



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie

MÉMOIRE

Présenté par

CHAIB DJAMILA

ET

NOUALI KENZA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences alimentaires

Option Sécurité Agroalimentaire Et Assurance Qualité

Thème

Activité antimicrobienne des actinomycètes isolées à partir des de la grotte d'Ighezer (Timimmoune) vis-à-vis des microorganismes responsables des infections alimentaires.

Soutenu le 25/06/2023 devant le jury composé de :

Président	Mme. LOUKIDI Bouchra	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	M. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	M. BELYAGOUBI Larbi	M.C.A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Remerciement

Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Je tiens tout d'abord à remercier l'encadreur Monsieur BELYAGOUBI Larbi Maître de Conférences classe A à l'Université Abou bekr Belkaid -Tlemcen, qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses conseils précieux et sa gratitude.

Je tiens à remercier LA ProfesseurE Madame Loukidi Bouchra pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes plus vifs remerciements vont à Madame BELLIFA Samia Maitre de conférences à l'université de Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis honoré par sa participation au jury de ce mémoire.

Je voudrais remercier Madame la Doyenne Pr. SOULIMANE-MOKHTARI Nassima Amel, pour nous avoir accordé l'autorisation d'accéder au Laboratoire pédagogique de Microbiologie et de nous approvisionner en matériel et produits chimiques. Votre générosité et votre soutien ont grandement contribué à la réussite de notre projet.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers Madame la Professeure BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila pour son soutien et son accompagnement précieux tout au long de la préparation de nos expériences.

Mes remerciements s'adressent également aux responsables des laboratoires de Microbiologie, notamment à Madame ZEKRAOUI Fatima, Madame Tebti Fatima zehra et Mr Habi, pour leur aide, leur assistance, leur patience et leur soutien tout au long de la période de préparation de nos mémoires de Master.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers Madame la Professeur BOUCHERIT-OTMANI Zahia pour avoir mis à notre disposition la souche de référence de *Candida albicans*.

J'aimerais également adresser mes remerciements à Mesdames Docteur BELLIFA Samia et pour les souches bactériennes de référence qu'elles nous ont fournies.

Sans oublier *Professeurs Madame BEKHECHI-BENHABIB Chahrazed et Monsieur AZZI Rachid pour la fourniture des milieux de culture nécessaires pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne*

Je suis sincèrement reconnaissant envers chacune de ces personnes qui ont joué un rôle essentiel dans notre parcours académique. Leur soutien indéfectible et leur générosité ont été des facteurs déterminants dans notre réussite.

Dédicace

Avec une profonde gratitude envers Dieu, je consacre ma cérémonie de remise de diplôme à ma mère à qui je dois mon succès et mon excellence

Je remercie également mon père, que dieu lui fasse miséricorde, ma famille "CHAIB" et "BELLAAMA", ainsi que tous ceux qui m'ont soutenu financièrement et moralement.

Mes frères, sœurs et leurs conjoints, ma chère sœur Naïma et ma nièce Retaj, mes amis et collègues, en particulier mon binôme Kenza, ainsi que mon honorable superviseur, M. Belyagoubi, du collègue de biologie, et mes professeurs.

Je n'oublie pas de rendre hommage à mon université, l'Université Abou Baker Belkaid, où j'ai acquis une solide formation, tout en cultivant l'optimisme et la patience

CHAIB DJAMILA

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, le Généreux et le tout Miséricordieux, j'ai pu cet humble travail que je dédie :

A mes très chers parents Sidi Ahmed et Fatma qui ont cru en moi et m'ont soutenu dans la réalisation de mes objectifs, que ce soit moralement ou financièrement.

Qu'Allah vous protège et vous prête bonne santé et longue vie A mes belles sœurs (Ma nièces Tasnim et Israe) frères et la famille kacher pour tous vos conseils votre soutien moral.

Ces j'adresse mes sincères remerciements à mes amies Asma et Chahinez et mon binôme Djamila pour leurs encouragements et pour tous les moments amusants que nous passons ensemble.

Nouali Kenza

ملخص

تأوي النظم البيئية الجزائرية المتطرفة مثل الكهوف مجموعة متنوعة مثيرة للاهتمام من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تكون مصدرًا رائعًا لمجموعة متنوعة من الجزيئات المضادة للميكروبات.

