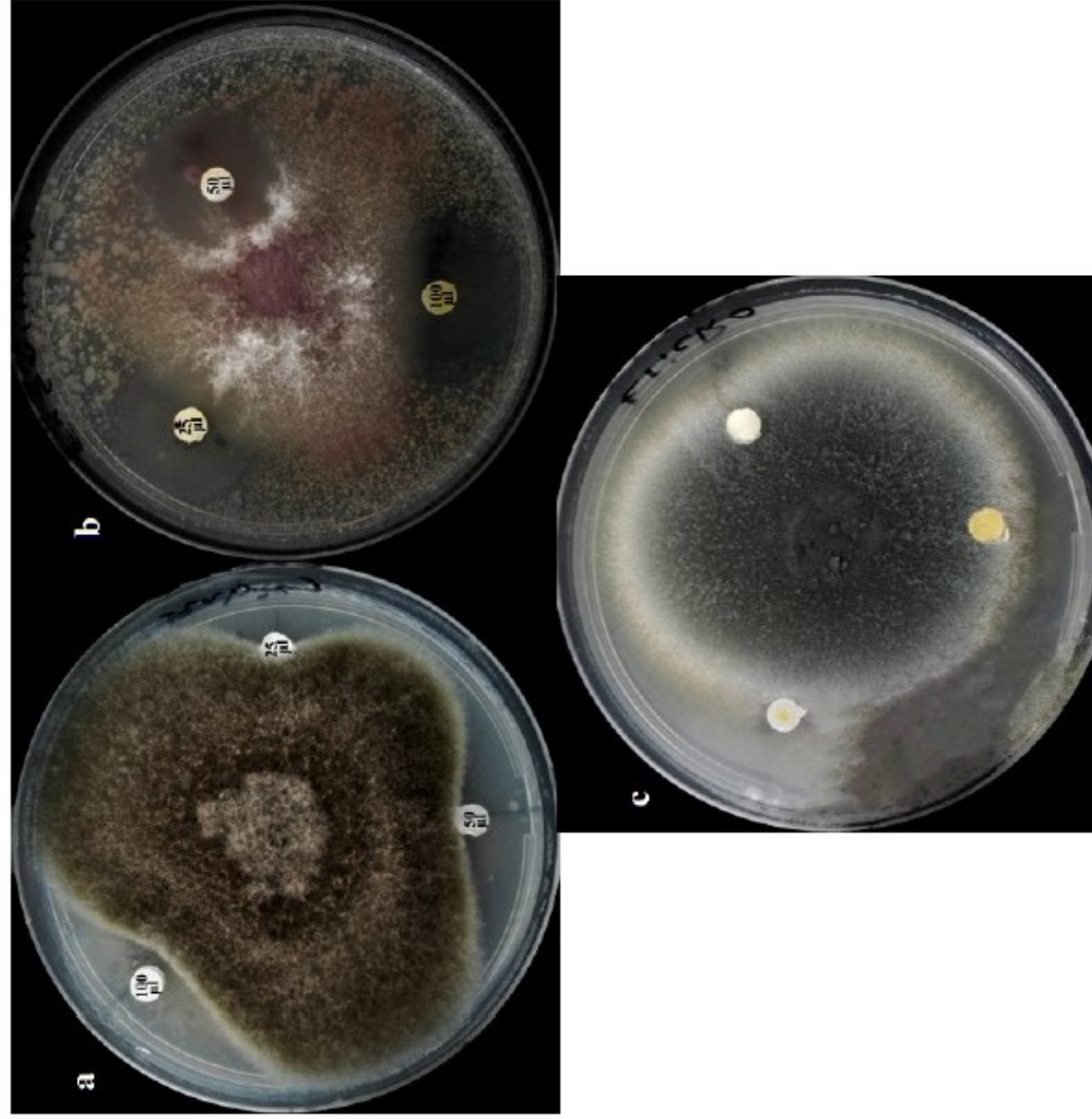


Figure 17. Test de l'effet antifongique de l'extrait CVF a (100µl, 50µl, 25µl).

a- *Alternaria* sp **b-** *Fusarium oxysporum* **c-** *Trichophyton rubrum*.

