MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité **:** ***Microbiologie Appliquée***

THEME

Isolement et Sélection des Souches d'Actinomycètes d'Origine Marine Productrices d'Antibiotiques.

Présentée : par

- **Melle. : LAZOUNI Farida** - **Melle. : FERHAOUI Wiam Sabrina**

- Devant le jury composé de :

Dr. : **AINAS Mahfoud**	MCB	Université Médéa	Examinateur
Meme. : **BOUZIDI A .**	MCB	Université Médéa	Présidente
Meme. : **ZERGOUG Amina**	MCB	Université Médéa	Promotrice

Année Universitaire 2021 - 2022

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail n'aurait pas été réussi, intégré, et riche en information sans l'aide et l'encadrement de notre mentor **DR ZERGOUG AMINA** maitre de conférences à l'université de média je croie que sans vous notre diplôme n'aurait pas été possible, votre travail est stressant. Vous ne compter plus les heures. Et pourtant vous avez toujours été attentive et compréhensive. Nous tenions à vous remercier pour votre engagement à nos coté, pour votre soutien d'avoir enrichi nos connaissances et de nous avoir guidé durant toute cette année, merci pour tout, une prof comme vous nous ne l'oublierais jamais.

Nos remerciement s'adresse aussi à **Mme Bouzidi.A MCB** à l'université de média en étant président du jury et **MR AINAS MCB,** à l'Université **YAHIA FARES Média** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciement s'adresse également à tout nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Aussi, je veux dire dans ces dernières lignes de remerciement et d'appréciation que les écoles, les collèges, et les universités ne sont pas acclamée en raison de leurs bâtiments historiques, de leurs financements importants ou de leurs anciens élèves célèbres. Ils deviennent formidables parce qu'ils ont des professeurs exceptionnels comme vous. Merci pour tous vos encouragements. Vous êtes des personnes extraordinaire et je veux que vous sachiez que vous avez eux un impact significatif sur nos vie , mes professeurs merci beaucoup d'être si encourageant et de faire tout votre possible pour nous garder motivés et soutenus tout au long de notre programme. Vos connaissances et votre leadership nous fournissent un modèle inestimable pour nos propres carrières. Je suis si heureuse que vous fassiez partie de mon éducation.

Dédicace

JE dédie ce modeste travail **A ALLAH** le tout puissant le miséricordieux.

A son envoyé le prophète **MOUHAMAD**, Bénédiction et paix sur lui.

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères:

- A mon père ABDELLAH **<Ma force>**

Pour tous les sacrifices que vous avez faits, pour tout ce que vous nous avez donné, pour tout votre amour et préoccupation, pour toutes les fois que vous avez toléré nos singeries. Aujourd'hui, je voulais vous remercier pour le père que vous êtes, peu importe votre âge vous serez toujours mon étoile la plus brillante, chère papa sans l'inspiration, l'enthousiasme et le soutien que vous m'avez donnés, je ne serais jamais devenu la personne que je suis aujourd'hui, merci de toujours comprendre les choses que je n'ai jamais pu vous dire. Merci de toujours comprendre mon père, jusqu'à ce moment il est impossible de mesurer l'infini, il m'est impossible de vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci papa.

- A ma sœur **RANIA**

Merci de me suivre et m'encourager dans mes projets et dans mes rêves les plus fous : tu me fais toujours sentir que tu es derrière moi et que tu crois en moi et ton support fait une grande différence dans ma vie**, RANIA** merci de me rappeler aussi souvent que nécessaire que rencontrer des difficultés en tant que femme, en tant que fille, en tant que mère, en tant qu'amie et en tant qu'employée est normal et qu'on vit tous des moments plus difficiles à surmonter ; mais j'ai toujours la chance de t'avoir à mes cotés quand vient le temps de les affronter.

- A mes cousines et mes cousins

HAFIDA, SMAIEL, AHMED, **MOHAMED, HADJER, DAHBIA, SOUAD, SARAH, AMEL, Chahinaz, et Yasmin, Lilia,** j'ai traversé des moments si difficiles que plus d'une fois j'ai pensé que je ne verrai jamais le bout du tunnel. A chacun de ces moments, vous étiez là pour me réconforter et m'aider à trouver des solutions .Je ne vous remercierez jamais assez pour tous ce que vous avez faisiez pour moi.

- A ma famille :

Je voudrai remercier toute ma très nombreuse famille, pour son soutien de tous les instants, qui m'a encouragée à poursuivre mon chemin. Avec un attention particulier pour mes deux oncles**{ AHMED, RABEH },** aussi ma deuxième MAMAN **FARHA**, et mes tantes**{ ZAHIA, CHRIFA, HOURIYA, Rachida et Safia}** toujours présentent à mes cotés pour soutenir mes ambitions et m'aider à accomplir mes rêves. Tout ce que je pourrais dire ne pourra jamais suffire à

Exprimer tout ce que je leurs dois et combien ils ont été importants pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui.

- Merci aussi à tous mes amies**, Nawel, Ikram, SAMIHA, AHLAM, NORA, KHADIDJA, Wafaa, LOBNA, Hadjar, SALIMA, THaNILA, MOHAMED, KHALIDA, KHADIJA, MARWA, SAMIRA, MAROUA, KHAWLA, MARWA, AICHA, WISSAM, MAROU.D, HADJER, Khadidja, Abir, Asmaa, Noor, Ghania, Ghada, Younass, Hadjira, Rayan, za9zou9a.** SANS OUBLIER **FAIZA, Wahiba ET FATMA }**qui ont su m'apporter les moments de bonheur nécessaire, et vous êtes l'une des rares personnes dans ma vie qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui donc vous méritez un million de remerciements et tous les câlines que je peux vous faire.
- Je veux également remercier **WIAM FARHAOUI** QUI à été présente tout au long de la partie pratique de cette thèse, pour sa bonne humeur et son aide précieuse, sans qui les tests n'auraient pas pu être réalisables, **WIAM** nous sommes restées des amies dans les hauts et les bas de nos vies. Je veux que tu saches combien je chérie mon amitié avec toi.. Aussi je veux remercier **Siham Bakhti** et, **Wafaa FARHAOUI** et je veux vous dire que vous été un arc en ciel n'a aucune valeur sans ses couleurs, un parfum n'a aucune valeur sans son odeur, parce que vous nous a aidés en ces temps difficiles, et nous a fait ressentir une énergie positive et ne pas avoir peur du jour de la remise des diplômes…merci beaucoup.
- ENFIN, moi et mon binôme **WIAM** tenons à exprimer notre satisfaction d'avoir travailler dans un environnement agréable, et parmi des professeurs professionnels dans ce domaine, donc nous gardons un excellent souvenir de cette mémoire qui constitue une expérience professionnel valorisante et encourageante .

FARIDA

Dédicace

Depuis d'abord, je remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volante d'entamer et de terminé ce travaille par assez accomplit.

Je dédie d'abord ce modeste travail comme preuve de respect gratitude et de reconnaissance a mes **chères parents** qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de me conseiller, il m'ont beaucoup aidé tout en long mon chemin grâce a leur patience et leur compréhension.

Je remercie ma sœur **Wafa** pour tout son encouragement et son soutien, son oublier mes chères frère ma consultation dans la vie, (Hama, Walid, Younes).et ma nombreuse famille maternelle et paternelle.

Nulle dédicace ne pourrait exprimer ma profonde affection immense gratitude pour mes chères amies : **Farida ma chère binôme**, Nawal, Ikram, Fatma, Ahlam, Samiha, Khalida, Samira, Hanadi, Loubna, Maroua, Manel, Ze9zou9a, Ilham, Hajer, Aicha, Nora, Hajira, Hania.

-Ce travaille ne serait assez accompli et n'aurait pas pu avoir le jour son l'aide de la promotrice **Mme ZERGOUG Amina,** je la remercier mille fois pour la qualité é de son encadrement exceptionnelle, et pour ca patience et ca disponibilité durant notre préparation de ce mémoire en dépit de ces préoccupation et ses charge professionnelle.

Wiam

Listes des Figures

Figure 01 : Vue au microscope électronique à balayage des types mycélium des actinomycètes……5

Figure 02 : les principaux genres d'actinomycète……....6

Figure 02 : les principaux genres d'actinomycète…….…….. 6

Figure 04 : applications biotechnologiques des actinomycètes……..10

Figure 05 : principales cibles et mode d'action des antibiotiques……..…… …..14

Figure 06 : Carte Michelin Mostaganem de ……..……17

Figure 07 : Plage Sidi Mejdoub ……..18

Figure 08 : Plage sidi Mansor ……18

Figure 09 : Plage sidi Mansor ……18

Figure 10 : Site de prélèvement des échantillons……...……..19

Figure 11 : Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures……...26

Figure 13 : Mesure du pH du sol ……29

Figure 14 : Dosage de l'eau par la méthode KARL-FISCHER ……31

Figure 15 : actinomycètes isolés des échantillons traités sur les milieux (GAUSSE, ISP2, SCA)…… ……...…….32

Figure 16 : actinomycètes isolés des échantillons non traités sur milieux SCA ……..……..32

Figure 17 : Résultats de purification des quelques souches d'actinomycètes sur milieu SCA……..34

Figure 18 : Résultats de purification de souche d'actinomycète sur milieu GAUSSE……..……35

Figure 19 : observation microscopique (×40et ×100) de culture sur lamelle des actinomycètes……..…….36

Figure 20 : coloration de Gram des souches d'actinomycètes isolés……..……37

Figure 21 : Test catalase positif ……38

Figure 22 : croissance des souches d'actinomycètes en différents concentration de Na Cl…40

Figure 23 : croissance des souches d'actinomycètes en différents concentration de pH…… 41

Figure 24 : croissance d'actinomycètes (50% l'eau de mére, 50% l'eau distillé)en différents températures (28°,37°,42°)……42

Figure 25 : Résistance ou la sensibilité des souches d'actinomycètes au agent chimique (cristal violet) après d'incubation 4 jours ……43

Figure 26 : Photographie illustrant le test d'antibiogramme des isolats d'actinomycète……45

Figure 27 : Avant l'hydrolyse d'amidon **(Prise personnel**) ……48

Figure 28 : L'hydrolyse de l'amidon **(prise personnel**)……48

Figure 29 : avant l'hydrolyse de gélatine. **(Prise personnel**)…….....50

Figure 30 : L'hydrolyse de gélatine **(prise personnel**)…….50

Figure 31 : Dégradation de la tyrosine **(prise personnel)** ……49

Figure 32 : Les souches fluorescentes ……...49

Figure 33 : L'arginine 100 % …….....50

Figure 34 : L'arginine 50 % ……51

Figure 35 : Contrôle positif et contrôle négatif ……..52

Figure 36 : Dégradation de l'un des sucres ……52

Figure 37 : Production du Gaz ……53

Figure 38 : Sensibilités en Métaux lourds (Cu ;Zn) ……54

Figure 39 : Test antagoniste par la méthode de cylindre d'agar ……57.

Figure 40 : Activité antagoniste par méthode des puits ……58

Figure 41 : Histogramme représente le rendement de nos extraits ……40

Figure 42 : L'effet de l'extrait brut sur les différentes souches pathogènes ……..59

Figure 43 : Les extraits bruts obtenus ……59

Liste Des Tableaux

Tableau 01 : Classification des actinomycètes…….8

Tableau 02 : Répartition des actinobactéries dans la nature…….9

Tableau 03 : principales différences entres les métabolismes primaire et secondaire chez les eucaryotes……..12

Tableau 04 : Classification des antibiotiques selon leurs structure chimique……14

Tableau 05 : Importance relative de groupes microbiens producteurs d'antibiotiques……17

Tableau 06 : Le pH des échantillons du sol…….....29

Tableau 07 : Résultats macroscopiques et caractères culturaux des souches d'actinomycètes…….33

Tableau 08 : Les caractères physiologiques actinomycètes marin…….....38

Tableau 09 : producteurs d'antibiotiques…….....44

Tableau 10 : Les tests biochimiques……..46

Tableau 11 : Activité antagoniste des 20 isolats à l'égard de 5 germes cibles…….56

Tableau 12 : Illustre les résultats des extraits sur les germes cibles…….59

LISTE DES ABREVIATIONS

GYEA : yeast extract glucose agar (milieu de culture).

$CaCo_3$: carbonate de calcium.

ISP : International *Streptomyces* Projet (milieu de culture).

SCA : Starch Casein Agar.

MA : mycélium aérien.

MS : mycélium du substrat.

DO : Densité optique.

ATCC : Amerecan Type Culture Collection.

E. Coli : Escherichia coli.

pH : potentiel Hydrogéne.

Na Cl : Chlorure de sodium.

1* : phase organique (extrait de la souche S210-1).

1 : phase aqueuse

2* : phase organique (extrait de la souche S210-2non traité).

2 : phase aqueuse.

3* : phase organique (extrait de la souche S210-2)

3 : phase aqueuse.

4* : phase organique (extrait de la souche ZA310-1).

4 : phase aqueuse.

(ZnSO4) : le Zinc.

(CuSO4) : le Cuivre.

MH : Milieu de culture Muller Hinton.

Résumé

On a choisi trois différentes régions de la willaya de Mostaganem pour obtenir trois échantillons de sol marin. Les prélèvements du sol sont suivis par des isolement sélectifs des actinomycètes 20 ont été isolé, qui ont subis un traitement physique (par la chaleur), et traitement chimique (par l'ajout de CaCo3).

Cette étude, a montré selon l'observation microscopique qu'il s'agit d'une bactérie aérobie filamenteuse, à Gram positif, à croissance lente.en plus on a fait multiples expériences physiologique et biochimiques qui nous ont permis de conclure que les Actinomycètes sont capables de dégrader différents substrats (amidon, caséine....). Les inocula des différents isolats ont été utilisés dans la production de deux métabolites (l'huile, antibiotique). Suivie d'une évaluation de l'activité antibactérienne des extraits (ATB, huiles) vis-à-vis eux souches pathogènes (E.coli, S.aurus, Pseudoaeruginosa, Bacillussubtilis, Candida albicans). Les résultats de l'antibiogramme confirment une activité antibactérienne contre les cinq germes pathogènes.

Mots clés : actinomycètes, , sol Marin, substance antimicrobienne, pathogènes.

Abstract

Three different regions of the town of Mostaganem were chosen to obtain three samples of marine soil. The soil samples were followed by selective isolation of the 20 actinomycetes isolated, which underwent a physical treatment (by heat), and chemical treatment (by adding CaCo3).

This study, showed according to the microscopic observation that it is about a filamentous aerobic bacterium, to Gram positive, to slow growth.In addition we made multiple physiological and biochemical experiments that allowed us to conclude that the Actinomycetes are able to degrade different substrates (starch, casein....). The inocula of different isolates were used in the production of two metabolites (oil, antibiotic). Followed by an evaluation of the antibacterial activity of the extracts (TBA, oil) against them pathogenic strains (E.coli, S.aurus, Pseudoaeruginosa, Bacillussubtilis, Candida albicans). The results of the antibiogram confirm an antibacterial activity against the five pathogenic germs.

Key words: actinomycetes, , marine soil, antimicrobial substance, pathogens.

ملخص

قمنا باختيار ثلاث مناطق من ولاية مستغانم من أجل الحصول على ثلاث عينات من تربة البحر، وهذه العينات كانت متبوعة بعزل انتقائي للفطريات الشعاعية ، من هذه الأخيرة تم انتقاء 20 سلالة أين خضعت لمعالجتين المعالجة الأولى كانت معالجة فيزيائية (بالحرارة) والمعالجة الثانية كانت كيميائية (بإضافة CaCo3) ، أظهرت هذه الدراسة وفقا للملاحظة المجهرية أنها بكتيريا هوائية خيطية، ايجابية الجرام، بطيئة النمو، بالإضافة إلى أننا قمنا بإجراء العديد من التجارب الفسيولوجية والكيميائية الحيوية التي سمحت لنا باستنتاج أن الفطريات الشعاعية قادرة على تحطيم ركائز مختلفة (النشاء، الكازيين، الخ...). تم استخدام خلاصة العزلات المختلفة في إنتاج مستخلصين (زيت، مضاد حيوي) متبوعا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات (مضاد حيوي ، الزيت) ضد السلالات الممرضة مثل (الإيشيريشياكولي ...)،كما تؤكد نتائج المضاد الحيوي النشاط المضاد للبكتيريا ضد مسببات الأمراض الخمسة .

الكلمات المفتاحية : الفطريات الشعاعية، تربة البحر، مادة مضادات الميكروبات الممرضة.

Sommaire

Remerciement

Dédiasse

Résumé

Abstract

ملخص

Liste Des Abréviations

Listes Des Figures

Liste Des Tableaux

Introduction…….1

Chapitre I : Généralité sur les Actinomycètes et leurs agents antimicrobiens

1-Historique……...3

2-Définition……3

3-Critères actuels d'identifications……..4

3-1Morphologique……..4

3-2Physiologiques……..5

3-3Moléculaire……5

4-Classification……6

6-L'importance des actinomycètes marins……7

6-1 Dans l'environnement et agriculture……7

6-2 Dans la biotechnologie……7

1-Définition des antibiotiques……..10

2-Métabolisme des actinomycètes…….11

3-L'origine des antibiotique……11
4- Classification des antibiotiques……12
4-1. Structure chimique…….13
4-2 Mode d'action des antibiotiques…….15
5-Classement suivant l'utilisation des antibiotiques……..18
Chapitre II : matériel et méthode
1-L'objectif…….20
Période et lieu de stage……19
3- Echantillonnage……..20
4-Caractéristiques physico-chimique du sol des échantillons…….21
4-1Mesure de pH des échantillons……..21
4-2Dosage de l'eau par la méthode de KARL-FISCHER……..21
5-Prétraitements des échantillons……..……21
5-1Les milieux de cultures utilisés…….21
6-Isolement des actinomycètes……..22
6-1-Ensemencement et incubation…….22
6-2Purification des isolats……...22
7-Etude des caractérisations des actinomycètes……...23
7-1Caractérisations microscopiques Coloration de Gram…….……23
7-2Recherche de catalase……23
8-Etude physiologique……24
8-1Croissance à différentes concentrations de Na Cl…….……24
8-2Croissance à différentes valeurs de pH……...24
8-3Croissance à différents températures……..24

8-4Sensibilité aux différents agents chimiques……24

8-5Sensibilité aux antibiotiques……24

9-Etude biochimique……..25

9-1Hydrolyse de l'amidon…….25

9-2Dégradationde la gélatine……25

9-3Dégradation de la tyrosine……..25

9-4 utilisations des acides aminés comme seule source de carbone…… 26

9-5 Dégradation des Métaux Lourdes……..26

10- Mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques……26

10-1 Standardisation des inoculas bactériennes……27

10-2 Test antagoniste par la méthode de Cylindre d'agar……..27

10-3 Mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques par la méthode des puits……..28

10-4 Mise en évidence des activités antagonistes des extraits brutes……29

Chapitre III : Résultats et discussion

1-caractéristiques physico-chimique du sol……..29

1-1 pH du sol…….29

1-2 Le dosage d'eau par la méthode de KARL-Fescher……..30

2-Isolement des actinobactéries…….31

2-1Caractérisation macroscopiques…….32

2-2Caractérisation microscopique……35

2-3 recherches catalase……...36

3- teste physiologique……37

3-1Croissance à différentes concentrations de Na Cl…….....39

3-2Croissance à différentes valeurs de pH…….40

3-3Croissance à différentes températures……..……41

3-4 Sensibilités au différants agents chimique (cristal violet 0.001%)……41

3-5 Sensibilité aux antibiotiques……...42

4-test biochimique……..44

4-1-Hydrolyse de l'amidon……46

4-2Dégradationde la gélatine………….47

4-3Dégradation de la tyrosine……48

4-4Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone …….49

4-5Utilisation des composés glucidiques comme source de carbone………..50

4-6Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds……....52

5- Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries……...52

5-1Méthode des cylindres d'agar…….53

5-2Méthode des puits…….55

6-Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts obtenus……56

Conclusion et Perspectif

Références

Annexe

Introduction

Les microorganismes sont presque propagés dans tous les milieux (sur l'eau, l'air et le sol) et occupe une place prépondérante dans notre vie, donc ils ont marqué un rôle crucial dans multiples domaines surtout la biotechnologie ***(Smaoui 2010).***

Parmi ces microorganismes, on mentionne les actinomycètes qui sont considérés autant qu'une principale source des molécules bioactives ***(Sanglier et al., 1996 et Sudo et al.,1945 ;Takahashi et Omura,2003et Kitauni et al .,2005).*** Ils ont la capacité de produit d'environ70 % des antibiotiques ***(Bérdy, 2005)***

Les actinomycètes ont un impact antimicrobien plus fort envers les bactéries pathogènes et les mycètes ***(Okami et Hotta, 1988).***

De nos jours, l'apparition de bactéries résistantes a orienté les chercheurs vers le triage des nouvelles souches « actinomycètes marins » productrice des antibiotiques. **(*Manivasagan, et al ,2014 ; Blunt et al, 2016).***
Les principaux antibiotiques sécrétés par ces microorganismes sont : la streptomycine, la néomycine, les tétracyclines et le chloramphénicol

Également, la présence de ces microorganismes dans le sol est primordiale en raison de leur performance dans la dégradation des substances organiques non biodégradables par les champignons surtout le genre *Streptomyces* qui représente environ 70 à 90 % des actinomycètes ***(Alliouch 2014 et Crawford 1993).*** Leur profusion dans le sol est affectée par différents facteurs tels que : pH, température, salinité.