ركز عملنا بشكل أساسي على عزل الفطريات الشعاعية من الصخور والرواسب في كهف إيغزر الواقع في جنوب الجزائر (ولاية تميمون).

تم عزل الجزيئات الشعاعية المنتجة للجزيئات المضادة للميكروبات بطريقة التباطؤ وتم فحص النشاط المضاد للميكروبات بطريقتين: تقنية البئر وتقنية اسطوانة أجار.

تم عزل 07 سلالات من الفطريات الشعاعية. وفقًا لاختبارات التحديد التي تم إجراؤها والملاحظة المجهرية ، فإن السلالات المعزولة هي على الأرجح العقدية.

يعد وسط *ISP2* و *بينت* أكثر ملاءمة لعزل الفطريات الشعاعية.

أظهر اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للعزلات أن سلالتين *AI* و *A3* أظهرتا نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد البكتيريا الممرضة التالية: اشيرشيا القولونية، بكتيريا سيربوس العصوية ، الكلبسيلا الرئوية ، المكورات العنقودية الذهبية ، وخميرة كانديدا البيكان حيث تختلف أقطار التثبيط بين 11.5 و 13 ملم.

تعد بكتيريا الشعاعية مصدرًا رائعًا لمجموعة متنوعة مثيرة للاهتمام من الجزيئات المضادة للميكروبات. تأوي النظم البيئية الجزائرية مجموعة متنوعة مثيرة للاهتمام من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن يكون لها أنشطة بيولوجية.

الكلمات المفتاحية: كهف إيغزر ، الصخور ، الرواسب ، البكتيريا الشعاعية ، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract

Extreme Algerian ecosystems such as caves harbor an interesting variety of microorganisms that can be a prodigious source of a wide variety of antimicrobial molecules.

Our work focused mainly on the isolation of actinomycetes from rocks and sediments of the Ighezer cave located in southern Algeria (wilaya of Timimoune).

Isolation of the actinomycetes producing antimicrobial molecules was carried out by the dullition method and the screening of the antimicrobial activity was carried out by two methods: the well technique and the agar cylinder technique.

07 strains of actinomycetes were isolated. According to the identification tests carried out and the microscopic observation, the isolated strains are probably *Streptomyces*.

ISP2 and Bennett medium are more suitable for the isolation of actinomycetes.

The antibacterial activity test of the isolates indicated that 2 strains A1 and A3 showed antibacterial activity against the following pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and a yeast *Candida albicans* where the diameters of the areas of inhibition vary between 11.5 and 13mm.

Actinomycete bacteria are a prodigious source of a wide variety of antimicrobial molecules. Algerian ecosystems harbor an interesting variety of microorganisms that can have biological activities.

Keywords: Ighezer cave, rocks, sediments, actinomycetes, antimicrobial activity.

Résumé

Les écosystèmes extrêmes Algériens tels que les grottes abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent être une source prodigieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité.

Notre travail a porté principalement sur l'isolement des actinomycètes à partir des roches et des sédiments de la grotte d'Ighezer située dans le sud algérien (wilaya de Timimoune).

Isolement des actinomycètes productrices des molécules antimicrobiennes a été réalisé par la méthode de dillution et le screening de l'activité antimicrobienne été effectué par deux méthodes : la technique des puits et la technique des cylindres d'agar.

07 souches d'actinomycètes ont été isolées. D'après les tests d'identification réalisée et l'observation microscopique les souches isolées sont probablement des *Streptomyces*.

Les milieux ISP2 et Bennett sont plus appropriés pour l'isolement des actinomycètes .

Le test d'activité antibactérienne des isolats a indiqué que 2 souches A1 et A3 ont présenté une activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes suivantes : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* , *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, et une levure *Candida albicans* où les diamètres des zones d'inhibition varient entre 11.5 et 13mm.

Les bactéries actinomycètes sont une source prodigieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité. Les écosystèmes Algériens abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent avoir des activités biologiques.

Mots clés : Grotte d'Ighezer, Roches, Sédiments, Actinomycètes, Activité antimicrobienne.