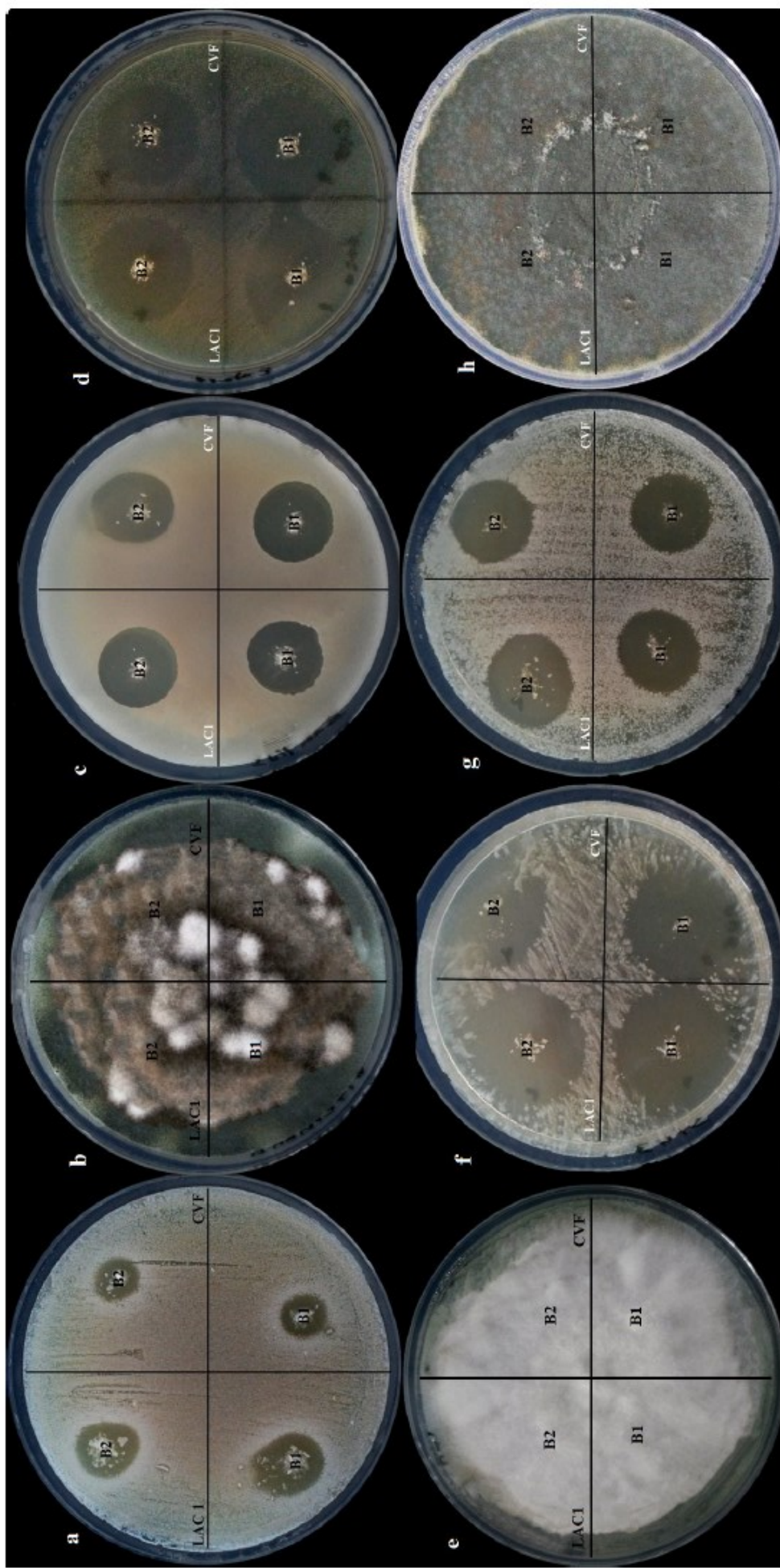


Figure 19. Bioautographie et du chromatogramme.

a- *Acinetobacter* sp. **b-** *Alternaria* sp. **c-** *Bacillus* sp. **d-** *Enterobacter* sp. **e-** *Fusarium oxysporum* **f-** *S.aureus* 43 **g-** *S.aureus* 25 **h-** *Trichophyton rubrum*

Extrait CVF : Extrait de la souche du Sol rhizosphérique du citronnier. Extrait LAC1 : Extrait de la souche Sol rhizosphérique Batna.

B1: bande 1, B2: bande 2.