Afin d'aboutir cet objectif, le travail doit suivre de trois parties essentielles :

1. Une synthèse bibliographique qui inclut les généralités des actinomycètes et leurs activitésantimicrobiennes.

2. Une partie expérimentale qui regroupe l'ensemble des techniques et la description des méthodes effectuées.
3. Les résultats et discussions lesquels sont présentés en quatre parties :

- L'isolement des souches d'actinomycètes à partir d'échantillons de sols marins

Provenant de trois régions différentes de la wilaya de Mostaganem : sidi Mejdoub, Sablette et sidi Mansour.

- La mise en évidence de l'activité antibactérienne d'isolats sélectionnés vis-à-vis de bactéries pathogènes.
- Identification des isolats sélectionnés par l'étude des caractères morphologiques, physico-chimique.
- Sélection des souches productrices d'antibactériens et la mise en évidence de cette activité.
- Production et extraction des antibiotiques sécrétées par les actinomycètes.
- Enfin, le manuscrit se termine par une conclusion qui permettra de tirer quelques perspectivesde prolongement à ce travail.

I -Généralité sur les Actinomycètes

1- Historique :

L'histoire des actinomycètes probablement passé en 4 Périodes :

La première période (1877 et 1899) Pourrait être nommé (la médicale) Parce que l'intérêt de ces organismes étaient dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuer **(*Baldacci, 1962*).**

La deuxième période (1900-1940) ***(Mariat et Sebald*)** couvre la découverte des conditions saprophytique d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives faites pour Distinguer 2 groupes : les pathogènes et les saprophytes

La troisième période Débute avec la découverte des antibiotiques produit Par les actinomycètes en 1940. En 1944 la streptomycine produit par Streptomyces griseus ***(le minor, 1989 ; Sanglier et Trujillo, 1997).***

La dernière période (1940-1970) commence à l'époque où l'on découvrit que des antibiotiques identiques pouvaient être produit Par des actinomycètes qui différent aussi bien par leur culture que par leur morphologie.

2- Définition

L'étymologie du mot actinomycètes est le mot grec 《aktis》 Qui signifie Champignons 《champignons à rayons》 ou bien 《Champignons rayonnants》. **(*Lamari, 2006)***

Ils ont été découverts pour la première fois en 1879 dans l'eau. Cela vers 1898 les premiers actinomycètes thermophiles ont été considérés comme étant un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons ***(Isabelle H, 1999).*** De nos jours ils sont réputés Comme des organismes procaryotes. Malgré la ressemblance présentée par ses microorganismes avec les bactéries et les champignons ***(Andriambololna, 2010).*** Les actinomycètes ont un autre nom qui est des actinobactérie ***(Perry et al ; 2004),*** la croissance de ces derniers lui donne une morphologie complexe.

Ils sont composés d'hyphes Autrement dit Des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du centre de développement **(*Gottleub, 1973 ; Lechevalier ,1981 ; Eunice et Prosser, 1983).***

Les actinomycètes sont des bactéries de coloration Gram positifs, qui a un coefficient de Chargaff (GC%) généralement entre 60 -70 % ***(Larpent, 1989),*** Ces derniers ce sont des

bactéries saprophytes formants des filaments ramifiés, minces et septées. La quasi-totalité des espèces sont stables, hétérotrophes qui exigent des composés organiques (l'amidon de maïs, le glucose, le fructose, le saccharose et la mélasse qui sont rapidement assimilés) comme source de carbone et d'énergie, mais il existe des espèces qui sont capables de la croissance chimio-trophique ***(Ensign et al., 1993)*** et aérobie formant des mycéliums, Également leur paroi cellulaire ne contient pas ni la chitine ni la cellulose.

Généralement, la plupart des actinobactéries sont des hétérotrophes et exigent des composés organiques (l'amidon de maïs, le glucose, le fructose, le saccharose et la mélasse qui sont rapidement assimilés) comme source de carbone et d'énergie, mais il existe des espèces qui sont capables de croissance chimio-trophique ***(Ensign et al., 1993).*** Les actinomycètes sont fondamentalement telluriques, qu'on les trouve dans différents écosystèmes naturel ***(Patil et al., 2011)*** spécialement les actinobactéries marin sont métaboliquement actif, qui est centralisé dans 2 différentes zones : le littorale et la zone de sédiments de fonds marins, ces Microorganismessont caractérisés par une densité dans les mers qui ne sont pas plus profonds ***(Weyland.,1969).***

3- Critères actuels d'identifications

La systématique des actinomycètes est basée sur différents critères : Morphologiques, physiologiques, chimiques et génétique

Morphologique

D'après ***Prescott et al. (1997),*** les actinomycètes ont un aspect morphologie équivalent aux mycètes. Il se caractérise par des qualités culturales et micromprphologiques. ***(shirling et Gotleib., 1996)***

A) Caractères macromorphologiques :

La présence ou l'absence de mycélium aérien (MA).

- La production ou non de pigments de mélanoides
- La production et la couleur des pigments diffusibles.
- La couleur de (MA) et de mycélium du substrat (MS), dans le cas des *Streptomyces,* les espèces peuvent produire :
- Un MS de couleurs caractéristique couleur vive ou foncée, rouge, orange…. Ces couleurs autorisent la classification des espèces

- Un MS de couleur non caractéristiques : soit non coloré, soit coloré de maniéré.
- claire, beige, jaune orangé clair… ces couleurs peuvent se modifier selon les souches d'une mêmeespèce.

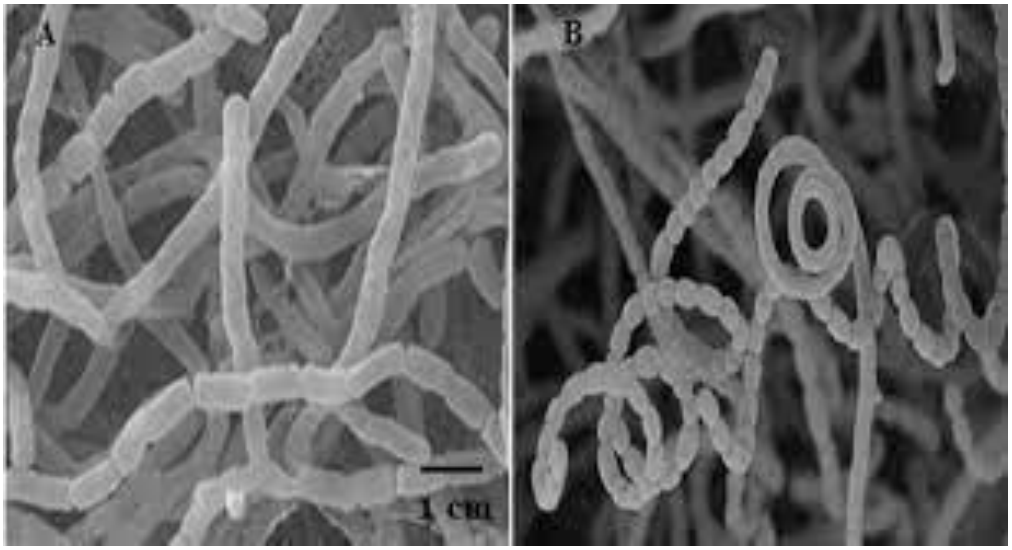


Figure 01 : Vue au microscope électronique à balayage des types mycélium des actinomycètes. (Gottlieb, 1973).

(A) Mycélium du genre Nocardia fragmenté,

(B) Mycélium du genre Streptomyces en sporulation.

B) Caractères macromorphologiques

Les critères micro morphologique prépondérants selon ***Boudjalal (2012)*** sont :

-La fragmentation on non du MS : le MS peur se fragmenter avec une intensité plus ou moins grandecoccoide et batonnets.

- Formation de spores sur le MA et /ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement

: isolées, par deux, par quatre ou en chaînes.

- Présence de sporanges sur le MA ou sur le MS, a forme et la taille des sporanges ainsique la ainsi que la si que la longueur des sporangiophores.

- Présence de spores mobiles ou non mobiles.
- la formation d'endospores (Thermoactinomyce) ou des structures spéciales telles que lessynnemata (actinosynnema)…ect
- Formation de structures particulières : faux sporanges, etc.

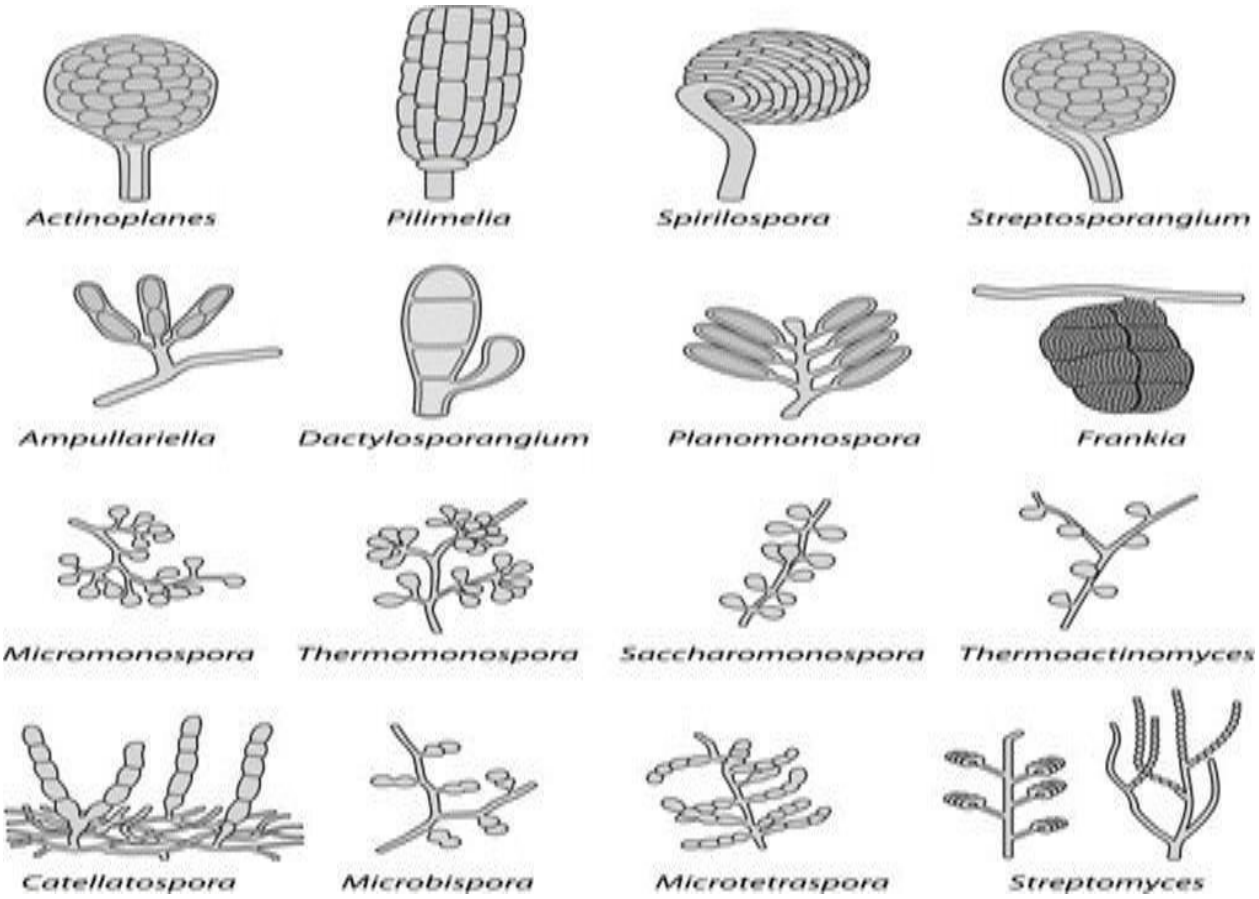


Figure 02 : les principaux genres d'actinomycète **(Sabaou, 1988).**

Physiologiques

- **Le pH** : la majorité des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles, Leur accroissement est optimale à un pH compris entre 7 et 8. D'après ***(McKinney 2004*)**, ils peuvent tolérer un pH acide inférieurs à 4.
- **La température :** les actinomycètes se sont des espèces mésophiles dont la température estime entre 25 et 30 C° (**Holt et *al.*, (1994)**. cependant il existe des espèces thermophiles d'unecd température de 60°C comme ***Streptomyces thermocoprophilus (Kim et al., 2000 ; Rangaswami et al., 2004).***

L'oxygène : les actinomycètes peuvent être divisés en deux types par rapport à leur genre respiratoire :

-Les formes oxydatives aérobies, telles que les Streptomyces, sont abondantes dans la Nature

en particulier sur le sol ***(Avril et al., 1992).***

- Les formes fermentatives, représentées par le genre types actinomyces, ils sont commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs.

Tolérance en Na Cl : ils sont divisés en deux groupes.

Les halophiles : Les faiblement halophiles, la concentration varie de 1-6 %, pour les bactéries extrêmes halophiles les taux peuvent atteindre jusqu'aux 15 à 30 %.

Les halotolérants : On distingue, les légèrement tolérants de 6 à 8 % de Na Cl ; les modérément tolérants de 18 à 20 %; et les extrêmement tolérants se développe de 0 %jusqu'à saturation en Na Cl**.** Cette tolérance n'est pas obligatoire pour leurs Croissances.

Activité de l'eau : L'activité d'eau optimale pour leur croissance et leur développement est d'environ 0,98 ***(Zvyagintsev et al., 2005).***

Matière organique : le taux des actinomycètes est liée positivement avec le taux de la matière organique .Cela a été ramené par différents auteurs tel que ***(Henis en 1986 et Lee et hwangen2002)*** **.**

Moléculaire

Ces dernières années, la biologie moléculaire s'est exigée en tant qu'un élément nécessaire pour l'identification des actinomycètes. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont l'hybridation ADN-ADN (Wayne et *al*., 1987),le séquençage de l'ADN ribosomique 16S par la méthode de ***(Stackebrandt et., al1997)*** et le pourcentage GC % qui donne une indication sur la famille. Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinobactéries.

4- Classification

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'Ordre des Actinomycétales crée par Buchanan en 1917.

Selon le Bergey'smanual, (2012), les actinomycètes sont classés dans le domaine Bactériaetphylum des Actinobacteria qui est subdivisé en 06 classes dont celle de Actinobacteria.

Tableau 01 : Classification des actinomycètes selon le **"*Bergey's Manual*** de Systematique Bactériologique, (2012).

Domaine	Bactéria					
Phylum	Actinobacteria					
Classe	*Nitriliruptoria*	*Acidimicrobiia*	*Actinobacteria*	*Rubrobacteria*	*Coriobacteria*	*Thermoleophilia*
Ordre	-*Actinomycetales* -*Streptomycetales*plus les 13 Ordres					
Famille	*Actinomycetaceae*			*Streptomycetaceae*		
Genre	*Actinomyces* plus les 6 autres genres			*Streptomyces* plus les 2 autres genres		

5-Ecologie des actinomycètes et leur distribution dans le milieu marin

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature La grande majorité est d'origine tellurique 10 à 20 % ou parfois plus **(Dommergues *and Mangenot, 1970 ;Ishizawa and Araragi, 1976)*.** Elles sont généralement saprophytes (genre Frankia), ces microorganismes peuvent vivre à l'état libre ou en association, les associations établies sont ; la symbiose avec les plantes non légumineuses comme le genre Frankia (fixation de l'azote atmosphérique) ou l'endophytisme **(*Bradbury, 1986 ; Benson et Silvester, 1993 ; Doumbou et al., 1998 ; Salomon et al.,2004 Verma et al., 2009).*** Elles sont capables de se propager dans différent biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc.), On en trouve ainsi dans l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts ***(Lacey, 1973).***

Tableau 6 : Répartition des actinobactéries dans la nature (Goodfellow and Williams, 1983).

Genre	**Habitats**
Actionomadure	Sol
Actinoplanes	Sol, eau, litière
Frankia	Nodule de racines des non légumineuses
Microbispora	Sol
Micromonospora	Sol, eau, sédiments, les sols humides
Nocardia	Sol, eau
Rhodococcus	Sol, eau, fumier, litière
Accharomonospora	Matière en décomposition
Streptomyces	Sol, eau, litière
Streptosporanguim	Sol
Thermomonospora	Matière en décomposition et fermentation
Nocardiaamarae	Les boues activées

Les actinobactéries ont également été isolées à partir de nombreux environnements aquatiques :

➢ Eau douce ***(Kitouni et al., 2005);***

➢ Eau issue de marécages salés ***(Al-Zarban et al., 2002).***

➢ Eau de mer et de sédiments marins ***(Bull and Stach, 2007 ;Ghanem et al., 2000;Jensenet al., 1991;Ward and Bora, 2006).***

Certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins **(*Singh et al., 2006 &Imada et al., 2007)*,** dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur **(*Khattabi et al., 2002)*** , même à partir de l'eau douce***(kitouni et al .,2005)***. D'autre souche dans les fond fluviauxou lacustres et même à partir d'eau issue de marécage salés et les lacs extrêmement alcalins **(*Al- Zarban et al ., 2002 ; Boughachiche et al., 2005).***

6- L'importance des actinomycètes marins

Dans l'environnement et agriculture

Les actinomycètes sont des micro-organismes qui sont partout dans le monde marin, et jouent un rôle écologique essentiel dans le recyclage et la décomposition des composés organique **(weyland 1969),** même des polymères complexe (chitine, polysaccharide..) et d'autre substrat

Ils ont un rôle crucial dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et dans amélioration des paramètres physiques, la protection de l'environnement ***(Goodfellow and Williams 1983*)**.