Liste des figures

Figure1:photo personnel de monsieur belagoubi2023.....	3
Figure2: photo personnel de monsieur belagoubi2023.....	5
Figure3:cycle de vie d'actinomycète.....	10
Figure4:enterococcus feacalis.....	12
Figure5:Bacillus subtilis	12
Figure6 : Escherichia coli.....	13
Figure 7: Klebsiella pneumoniae	13
Figure 8 : Staphylocoque aureus	14
Figure 9 : Candida albicans.....	14
Figure 10 : Photo personnel(chaib djamila 2023)	15
Figure11 photo de ksar Ighzar.....	15
Figure12 : situation grotte Ighzar.....	16
Figure13 :isolement des actinomycètes a partir des roches noire et E.Ph(A,B,C,Det E).....	17
Figure14 : Le prélèvement du sol et des rochers et la méthode d'incubation des échantillons	18
Figure15: (pH mètre).....	19
Figure16: les souches actinomycètes.....	22
Figure17 :((A).(B).(C)et(D) les antibiotique utilisé).....	24
Figure18: lait écrémé.....	26
Figure19 : citrate de Simmons.....	26
Figure21 :La moyenne de pH.....	27
Figure22: Macromorphologie des isolats d'actinomycètes étudiés.....	28
Figure23 :citrate de Simmons	29
Figure24 :hydrolyse de gélatin gélatine.....	29
Figure25 :lait écrémé.....	29
Figure26 : Photos des tests d'activité antimicrobienne des actinomycètes sur les souches.....	32
Figure27 : Observation des souches actinomycetales (G× 1000) après coloration de Gram..	34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Situation géographique de la station d'échantillonnage.....	16
Tableau 2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	20
Tableau 3 : observation des souches sur votre milieu ISP2 et Bennet.....	29
Tableau 4 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales..	30
Tableau 5 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes.....	32
Tableau 6 : les antibiotiques.....	33

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- h : Heure
- ISP : International *Streptomyces* Project
- L : Litre
- mg : Milligramme
- min : Minute
- mL : Millilitre
- mm : Millimètre
- P/V : Poids/Volume
- T.S.A : Bouillon Trypto-Caséine Soja
- UFC : Unité Formant Colonie
- % : Pourcentage
- °C : Degré Celsius
- µg : Microgramme
- µL : Microlitre
- NaCl : chlorure de sodium
- E : échantillon

Sommaire

Synthèse bibliographique	3
1Les grottes	3
1.1 Introduction	3
1.2 Historique de la microbiologie des grottes :	5
1.2.1 Écologie microbienne des grottes :	5
1.3 Les actinomycètes	7
1.3.1 Introduction :	7
1.3.2 Historique de l'étude des actinomycètes :	8
1.4 Physiologie et écologie des actinomycètes :	9
1.4.1 Physiologie	9
1.4.2 Ecologie	10
1.4.3 Cycle de vie des actinomycètes :(Figure3)	10
1.5 les actinomycètes des grottes :	11
1.6 Les microorganismes pathogènes	11
1.6.1 Enterococcus feacalis :	11
1.6.2 Bacillus subtilis :	12
1.6.3 Escherichia coli :	12
1.6.4 Klebsiella pneumoniae :	13
1.6.5 Staphylocoque aureus :	13
1.6.6 Candida albicans :	14
Matériel et méthodes.....	3
1Lieu d'étude :	15
1.1 La grotte mystérieuse :	15
1.2 Le Ksar d'Ighezar :	15
2Principaux sites touristiques :.....	16
3Prélèvement :.....	16
4pH du sol :	19
5Isolement des actinomycètes :.....	19
6Conservation des actinomycètes :	20

7Test d'activité antimicrobienne :	21
7.1 Méthode des cylindres d'agar	21
7.2 Criblage par la technique des puits :	22
8Identification de souches d'actinomycétales actives.....	23
8.1 Critères morphologiques	23
8.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux	23
8.1.2 Etude micro morphologique	23
9Critères physiologiques et biochimiques	23
9.1 Hydrolyse de la gélatine	24
9.2 Action sur le lait écrémé	24
9.3 Utilisation du citrate comme seule source de carbone	24
9.4 Recherche de catalase	25
Résultats et discussion	15
1pH du sol :	36
2Isolement des Actinomycètes.....	36
3Observation microscopique.....	37
4Identification des souches d'actinomycètes	38
5Etude morphologique	38
6Étude physiologique et biochimique.....	40
7Méthode des puits :	41
8Test d'activité antimicrobienne des Actinomycète	43
Tableau5 :l'activité antimicrobienne des actinomycètes	43
9Identification :	44
Conclusion.....	26
Références bibliographiques	36
Annexes	37

Introduction

L'Algérie, habite de nombreuses grottes naturelles à travers ses différentes régions géographiques. La plupart de ces grottes sont des grottes karstiques et le reste sont des grottes volcaniques (tubes de lave). Ces grottes ont également été les premiers abris et habitations d'êtres vivants à l'âge de pierre.