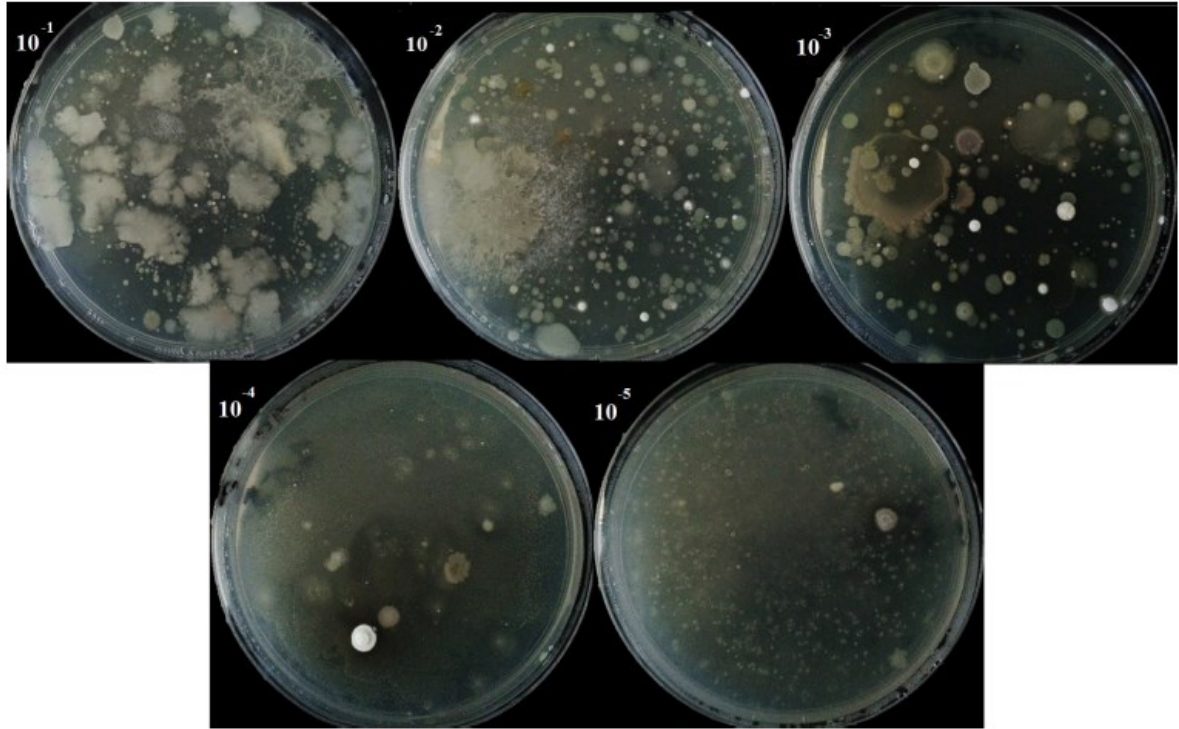


Figure 20. Dilutions décimales des échantillons.

Références bibliographiques

Abd-Allah E.F. (2001). *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. *Folia Microbiol.* 46, 309-314.

Abebe B., Feleke M., Berhanu A. (2013) Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Dis* ; 3(5): 375-381.

Aboul-Enein A., About elalla F., Serour E., Hussien T. (2010). *International Journal of Academic Research.* 2: 81-85.

Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology.* 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, U.S.A.

Aoyagi T., Yagisawa M., Kumegai M., Hamada M., Okami Y., Takeuchi T. et al., (2006). Anenzyme inhibitor, Panostalin produced by *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics.* 24 : 860-869.

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.

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine Saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J.Mycol.Méd.*, 15(4), 211-219.

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

Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. and Beaulieu C. (2002). Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 49-54.

Barsby T, Kelly MT, Gagne SM, Andersen RJ. (2001). Bogorol A produced in culture by a marine Bacillus sp. reveals a novel template for cationic peptide antibiotics. *Org Lett* ; 3: 437-440.

Berg G., Kurze S., Buchner A., Wellington E.M. and Smalla K. (2000). Successful strategies for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilt. *Can. J. Microbiol.* 46, 1128-1137.

Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A, Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Ain Mlila, *Sci. Technol.* 23, 5-10.

Bouizgarne B., El-Maarouf-Bouteau H., Madiona K., Biligui B., Monestiez M.,Pennarun A.M., Amiar Z., Rona J.P., Ouhdouch Y., El Hadrami I., Bouteau F. (2006). Aputative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobanche ramosa*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 550-556.

Braña A.F., Wolf S., Demain A.L. (1985). Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Canadian Journal of Microbiology.* 31 :736-743.

Burianek L.L. et Yousef A.E. (2000) Solvent extraction of bacteriocins from liquid culture. *Let App Microbio.*31: 193-197.

Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008) Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.

Campelo A.B. and Gil J.A. (2002). The candididin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU. 3570. *Microbiol.* 148, 51-59.

Carle S., Pharm B. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel.* 36: 25-41. Cavala, M. et T. Eberlin. 1994. Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron.* 4: 7-13.

Challis, G.L. and D.A. Hopwood. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 100: 14516-14555. DOI: 10.1073/pnas.1934677100.

Chaubal M.V., Pyne G.F., Reynolds C.H. et Albright R.L. (1995) Equilibria for the absorption of antibiotics into neutral polymeric sorbents. *Biotechnol Bioeng.* 47: 215-226.

Chen Y., Krol J., Sterkin V., Fan W., Yan X., Huang W et al. (1999). New process control strategy used in as rapamycin fermentation. *Process Biochemistry.* 34: 383-389.

Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int., J. Syst. Bacteriol.* 47, 492-498.

Cook R.J. & Baker K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Americ. Phytopathol. Society.* 530pp.

Coombs J.T., Michelsen P.P. and Franco M.M. (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control.* 29, 359-366.

Cooper W.E. and Shilton S.J.P. (1949). Antibiosis of *Actinomyces* strains to *Pythium arrhenomanes* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* **19**, 5.

Copping L.G., and Menn J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manage. Sci.* 56, 651-676.

Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytec hniques et universitaires romandes.*

Cortès J., Liras P., Castro J.M., Martin J. M. (1986). Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* exerted on the formation of alpha-aminoadipylcysteinyl- valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *Journal of General Microbiology.* 132 :1805-1814.

Cotarlet M., Bahrim G.E., Negoita T.G., Stougaard P. (2010). Characterization of Newly Polar Psychrotrophic Streptomycetes Isolated from Polar Soils with Cold Adapted Bioremediation Potential. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Oluj Napoca.* 38: 61-65.

Courvalin P., Philippon A. (1990). Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. *In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.* Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch 14 : 332-355.

Craxford D. I., Lynch J.M., Whipps J. M. and Ousley M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3899-3905.