Dans la biotechnologie

Les actinomycètes sont bien réputés pour leur production de métabolite primaire et secondaire qui a des applications essentielles dans divers domaines. Ils sont également une source promoteurs de large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle (laccase, tyrosine…). Une grande partie des antibiotiques provient des actinobactéries .ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement de cancer qui améliore la réponse immunitaire .Selon ***(Oskayetet al.2004)***. Les actinomycètes produisent d'autres métabolites secondaire dotés d'une large gamme d'activités telle que les vitamines (vitamines C, E, et A) ***(Dekkers et al ., 1996Kaczmarskiet al., 1999*)**, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques (Pyridinium) ***(Dasarietal. 2012).***

En effet ces microorganismes sont également importants dans le domaine de la biotechnologie végétal **(PGPR).**

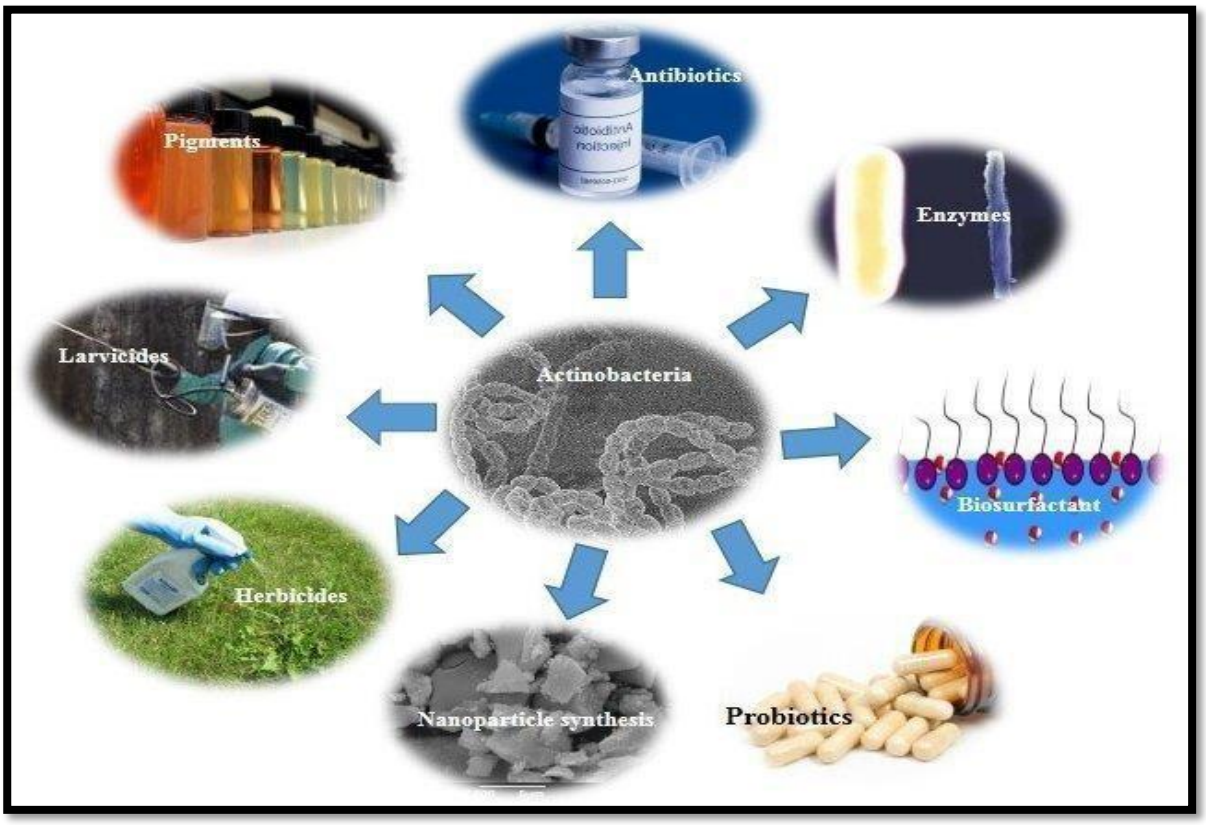


Figure 04 : Applications biotechnologiques des actinomycètes ***(Anandan, 2016).***

II- Les antibiotiques

L'antibiotique est l'une des activités biologiques d'actinomycètes la plus importante

1- Définition

Etymologiquement, le mot antibiotique a été dérivé des mots grec anti :(contre), et bios :(la vie). Au sens strict, un antibiotique a est une substance naturelle produite par un micro-organisme dont l'action est de limiter la croissance (action bactériostatique) ou de tuer (bactéricide). En principe, les antibiotiques sont des médicaments de chimiothérapie antibactérienne utilisables par voie générale et produits par des micro-organismes (champignons ou bactéries) ***(Hiller-Buys, 2005).***

2- Métabolisme des actinomycètes

Le métabolisme des actinomycètes est résumé dans le **(tableau 3).**

Tableau 3 : principales différences entres les métabolismes primaires et **s**econdaires chez les eucaryotes**.** ***(Delaunay et al., 2003).***

Métabolite primaire	**Métabolite secondaire**
Synthèse pendant la trophophase (phase de croissance cellulaire)	Synthèse lors de l'idiophase (phase deralentissement et stationnaire)
Présent tout du long du cycle cellulaire	Apparition à un moment du cycle cellulaire
Nécessaire a 1 croissance	Inutile pour la croissance
Rôle physiologique connu	Rôle physiologique mal connu
(turn-over) élevé	(turn-over) pratiquement nul
Produit dans les conditions de culture Diverses	Produit dans les conditions de culture bien définies
Ubiquitaire	Spécifique
Enzyme a spécifié étroite	Enzyme a spécifié large
Voies de synthèse simple et courte	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit bien défini	Synthèse d'un mélange de produit
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

3-L'origine des antibiotiques

L'origine de ces molécules peut être naturelle, semi-synthétique ou synthétique. Ainsi, depuis le début des années quatre-vingt-dix, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de découvrir et de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques, aussi bien pour la médecine humaine et vétérinaire que pour l'agriculture **(*Donadio, 2002).*** Sachant que le milieu naturelle est à l'origine d'environ 70% des médicaments et des anti-infectieux actuels ***(Newman, 2003),*** les antibiotiques naturels sont produits en majorité par les micro-organismes qui ont été la source de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique humaine (pénicilline, érythromycine, vancomycine, streptomycine, amphotéricine, etc.) ***(Mc-Manus, 2002).***.Parmi ces micro-organismes, les Actinomycètes, sont les grands producteurs de substances antimicrobiennes.

Actinomycètes : ils sont à l'origine de 70% des antibiotiques et 60% pour la seule espèce de *Streptomyces.* ***(Mc-Manus, 2002).***

3- Classification des antibiotiques

La diversité et la complexité des antibiotiques nécessitent la classification selon plusieurs critères (leur structure chimique et leur mode d'action sur les bactéries) :

4-1. Structure chimique

Selon la structure chimique assez proche des antibiotiques, près de 7000 de ces molécules ont été classées dans 9 familles et dans de nombreuse sous familles ***(Boudjelal, 2012).***

Tableau4 Classification des antibiotiques selon leur structure chimique.

(Boudjelal, 2012).

Familles	**Sous familles**	**Exemples**
Antibiotiques contenantdes glucides	-Glucides purs -Amin glycosides -Glycopeptides	-Streptomycine, Gentamycine, Katamycine -Nojirimycine -Vancomycine,Ristocétine
Lactones macrocycliques	-Macrollies -Polyénes -Macorlactames	-Erythromycine,Spiramycine -Nystatine, Amphotéricine -Maytansine
Quinones et antibiotiquesapparentés	-Composés polycycliques linéairement accolés -Anthraquinones -Naphtoquinones -Benzoquinones	-Tétracyclines -Anthracyclines -Rubomycine -Mitomycines,Saframycine
Acides aminés et peptides	-Dérives d'acides aminés -Homopeptides -Depsipeptides -Lipopeptides	-Péniciline,Cucosérine -Bacitracine -Valinomycine -Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliqus contenant l'azote	-Hétérocycle non accolés -Hétérocycles condensés	-Mildiomicine -Phénazines
Antibiotiques hétérocycliquscontenant l'oxygéne	-Dérivés du furane -Polyéthers	-Monensine
Antibiotiques aromatiques	-Composés benzéniques -Composésaromatiques condensés,et autre dérivés	-Chloramphénicol -Griséofulvine -Novobiocine

Antibiotiquesalcycliques	-Dérivés du cyclo-alcane -Terapéne -ligoterpénes	-Cycloheximide -Acide marasmique -Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	-Dérivés d'alcanes -Dérivés des acides carboxyliquesalphatiques -Composés contenan	-Elaiomycine -Cérulénine -Fosfomycine

4-2 Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont divers modes d'action pour inhiber ou contrôler la croissance de micro-organismes, comme l'inhibition de la formation de la paroi cellulaire (pénicillines, céphalosporines, novobiocines), les protéines (tétracyclines, aminosides) la synthèse de la membrane cytoplasmique (poly myxines, tyrothricine) ***(Cloutier, 1995).(Figure04).(Davies et Mazel,1997).***

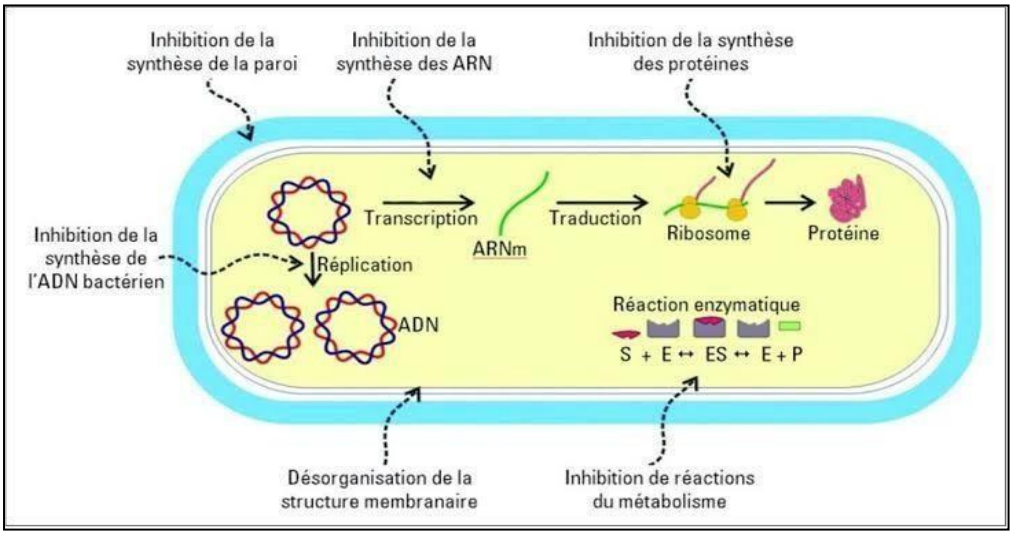


Figure 05 : principales cibles et mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques produits par les actinomycètes manifestent des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale ou antiparasitaire ***(Leveau etBouix, 1993 ; Oskay et al., 2004 ; Gebreselema, 2003*)**. Les antibiotiques présentent un intérêt significatif dans le domaine de la santé humaine, animalede l'élevage et de l'agriculture ***(Leveau et Bouix, 1993).***

Les antibiotiques sont synthétisés à la fin de la phase exponentielle (tropopause) et au débutde

la phase stationnaire (idiophase).

Les Streptomyces ont la capacité de produire différents types d'antibiotiques environ plus de 80% à l'heure actuelle ***(Demain, 2000).*** La néomycine et la streptomycesfradiae, qui sont caractérisés par leur propriété bactéricide, fongicide et herbicide contre les Streptomyces multi-résistants et les bactéries à Gram positif ***(Rudi et al., 2012).*** Jusqu'à présent, environ 10% de ces molécules sont largement utilisées dans le domaine thérapeutique humaine et vétérinaire, ainsi qu'en agriculture et en industrie agroalimentaire, le type de composé synthétisé est propre à chaque espèce productrice ***(Demain, 2000 ; Colombié, 2005).***

Parmi les souches isolées d'actinomycètes, 50 à 70% produisent des antibiotiques et sont à

L'origine des 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde. **(Tableau 05)** ***(Okami et Hotta, 1988).***

Tableau 05 : Importance relative de groupes microbiens producteurs d'antibiotiques. ***(Okami et Hotta, 1988).***

Micro-organisme producteurs d'antibiotiques.	**Pourcentage (%) du total des antibiotiques décrits.**
Lichens et algues	**0.8**
Champignons **-penicillium** **-Aspergillus** **-Fusarium** **-Cepphalosporium** **-Autres champignons imparfaits : Basidiomycètes et Ascomycètes**	 **4.1** **3.0** **1.2** **0.8** **5.4** **5.0**
Bactéries **-Pseudomonadaceae** **-Bacillaceae** **-Autre Eubactéries**	 **1.3** **7.0** **1.7**
Actinomycètes	**69.7**

A- Antibiotiques inhibant la synthèse de peptidoglycane

Piactamines + pénicillines

+ CéphalosporinesGlycopeptide Fosfomycine

b- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

ammosides chloramphénicol et dérivés Tétracyclines macrolides. lincosamides, streptogramines Acide Fusidique

c-Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques :

Quinolones rifampicinenitrofuranes

d-Antibiotiques inhibant la synthèse des folates :

Sulfamides et associations sulfamidées

d-Antibiotiques inhibant la synthèse des acides mycoliques :

Isoniazide éthionamide Prothionamide pyrazynamide Source **: (*Abderrahmane, 2000)***

4- Classement suivant l'utilisation des antibiotiques

Selon leur activité, il existe plusieurs classes d'antibiotiques :

- anti-infectieux : Bac-trime Forte,
- anticancéreux : Adriamycine,
- pesticide : Kasugamycine,
- conservation aliments:Piramicine,
- élevage intensif:Monensine, **(Abderrahmane, 2000).**

1-L'objectif

L'objectif principal de notre travail est basé sur l'isolement et l'identification des actinomycètes isolés d'origine marine de la région côtière à savoir la wilaya de Mostaganem (Algérie).

Afin de sélectionner les souches les plus performantes afin de les caractériser pour la production d'antibiotiques.

1. Période et lieu de stage

Notre étude expérimentale a été réaliser au niveau des laboratoires pédagogiques de Biologie1 et 2de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de L'Université Dr << Yahia Fares>>à Médéa , durant la période s'étalant entre mois de mars et mois d'avril 2022, et dans laboratoire de microbiologie et laboratoire physicochimique dans le groupe SAIDAL ANTIBIOTICAL à Médéa durant la période du 9 mai à 12 mai 2022.



Figure 06 : Carte Michelin Mostaganem de

(Google Maps, 21/05/2022).



Figure 07 : plage Sidi mejdou



Figure 08 : plage Sablette



Figure 09 : plage sidi mansor

3. Echantillonnage

Les échantillons de sol d'origine marine ont été prélevés d'un site du littoral de la cote Ouest de la wilaya de Mostaganem. Nos trois échantillons ont été prélevés au début du mois de janvier 2022 **(Figure 1 et 2).** A l'aide d'une spatule stérile : les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés. Cent à cent-cinquante (100 à 150) grammes de sol de la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur), puis sont déposés (chaque échantillon des 3 régions) dans des boites stériles transportés le plus rapidement possible au laboratoire ***(pochonTardieu, 1962).*** Les échantillons sont immédiatement conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'àl'utilisation.



Figure 10 : Site de prélèvement des échantillons **(prise personnelle 2022).**

4- Caractéristiques physico-chimique du sol des échantillons

4-1 Mesure de pH des échantillons

Après séchage de 35°C pondant 3 heures on prépare une suspension de sols (10g de sol pour 25ml d'eau distillée). Les pH sont alors mesurés à l'aide d'un pH-mètre selon la technique de ***(Pochon et Tardieux, 1962)***

4-2Dosage de l'eau par la méthode de KARL-FISCHER

5- Prétraitements des échantillons

Le traitement des échantillons permet de réduire la croissance de la flore fongique et bactérienne, afin, d'augmenté le nombre des actinobactéries contenue dans les sols et sédiments**(*Cavala, 1994*).**Chaque échantillon subi deux types de prétraitement :

- **Le prétraitement (T 1)** : Consiste à chauffer deux grammes (2g) de chaque échantillon à60°C pendant 30 minutes **(*Takizawa et al ., 1993).***
- **Le deuxième prétraitement (T 2)** : consiste à traiter 1 g de sol de chaque échantillon avec 0.1 g de CaCO3. Le mélange est mis dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant sept jours à 28°C ***(El-Nakeeb et Lechevalier, 1963).***

Les milieux de cultures utilisés

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinobactéries sont :

- **Milieu ISP2** (International Streptomyces Project) **(*Ara et al., 2012).***

- **Milieu de gausse.**
- **Milieu SCA.**

6- Isolement des actinomycètes

Pour chaque échantillon, 1g de sol sont dilués dans 9ml d'eau physiologique stérile, puis agités au vortex deux fois pendant 5 minutes, cette suspension constitue la dilution 10 -1 . Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-3}) est effectuée pour chaque échantillon. 400µl par dilution par boîte de Pétri sont étalés en surface de trois milieux de cultures : ISP2et milieu du Gausse et SCA**.** Les boites de Pétri sont alors incubées à 28°C. Elles sont observées après à partir du 3 eme jour.

- La préparation des solutions de sol se fait par la méthode de dilutions des suspensions. La suspension mère du sol est préparée par l'addition de 1gramme de sol, et introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Les échantillons sont homogénéisés par agitation au vortex pendant quelques minutes. Les suspensions ainsi obtenues constituent les solutions à analyser. Cette suspension mère sert à réaliser des dilutions décimales ***(Agate et Bath, 1963).***

6-1-Ensemencement et incubation

À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau, 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1}à 10^{-3}) a été étalée sur la surface d'un milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine ***(Lemriss et al., 2003).***

6-2-Purification des isolats

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues ont été repiquées et ensemencées à l'aide d'une anse stérile puis purifiées par stries sur le milieu SCA, ISP2 et Gausse.

Les isolats obtenus sont numérotés et, sont ensuite ensemencés dans des boites pétrie contenant le même milieu de culture. Les tubes sont incubés pendant sept jours à 28°C puis conservés à 4°C **(*Arifuzzaman et al ., 2010).***

Conservation des souches

Seules les colonies à Gram positif présentant les aspects caractéristiques des actinomycètes,

Conservation des souches à court terme

La méthode de conservation des souches consiste à repiquer les souches en tube sur géloseinclinée ***(Botton et al., 1990)***, puits incubé 7jour pour les actinomycètes.

La souche pure doit être conservée à4°C pour une réalisation ultérieure des tests biochimiques, physiologiques et la technique de fermentation.

Conservation à long terme

Les isolats d'actinomycètes sont conservées dans une solution de glycérol à -20ºC.

7-Etude des caractérisations des actinomycètes :

7-1 Caractérisations microscopiques de coloration de Gram

D'après ***(Williamet al., 2010)*,**les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, qui a été mise au point en 1884 par le bactériologiste **Danois Hans Christian Gram**. Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu sur le milieu caséine amidon, ces frottis sont colorés, après observation à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x100), ce dernier permet de remarquer les formes morphologiquesdes différentes bactéries et indiqué le Gram + et Gram- .

- Les bactéries « Gram positif» gardent leur coloration violette après
- Les bactéries « Gram négatif» décolorées par alcool, sont teintées par la fuchsi ne et apparaissent roses.

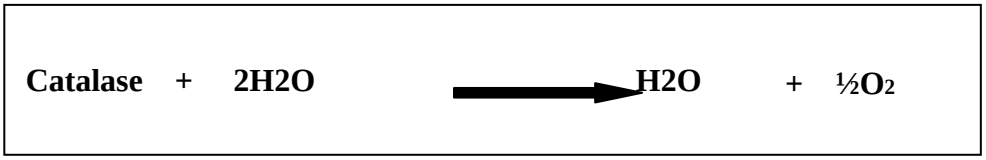
L'examen, nous permet de déterminer quelques caractères morphologiques des Actinomycètes, concernant le type de Gram+ et des indications sur leurs formes des filaments et présence ou absence de spores isolées ***(William et al., 2010).***

7-2Recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H_2O_2 qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air :

Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîchede H_2O_2 à 10 volumes. une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène. On dit que le test catalase est

positif et s'il n'y a pas de bulles, le test est négatif **(*Delarras, 2014*).**



8-Etude physiologique

8-1Croissance à différentes concentrations de Na Cl

Les souches d'actinomycètes ensemencée sur milieu ISP2 gélose à différentes concentrations en Na Cl qui sont : 0 ; 3.5 ; 6.5 (m/v). Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivepar observation des colonies toutes les 24h ***(athalye et al, 1985).***

8-2Croissance à différentes valeurs de pH

Ce test est réalisé sur milieu ISP2 gélosé ajusté à différents pH (5,7et 9.5). La souche est ensemencée puis incubée à 28°C. La croissance est observée et notée après 7éme, 14éme et 21éme jours ***(Athalyeet al., 1985).***

8-3Croissance à différents températures La souche d'actinomycète est ensemencée sur les milieux ISP2 (eau distillée 100%) et ISP2 (eau de mer 50%) qui sont incubée à différentes températures (28, 37,40 et 44°C). La croissance est suivie pendant 21 jours d'incubation.

8-4Sensibilité aux différents agents chimiques

Ce test est réalisé par l'ensemencement de la souche en stries sur le milieu GYEA préconisé par ***(Athalyeetal, 1985)*** additionné du composant des agents chimiques à tester suivant : Crystal violet (0,001%), Acide de sodium (0,001% et 0,01%) et Telluride de potassium (0,01% et 0,05%). Les boites sont incubées 21 jours à 28°C.

Glucose-Yeast Extrait-Agar (G.Y.E.A)

Extrait de levure……10g

Glucose ……10g

Agar ……18g

PH ……....6.8

8-5Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est effectuée sur le milieu Muller Hinton **(Athalyeetal., 1985).** Les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince à la surface de la gélose qui est préalablement ensemencée en stries par la souche testé. Les boites sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours. Les diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont

mesurés.

9-Etude biochimique

9-1Hydrolyse de l'amidon Selon la méthode de Marchal et al. (1991) le test de l'hydrolyse de l'amidon est réalisé sur la gélose nutritive contenant 10% (m/v) d'amidon soluble. Après incubation à28°C pendant 14 jours, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'absence de l'apparition des zones claires autour des colonies indique l'hydrolyse de l'amidon, par contreles zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

9-2 Dégradation de la gélatine Le test d'hydrolyse de la gélatine est réalisée sur la gélose nutritive contenant 0,4% (m/v) de gélatine. Après ensemencement de la souche, les boites sont incubées à 28°C pendant 14 jours. La révélation de la dégradation est effectuée avec une solution de chlorure mercurique à 15% (m/v). Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine ***(Williams et Cross, 1971).***

9-3 Dégradation de la tyrosine La dégradation de la tyrosine est réalisée selon la méthode préconisée par **(*Gordon et al, 1974),*** Les 100 ml de gélose nutritive sont complétée par une suspension de 0,4 g de tyrosine qui est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée puis stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 20 min). Les boites ensemencées sont incubées à 28°C, la lecture est effectuée après le 7éme, 14éme et 21éme jour, et se traduit par l'apparition des zones claires, correspondent aux zones d'hydrolyse de la tyrosine.