Les Actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradiant, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination : le mot « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». Ainsi les a-t-on désignés par référence soit à la morphologie des jeunes colonies dont les hyphes ramifiées rayonnent à partir du centre de la croissance, soit à la disposition radiée des hyphes épaissies en massues que l'on trouve dans les concrétions que produisent les formes pathogènes responsables des actinomycoses et des mycétomes actinomycétiques. Les formes les plus évoluées des Actinomycètes rivalisent en complexité morphologique avec les moisissures (Champignons imparfaits) mais en diffèrent radicalement puisque, comme toutes les autres bactéries, ce sont des procaryotes (cellules sans enveloppes autour du matériel génétique). Un corollaire de leur structure cytologique est le diamètre de leurs hyphes qui est de l'ordre de 0,5 μm , soit approximativement un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques.

D'après S. A. Waksman (1959), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un Actinomycète en 1875, et C. O. Harz, en 1878, nomma *Actinomyces bovis* un organisme parasite trouvé dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les Actinomycètes, dont la plupart sont des Saprophytes, ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux et, en général, de presque tous les habitats où la vie est possible. Notons que ce ne sont pas des organismes marins et qu'ils deviennent de plus en plus rares dans les mers au fur et à mesure qu'on s'éloigne des côtes.

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'Actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, illustrées par le genre *Actinomyces*, qui habitent les cavités naturelles des animaux et de l'homme. Ces organismes peuvent être anaérobies ou aérobies, mais ils sont souvent microaérophiles. Morphologiquement, ces espèces sont peu variées et ne forment pas de spores.

En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces*, qui sont surtout des espèces telluriques, lesquelles, suivant les groupes, peuvent former des spores et être morphologiquement complexes.

En général, les Actinomycètes sont des hétérotrophes utilisant des molécules organiques préfabriquées, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-auto trophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. Ce genre de chimio-autotrophie facultative n'est pas limité aux Actinomycètes mais se retrouve dans de nombreux groupes de bactéries.

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (**Okami et Hotta, 1988**), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (Islam et al., 2009).

Les actinomycètes, très ubiquitaires, sont rencontrées sur tous les substrats naturels. Ils jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Larpent et Sanglier, 1989**).

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable. Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

Afin d'atteindre notre objectif , la démarche expérimentale se réduire a :

- Isolé des actinomycètes a partir des échantillons prélevés de différents endroits de la grotte
- Purifié et identifié les souches isolées ;
- Criblé du pouvoir antimicrobien des microorganismes contre des souches pathogènes.

Synthèse bibliographique

1 Les grottes

1_1 Introduction

C'est une cavité sous la surface de la terre qui a une entrée depuis la surface de la terre ou depuis la mer. On le trouve généralement dans des zones composées de calcaire ou sur des côtes rocheuses, prenant généralement une direction horizontale ou un angle obtus. La grotte peut prendre la forme d'un couloir, et sa forme dépend dans une certaine mesure du modèle ou de la structure de la liaison rocheuse et dans une certaine mesure du type de l'opérations qui ont conduit à sa formation (Figure1).



Figure1 : Photo de la grottes Chaabe de la region de Tagma Tlemcen (**personnel de Belyagoubi (2023)**)

Une grotte est un espace naturel sous la surface de la terre qui s'étend au-delà de la zone crépusculaire, qui est accessible aux humains, « ainsi l'explorateur l'a défini (**Gillieson, 1996**), et du point de vue des biologistes **White et David (2019)**, il se définit comme une ouverture pouvant accueillir des organismes adaptés aux grottes.