Cross T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 397-410.

Davelos A., Kinkell L., Samac D. (2004) Frequency and intensity of antibiotics interaction among *Streptomyces* from Prairie soil. *Appl Environ Microbiol.* 70(2): 1051-1058.

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. 1ère édition, INRA, Paris.

Davies F.L., Williams S.T. (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 227-238.

De Boer E.C., De Dejkhuijzen T.M., Vos P.C.N., Kurth K.H., Schamhart D.H.J. (2000). Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell wall skeletons (Rubratin) and *Bacillus Calmette-Guerin* as therapy superficial bladder cancer: A comparative study. *Clinical infectious diseases.* 31: SUP 3 (65p).

Decker S. R., Adney W. S., Tood B. (2001). Two novel alkalotolerant dextranases from *Streptomyces anulatus*. *Journal of the American Chemical Society Symposium.* 769: 222-235.

Deshayes C., Falconer C., Mazieres N., Saddler G, Sanglier J.J. et Sire B. (1989) Sélection des souches productrices et caractérisation des molécules actives, dans : Larpent J.P. et Sanglier J.J. Biotechnologie des antibiotiques. Masson Edition Paris: 72-138.

Devi NKA, Jeyarani M, Balakrishnan K. (2006). Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in microbial activity. *Pak J Biol Sci;* 9(3): 470-472

Dhungel B., Subedi M., Tiwari K.B., Shrestha U.T., Pokhrel S., Agrawal V.P. (2007). Thermostable glucose isomerase from psychrotolerant *Streptomyces sp.* *The International Journal of Life.* 1: 6-10.

Djaballah C. (2010). biodiversité des actinomycetes halophiles et halotolerants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Thèse de magistère. Constantine :université de mentouri,73p

Données OMS "Principales causes de mortalité dans le monde en 1996", (1997).

Dulaney E. L. (1948). Observations on *Streptomyces griseus* II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *The Journal of Bacteriology.* 56: 305-313.

Duffy B. K. and Défago G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2429-2438.

Elarbi B., Issam M.K., Lahoucine H., Abderraouf H. (2012). Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques. ScienceLib Editions Mersenne : Volume 4, N ° 120801.

El-nakeeb M.A., Lechevalier H.A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.* 75-7.

Elson M.K., Schisler D.A. and Bothast R.J. (1997). Selection of microorganisms for biological control of silver scurf (*Helminthosporium solani*) of potato tubers. *Plant Dis.* 81, 647-652.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J., Sivasithamparam K., Hussain A.M. and Kurtboke D.I. (1997). The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pythium coloratum*, by Streptomycetes and non-Streptomycetes actinomycetes. *New Phytologist*, 137: 495-507.

El-Tarabily K.A. (2006a). Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-Streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* 84, 211-222.

El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 38, 1505–1520.

Emmert E.A.B. & Handelsman J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett.* 171 : 1- 9.

Ensign J.C. (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev.Microbiol.* 32, 185-219.

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.

Escalante L., Gonzalez R., Obregon A.M., Sanchez S. (1992). Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *The Journal of Antibiotics.* 45: 465-469.

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

Enical W., Jensen P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology.* 2: 666-673.

Floyd M. H., Pieper R. L. and Mertz F. P. (1987). Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind, Microbiol.* 2, 235-241.

Fukunagak K., Misatot T., Asakawa M. Blasticidin, A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan.* 19: 181-188.

Gebhardt K., Schimana J., Krastel P., Dettner K., Rheinheimer J., Zeeck A. and Fiedler H.P. (2002). Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. Part 1. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 55(9), 794-800.

Genné D., Siegrist H. H. (2003). De l'antibiogramme a la prescription d'un antibiotique. *Forum Med suisse.* 20 ; 464-468.

George S. P., Ahmad A., Rao M. B. (2001). Studies of carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresources Technology.* 77: 171-175.

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

Girard H., Rougieux R. (1967). *Technique de microbiologie agricole*. Ed. Dunod, paris. 216p.

Gonzalez-Franco CA, Robles-Hernandez RY. (2009). Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua* 2009; 3(2): 64-73

Goodfellow M, Jones AL, Maldonado LA, Salanitro J. (2004). *Rodococcus aethrivorans* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether degrading actinomycetes. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:61-5

Goodfellow M., Willimams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 189-216.

Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the actinomycetales. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.

Guiraud, J. et P. Galzy. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. P. 33-40. Les éditions de l'usine nouvelle. Paris.

Gungi S., Arima K., Beppy T. (1983). Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry.* 47: 2061-2069.

Gurung TD, Sherpa C, Agrawal VP, Lekhak B. (2009). Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal J Sci Technol* ; 10: 173-182.

Haas D. and Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.

Harir M. (2010). Effets antagonistes entre les souches d'actinomycètes et *Verticillium dahliae* kleb agent de la verticilliose de l'olivier. Mémoire de Magister .Université d'Oran. 78p.

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

Haslay C., Leclerc H. (1993). *Microbiologie des eaux d'alimentation*.Lavoisier TEC &DOC. France.