9-4 Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence des acides aminés en utilisant le milieu ISP9 préconisé par ***(Pridham et Gottlieb, 1948).*** Les acides aminés testés comme seule source de carbone sont les tests suivants : tyrosine, L-arginine, glycine. Après ensemencement sur les tubes et incubation pendant 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les tubes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP2 sans source de carbone (témoin négatif).

9-5 Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu ISP9 préconisé par ***(Pridham et Gottlieb, 1948).*** Les glucides testés comme seule source de carbone sont les tests suivants : sucrose, L- arabinose, D -mannitol, D+xylose, D- glucose, lactose, D+saccharose, fructose, D+cellobiose, D-mannose, D- sorbitol. Après ensemencement sur les tubes et l'incubation pendant 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les tubes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celles obtenues sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9

contenant le glucose (témoin positif).

9-6 Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds

Afin de mettre en évidence la résistance ou la sensibilité des souches d'actinobactéries étudiées aux métaux lourds, des milieux de culture gélosés ont été préparés en utilisant une gélose nutritive contenant différents métaux sous forme de sels organiques : le zinc (ZnSO4), le cuivre, ainsi que le mélange de ces métaux, à raison de 50 mg/L **(**Daboor et al, 2014). La croissance des isolats est observée après 21 jours d'incubation à 28°C.

L'appréciation de la résistance ou de la sensibilité des isolats testés est traduite par la croissance ou l'absence de cette dernière.

10-Mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques

10-1 Standardisation des inocula bactériens Après leurs revivifications, une culture de 18h dans des tubes de 5ml de bouillon nutritif incubée à 37°C a été réalisée pour chacune des bactéries cibles. Ces cultures sont considérées comme des suspensions mères. Une série de dilutions décimales est réalisée est les bactéries sont dénombrées sur deux boites de milieu GN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. A l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Shimadzu UV mini.1240), les valeurs d'absorbances correspondantes aux dilutions présentant. Nombre de 10^6UFC/ml ont été retenus pour préparer des cultures de 18h qui ont servi pour le test d'activité antibiotique ***(Billerbecketal, 2002*)**.

10-2 Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar

Activité antibactérienne L'activité antibactérienne de la souche est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller Hinton. **(*Selon Bastide et al,1986),*** qui consiste à ensemencer la souche sur les deux milieux étudiés (SCA et ISP2) et incuber pendant 5 jours à 28°C , des disques d'agar de 6mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un embout stérile ou une pipete pasteur stérile à partir des deux milieux cités plus haut puis déposer à la surface du milieu Mueller-Hinton

Préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les germes cible, les boites sont par la suite mises à4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, et enfin incubées à 37°Cependant 24h. Les lectures sont effectuées par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des cylindres.

11-Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des puits

Afin de mettre en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des puits, des pré-cultures de 5 ml sur les milieux SCA et ISP2 liquide de cette souche servent pour ensemencer des cultures de 50 ml des mêmes milieux contenus dans des flacons de 250

ml. Les flacons sont incubés à 28°C sous agitation à 250 rpm pendant 5 jours **(*Poosarlaetal, 2013)*.** L'activité antibiotique et antifongique est déterminée par la méthode despuits **(*Nouasri, 1996)*.** En utilisant le milieu Mueller Hinton et gélose à l'extrait de maltpréalablement tapissés par une goutte de gélose blanche et ensemencés avec le germe cible (10^6 UFC/ml) pour la bactérie et (10^5 spores /ml) pour les moisissures. Après décantation des flaconsprécédents, une quantité de 50µl de chaque surnageant de culture est prélevé stérilement avec une micropipette, puis introduit dans les puits par ordre des jours de prélèvement (5éme ,7éme et 9éme jours). Les boites sont ensuite mises à 4°C pendant 2h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les moisissures. La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits après 24h pourles bactéries et 48h pour les moisissures. En utilisant un pied - à - coulisse.

Milieu de production d'antibiotiques

Afin de déterminer le meilleur milieu de production d'antibiotiques, nous avons repiqué la souche sur deux milieux différents : SCA et ISP2. Après cinq jours d'incubation à 28°C, un test d'activité antimicrobienne est réalisé par les méthodes des cylindresd'agar et des puits vis-à-vis, des germes cibles préalablement cités (2-2). Le Meilleur milieu de production d'antibiotiques sera celui qui remis l'obtention des diamètres des zones d'inhibitions les plus importants.

12-Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits brutes obtenus

Les extraites bruts sont obtenus par macération en utilisant butanol comme solvant.

Les extraits bruts sont obtenus après évaporation à sec, afin d'éliminer totalement le solvant d'extraction. Les extraits bruts sont par la suite récupérés dans un volume de 5m l de méthanol puis conservés à 4C° pour une utilisation ultérieure. Test d'antagonisme A l'aide d'un emporte- pièce, des puits de 6mm de diamètre sont réalisé sur le milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé avec les germes cibles.

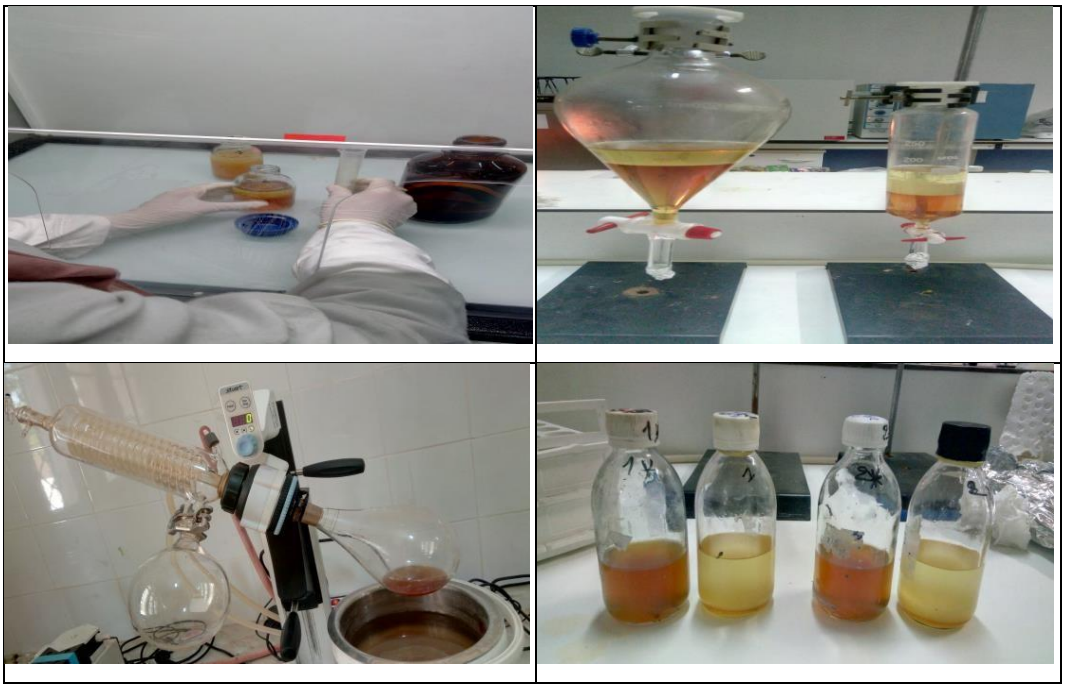


Figure 11 : Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures.

IV. Résultats et discussion

1-caractéristiques physico-chimique du sol

1-1 pH du sol

Le pH des échantillons prélevé est démontré sur le **tableau 6**. Le pH joue un rôle indispensable dans la production des métabolites secondaires par différents mycète ***(Dumenil et Sanglier, 1989).***

Normalement c'est dans la partie matériel et méthodes si ce n'est pas fait mettez le



Figure13 : Mesure du pH du sol**, (prise personnelle).**

Tableau 10 : le pH des échantillons du sol

Les Echantillons	pH
M1	9,69
S2	9,65
SM3	9,30

Ces échantillons sont caractérisés par des valeurs de pH entre 9.3 et 9.69, et qui présentent un pH alcalin.

1-2Dosage de l'eau par la méthode de KARL-FISCHER

C'est une technique qui permet le dosage de l'eau par le réactif de Karl-Fischer est celle qui est utilisée par la plupart des laboratoires. Elle permet le dosage de l'eau dans les substances solides, liquide sou gazeuses. Elle est utilisée habituellement pour déterminer des teneurs en

eau de l'ordre de 0,5 à 5 %, mais elle peut s'appliquer en fait à des échantillons contenants entre 10-4et 100 % d'eau. **(1) J. MITCHELL et D.M. SMITH, "Aquametry", 2e éd., Chemical**

AnalysisSeries, vol. 5, part. 1, 2 et 3, Wiley, 1977

La loi de cette méthode : $Kf= \frac{f \times v}{p} \times 100$

F : le facteur du réactif exprimé en mg d'eau par ml (constant)

V : le volume du réactif

P : la masse de la prise d'essai en grammes

Les résultats :

M1= $\frac{4.8153 \times 0.13}{114.9} \times 100$

Kf= =0.544 %

S2= $\frac{4.8153 \times 0.18}{116.6} \times 100$

Kf== 0.743%

SM3 = $\frac{4.8153 \times 0.09}{112.9} \times 100$

Kf = 0.383 %

Ces résultants nous permettent de conclure que tous les échantillons du sol sont caractérisés par un taux d'humidité faible.



Figure14 : Dosage de l'eau par la méthode KARL-FISCHER (prise personnelle).

2-Isolement des actinobactéries

Le but de ces prétraitements pour la réduction la flore bactérienne et fongique contaminante, et l'augmentation le nombre des actinomycètes contenue dans le sol marin ***(Cavala,1994*)**.

Les 3 milieux utilisés ont démontré une bonne croissance, sauf quele milieu SCA, ISP2 ont donné une donnée une bonne croissance d'actinomycètes par rapport au milieu GAUSSE. Cela peut être du a la présence de l'extrait de malt dans le milieu ISP2, et CaCo3 dans le milieu SCA.

Il a été constaté que le nombre des colonies d'actinomycètes est plus faible lorsque les échantillons ne subissent aucun traitement.

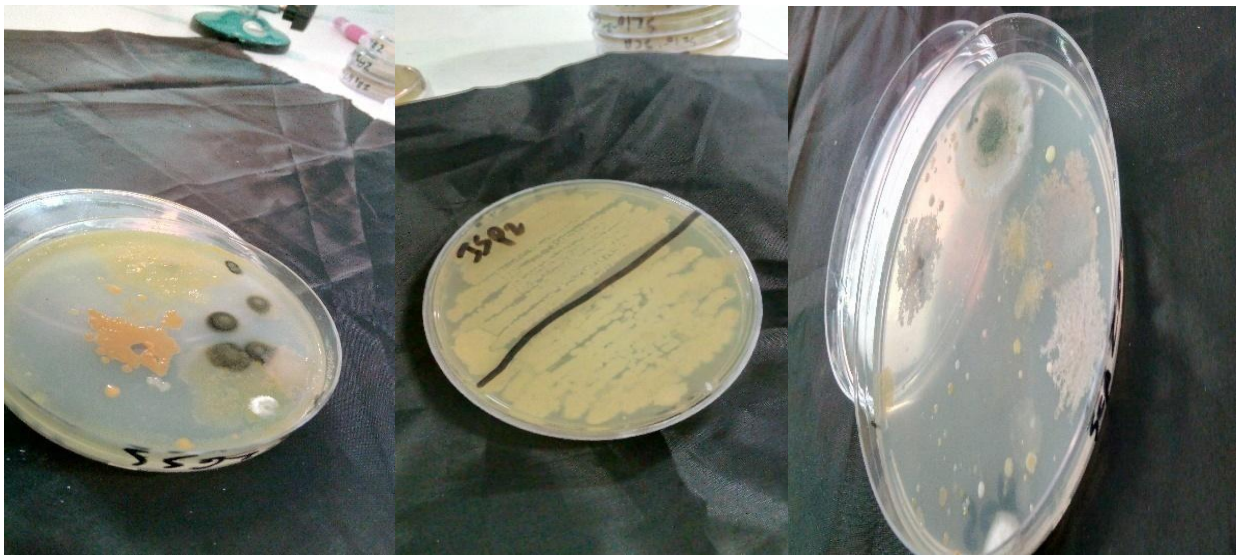


Figure 15 : actinomycètes isolés des échantillons traités sur les milieux (GAUSSE, ISP2, SCA) (prise personnelle).



Figure 16 : actinomycètes isolés des échantillons non traités sur milieux SCA

(Prise personnelle).

2-1Caractérisation macroscopiques

Après l'observation macroscopique, les caractéristiques morphologiques des actinobactéries sont basées sur les critères morphologiques décrits

Tableau 11 : résultat macromorphologique et caractères culturaux des souches actinomycètes.

La souche	Le milieu de culture	Aspect macroscopique
S210-1	SCA	Colonie blanchâtre creusé dans la gélose
S210-1	SCA	Colonie marron
SM3 10-2 N	GAUSSE	Colonie orange creusé dans la gélose
ZA310-2	SCA	Colonie blanchâtre creusé dans la gélose
ZA310-2	SCA	Colonie rose creusé dans la gélose
ZA2m	SCA	Colonie vert foncé
ZA2m	SCA	Colonie rose clair
M1 10-1	GAUSSE	Colonie orange creusé dans la gélose
S2 10-3	GAUSSE	Colonie jaunâtre
Sm3m	GAUSSE	Colonie jaunâtre creusé dans la gélose
S2 10-2	GAUSSE	Colonie jaunâtre
S2 10-1 N	SCA	Colonie rose creusé dans la gélose
ZA1 10-3	SCA	Colonie blanchâtre
ZA2 10-1	GAUSSE	Colonie marron
M1 10-1	SCA	Colonie blanchâtre creusé dans la gélose
ZA2 10-3	SCA	Colonie rose
ZA2 10-2	SCA	Colonie jaunâtre creusé dans la gélose
S2 10-2	GAUSSE	Colonie jaunâtre creusé dans la gélose
ZA1 10-1	SCA	Colonie blanchâtre
ZA3 10-1	SCA	Colonie jaune

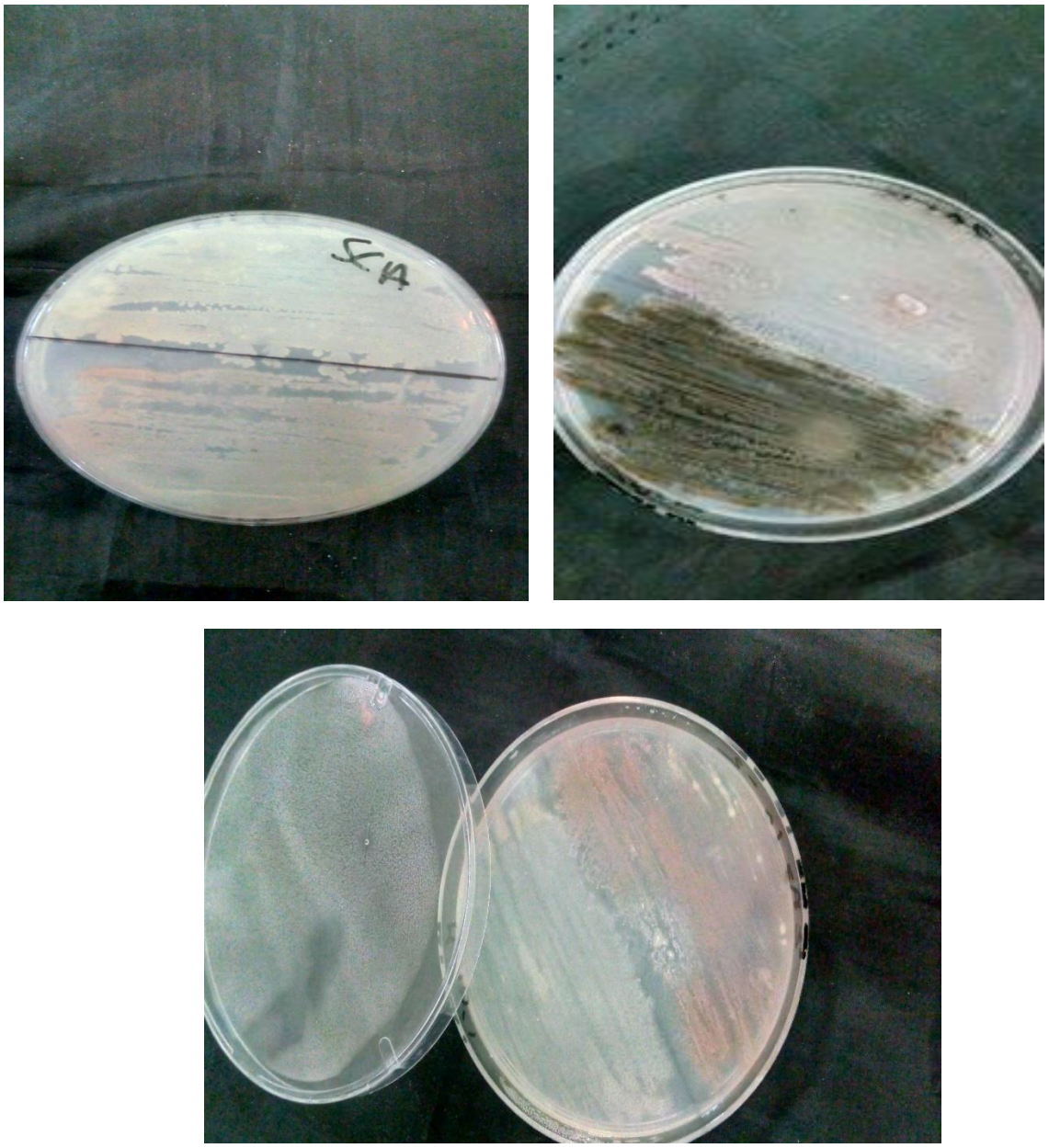


Figure17 : Résultats de purification des quelques souches d'actinomycètes sur milieu SCA. **(Prise personnelle, 2022).**



Figure18 : Résultats de purification de souche d'actinomycète sur milieu GAUSSE. Prise **personnelle, 2022.**

2-2Caractérisation microscopique

La culture sur la lamelle permet d'observer du mycélium aérien et de substrat avec les spores, sur cela, les résultats obtenus après observation microscopique, sont représentés par **la figure 21.**

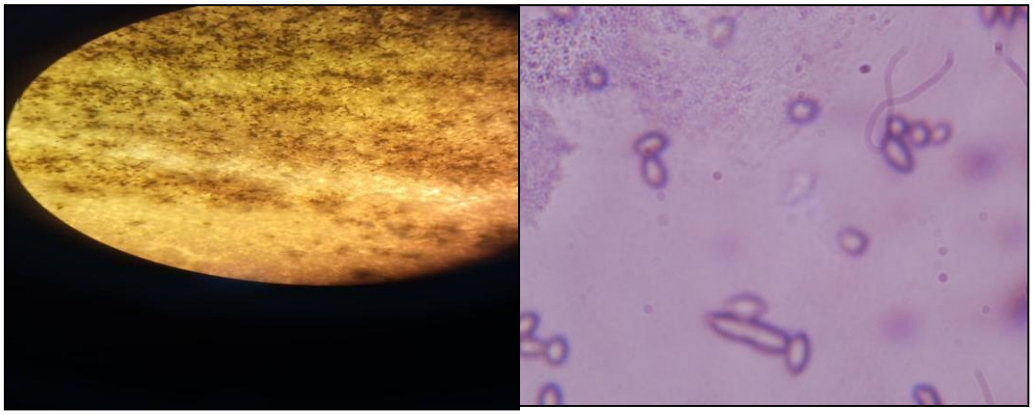


Figure 19 : observation microscopique (×40et ×100) de culture sur lamelle des actinomycètes **Prise personnelle, 2022.**

L'observation microscopique de grossissement (×40et ×100) indique que les souches d'actinomycètes sont des bactéries Gram+, ces derniers possèdent une forme filamenteuse fins ramifiée.