Les grottes sont des environnements sombres avec une humidité élevée et des fluctuations de température limitées, et sont considérées comme des environnements difficiles pour la vie en raison de l'absence de lumière, du manque d'apport de carbone organique provenant de la photosynthèse et de nombreux gradients physiques et chimiques (**Northup et al., 2001**). Cependant, la spéléologie est une vaste science interdisciplinaire qui traite d'une exploration approfondie de la création de grottes, des propriétés karstiques et de leurs impacts sur leur environnement dans le monde entier (**Lee et al .,2012**). De plus, les grottes peuvent

être classées de plusieurs manières, y compris la méthode de formation et le type de roche **(Palmer,1991)**.

Les interactions des micro-organismes avec les minéraux jouent un rôle très important dans la formation des grottes par la formation de diverses structures principalement des stalagmites et des stalactites ainsi que dans la décomposition des roches lors de l'accumulation d'oxydes métalliques sous l'effet de l'activité microbienne, ce qui conduit à la formation de surfaces rocheuses cassantes, ce qui entraîne l'expansion des grottes **(Raji et al.,2019)**.

Le système de grottes est également divisé en quatre écorégions, en fonction de l'influence directe des conditions environnementales externes qui l'entourent. La première zone et la zone adjacente à l'entrée où la température, l'humidité et l'intensité lumineuse dépendent de l'environnement extérieur est appelée "zone crépusculaire". Ensuite, la zone presque sombre avec une température et une humidité instables est appelée la "zone de transition". Cependant, la "zone profonde" est la troisième zone, elle est complètement sombre et a une température et une humidité constantes proches de 100%. Enfin, la quatrième zone est la "zone de stase" qui est assez sombre et humide et à ce niveau il y a peu d'échange d'air et la concentration en dioxyde de carbone peut devenir très élevée **(Biswas, 2010)**.

Au cours de la dernière décennie, les grottes ont attiré l'attention des microbiologistes grâce à leur diversité microbienne, ces micro-organismes ont été isolés de différentes parties de la grotte y compris les sédiments et l'eau par le point qui relie l'environnement extérieur, les stalagmites et la grotte sont des gouttelettes d'eau qui s'infiltrent. Par conséquent, la recherche sur les communautés microbiennes dans ces eaux est cruciale. En conséquence, les procaryotes oligotrophes des grottes ont été formellement étudiés pendant des décennies et une longue liste de bactéries a été compilée, et plusieurs rapports ont été publiés sur la découverte de nouvelles lignées dans les grottes.

2 Historique de la microbiologie des grottes :

2_1 Écologie microbienne des grottes :

Les microbes ont été répandus dans les sédiments et l'eau selon les premières études microbiologiques sur les grottes qui ont été basées principalement sur la culture et la microscopie. Au début des années 1900, notamment dans les années 1940 de nombreux gisements de grottes ont été considérés comme ayant une origine microbiologique. Dans les années 1960 les rôles écologiques et géologiques des microbes dans la grotte ont commencé à se concentrer, les microorganismes ont été isolés par des approches culturelles. On pensait que la matière organique produite par photosynthèse est indispensable pour la vie dans les grottes mais à la fin des années 1980 et jusqu'à 1990, après la coïncidence de découvertes des événements hydrothermaux en haute mer et le développement de techniques de génétique moléculaire il y avait introduction de nouveau concept "la production primaire microbienne est basée sur la chimiosynthèse, plutôt que la photosynthèse" (Christiansen, 2012),

La biologie des grottes est un sujet passionnant en raison des nombreux aspects des environnements claustrophobes et de leur relation avec les environnements de surface. On peut affirmer à ce stade, cependant, qu'il s'agit en quelque sorte d'une nouvelle avant-garde qui n'inclut que les microbes et autres organismes et leurs relations avec les minéraux qui nous fournit une excellente compréhension des interactions chimiques et géo microbiologiques .(Figure2)suivant :



Figure2 : Photo de la grotte Chaabe de la région de Tagma Tlemcen (personnel de Belyagoubi2023)

Ce sont des écosystèmes qui contiennent des animaux et des plantes spécifiques qui peuvent varier en fonction d'apports naturels endogènes ou exogènes, liés aux activités humaines, dans l'espace et dans le temps. Toutes les cavités naturelles représentent des systèmes ouverts, en relation continue avec l'environnement, tant interne qu'externe. Cependant, les micro-organismes sont introduits dans les grottes par les humains, les animaux, le débit d'eau et l'action du vent. Des changements dans le climat local et les conditions du réseau trophique peuvent être entraînés si la grotte est ouverte aux visiteurs. Les sédiments peuvent être trouvés dans les grottes, et ils sont généralement habités par des micro-organismes adaptés à des environnements très limités (Baskar et al., 2011).