Hilali L. (2006). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. Production, extraction, purification de métabolite active et étude taxonomique. Thèse de doctorat: Université Hassa II- Faculté des sciences (Maroc).

Hilali L., Khattabi A., Nssarllah N., Malki N. et Finance C. (2002) Isolement de nouvelles souches d'actinomycetes prodctrices de substances antifongiques a partir de milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech.* 2: 49-53.

Hogan CM. Bacteria. In: **Sidney Draggan, Cleveland CJ, Eds.** (2010). *Encyclopedia of Earth*. Washington DC: National Council for Science and the Environment.

Horinouchi S. (2002). Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences*. 7: 2045-2057

Hsu S.C., Lockwood J.L. (1975). Powder chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol. Technol.*

Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. (2001). Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3739-3745.

Ikinose Y., Genka K., Koike T., Kato H., Wtanake Y., Mori T et al. (2003). Randomized double-blind placebo stage I squamous-cell lung carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*. 95: 605-610

Inoue O. O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R. (2007). Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 58-61.

Isu N.R., Onyeagba R.A. (2002). Basic practicals in Microbiology. 2nd edition. Fasmen Communication, Okigwe. 25-45.

Iwai Y., Takahashi Y. (1992). Selection of microbial sources of bioactive compounds in «The search for bioactive compounds from microorganisms», Springer-Verlag, New York, (Ed.), 281-302.

Iwami M., Nakayama O., Terano H., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. (2006). A new immunomodulator, FR-900494: Physico-chemical and biological characteristics. *The journal of Antibiotics*. 40: 612-622.

Jijakly M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, *In* : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.

Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca*. 2: 63-74.

Joo G.J. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* 27, 1483-1486.

Kanoh K., Matsuo Y., Adashi K. (2005). Mechercharmycin A et B cytotoxic substance from marine derived *Thermoactinomyces* sp. YM3- 251. *The Journal of Antibiotics*. 58: 289-92.

Khamna S., Yokot A. and Lumyong S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 649-655.

Khan N.I., Filonow A.B. and Singleton L.L. (1997). Augmentation of soil with sporangia of *Actinoplanes* spp. for biological control of *Pythium* damping-off. *Biocontrol Sci. Technol.* 7, 11-22.

Khanna, M., R. Solanki and R. Lal. (2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 2: 357-375.

Killian CH. et Feher D. (1939). Microbiology of desert soils. pp: 21-127. *Encyclopedie Biologique*.

Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H et al. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal of Medical Mycology*. 15: 45-51.

Koch A. (1999) Diffusion through agar blocks of finite dimensions: A theoretical analysis of three systems of practical significance in microbiology. *Microbiology*. 145: 643-654.

Komatsu K., Tsuda M., Tanaka Y., Mikami Y., Kobayashi J. (2005). SAR studies of Brasilicar for immunosuppressive and cytotoxic activities. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 13: 1507-13.

Korkmaz H., Unaldi M.N., Aslan B., Coral G., Arican B., Dinçer S. et al. (2003). Keratinolytic activity of *Streptomyces* Strain BA7 a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*. 53: 85-93.

Kwon H.C., Kauffman C. A., Jensen P.R. (2006). Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinospora*. *Journal of the American Chemical Society*. 128: 1622- 1632.

Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4, 113-121.

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

Larkin, R.P, Fravel, R. (1998). Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms.

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

Lechevalier M. P. and Lechevalier H. (1985). ‘‘Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* in: *Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC.* 315-360.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20, 435-443.

Lehr N.A., Schrey S.D., Hampp R., Tarkka M.T. (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol.* Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x.

Leminor L., Veron M. (1989). *Bacteriologie médicale*. 2 ème édition. pp 335-349.

Lemriss, S., F. Laurent, A. Couble, E. Casoli, J. M. Lancelin et D. Saintpierre-Bonacci. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49: 669-674.

Levy S-B. (1992). Antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle. Ed: Plenum Press. P: 145.

Linda M. Sherwood, Joanne M. Willey, Christopher J. Woolverton. (2010). *Microbiologie*. 3^{ème} édition. Pp 589.

Liu S., Liu S. Y., Lu Z. X. (2007). Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. 23: 1077-1081

Locci R. and Sharples G. P. (1984). Morphology. In: "The biology of actinomycetes". (Goodfellow M., Modaski M. and Williams S. T., Eds) pp 165-199. *Ac. Press. London*.

Lo, C.W., Lai, N.S., Cheah, H.Y, Wong, N.K.I. and Ho, C.C. (2002). Actinomycetes isolated from soil samples from Crcker Range, Sabah. *ASEAN Review on Biodiversity and Environmental Conservation* July–September 2002.

Locci R. (1976). "Developmental microbiology of actinomycetes". In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed, Tokyo*. 170-180.

Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P. (1995). Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*. 31: 304-311.

Madigan M. T., Martinko. J. M., Prker J. (1997). *Biology of microorganisms*. Prentice Hall International (Ed).

Mahadevan B. and Crawford D.L. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbil. Tech.* 20, 489-493.

Malet-Gason L., Romero F., Espliego-Vazquez F., Gravalos D., Fernandez-Puentes J.L. (2009). IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *The Journal of Antibiotics*. 56: 219-225.