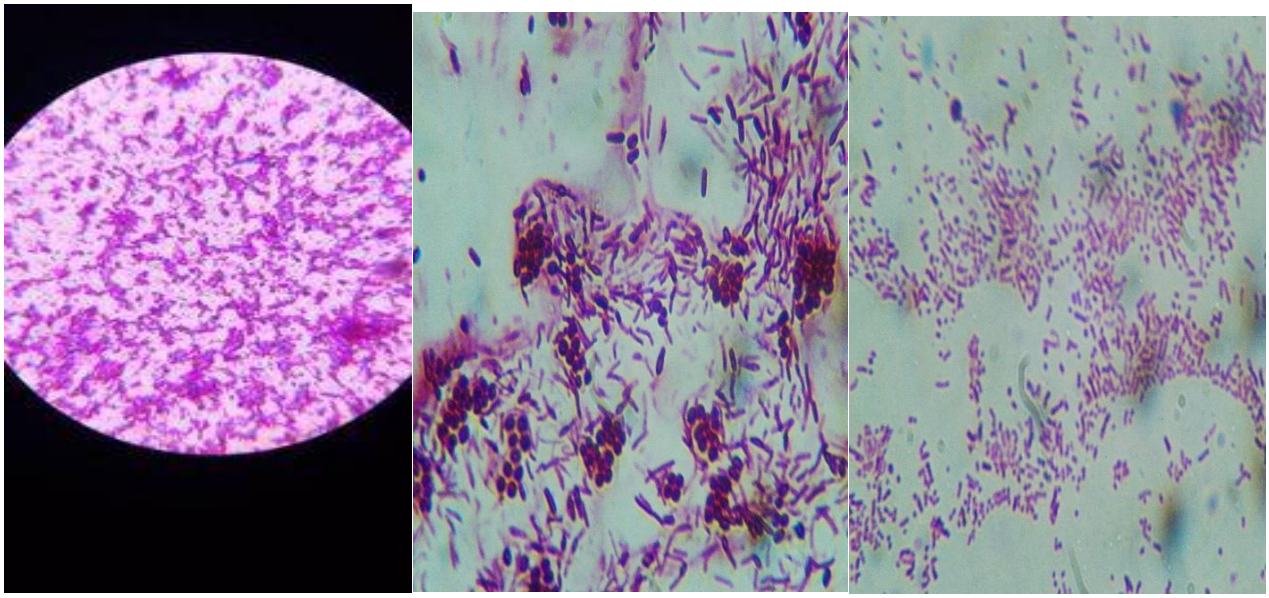


Figure 20 : coloration de Gram des souches d'actinomycètes isolés. **Prise personnelle.**

2-3 Recherches catalase

L'examen de la recherche de la catalase, montre que la majorité des isolats sont de catalase positive (appariation de bulles d'air) **(fig. 26)** qui traduit la décomposition De dioxygène.

D'après **Tortora *et al.*, (2003),** la catalase c'est une enzyme oxydoréductase qui catalyse la peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène**.**

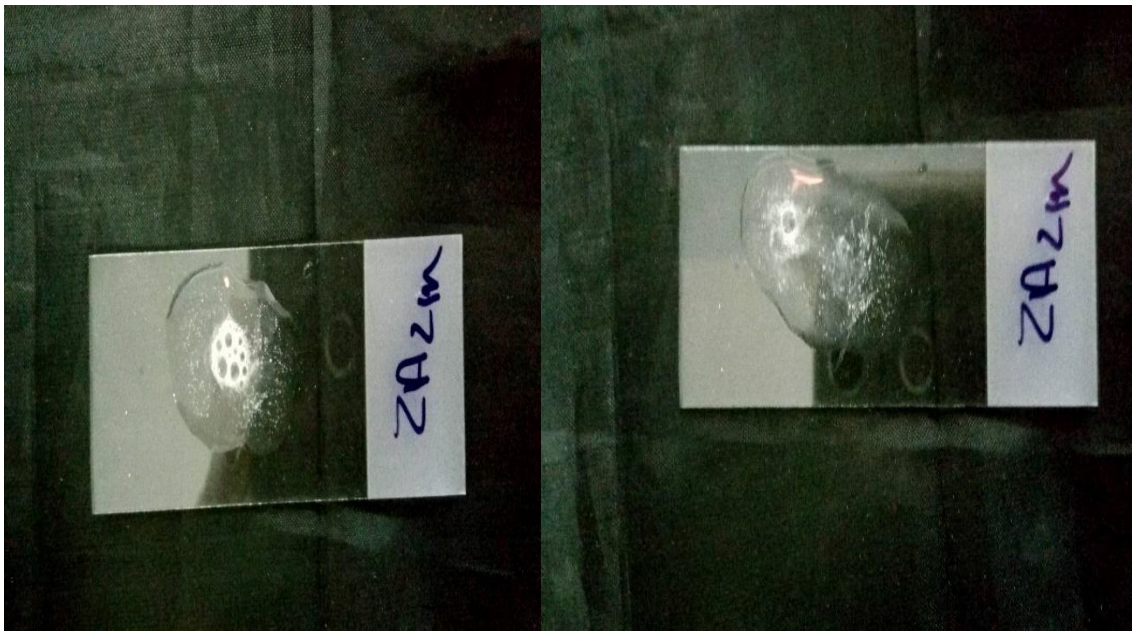


Figure 21 : Test catalase positif.

3-Teste physiologique

Tableau12: les caractères physiologiques des actinomycètes marins

Test / Souche	Na Cl		Ph		ISP2						Sensibilité aux différents agents chimiques (Crystal violet 0.001%)	Catalase
					100% L'eau distillée			50% L'eau de mer 50% L'eau distillée				
	3.5%	6.5%	5.7	9.5	28°	37°	42°	28°	37°	42°		
1)ZA2m	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	+++
2)ZA2m	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	++
3)ZA310-2	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++
4)ZA310-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+++
5)ZA110-1	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6)ZA210-1	+	+++	-	+++	++	++	+++	+++	+++	-	+++	-
7)M110-1	+	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
8)S210-1 N	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	+
9)S210-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++

10)S2 10-1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
Sm3 10-2 N	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	-	++	+
12) ZA2 10-2	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+
13)ZA 3 10-1	-	+++	+++	+	+	++ +	+++	+++	+++	+++	+++	++
14)ZA 2 10-3	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15)S2 10-3	++	++	+++	++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	++
16)M1 10-1	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	-	+	+++	++
17)S2 10-2	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+
18)Sm 3 m	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	-	+	-	++
19)ZA 1 10-3	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-
20)S2 10-2	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+

NB : -Un bon résultat : +++ -Un résultat moyen : ++ -Un résultat faible : +

-Aucun résultat : -

3-1Croissance à différentes concentrations de Na Cl

Le tableau 12 illustre les résultats de croissance des souches d'actinomycètes à différentes concentrations de NaCl**(0%, 3.5% et 6.5%),** qui nous montre que ses microorganismes se développent à d NaCl=0%, NaCl=3.5% et elle a également un très bon développement lorsque le NaCl=6.5%.**Kuchner, (1987) cité par *Tang et al, (2003*)** a classé les actinobactéries selon leur aptitude à croitre en présence de NaCl Cela nous explique la cohabitation de ces microorganismes dans l'écosystème marin.



NaCl=0% NaCl=3.5%



NaCl=6.5%

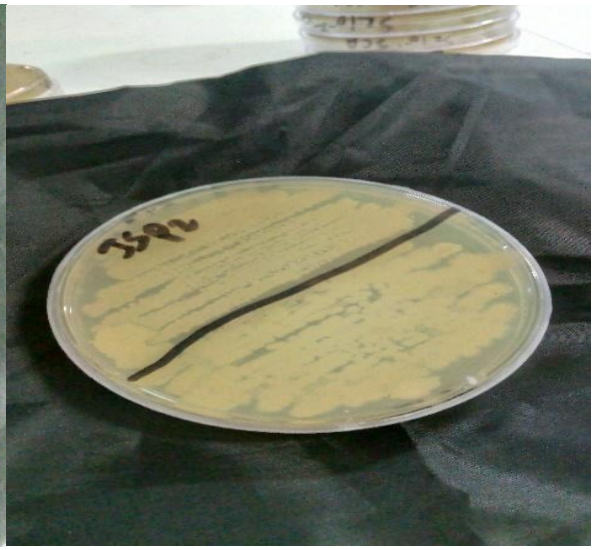
Figure 22 : Croissance des souches d'actinomycètes en différents concentration de NaCl.

3-2Croissance à différentes valeurs de pH

Concernant le pH **(tableau 05),** cette étude a montré que nos souches ont la capacité de se développer dans le milieu ISP2 à différentes valeurs de pH, **(7. 2,5.7,9.5).**Mais généralement les actinomycètes se comporte comme des bactéries. Selon ***(Boubetra et al.,2013)*** ont signalé l'absence de croissance de leur souche à pH 5.D'autre part les actinomycètes acidophiles et neutrophiles croient dans une gamme de pH allant de 3-5 à un pH neutre, avec un optimum situé entre 5 et 5,5,ces résultats concordent avec ***Lonsdale, 1985*.**



pH=7.2



pH=5.7



pH=9.2

Figure 23 : croissance des souches d'actinomycètes en différents concentration de pH **(prise personelle)**

3-3Croissance à différentes températures

Les résultats qui figurent dans le tableau 20, nous montrent que l'ensemble des isolats d'actinomycètes ont un développement plus important à température 28°C, avec un optimum de croissance à37° et 42°dans le cas de 100% l'eau distillé. Par contre le cas de (50% l'eau de mére, 50% l'eau distillé), le développement des souches dans température 28° reste très important, mais en 37° et 42° la croissance a été réduit (faible croissance) et quelques souches n'ont pas poussé tel que (ZA2 10-1, M1 10-1, Sm3 10-2 N). Les résultats de ***Boubetra et al., (2013), Aouiche et al.,(2012) et Boudjella et al.,(2006)*** avec des températures 28°C, et 37°C semblent confirmer les notres.

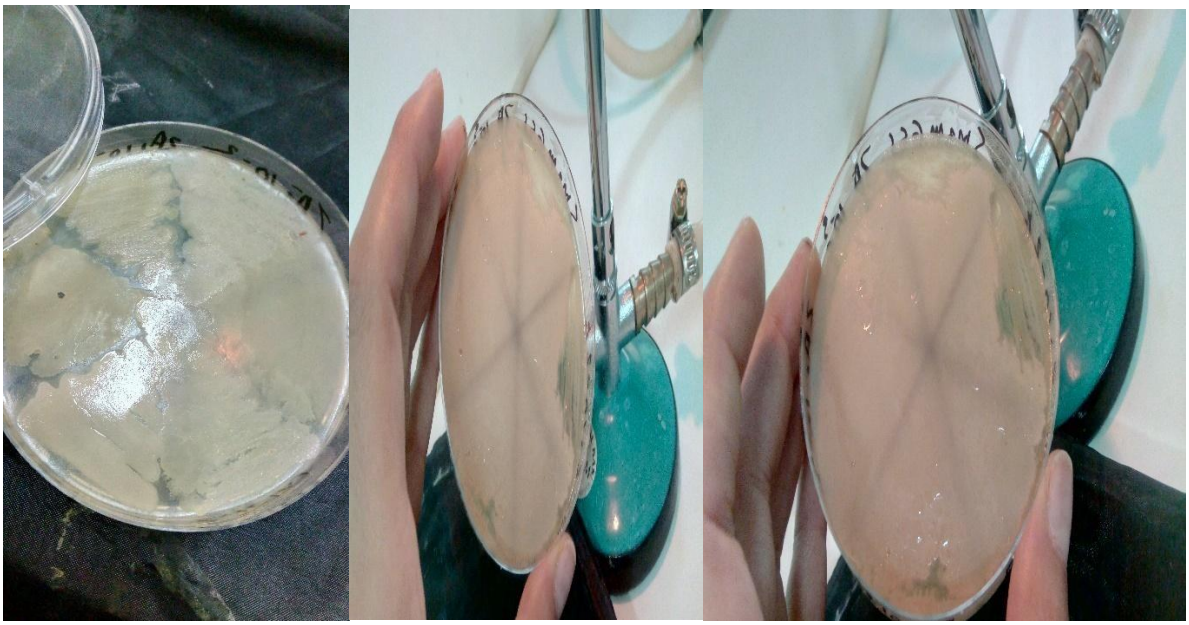


Figure 24 : croissance d'actinomycètes (50% l'eau de mére, 50% l'eau distillé)en différents températures (28°,37°,42°).

3-4 Sensibilité aux différents agents chimiques (Cristal violet 0,001%)

D'après les résultats de **tableau 12,** les majorités des souches d'actinomycètes sur lesquels nous avons travaillé sont sensibles au cristal violet (ZA1 10-3, Sm3 m, S2 10-1 N…), mais ils existent des souches résistantes qui sont observée et traduite par leurs croissance.

Nos résultats sont en d'accords avec les travaux antérieurs réalisés sur les actinomycètes.
Selon ***(mémoire de magister Bejaia ,2017 kahina.y, Bendris.O)***

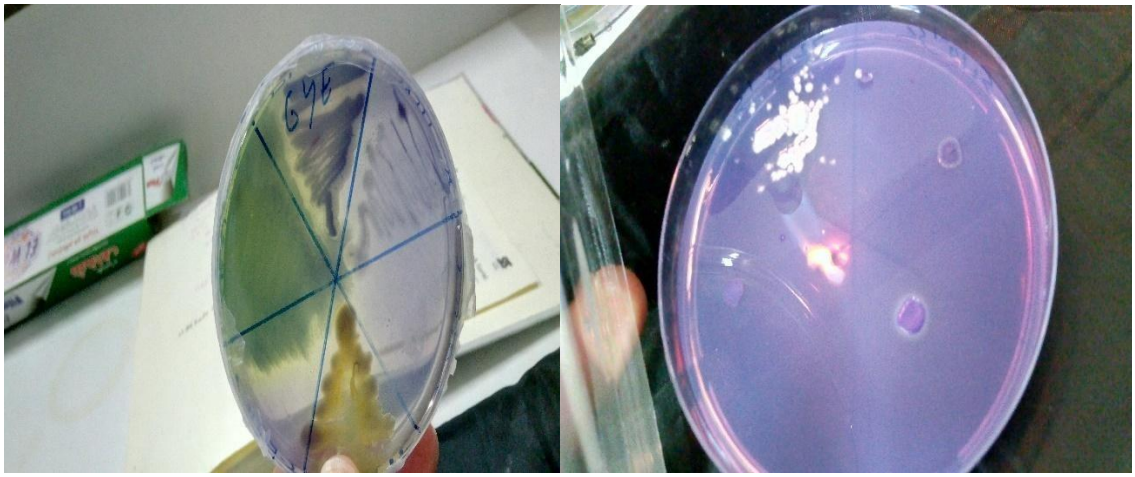


Figure 25 : Résistance ou la sensibilité dessouches d'actinomycètes au agent chimique (cristal violet) après 4 jours d'incubation. **Prise personnelle 2022.**

3-5 Sensibilité aux antibiotiques

Tableau 13 : Résistance ou la sensibilité d'isolats d'actinomycètes en différents antibiotiques après 7jours

Le diamètre des zones des souches sensibles est dans l'annexe : tableau13

ATB / **Souche**	Benzyle-pénicilline (1)	Céfazoline (2)	AMOXICILLINE (3)	Pénicilline (4)	Gentamicine
ZA2m	R	R	R	R	R
ZA2m	R	S	S	S	S
ZA3 10-1	R	R	S	R	S
Sm3 m	R	R	S	S	S
S2 10-2	R	S	S	R	S
S2 10-2	R	S	S	S	S
M1 10-1	R	S	S	S	S
S2 10-3	R	S	S	S	S
ZA2 10-1	S	S'	S	S	S
ZA1 10-3	S	S	S	S	S
S2 10-1 N	R	S	S	R	S
ZA1 10-1	S	S	S	S	S
ZA2 10-3	S	S	S	S	S

ZA2 10-1	R	R	S	S	S
M1 10-1	S	S	R	R	S
S2 10-1	R	S	S	S	S
S2 10-1	S	S	S	S	S
ZA3 10-2	S	S	S	S	S
ZA3 10-2	S	S	S	S	S
Sm3 10-2N	R	S	S	S	S

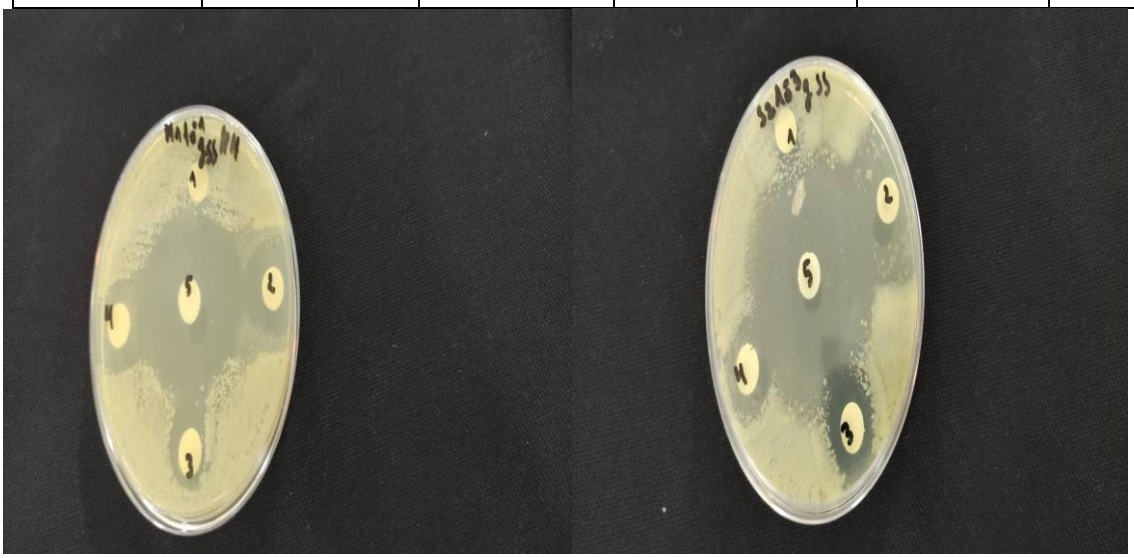


Figure 26 : Photographie illustrant le test d'antibiogramme des isolats d'actinomycètes après 7 jours d'incubation.

Selon ces résultats, on déduit que la souche montre une résistance à un antibiotique. Il peut s'agir de l'aptitude à produire cet antibiotique, et La souche qui présente une sensibilité aux antibiotiques c'est-à-dire que ces antibiotiques ont un effet bactéricide sur la souche. D'après **(*Marcone et al ., 2010),*** la résistance des isolats à certains antibiotiques proposent leur aptitude à la production de ces molécules.

4-test biochimique

Tableau 14 : les tests biochimiques.