En général, ces bactéries sont dormantes et ne donnent pas de manifestations néfastes visibles, mais parfois les espèces évoluent de manière chaotique grâce à des conditions favorables qui conduisent à des déséquilibres. D'autre part, plusieurs facteurs tels que le rayonnement solaire, le vent, la température et l'humidité peuvent activer les organismes flottants en suspension dans l'air.

Tout un groupe de micro-organismes est naturellement présent dans les sédiments des grottes, les actinomycètes étant parmi les bactéries hétérotrophes dominantes, les bactériophages du genre *Pseudomonas*, les spores fongiques, les algues et les cyanobactéries, ou des protozoaires existent également.

Le manque d'énergie dans les cavéoles provoque des interactions complexes entre différents micro-organismes entraînant la production de métabolites secondaires, tels que des antibiotiques, des transporteurs de fer et des pigments. Cependant, avec l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, la majorité des micro-organismes isolés sont identifiés comme de nouvelles espèces (Gabriel et al., 1999).

Les champignons sont des micro-organismes eucaryotes et des aliments biologiques. Ce sont des habitants pionniers omniprésents sur les surfaces rocheuses et dans des environnements pauvres en nutriments très défavorables, y compris les grottes. Ils constituent une grande partie de la diversité microbienne et offrent des perspectives intéressantes dans la recherche de biomolécules avec différents potentiels de production de biomolécules. Plusieurs études ont été menées sur les possibles fonctions écologiques des communautés fongiques dans les grottes généralement pauvres en nutriments organiques et relativement constantes en température. Or, de nombreuses études ont montré que les bactéries, qui fournissent leurs énergies à partir de l'oxydation de composés chimiques tels que l'hydrogène sulfuré et le soufre (chimolithotrophes), jouent le rôle de producteurs primaires dans des milieux totalement

dépourvus de rayonnement lumineux et conduisent au développement de micro-organismes hétérotrophes..

Il a été rapporté que la majorité des isolats pourraient être liés au genre *Streptomyces* dans certaines grottes(Zhou et al., 2007).

3 Les actinomycètes

3_1 Introduction :

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'Ordre des Actinomycetales. La grande diversité métabolique des actinomycètes leur confère parfois certaines propriétés inhabituelles (Davidson, 1995). Par exemple, quelques espèces sont capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaire (Holzapfel et al., 2002). Près d'un quart des décès dans le monde résulte de maladies infectieuses et un nombre grandissant d'infections est provoqué par des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques (Mukhopadhyay et al., 2008). Bien que ce phénomène illustre l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, il est devenu une préoccupation essentielle de l'humanité. Ainsi, la production de nouvelles molécules «bioactives» sur les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles fait l'objet de plus en plus de projets de recherche interdisciplinaires. cette espèce a été isolée en 1992 de la palmeraie d'Adrar (Algérie). Cette bactérie filamenteuse appartient au groupe des actinomycètes. Celle-ci s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster et al., 2000; Oliva et al., 2001; Minamiguchi et al., 2001). Le noyau dithiopyrrolone possède une structure composée de deux hétérocycles de 5 atomes : un cycle dithiol et un cycle pyrrol. Chaque association « radicalnoyau » confère à la dithiopyrrolone des propriétés différentes, ce qui rend ce modèle d'étude intéressant.(Lamari et al. 2002) ont trouvé que Sa. Algériens produit principalement six molécules de cette classe. Le genre *Saccharothrix* fait partie des Actinomycètes rares très peu étudiés. Aucune donnée intéressante sur ce groupe n'est disponible dans la littérature. Les travaux de Bouras (2005), ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur les productions spécifiques des six molécules produites. De plus, également lors de ces travaux, de nouveaux dérivés dithiopyrrolones ont pu être produits en modifiant le milieu de culture. Ces potentialités synthétiques sont donc prometteuses. En effet, la compréhension du métabolisme des actinomycètes, producteurs d'une grande diversité de métabolites secondaires, est fondamentale. Par ailleurs, les exigences en matière de maîtrise du