Manfred M., Nicole M. (2000). *Précis des risques alimentaires*. Tech. et Doc. Edition, Londres-Paris-New-York, 442.

Mao W., Lewis, A., Lumsden R.D., and Hebbar K.P. (1998). Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* 17: 535-542.

Mariat F. et Sebland M. (1990). Les actinomycetes. Dans : *Bacteriologie médicale*.

Maskey R.P., Helmke E., Kayser O., Feibig H.H., Maier A., Bushe A et al. (2004). Anti-cancer and antibacterial trioscacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *The Journal of Antibiotics*. 57: 771-779.

Miyashita K., Fujii T. and Sawada Y. (1991). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2065-2072.

Mohamed Z.K. (1982). Physiological and antagonistic activities of Streptomycetes in rhizosphere of some plants. *Egypt. J. Phytopathol.* 14, 121-128.

Mukai A., Fukai T., Matsumoto Y., Ishakawa J., Hoshino Y., Yazawa K et al. (2006). Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The Journal of Antibiotics*. 59: 366-9.

Nemoto A., Hoshino Y., Yasawa K, Ando A., Mikami Y., Komkaki H et al. (2002). Asterobactin, a new siderophore group from *Nocardia asteroides*. *The Journal of Antibiotics*. 55: 593-7.

Ogunmwonyi IH, Mazomba N, Mabinya L, Ngwenya E, Green E, Akinpelu DA, et al. (2010). Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr J Microbiol Res* (21): 2223-2230.

Olson E.H. (1968). Actinomycetes isolation Agar. In : Difco Supplementary Literature. Difco Lab. Detroit, Michigan.

Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H et al. (2006). Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*. 32: 255-261.

Ottow J. C.G. and 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, 170-171.

Ownley B.H., Weller D.M. & Thomashow L.S. (1992). Influence of in situ and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* 82: 178-184.

Parker M.M. (2000). Biology of microorganisms Brock (ed.) pp 637-743.

Parungao MM., Maceda EBG., Villano MAF. (2007) Screening of antibiotic producing actinomycetes from marine, brackish and terrestrial sediment of Samal Island, Philippines. *J Res Sci Comput Eng* ; 4(3): 29-38.

Paulitz T.C. and Bélanger R.R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103-133.

Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004). Microbiologie. *Edition Dunod.*

Petersen, M.; Simmonds, M. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.

Petrosan, P., M. Garcia-Varela, M. Luz-Madrigal. C. Huitron et M. E. Flores. (2003). *Streptomyces mexicans* sp. Nov. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 269-273.

Pine L. (1970). Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int. J. Bacteriol.* 20, 445-474.

Pochon, J. et Tardieux, P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Saint Mandé: Edition de la tourtourelle

Prévost K., Couture G., Shipley B., Brzezinski R., Beaulieu C. (2006). Effect of chitosan and a biocontrol streptomyces on field and potato tuber bacterial communities. *Biocontrol* 51, 533-546.

Raaijmakers J.M., Vlami M., Jorge T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuw* 81, 537-547.

Rahman M.S., Ano T. and Shoda M. (2007). Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127(3):503-507.

Rawashdah R., Saadoun I., Mahashneh A. (2005). Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib24D) and its potential to utilize tomato pomace. *African Journal of Biotechnology*. 4: 251-5.

Rex MA, Stuart CT, Etter RJ. (2001). Do deep-sea nematodes show a positive latitudinal gradient of species diversity? The potential role of depth. *Mar Ecol Prog Ser* 210: 297-298.

Reyes M.E.Q., Rohrbach K.G. and Paull R.E. (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.

Saadoun, I. et F. Al moumani. 1997. *Streptomyces* from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actino.* 8: 29-36.

Sabaou N., Bounaga N. and Bounaga D. (1983). Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et autres formae speciales. *Can. J. Microbial.* 29, 194-199.

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. et al. (1998). Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. 9, 147-153.

Saleem Basha N., Rekha R., Komala M., Ruby S. (2009). Production of Extracellular Antileukaemic Enzyme L-asparaginase from marine Actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and Characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8: 353-360.

Sanglier J. J. et Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 12, (13) pages.

Scherrer R., Gerhardt P. Molecular sieving by the B. (2009). Megaterium cell wall and protoplast. *J. Bacteriol.* 1971: 107:718-735. Selvameenal L., Radakrishnan M., Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening, *Indian J Pharma Sci.*71: 499- 504.

Schmitzer P.R., Graupner R.R., Chapin E.L., Fields S.C., Gilbert J.R., Gray J.A et al., (2000). Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation. *Natural Products*.63: 777-781.

Schottel J.L., Shimizu K., Kinkel L.L. (2001). Relationships of *in vitro* pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biol. Control* 20, 102–112.

Selvameenal L., Radakrishnan M., Balagurunathan R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening, *Indian J Pharma Sci.* 71: 499- 504.

Shapiro S., Vining, L.C. (1985). Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous culture. *Canadian Journal Microbiology*. 31: 119-123.

Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. et Nida T. (1979) Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot.* 32 : 427-435.