Tests / Zones	Test Biochimique									
	Hydrolyse de l'amidon	Dégradation de gélatine	Dégradation de tyrosine	Sensibilité de Zinc	Sensibilité de Cuivre	Acide Aminé				TSI (dégradation des sucres)
						Arg 50 %	Arg 100 %	Gly 50 %	Gly 100 %	
ZA2m	++++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA2m	++++		+++	+	++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA3_10-2	++++		+++	+	+	+++	+++	+++	++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA3_10-2	++++		+++	+	++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA1_10-1	++++		+++	+++	_ _ _	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA1_10-1	++++		+++	+	+++	+	++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
M1_10-1 sca	++++		+++ Fluo	+	_ _ _	+++	+++	+++	++	Tube jaune (virage de couleurs)
S2_10-1N	++++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
S2_10-2	++++		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)
S2_10-1	++++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune avec une tache noire
S2_10-1	++++		+++	++	+	+++	+++	+++	+++	fond marron et surface jaunâtre
SM3_10-2N	++++		+++	++	+++	+++	+++	+++	+	fond jaune et surface rougeâtre
ZA2_10-2	++++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA3_10-1	++++		+++ Fluo	+++ Fluo	+++	+++	+++	+++	+++	Tube jaune (virage de couleurs)

ZA2_10-3	++++		+	+	+++	++	++ +	++ +	++	Tube jaune (virage de couleurs)
S2_10-3	++++		++	++	+	+++	++	++ +	++ +	Tube jaune (virage de couleurs)
M1_10-1 gss	++++		+++	+++	+++	+++	++ +	++ +	++	Tube jaune (virage de couleurs)
S2_10-2	++++		+++	+++	+++	+++	++ +	++ +	++	Tube jaune (virage de couleurs)
SM3m	++++		++	++	+++	+++	++ +	++ +	++ +	Tube jaune (virage de couleurs)
ZA1_10-3	++++		+	+	++	+++	++ +	++ +	++ +	Tube jaune (virage de couleurs)

Meilleures Résultats : +++ Résultats Moyennes : ++ Faibles Résultats : +

Aucuns Résultats : _ _ Fluo : Fluorescence

4-1-Hydrolyse de l'amidon

L'hydrolyse de l'amidon est un test réalisé sur une gélose nutritive contenant10% (m/v) d'amidon soluble. Après incubation 28°C dans les 14 jours. On mettre une solution de Lugol sur la gélose (le trait ensemencé d'actinomycète sur la gélose). Après l'ajout de Lugol, l'absence de coloration bleue autour des colonies traduit une synthèse extracellulaire des α-amylase diffusés dans le milieu .par contre les zones ou la souche bactérienne est présente la couleur du réactif Lugol a viré vers le bleu se traduit par la présence de l'amidon **figure28.**Les mêmes résultats ont été obtenus et décrites sur les Streptomyces sp par plusieurs équipes **(Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier et al., 1993)..**

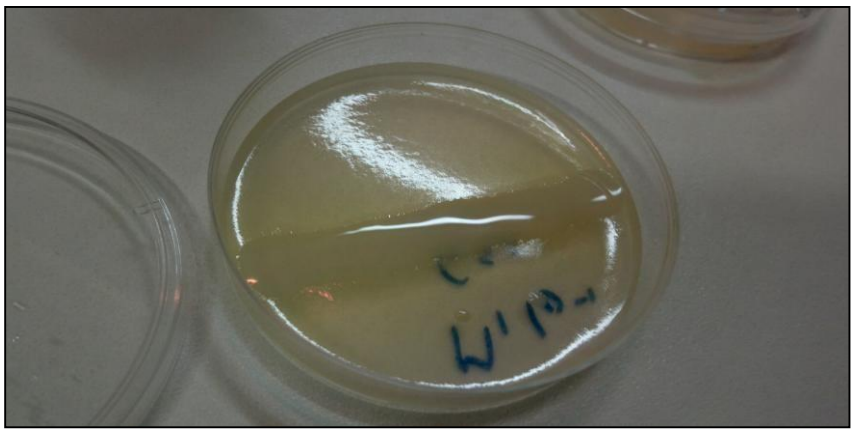


Figure 27 : avant l'hydrolyse d'amidon. **(Prise personnel).**

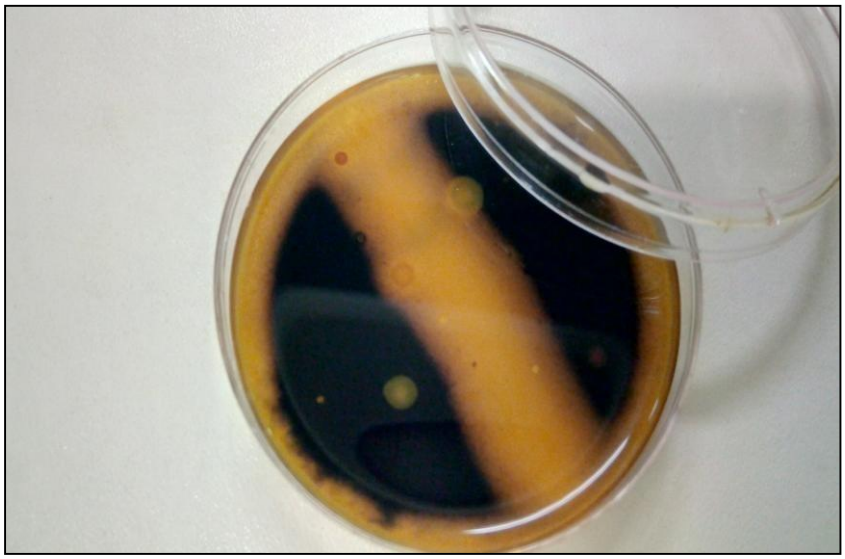


Figure 28 : L'hydrolyse de l'amidon. **(Prise personnel).**

4-2Dégradationde la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine est un test réalisé sur une gélose nutritive contenant 0,4% (m/v) de gélatine. Après on a fait un ensemencement de la souche. Les boites sont incubées à 28°C pendant 2 jours. La révélation de la dégradation est effectuée avec quelques gouttes d'une solution de chlorure mercurique. **(Williams et Cross, 1971).**

Après l'ajout de chlorure mercurique, les zones autours de colonies d'actinomycètes sont de colorés clairement. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine, qui est due à la présence d'enzyme gélatinas sécrété et diffusé dans le milieu.

Cependant, beaucoup de travaux ont été réalisés sur les Streptomyces sp est confirment les capacités de ce genre à dégrader certains substrats et déchets. ***(Bergey, 2012).***

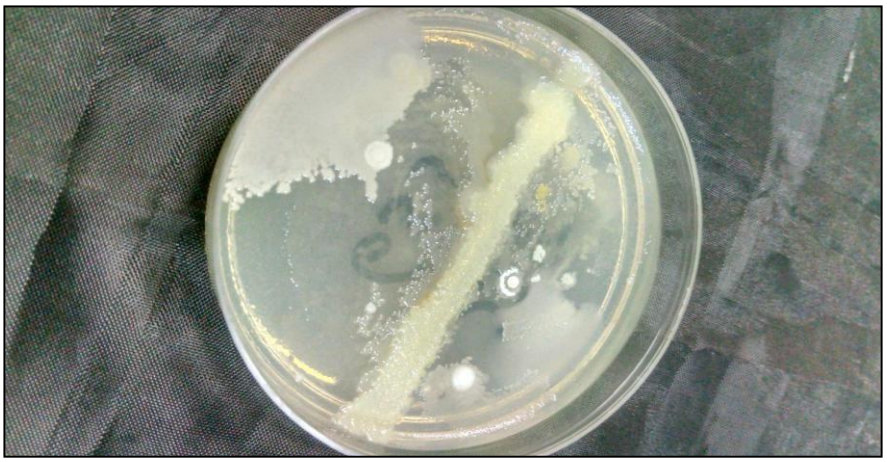


Figure 29 : avant l'hydrolyse de gélatine. **(Prise personnel).**

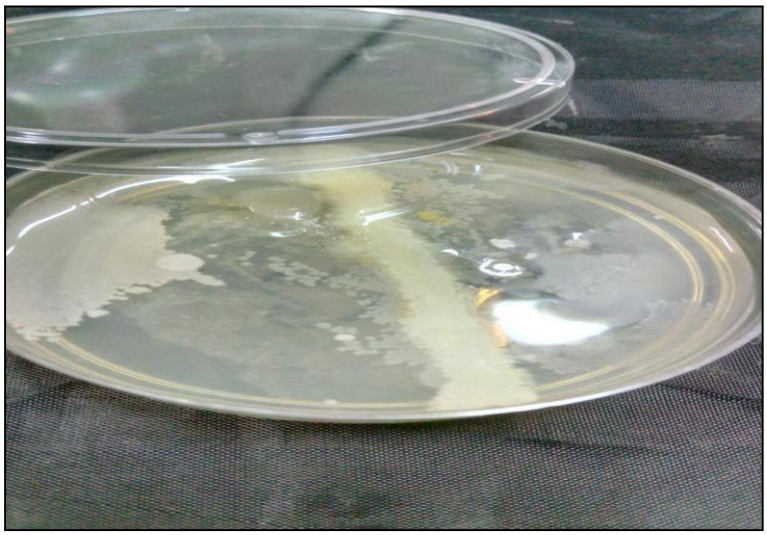


Figure 30 : L'hydrolyse de gélatine. **(Prise personnel).**

4-3Dégradation de la tyrosine

Toutes les souches ont donné un bon effet ça veut dire que le rendement est positif, avec quelques souches fluorescentes. Les souches sont bien claire qui signifier qu'on a une dégradation de la tyrosine. **(Figure 16**).Hydrolyse de la tyrosine selon **(Goodfellow 1971, Gordon et al., 1974),** se traduit par une auréole claire autour des colonies.



Figure 31 : dégradation de la tyrosine. **(Prise personnel).**

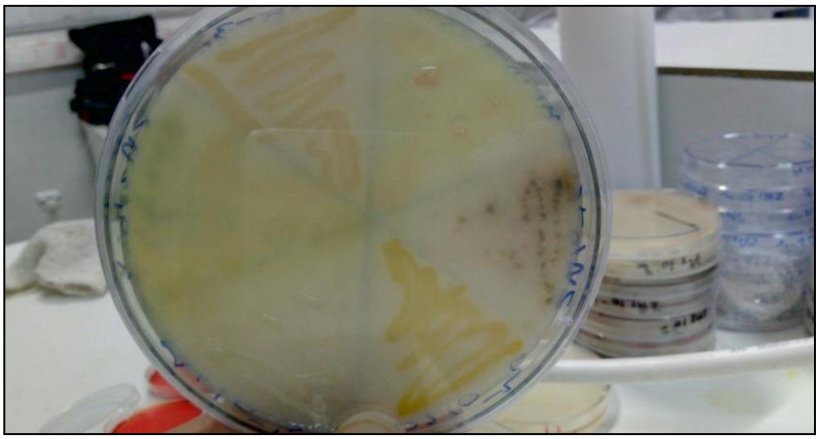


Figure 32 : les souches fluorescentes**.(Prise personnelle).**

4-4Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone

Les acides aminés utilisés comme source de carbone sont les suivants : L-arginine, glycine. On a préparés des solution aqueuses de 0,1g de chaque acide aminé dans 10ml d'eau distillé bien agiter par le vortex puis stériliser. Après stérilisation on a mélangés les solutions avec le milieu préparé chaque un appart, puits ensemencement sur des boites de pétris et incubation à 28°C pendant 5 jours. Les résultats sont positifs marquons dans **le Tableau 13**, qui veut dire que sont positifs. Résultat positive veut dire que la croissance des souches grâce à l'utilisation de ces acides comme source de Carbone, Les mêmes résultats ont été obtenus par ***(Gordon et al., 1974)***

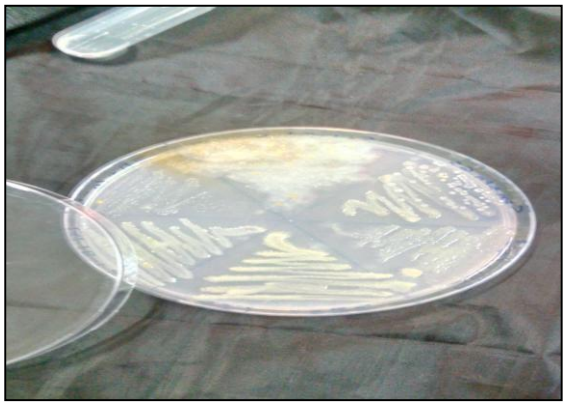


Figure 33 : L-arginine 50%.

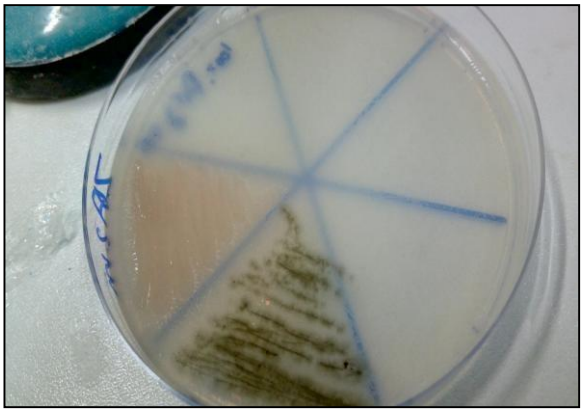


Figure 34 : arginine 100%.

4-5Utilisation des composés glucidiques comme source de carbon

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu ISP9 préconisé par ***(Pridham et Gottlieb, 1948).***En raison du manque de composants de ce milieu, nous avons utilisé un autre milieu TSI qui est préparé dans des tubes inclinés.

Après ensemencement sur des tubes inclinés et l'incubation pendant 5 jours à 28°C, la croissance est induite sur les tubes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celles obtenues sur TSI sans source de carbone (témoin négatif) et sur TSI contenant le glucose (témoin positif).Si le résultat est positif, cela se traduit par une croissance de ses bactéries testées, donc il y a utilisation du glucide comme source de carbone, Alors que l'absence de la croissance bactérienne indique un résultat négatif, donc la souche n'a pas la capacité d'utiliser le glucide comme source de carbone.

On a des tubes contenant un virage de couleurs différentes par rapport les sources de carbone :

- Des tubes sont colorés en jaune.
- Des tubes sont colorés en orange et rouge.
- Des tubes contenant une tache noire.
- Le milieu est monté dans le tube vers le hot.

Lorsque l'un des glucides est fermenté, le pH est diminué danc la couleur de milieu sera orange rougeâtre (dégradation du glucose). Le milieu jaune c'est la couleur original. Un milieu monté vers le hot grâce à la production du Gaz.

Les même résultats sont obtenu par ***Morakchi (2011)*** montrent que la plupart des souches des actinomycètes de genre Streptomyces utilisent des glucides comme source de carbone mais qui diffère selon les besoins nutritionnelle de chaque souche.

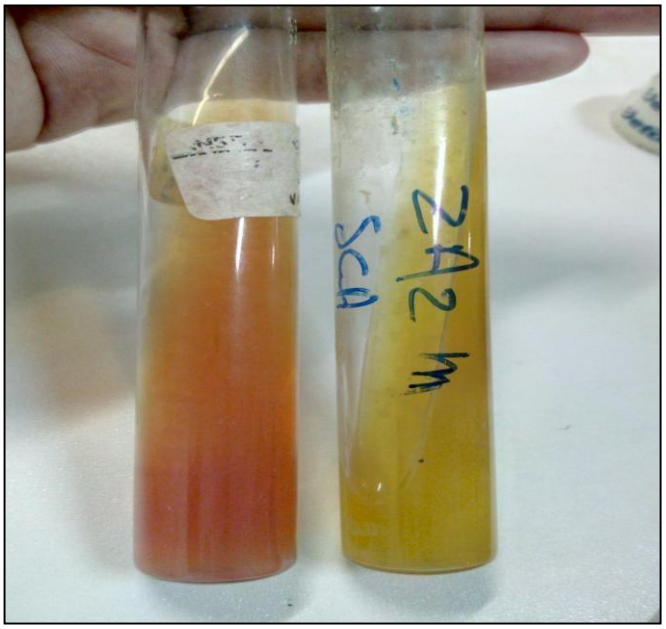


Figure 35 : Contrôle positif et Contrôle négatif.

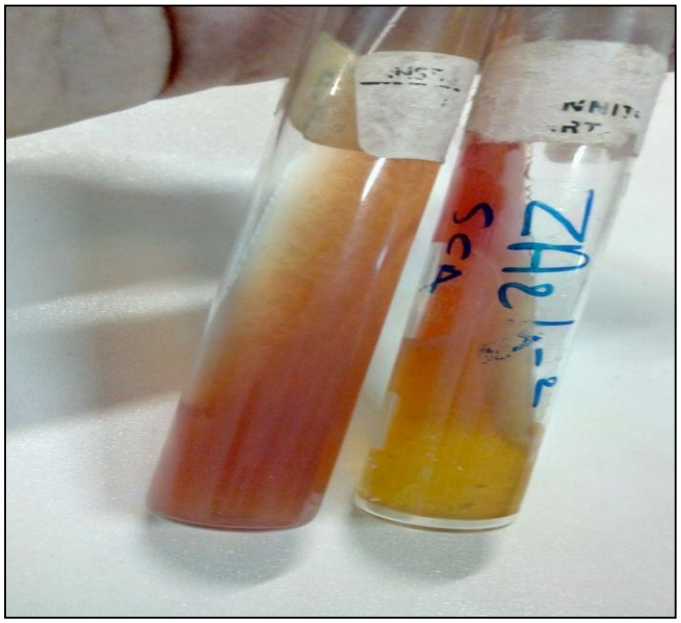


Figure 36 : dégradation de l'un des sucres.



Figure 37 : production du Gaz.

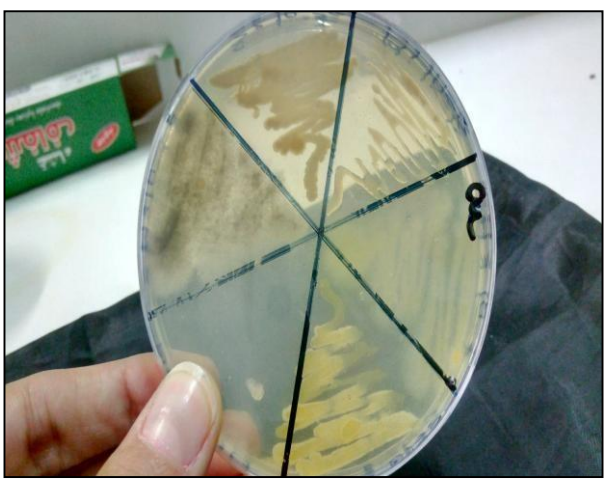
4-6Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds

Selon les résultats obtenus, le cas du Cuivre et Zinc. La majorité des souches tentées présentent une sensibilité en présence de ces deux métaux qui veut dire que le résultat est positif.

Il est nettement remarqué que le résultat des deux isolats (ZA1_10-1 ; M1_10-1) sont négatifs c'est-à-dire résistés.

(ZA1_10-1 ; M1_10-1) ont une résistance en présence du Cuivre et Zinc comme ions métallique. Par ailleurs, le développement du Mycélium du substrat a été observé chez les autres isolats en présence de Cuivre et Zinc.

De plus, la totalité des souches présentent un bon rendement sur le milieu de culture préparé à Base de mélange de métaux lourds (zinc, cuivre).ces résultats sont en d'accords avec les travaux antérieurs réalisé sur les actinomycètes. Selon université de **Bejaia., 2017.**



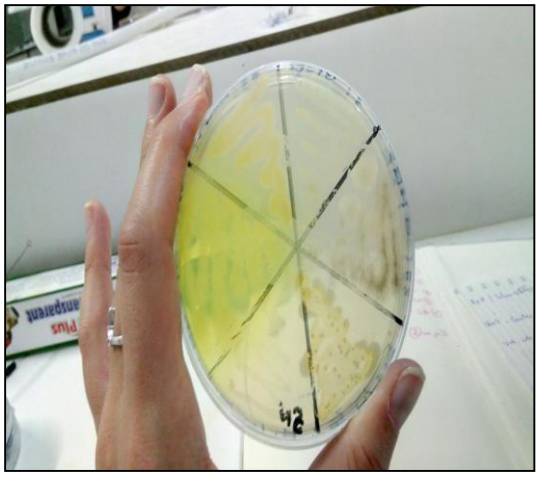


Figure 38 : Sensibilités en Métaux lourds (Cu ; Zn).

5- Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries

5-1Méthode des cylindres d'agar

L'activité antimicrobienne des 20 souches étudiées a été mise en évidence par la technique de cylindres d'agar qui est une méthode de diffusion sur milieu MH. La mesure des diamètres des zones d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C.

D'après les résultats obtenus, il est constaté que parmi les 20 souches étudiées il existe quelques souches d'actinomycètes représentent l'activité antimicrobiennes relativement variables aussi bien vis-à-vis de la levure Candida albicans que des bactéries à Gram positif (s.aurus,bacillus) et à Gram négatif(E. coli, pseudo aeroginosa). Ces résultats s'expliquent que les actinomycètes peuvent produire plusieurs types des molécules antibactériennes tout dépend la composition et la concentration des composants du milieu de culture. ***(Boughachiche et al., 2005).*** Ces résultats sont en accord avec de ***Kokare et al., (2004) et Sirisha et al.,(2013)*** qui ont rapporté une activité à l'accord eux de S.aureus.

Et les résultats de Ouazenet ., al ont montré que :des isolats d'actinomycètes ont une activité antimicrobienne sur au moins une bactéries -test avec des zone d'inhibition variable entre 6.5et 38mm de diamètre ,sur le milieu de culture MH. quelque isolat ne montre aucune zone d'inhibition vis-à-vis les bactéries cible.

Tableau 14 : Activité antagoniste des 20 isolats à l'égard de 5 germes cibles.