procédé sont primordiales en termes de compétitivité et de concurrence industrielle. Le travail de Strub (2008) a eu pour ultime objectif la définition de conditions d'un procédé de production d'une molécule d'intérêt. Ainsi, cette étude se concentre plus sur les aspects macroscopiques de l'examen du comportement du microorganisme que sur une analyse 2 microscopique de sa physiologie. Cet objectif se décompose en plusieurs étapes :- Concevoir un milieu de culture chimiquement maîtrisé permettant une croissance appréciable de *Sa. algériens* en culture liquide.- Présenter et comprendre la croissance du microorganisme et la production de thillotine associée sur milieu semi-synthétique standard afin d'acquérir une certaine connaissance des caractéristiques physiologiques du microorganisme ainsi que des voies de biosynthèse de l'antibiotique produit et des régulations qui s'y opèrent. Parallèlement, les connaissances se développent sur les voies de biosynthèse des molécules déjà découvertes et ces connaissances permettent ensuite d'exploiter la flexibilité naturelle du système de production pour la synthèse de nouveaux dérivés. Ainsi, l'ajout de précurseurs des métabolites au milieu de culture permet de diriger la production vers de nouveaux analogues de ces métabolites (**Bouras et al. 2008**). Au-delà même de la synthèse dirigée par les précurseurs, la modification des gènes de biosynthèse par ingénierie métabolique permet à la fois d'augmenter les rendements de production mais aussi de produire de nouvelles molécules, appelées aussi antibiotiques hybrides (**Niemi, 1995**). Enfin, la modification chimique ou enzymatique de composés naturels, ou semisynthèse, permet d'obtenir de nouvelles molécules bioactives possédant des propriétés biologiques accrues. L'étude de (**Chorin.,2009**) s'inscrit dans cette volonté de découvrir et de synthétiser de nouvelles molécules bioactives. Elle illustre les tendances actuelles dans le développement de ces molécules, notamment l'utilisation de la biodiversité comme source de molécules bioactives, la compréhension des mécanismes de synthèse et de régulation des métabolites secondaires ainsi que la semi-synthèse de nouveaux composés.

4 Historique de l'étude des actinomycètes :

Les Actinomycètes sont des Bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination : le mot « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fungi*) et aussi en allemand et en russe. Ainsi les a-t-on désignés par référence soit à la morphologie des jeunes colonies dont les hyphes ramifiées rayonnent à partir du centre de la croissance, soit à la disposition radiée des hyphes épaissies en massues que l'on trouve dans les concrétions que produisent les formes pathogènes responsables des actinomycoses et des mycétomes actinomycétiques. Les formes les plus évoluées des Actinomycètes rivalisent en complexité morphologique avec les moisissures (Champignons imparfaits) mais en diffèrent radicalement

puisque, comme toutes les autres Bactéries, ce sont des Procaryotes (cellules sans enveloppes autour du matériel génétique). Un corollaire de leur structure cytologique est le diamètre de leurs hyphes qui est de l'ordre de 0,5 μm , soit approximativement un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques.(Lewin et al.,)

D'après S. A.(**Waksman.,1959**), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un Actinomycète en 1875, et C. O. Harz, en 1878, nomma *Actinomycesbovis* un organisme parasite trouvé dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les Actinomycètes, dont la plupart sont des Saprophytes, ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux et, en général, de presque tous les habitats où la vie est possible. Notons que ce ne sont pas des organismes marins et qu'ils deviennent de plus en plus rares dans les mers au fur et à mesure qu'on s'éloigne des côtes.

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'Actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, illustrées par le genre *Actinomyces*, qui habitent les cavités naturelles des animaux et de l'homme. Ces organismes peuvent être anaérobies ou aérobies, mais ils sont souvent microaérophiles. Morphologiquement, ces espèces sont peu variées et ne forment pas de spores.

En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces*, qui sont surtout des espèces telluriques, lesquelles, suivant les groupes, peuvent former des spores et être morphologiquement complexes.

En général, les Actinomycètes sont des hétérotrophes utilisant des molécules organiques préfabriquées, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. Ce genre de chimio-autotrophie facultative n'est pas limitée aux Actinomycètes mais se retrouve dans de nombreux groupes de Bactéries

5 Physiologie et écologie des actinomycètes :

5_1 Physiologie

Physiologiquement, les formes aérobies des actinomycètes sont les plus nombreuses, les types anaérobies se trouvent primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Boucheffa, 2011**).