Silambarasan S., Praveen kumar E., Murugan T., Saravanan D., Balagurunathan R. (2012) Antibacterial and antifungal activities of Actinobacteria isolated from Rathnagiri hills. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2 (10), pp. 099-103.

Singh A., Mehta S., Singh H.B. & Nautiyal C.S. (2003). Biocontrol of Collar Rot Disease of Betelvine (*Piper betle* L.) Caused by *Sclerotium rolsii* by Using Rhizosphere-Competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Cur. Microbiol.* 47: 153- 158.

Sirry A.R., Salem S.H., Zayed M.A. and Anwar D. (1981). Rhizosphere microflora of some plants infected with root-rot disease and their activities on antagonizing the main pathogen. *Egypt. J. Microbiol.* 16, 65-78.

Smriti S., Pramod K.,Gopalan N., Bhuvnesh S., RC Kuhad., Hotam S.C. (2012) Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S1147-S1150.

Souad L. (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, 216p

Spadaro D. & Gullino M. L. (2004). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 23: 1-13.

Stoks S.M. et Thomas C.R. (2001) Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation. *Biotechnol and Bioeng.* 75 (6): 702-709.

Sturdikova M., Sturdik E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgimica Slovaca.* 2 : 63-74.

Sutherland E.D. and Lockwood J.L. (1984). Hyperparasitism of oospores of some *Peronosporales* by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Can. J. Plant Pathol.* 6, 139-145.

Suzuki S.I. (2001). Establishment and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy.* 15(2), 55-60.

Tahvonen R.T. and Avikainen H. (1987). The biological control of seedborne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agr. Sci. Finland.* 59, 199-208.

Takahashi Y., Omura S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology.* 49: 141-154.

Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC. (2007). Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Med Mycol;* 17: 242-249.

Thenmozhi M., Krishnan K. (2011). Anti-Aspergillus activity of Streptomyces sp. VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, India. *J Nat Environ Sci.;* 2(2): 1-8.

Thibodeau P.O., Twagirayesa P., Charrier F. (2002). Evaluation de 15 fongicides contre la moisissure chevelue (*Rhizopus stolonifer* et *Mucor* sp.) de la fraise et de la framboise. *Agrosol,* 13(1), 75-80.

Thomashow L.S. (1996). Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 343-347.

Thomashow L.S., Bonsall R.F. and Weller D.M. (1997). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: *Manual of environmental microbiology*. Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. and Walter M.V. (Eds). ASM Press, Washington. 493-499.

Thumar J. T., Singh S. P. (2007). Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavugerus* strain Mit-1. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 38.

Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H.M., Zeng, Q.G., Jia, Y.Y., Han, W.Q. and Zhou, S.N. (2004). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 303–9.

Ting A.S.Y., Tan S.H. and Wai M.K. (2009). Isolation and characterization of *Actinobacteria* with antibacterial activity from soil and rhizosphere soil. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3(4), 4053-4059.

Tortorano, A. M., E. Cabrini et M. A. Viviani. (1979). Sensibility *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.* 8: 69-74.

Trejo-Estrada S.R., Paszczynski A. and Crawford D.L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21, 81-90.

Tu J.C. (1988). Antibiosis of *Streptomyces griseus* against *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. phytopathol.* 121, 97-102.

Untrau S., Lebrhi A., Lefebvre G., Germain P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*. 28: 111-118.

Usha Rakshanya J, Hema Shenpagam N, Kanchana Devi D. (2011). Antagonistic activity of Actinomycetes isolates against human pathogen. *J Microbiol Biotech Res*; 1(2): 74-79.

Uyeda M., Mizukami M., Yokomizo K., Suzuki K. (2001). Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygrosopicus*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 65: 1252-4.

Valan arasu N., Duraipandiyan M., Agastian M., Ignacimuthu S. (2008). Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. *Mycol. Med*; 18:147-153.

Valdebenito M., Crumbliss A.L., Winkelmann G. and Hantke K. (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(8):513-520.

Valli S., Suvathi S.S., Aysha OS., Nirmala., Vinoth K.P, Reena A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 469-473.

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Déry C., Brzezinski R. and Beaulieu C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5), 1630-1635.

Van Soulinger P., Meyer D., Van Der Kley W. A., Barnett C., Bolle R., Power S. D et al., (2001). Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. *Extremophiles.* 5: 333-341.

Vino S., Lokesh K.R. (2008). Borrelidin: A promising anticancer agent from *Streptomyces* species. *Journal of advanced Biotechnolog Reviews.* 22-26.

Vitale L. (1999). Aminopeptidase of the Genus *Streptomyces*. *Food Technology and biotechnology.* 37: 29-37.

Waksman S.A. (1967). Distribution, isolation and methods of study. In : The actinomycetes- a summary of current knowledge. The ronald Press Company. New york. pp: 9-21.

Weller D.M. (1988). Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.

Werner G. and Hagenmaier H. (1984). Metabolisme product of microorganisms. 2241 Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiot.* 2, 110-117.

Whiffen A., Bohonqs J.N. and Emerson R.L. (1946). The production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* 52, 610 611.

Whipps J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511

Williams S.T. and Cross T. (1971). "Actinomycetes". In *Methods in microbiology. Booth C. Ed., Academic Press. London.* 4, 295-334.