B. pathogène / Souche	Staphe Aurus	Bacillus	E. coli	Pseudo aeroginosa	Condida Albicane
ZA2m	R	R	S (8mm)	R	R
ZA2m	R	R	R	R	R
SM3 m	R	S (12mm)	S (14mm)	S (10mm)	R
S2 10-2	S(14mm)	S (10mm)	S (14mm)	S (10mm)	R
S2 10-2	R	R	R	S (11mm)	R
M1 10-1	R	R	S(12mm)	R	R
S210-3	R	R	R	R	R
ZA2 10-1	R	R	R	R	R
ZA1 10-3	S(10mm)	S	S(26mm)	R	R
S2 10-1 N	R	R	R	S(20mm)	R
ZA1 10-1	R	R	S(27mm)	R	R
ZA2 10-3	R	S(13mm)	R	S(12mm)	R
ZA2 10-2	R	R	R	S(10mm)	R
M1 10-1	R	R	R	R	R
S2 10-1	S(14mm)	S(10mm)	S(20mm)	S(13mm)	R
S2 10-1	R	R	S(20mm)	R	R
ZA3 10-2	S(10mm)	R	R	S(17mm)	R
ZA3 10-2	R	R	R	R	R
SM3 10-2 N	R	S(10mm)	R	R	R

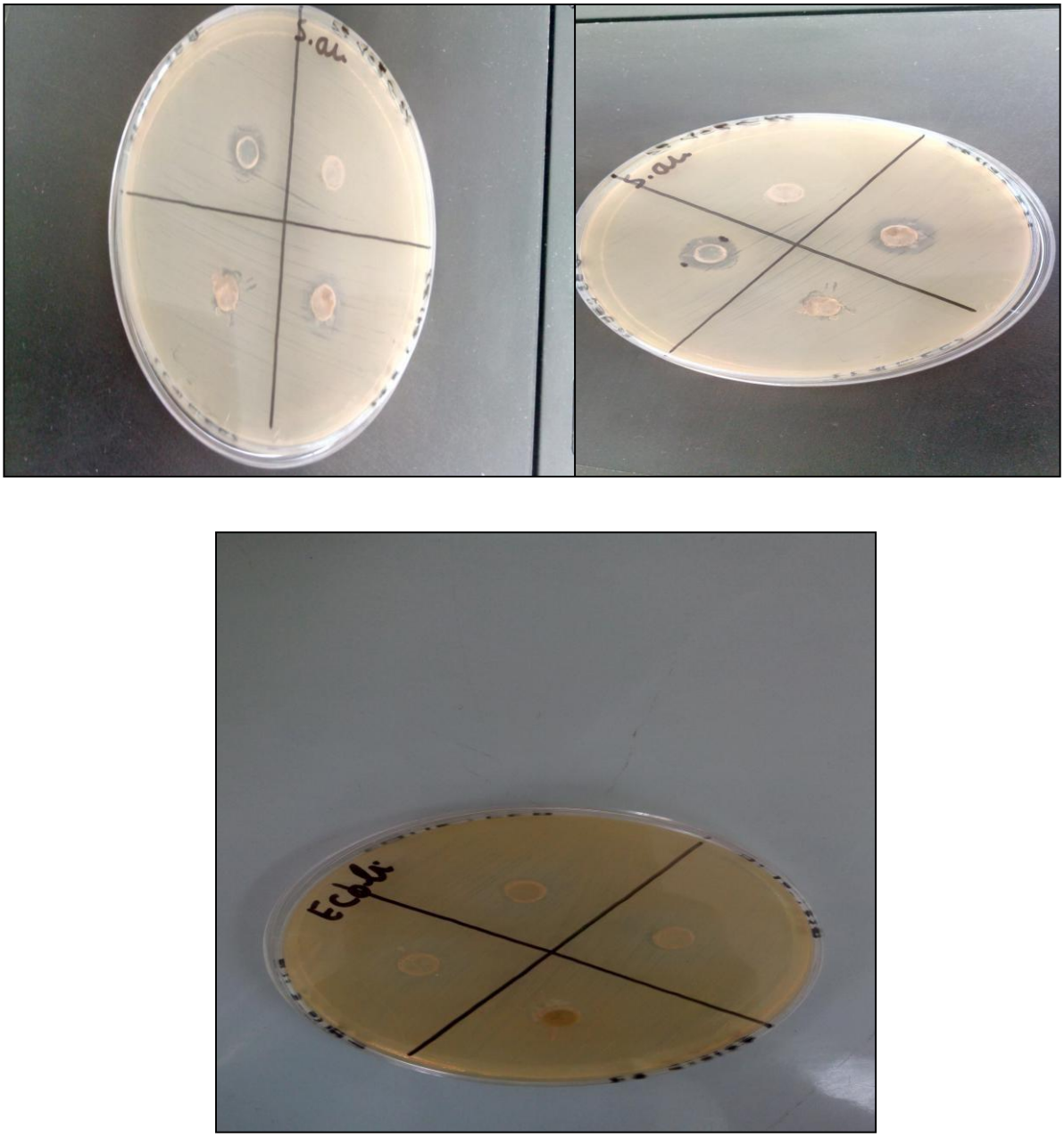


Figure 39 : Test antagoniste par la méthode de cylindre d'agar.

5-2Méthode des puits

Une deuxième méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits des cultures d'*actinobactéries* sur milieux ISP2 liquide. La mesure des diamètres des zones d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation

à 37°C. Cette Méthode a le mémé principe que la méthode de cylindre d'agar (activité antagoniste), et elle a un bon résultat que l'autre méthode. D'autres études ont présentés des résultats comparables. En effet, ***Nedialkova et Naidenova (2005) et Singh et al. (2006)*** ont

observé une réduction voir une absence d'activité en milieu liquide en comparaison avec celle observée par la méthode des cylindres d'agar (en milieu solide).

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 38.

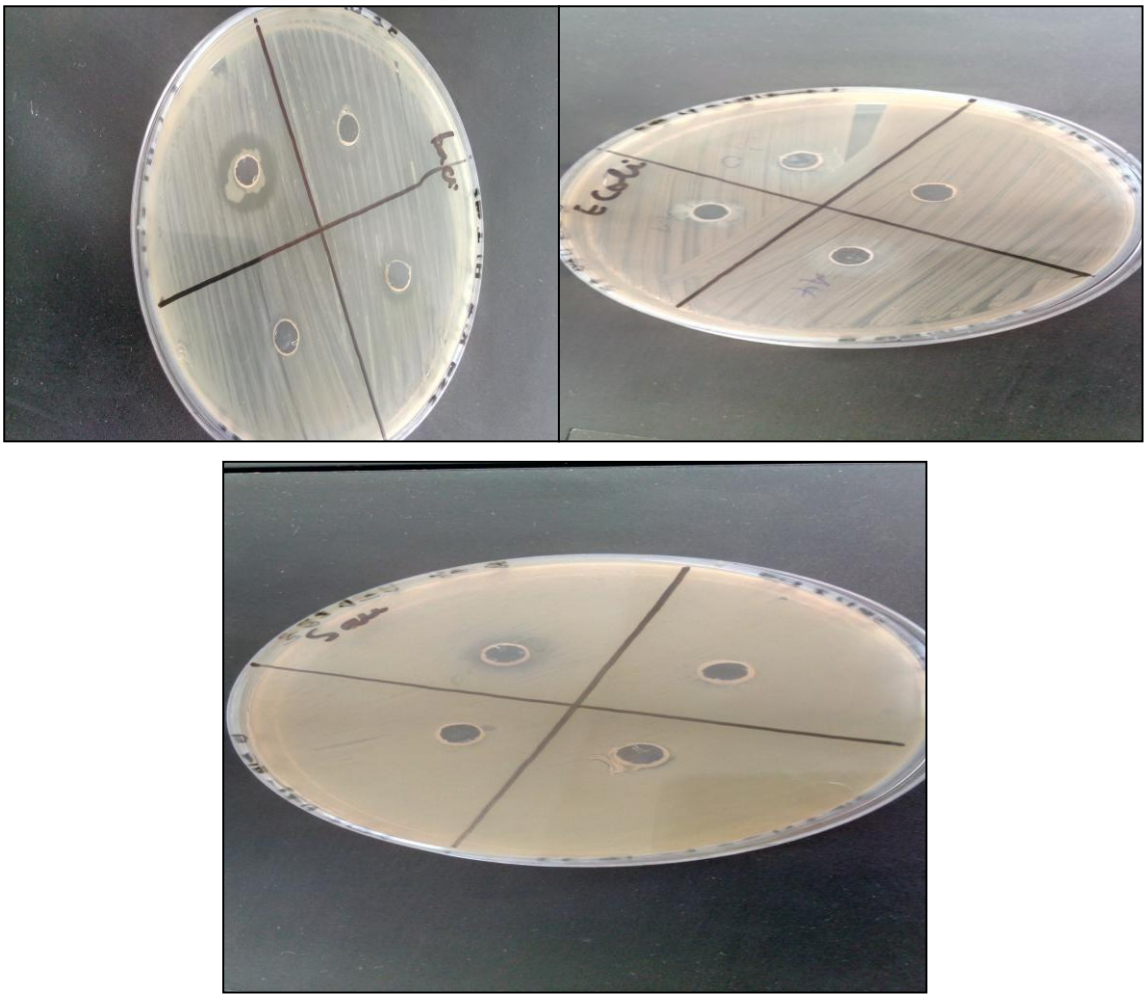


Figure 40 : activité antagoniste par méthode des puits**. (prise personnelle).**

6-Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts obtenus

Le principe de cette méthode est étudier la capacité des 8 extraits bruts à inhiber la croissance des germes cibles.

- Extrait 1 : S2 10-1
- Extrait 2 : S2 10-1 non traité
- Extrait 3 : S2 10-2
- Extrait 4 : ZA3_10-1

Les résultats de l'activité antibactérienne des filtrats (phase organique), et précipité (la phase aqueuse) sont résumés dans **le tableau.** L'activité des extraits étudiésa été évaluée par la présence ou l'absence d'inhibition de la croissance bactérienne.

Tableau14 : illustre les résultats des extraits sur les germes cibles.

Extrait / Souche	1*	1	2*	2	3*	3	4*	4
Pseudo (A)	S 10mm	R	R	S 17mm	R	S 10mm	S 20mm	S 10mm
Bacillus (B)	R	S 19mm	R	S 12mm	R	R	S 10mm	R
E. coli (C)	S 25mm	R	S 15mm	S 13mm	S 20mm	R	S 18mm	R
S.auriu (D)	R	R	R	S 15mm	R	S 10mm	S 14mm	S 10mm
Candida (E)	R	R	R	S 13mm	R	R	S 10mm	R

* : phase organique

Sans * : phase aqueuse

R : résistante

S : sensible

Les résultats révèlent que l'extrait 4* de l'actinomycète ont un effet antibactérien considérable sur toutes les germes photogènes.

Concernant l'extrait 1* possède un effet moyen sur les germes Pseudo et E. coli, par rapport l'extrait 2* et 3* qui ont un rendement faible à cause de son impact sur E. coli seulement.

Les précipités (phase aqueuse) ont un effet sois naturellement antimicrobien sur les germes cibles, soi pendant filtration y'a des substrats (phase organique) ou l'évaporation y'a le soulevant (butanol).

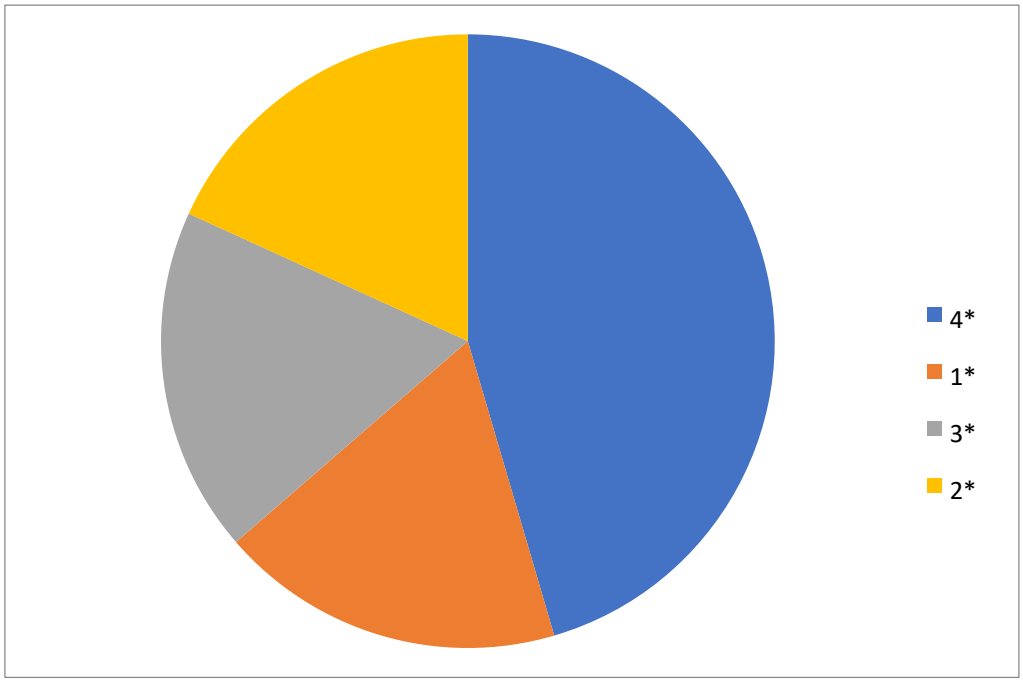


Figure 41 : Histogramme représente le rendement de nos extraits obtenus.

Parmi les techniques qu'on a fait de l'activité antimicrobienne, la technique d'extraction bactérienne est la plus importante que les autre techniques (cylindre d'agar ; méthode des puits). Les actinomycètes ont les capacités de produire des molécules bioactives nécessaire pour son activité antimicrobienne : l'extrait brut.

D'après ***Orhan et al., (2012),*** l'activité antibactérienne peut être exprimé par des huiles brutes des isolats d'actinomycètes

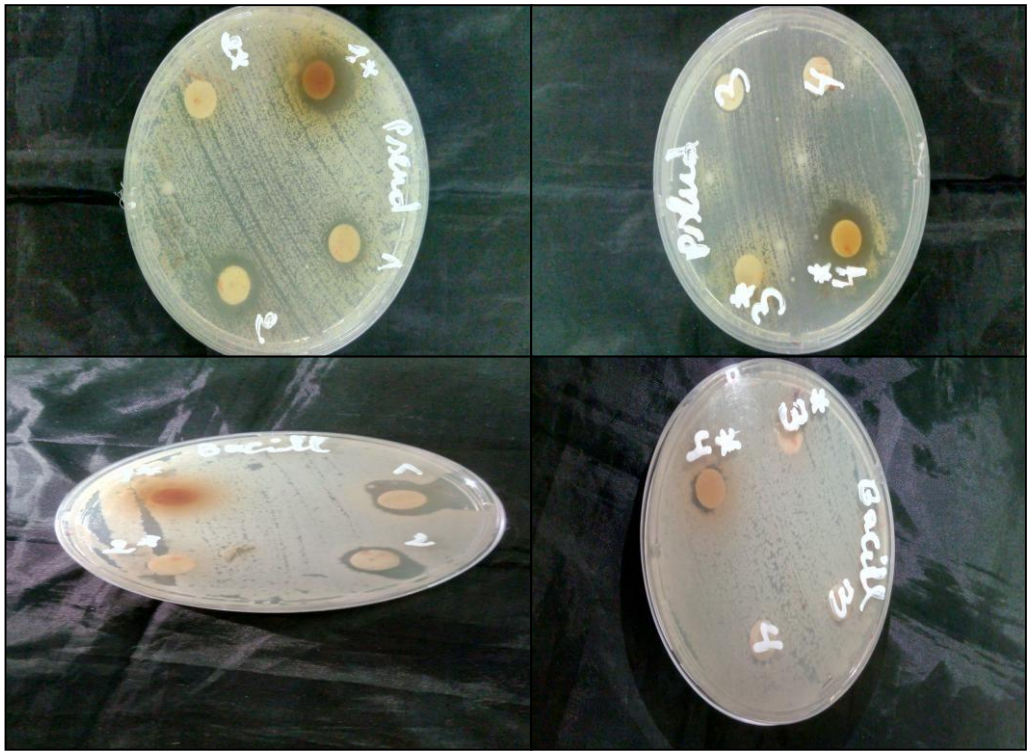


Figure 42 : l'effet de l'extrait brut sur les différentes souches Pathogènes **(Prise personnelle).**

Conclusion et perspectives

Les **actinomycètes** constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol, Le mot Actinomycètes provient de deux substantifs grecs et signifie (champignon rayonnants), ou (champignon à rayons).

Dans cette présente étude, nous nous sommes proposé d'étudier les aspects Morphologiques, physiologiques et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes d'origine marine qui ont été isolait à partir des sédiments marins de l'une des cotes algérienne plus précisément de Mostaganem.

Pour atteindre cet objectif, le travail a été divisé comme suit Des observations morphologiques, suivie des tests physiologiques, et biochimiques des différents isolats d'actinomycètes. Les colonies obtenus sont de tailles petite, moyenne et grande, avec des formes variables (lisse, bombé, aplatie), possède un mycélium végétatif (mycélium aérien) se colore en (jaune, marron, blanc etc..). L'examen microscopique révèle que les bactéries sont de Gram positif.

L'étude physiologique et biochimiqueafinde déterminer leur capacité à se développer en Présence de différentes sources de carbone, de métaux lourds, Ainsi qu'en présence de différentes concentrations en Na Cl, de pH et de croissance à différentes température.
L'activité antagoniste. Ainsi que la production et l'extraction des molécules bioactives a permis l'obtention des extraits méthanolïques nécessaire à l'évaluation de l'activité antagoniste par la méthode des puits, cylindre agar et diffusion par disquesà l'égard de 5 souches microbiennes à savoir *Staphylococcus aureus* avec ATCC6538,*Bacillus Subtilis avec* ATCC6633,*E. coli avec* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosaavec* ATCC9027, *et Candida albicans de* ATCC10231. *L*es résultats montrent que tous les extraits bruts testés possèdent une Activité antimicrobienne vis-à-vis des germes cibles testés.
Toutefois, cette étude est le point de départ pour approfondir et caractériser les propriétés des actinobactéries ayant des capacités antimicrobiennes ; de plus, ces informations pourrait être utilisés dans l'élaboration d'un programme de recherche afin d'identifier et de sélectionner des isolats performants des fins thérapeutiques.
Au final, plusieurs perspectives peuvent être proposées :

- Sélection des bactéries productrices de peptides antimicrobiens. Ces peptides seront isolés et caractérisés structuralement.

- Pour une meilleure optimisation des mécanismes d'interaction : actinobactéries-bactéries indicatrices, on peut envisager :

- D'étudier la distribution de ces espèces dans différents écosystèmes.
- Réaliser de nouveaux tests in *vitro* et in *vivo* avec une quantité élevée d'extrait.

Références

- **Agath A.D., Bath J.V., (1963).** A method for the preferentioal isolation of actinomycètes from soils. *Antonie Van leeuvenhoek.*, 29 : 297-304. Cavalla M, Eberlin T. Isolement des Streptomycetes do sol. L'opéron. (1994) 13-17.
- **Abderrahmane R, (2000).** « Du bon usage des antibiotiques », Développement et Santé, n°150.
- **Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985).**Numerical classification
- of Actinomadura and Nocardiopsis. Int. J. Syst. Bacteriol 35: 86-98.
- **Al-Zarban S.S., Al- Musallam A.A., Abbes I., Stackebrandt E. and Kroppenstedt R.M (2002).** Saccharomonospora halophila spnov., a novel halophilic actinomycete isolated from march soil in Kuwait.int. J. sys. Evmicrobiol., 52.555-558.
- **Allioch-kerboua c, GacemiKirane D, La Scola B. (2014).**Activité antimicrobienne d'une actinomycetale isolée d'une lagune en algérie. Ann Biol Clin (73) : 176-80 doi :10.1648/abc.2015.1030.
- **Andriambololna T. (2010).** Etude biologique et chimique des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. Thèse de doctorat. UNIVERSITED'ANTANANARIVO, Pp.5-10.
- **AnnandanR.**, DharumaduraiD ., MnogaranG.P (2016). Ai introduction to actinobacteria. In :Dhanasekaran D ., Jiang Y .(eds) actinobacteria :Basics and biothencnologicalapplication.Intech,Rijeka ,pp.3-37
- **Baldacci, E. (1962).**Tendances actuelle de la classification des actinomycètes .Ann. Soc.BelgeMed. Trop.4 :633-646
- **Bérdy J**. Bioactive microbial metabolites. Antibot. (2005); 58(1): 1–26
- **Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N.,**
- **(2007).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of Streptosporangium Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiol. Res., 161, 288-298.
- **Bouras, N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez Saccharothrixalgeriensis NRRL B-24137. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- **Bergey's manual of systematic Bactriology (2012).** Whitman WB, GOODFELLEW M, KampferP ,Busse HJ ,Trijillo ME , Ludwig W ,SuzukiKI,Parte A (Eds).Vol 5:The actinobacteria. 2 éme edition ,Springer ,New York .1750 p.