Williamson N. R., Fineran C. P., Leeper F.j., Salmon P. C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review.* Vol 4.

Williams & Wihs. (1986). *Bergey's manual of systematic bucteriology.* Baltimore. pp 2299-2648

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., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-2492.

Woznicka W. (1964). The Significance of variation of some antibiotic actinomycetes for the taxonomy of microorganisms of this genus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1964; 12: 37-54

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

Yuan W.M. and Crawford D.L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microb.* 61, 3119-3128.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria : Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, 156:98

Résumé

Pour isoler, évaluer et caractériser le potentiel d'*Actinomycètes* de la région semi-aride de l'est algérien à produire des molécules bioactives. Un total de 16 souches a été isolé et purifié de 4 différents sols rhizosphériques. L'activité antagoniste des isolats actinomycétales a été testée contre des bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que des champignons phytopathogènes par la technique de cylindre d'agar. L'extraction des molécules bioactives à partir de filtrat de culture des souches sélectionnées a été effectuée avec l'acétate d'éthyle. L'extrait brut a été testé par technique de diffusion par disque en papier et une chromatographie sur couche mince a été effectuée. Sur les 16 souches actinomycétales testées, 13 souches sont actives envers au moins une bactérie test et 15 le sont envers une souche fongique phytopathogène. Les souches CVF et LAC1 ont démontrés une activité antagoniste importante. Les résultats obtenus par la méthode de cylindre d'agar sont meilleurs que ceux obtenus avec diffusion par disque. Les deux extraits bruts ont montrés une bonne activité contre les champignons phytopathogènes et les Gram positif. La technique de chromatographie sur couche mince de gel de silice des extrait CVF et LAC1 a révélé la présence d'au minimum deux molécules à activité antimicrobienne. Les résultats de la présente étude a démontré que les *Actinomycètes* de la région semi-aride de l'est algérien présentent un potentiel important à produire des molécules à activités antimicrobiennes.

Mot clé: *Actinomycètes*, méthode de cylindre d'agar, méthode de diffusion par disque en papier, extrait, Antibiotique, activité antimicrobienne.

Summary

To isolate, characterize and evaluate the potential of *Actinomycetes* in the region of eastern Algeria to produce bioactive molecules. A total of 16 strains were isolated and purified from 4 different semi-arid rhizosphere soils. The antagonistic activity of actinomycetales isolates were tested against Gram positive and Gram negative bacteria as well as the phytopathogenic fungi by agar cylinders technic. The extraction of bioactive molecules from the culture filtrate of the selected strains was performed with ethyl acetate solution and the crude extract was tested by diffusion disc methode. A thin layer chromatography was performed on crude extracts. From the 16 actinomycetales strains tested, 13 strains were active against at least one of bacteria test and 15 are active against phytopathogenic fungals strains. CVF strains and LAC1 have demonstrated a significant antagonist activity. The results obtained by the method of agar cylinder are better than those obtained by disc diffusion. Both crude extracts have shown a good activity against phytopathogenic fungi and Gram positive bacteria. The thin layer chromatography of silica gel technic of crudes extracts CVF and LAC1 revealed the presence of at least two molecules, which has antimicrobial activity. The results of this study showed that *Actinomycetes* of the semi-arid region of eastern Algeria have an important role to produce molecules with potential antimicrobial activities.

Keyword: *Actinomycètes*, Cylinder agar method, diffusion method by paper disc, extract, antibiotic, antimicrobial activity.

المخلص

لتقييم إمكانات *Actinomycètes* المعزولة من منطقة شرق الجزائر لإنتاج المضادات الحيوية تم جمع وتنقية 16 سلالة معزولة من 4 أترربة شبه قاحلة مختلفة. تم اختبار النشاط العدائي ضد بكتيريا Gram و Gram + وكنلك من قبل الفطريات الممرضة للنبات بواسطة تقنية اسطوانة أجار. تم إجراء استخلاص الجزيئات النشطة بيولوجيا من رشاحة السلالات المختارة باستعمال خلاص الإيثيل. المستخلص الخام اختبر بتقنية القرص الورقي. وأجري Chromatographie على طبقة رقيقة على المستخلصات الخام. من 16 سلالة *Actinomycètes* التي تم اختبارها، كانت 13 سلالة فعالة ضد واحدة على الأقل من البكتيريا المختبرة و 15 سلالة فطرية ممرضة. وقد أظهرت السلالات LAC1 و FCV نشاط مضاد كبير. النتائج التي تم الحصول عليها من خلال طريقة اسطوانة أجار هي الأفضل من تلك التي حصلنا عليها بواسطة القرص الورقي. وقد أظهرت كل من المستخلصات الخام نشاطات جيدة ضد الفطريات الممرضة للنبات و Gram+. كشفت تقنية Chromatographie من طبقة هلام السيليكا بعد استخراج مستخلصات LAC1 و CVF وجود اثنين على الأقل من جزيئات ذوات نشاط مضاد للميكروبات. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن *Actinomycètes* المستخرجة من المنطقة الشبه قاحلة لشرق الجزائر دورا هاما في إنتاج المضادات الحيوية ضد الميكروبات.