- **Benson D. R.; Silvester W. B., (1993).** Biology of Frankia strain, actinomycetes symbiont of actinorrhizal plants. Microbiological Review., (57):293-319.
- **Blunt. J.W, Copp. B.R, Keyzers. R.A, Munroa. M.H.G, Prinsep. M.R .**Marinenatural
- products. Nat. Prod. Rep. (2016); 33: 382–431
- **Boughachiche. F; Reghioua. S; Oulmi. L ;Zerizer. H ;Kitouni. M.; Boudemagh. A ; Boulahrouf. A. (2005).** Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Ain Mlila. Sci & Tech C. 23, 5-10.
- **Bradbury J. F., (1986).** Guide to plant pathogenic bacteria. London, CAB International Mycological Institute Publisher.
- .**Bull and Stach, 2007.**Marin actinobacteria:presctiptive ,challenges, future direction. Antonies Van Leeuwenhoek,87 (1),65-79.
- **Botton B., Breton A., Fever M., Guy Ph., Larpent. Et Veau P., (1990).** Miosissures utiles et nuisibles (importance industrielle). Masson, France. Pp48-98.
- **Boudjelal-Bencheikh F. (2012).** Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus sp*. AH97. Thése de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P : 5-35.
- **Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyenique mircen J. 2 : 453-466.
- **Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005).** Isolement d'actinomycètales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkha de Ain Mlila. Sciences & Technologie C, 23 : 5-10.
- **Boubetra. D, Sabou. N, Zitouni. A, bijani .C, lebrihi. A et matieu. F**. Taxonomy and chemicacharacterization of new antibiotics produced by saccharothrix SA 198 isolated from a saharansoil. Micrological. Research. (2013); 186: 223-230.
- **Cavala M., Eberlint T., 1994.** Isolement des Streptomycètes du sol. L'opéron. 4 :13-7.
- **Cloutier MJ, (1995).** Antibiotics mechanismes of action and of the acquisition of résistance, Am J Pharm Educ, 59.

- **Colombié. V. (2005).** Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteurlogiciel. Thése de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Pp174.
- **Crawford D.L.,Lynch J.M., Ouseley M.,A (1993).**isolation and charterization of actinomycete antagonists of a fungal pathogen.appleid andenvironmental Microbiology.,59:3899-3905.
- **Dommergues Y. ; Mangenot F., (1970).** Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie.

France.

- . **Doumbou C. L.;Akimov V.; Beaulieu C., (1998).**Selection and characterization of
- microorganisms utilizing Thaxtomin A, a phytotoxin produced by Streptomyces
- scabies. Applied Environement Microbiological., (64): 4313-4316.
- **Dasari. V.R.R.K, Muthyala. M.K.K, Nikku. M.Y, Donthireddy. S.R.R.** NovelPyridinium com-pound from marine actinomycete, Amycolatopsis alba var. nov, DVR D4showing antimicrobial and cytotoxic activities in vitro. Microbiol Res. (2012); 167: 346–51
- **Dekkers. J, Van Doornen. L, Kemper. H.** The role of antioxidant vitamins andenzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. Sports Med (Auckland,NZ). (1996); 21(3): 213–38.
- **Delaunay S., Rondage E. et Germain P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. Technique de l'ingénieur. Opération sanitaires, génie de la réactionchimique. J 6 008 1-12.
- **Donadio, S., Sosio, M., Lancini , G. (2002).** Impact of the first Streptomyces genome sequensce on the discovery and production pf bioactive substance. Appl Microbiol Biotechnol, 60(4) : 377-80.
- **Demain AL, Sanchez S. (2000).** Microbial drug discovery : 80 years pf progress. *J Antibiot (Tokyo).* 62(1) :5-16.
- **Delarras C., (2014).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec et doc Lavoisir. 492p Edition de la tourelle, St. Mandé. Pp. 110-111.
- **Davies DG., Marques CNH(2009).** A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bactriole* .19, 1393–1403.

- **Daboor S.M., Amany M.H., Neven Abd Elfatah E., and Hanouna S.I. Heavy metal**

  Adsorption of *Streptomyces chromofuscus*. J. C. L. Med, (2014); 2(6),p. 431-437.

- **El-Nakeeb M.A. and Lechvalier H.A., (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycètes. Appl. Microbiol. 11. 75-77.
- **Ensign J. C.; Normand p.; Burden J. P.; Yallop C. A.** Physiology of some actinomycetes genera. Rev. Microbiol, (1993); 144, p. 657-660**.**
- **Eunice J A ., Prosser J.I (1983).**Mecylialgrowth and brunching of streptomycecoelicolor A3 2 on solide medium. Journal of genetic microbiology ,129,2029-2036.
- **Gebreselema Gebreyohannes, and A. N, and C.Bii, D. B. S., (2003).** Challenges of intervention, treatment, and antibiotics resistance of biofilm-forming microorganisms.
- **Gordon. R.E., Barnett. D.A., Handarhan. J.E and Hor-Nay-Pang. C. (1974).** Nocardia *coeliaca, Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 24 : 54-63.
- **Gottlieb, D., (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. In:

  Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press, London, New York.
- **Ghanem. B.N, Soraya. A.S, Zeinab. M.E, Gehan.A.A.E.** Isolation and enumeration of marineActinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. Appllied Microbiology. (2000); 46:105-11
- **Goodfellow. M and Williams .**S-T. Ecology of Actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol.(1983);37: 189-216.
- **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., (1994).**
- **Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins,Baltimore.**
- **Henis,Y.I.,Gutman,O., and Loyter,A.(1986)** Exp.cell Res .160,514-526.
- **Hillare-Buys, (2005).** Pharmacologie générale, bases de thérapeutique générale. Antibactériens (antibiotiques)
- **. Isabelle Harvey., Mai., (1999).**Médecine Expérimentale. Sélection de tests
- discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués
- dans l'alvéolite allergique extrinsèque, Mémoire, université laval canada, p 112

- **Ishizawa S.; Araragi M., (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. In:Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo,97-107.
- **Jensen P.,R Dwight R .and Fenical W (199).**Distribution of actinomycete in neare-shore tropical marin sediment .appl Enviro.Microbiol.,p 1102-1108.
- **Khattabi A, Hilali L, Dari K, Assobhei O, Gavini F. (2002).**Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de Yersinia ruckerietYersiniapseudotuberculosis. Rev. Biol. Biotech.;2:28–32.
- **Kitouni. M, Boudemagh .A, Oulmi. L, Reghioua .S, Boughachiche. F, Zerizer. H,Hamdiken. H, Couble. A, Mouniee .D, Boulahrouf.** A and Boiron .P. Isolation ofactinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the notheast of Algeria. Journal de MycologieMédicale. (2005); 15: 45–51.
- **Kaczmarski. M, Wójcicki. J, Samochowiec. L, Dutkiewicz. T, Sych. Z.** The influenceof exogenous antioxidants and physical exercise on some parameters associated withproduction and removal of free radicals. Pharmazie (1999); 54: 303-6.
- **Lamari.N.L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par unenouvelle espèce d'actinomycète, Saccharothrixalgeriensis. Thèse de doctorat en biologie, optionmicrobiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p.156.
- **Lechevalier A.H.,** 1981-Introduction to the order Actinomycetales, (volume 2).Springer-Verlag Edition Berlin: 1915-1922
- **Larpent J.P., Sanglier J.J., (1989).**Bbiotechnologie des antibiotiques. Masson ParisMilan Barcelone Mexico.p .1 :21 :104 :106
- **Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. Soc. Appl. Bacteriol.Symp. Ser., 2, 231-51.
- **Leveau. J. V. et M Bouix., (1993).** Microbiologie Industruelle. Paris. P : 424-439.
- **Lemriss. S. Laurent. F. Couble. A. Casoli .E. Lancelin . J.M. Saintpierre-Bonaccio. D. Rifali. S. Fassouane. a. Bioron.p. (2003).** Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinicalisolates of actinomycetes. Candian journal Microbiology. 49(11). 669-74.
- **MC-Manus, E.J., Alessi, D.R. (2002).** TSCT-TSC2 : a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. Nat. Cell Biol. 4(9) : E216. FlyBase ID. FBrf061485.

- **Marchal. N, Bourdon. J. L, Richard. C. L., (1991).** Les milieux de culltures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Dion editor, Paris. P : 67-122. Actinomyctes from the Soils of Menengai Crater in Kenya. Arch of Clinical Micr 8(3) : 45. Actinomyctes in the Chesapeake Bay. Apl. Enviro. Microbiol., 997-1002.
- **Matan N and Matan N., (2008).** Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on ribberwood (Hevea brasiliensis). International Biodeterioration & Biodegradation, 62 : 75-78. Mentouri de constantine. Algérie. Moléculaire et spectre d'activité. Thése de doctorat, Univérsité Baji Mokhtar, Annaba, 16p. molécules bioactives au niveau du lac Oubeira : Etude morphologique, physiologique,
- **Manivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim. S.K.** Pharmaceutically activesecondary metabolites of marine actinobacteria. Microbiol .Res . (2014); 169: 262-278.
- **Maria F .,Sebald M.1990. actinomycétales ..In:leMinor.** L., Véron M.Bactériologie.médicale.Medecine-Sciences.Flammation.France.Deuxième partie :933-999.
- **McKinney R. E., (2004).** Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press :New York. Pp: 448
- **Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66 : 1022-1037.
- **Nouasri A., (1996).** Les genres Microellobosporia, Saccharomonospora, nouvellement isolés et identifiés. Thése de doctorat, Univérsité de Toulouse, Yunisie, 103 p,
- **Okami Y ,Hotta K .,(1988).**search and discovery of new antibiotics,In:GoodfellowM,Williams ST , Mordarski M (Ed).Actinomycete in Biotechnology.academic press ,Inc .,san Diego ,33-67.
- **Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004).** Antibacterial activity of someactinomycetes isolated from farming soils of Turkey. Afr J Biotechnol., 3(9), 441–446.
- **Okami Y, Hotta K., (1988).** Search and discovery of new antibiotics, In : Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (Ed). Actinomycètes in Biotechnology. Academic Press, Inc., San Diego, 33-67.

- **O'Toole Jr. Laurence J., (1999).** Modeling the Impact of Pulic Management : Implications of Structural Context. University of Georgia. Kenneth J. Meider. Texas A&M University.
- **Pochon J., Tardieux P., (1962).** Techniques d'analyses en , ! 1 /icrobio-logie des sols, 105., Editions de la Tourelle, St-Mandé.
- **Pridham, T. G., Gottlieb D. (1948).** The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J Bacteriol, 56(1) : 107-114.
- **Patel J. J. , Brown M. E., (1969).** Iteractions of Azotobacter with rhisospher and root-surface microfora. Plant and soil. 31, 273-281.
- **Poosarla Aparanji, Venkata Ramana L. and R. Murali Krishna. (2013).** Isolation of pten antibiolic producing Actinomycètes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Island.
- **Perry.J.J.,StaleyJ.T.,Lory S .,(2004).**Microbiologie.Dunod,Paris.p:497-498.
- **Patil.R.C, Mule. A.D, Mali. G.V, Tamboli.R.R, Khobragade. R.M, Gaikwad. S.K, Katchi.V.I and Patil. D.** Isolation of Marine Actinomycetes from the Mangrov. (2011).
- **Prescott L. M.; Harley J. P.; Klein D. A., (1995). Microbiologie**. De Boek&Larcier,
- Bruxelle: P 806, 807 ,813, 819, 805–825.
- **Rudi, E., N. Fadli. (2012).** Community of herbivoryreef fishes in northern Acehnese reef. Depik, 1(1) : 37-44.
- **Rangaswami G.; Bagyaraj D. J.; Bagyaraj D. G., (2004).** Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi. Pp: 440.
- **Smaoui Slim., (2010)**, Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, thèse de doctorat, Université de Toulouse : 1-187, France.
- **Salomon C. E.; Magarvey N. A.; Sherman D. H., (2004).** Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an ever brighter future for marine natural product drug discovery. National Production Rep., (21):105-121.
- **Sanglier. J.J, Haag.H, Huck.T.A and Fehr .T.** Review of actinomycetes compounds 1990-1995. Expert. Opin. Invest. Drugs. (1996); 5: 207-223.
- **Sabaou N. (1988).** Contribution à l'étude des sols des palmerais algérienne .Systématiqueetécologie. Thèse de Doctorat Es Science Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Algerpp. 65-68

- **Sanglier. J.J, Trujillo. M**. Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie desélection des souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol. (1997) ; p: 12-13.
- **Singh. S, Baruah. I and Bora. T. C**. Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening forAntimicrobial Activities. *Biotechnology*. (2006); 5: 217-221.
- **Sudo.K, Konno. K, Yokota.T and Shigeta.S.** A. Screening system for antiviral compoundsagaints Herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L 929 cells.Tohuku. J. ExpMed. (1995); 176(3): 163-071.
- **Stackebrandt .E, Rainey .F.A,Ward-Rainey.N.L.** Proposal for a new hierarchic classificationsystem, Actinobacteria classis nov. *Int. Journal.Syst. Bacteriol.Apr*. (199747(2): 479-491.
- **Shirling, E. B., Gouttlied, D. (1966).** Méthods for characterization of Streptomyces species. Int J Syst Bacteriol, 16(3) : 313_340.
- **Takizawa M., Colwell R.R. and Hill R.T. (1993).** Isolation and Diversity of Thermoactionmyces et Thérmomonospora (Actinomycètales) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des rincipaux antibiotiques. Thése de Magister. Pp 130.
- **Takahashi .Y and Omura .S**. Isolation of new actinomycetes strains for the screening of newbioactive compounds. *J .Gen .Appl. Microbiol*. (2003); 49(3): 141-054.
- **Verma V. C.; Gond S. K.; Kumar A.; Mishra A.; Kharwar R. N.; Gange A. C., 2009.** Endophylitic Actinomycetes from *Azadirachtaindica*A. *Juss*.: Isolation, Diversity, and Anti-Microbiol activity. MicrobiolEcology., (**57)**: 749-756.
- **Wayne .L.G, Brenner .D.J, Colwell .R.R, Grimont .P.A.D,Kandler. O, Krichevsky. M.I,Moore. L.H, Moore .W.E.C,MurryR.G.E,Stackebrandt .E,Starr M.P et Trüper.H.G.**.Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.*International .Journal .Systematic and evolutionary microbiology*. (1987); 37: 463-464.
- **Weyland. H.** Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature* .(1969);223:858.
- **William B. R., Whitman., T Kieg., T James., R Daniel., P Brian Hedlund., J. Paster., (2010).** Bergey's Manual Of Sytematic Bacteriology. Springer New York Dordercht Heidelberg, London. Pp 25-49.

- **William S. T., CrossT. (1971).** Actinomycète. In : Method in Microbiology. Bouth C. Ed., Academic, press, london, 4, 295-334.
- **Zvyagintsev D. G.; Zenova G. M.; Sudnizin I. I.; Doroshenko E. A., (2005).** The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	**verreries**	**Autre matériel**
-autoclave -Bain marie -Etuve -Balance -Réfrigérateur -Microscope optique -pH-mètre -Vortex -Spectrophotomètre	-Becher -Boite de pétrie -Erlenmeyer -Lame et lamelles -Flacons -tube à essais - Eprouvette -	-Micro pipette -Pince en platine -Anses de platine -Tube Eppendorf -Spatule -Bec bunsen -Portoir pour les tubes -Baro-Magnétique -Ecouvillons

Annexe 02 :

2-1 Milieux de culture d'identification

Starch Casein Agar (SCA)

Amidon… ..... 10 g
Caséine… ..... 0,3 g
KNO3… ..... 2 g
NaCl… ..... 2 g
K2HPO4… ..... 2 g
MgSO4, 7H2O..... 0,05 g
CaCO3…..... 0,02 g
FeSO4, 7H2O .....0,01 g
Agar..... 18 g
l'eau distillée 1000ml
pH…..... 7,4±0,2

Gausse

Amidon… ..... 20 g

KNO3… ..... 1 g

K2HPO4… ..... 0.5 g

MgSO4, ... 0,5 g

NaCl… .....0.5 g

FeSO4 .....0,01 g

agar 20g

l'eau distillée 1000ml

pH… ..... 7,4±0,2

Milieu ISP2

Glucose… .....4 g
Extrait de levure… ..... 4 g
Extrait de malt… ..... 10 g
Agar… ..... 20 g

l'eau distillée 1000ml

pH… ..... 7,2±0,2

2.2 milieux d'Etude biochimique

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

Amidon… .....10 g
Gélose nutritive .....2,8 g
Eau distillée .....100 mL
pH… 7,5

. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

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

. Dégradation de la tyrosine (Goodfellow, 1971 ; Gordon et al, 1974)

Tyrosine .....0,4 g
Gélose nutritive ..... 2,8 g

Eau distillée .....110 mL
pH… 7,5

.Dégradation des sucres

TSI (Triple Sugar Iron)

Extrait de levure… 3g

Extarit de viande…..... 3g

Peptone..... 20g

Chlorure de soduim 5g

Lactose… 10g

Saccharose…..... 10g

Glucose…..... 1g

Thisufate de soduim 0.3g

Citrate de fer (III) 0.3g

Rouge de phénol 24mg

Agar agar bactériologique…..... 9g

3. Sensibilité aux différents agents chimiques
Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A)
Extrait de levure… ..... 10 g
Glucose…..... 10 g
Agar…..... 18 g
pH…..... 6,8

4-milieux pour l'activité antimicrobienne

-Mueller-Hinton (Williams et Kuster, 1964)
Extrait de viande .....2 g
Hydrolysat acide de caséine…..... 17, 5 g
Amidon…..... 1, 5 g
Agar…..... 10 g
l'eau de distillée 100ml
pH…..... 7,3

-Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande… .....1 g
Extrait de levure… ..... 2 g
Peptone..... 5 g
NaCl… ..... 5 g
Agar… ..... 15 g

l'eau distillée 100ml
pH… ..... 7, 4±0.2

l'ajustement de PH des milieux de cultures s'effectué à l'aide d'une solution de NaOH ou HCL

NaOH :10g NaOH de dans 250ml d'eau distillée.

HCL :200ml d'HCL dans 16.4ml d'eau distillée.

-Eau physiologique

Nacl… 9g

Eau distillée 1000ml

Colorants

Violet Gentiane

Violet Gentiane 1g

Ethanol 10ml

Phénol 2g

Eau distillée 100ml

La solution de lugol

Iodure de potassium..... 2g

Iode métalloïde I2… 1g

Eau distillée 100ml

La solution de fuchine

Fuchine basique… 10g

Phénol 50g

Ethanol 100ml

Eau distillé… 1000ml

Solvants

-Butanol

-Ethanol

-Methanol

Tableau 1 : Résistance ou la sensibilité de isolats d'actinomycètes en différents antibiotiques après 7jours

ATB / **Souche**	Benzyle-pénicilline (1)	Céfazoline (2)	AMOXICILLINE (3)	Pénicilline (4)	Gentamicine
ZA2m	R	R	R	R	R
ZA2m	R	S (27mm)	S (18mm)	S (20mm)	S (45mm)
ZA3 10-1	R	R	S (22mm)	R	S (46mm)
Sm3 m	R	R	S(10mm)	S(20mm)	S(45mm)
S2 10-2	R	S(10mm)	S(20mm)	R	S(40mm)
S2 10-2	R	S(30mm)	S(25mm)	S(20mm)	S(50mm)
M1 10-1	R	S (27mm)	S(18mm)	S(20mm)	S(45mm)
S2 10-3	R	S (3.5mm)	S(18mm)	S(19mm)	S(50mm)
ZA2 10-1	S(28mm)	S'(14mm)	S(16mm)	S(12mm)	S(50mm)
ZA1 10-3	S(20mm)	S(25mm)	S(10mm)	S(10mm)	S(4mm)
S2 10-1 N	R	S(30mm)	S(19mm)	R	S(45mm)
ZA1 10-1	S(25mm)	S(20mm)	S(10mm)	S(10mm)	S(40mm)
ZA2 10-3	S(26mm)	S(10mm)	S(20mm)	S(20mm)	S(20mm)
ZA2 10-1	R	R	S(35mm)	S(30mm)	S(50mm)
M1 10-1	S(10mm)	S(2mm)	R	R	S(3mm)0
S2 10-1	R	S(45mm)	S(38mm)	S(32mm)	S(50mm)
S2 10-1	S(20mm)	S(20mm)	S(2mm)	S(10mm)	S(40mm)

ZA3 10-2	S(30mm)	S(14mm)	S(30mm)	S(16mm)	S(46mm)
ZA3 10-2	S(24mm)	S(14mm)	S(26mm)	S(14mm)	S(40mm)
Sm3 10-2N	R	S(35mm)	S(18mm)	S(19mm)	S(50mm)



Figure 43 : les extraits utilisés