Avec l'avancement de la biologie moléculaire et le développement des amorces pour cibler la séquence de ARNr 16S des actinomycètes l'utilisation de la microscopie optique et les tests biochimiques devient de plus en plus secondaire parce qu'ils prennent beaucoup de temps et de produits, mais ils restent toujours indispensables pour garantir la certitude de l'identification des actinomycètes (Wang *et al.*, 1999). Ce qui a rendu l'identification de ces bactéries au niveau du genre possible et d'une manière précise et très rapide, car il est possible maintenant d'obtenir le genre en quelques heures seulement (Jeffrey, 2000).

5_2 Ecologie

Les actinomycètes ont une large distribution dans la nature et sont généralement saprophytes, mais quelques formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes ou les animaux. Elles sont retrouvées dans tous les écosystèmes (sol, eaux douces et salines et air). La majorité des actinomycètes vivent dans des conditions d'humidité peu élevées où l'activité de l'eau est très basse

6 Cycle de vie des actinomycètes :(Figure3)

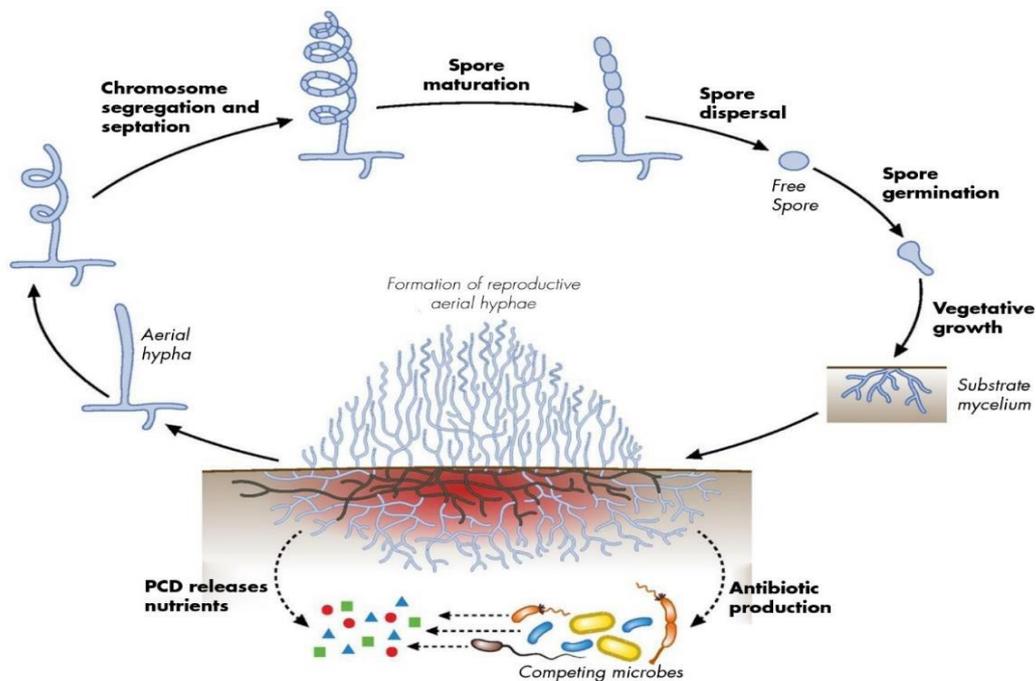


Figure3 : Cycle de vie des actinomycète (Hopwood *et al.*, 1985).

Les actinomycètes présentent un cycle de vie cellulaire asexué similaire à celui des champignons immatures, Ce cycle de vie commence par la germination des spores, lorsqu'elle

trouve des conditions favorables à la croissance, qui est à l'origine libre dans un état de dormance dans l'environnement, et la germination à la naissance du soi-disant "tube germinatif" qui à son tour favorise la croissance du mycélium végétatif sur le milieu de culture, il sert de base au champignon aérien. Après cela, lorsque les conditions dans le milieu deviennent défavorables, une autre étape appelée « enroulement » commence, et elle est principalement caractérisée par la ramification de la membrane aérienne fongique, qui donne une forme en spirale (**Chater, 2014**). Cependant, chaque spore contient généralement une copie du chromosome, mais de nombreux nucléotides coexistent dans le mycélium permettant la biosynthèse de différents composés.

7 les actinomycètes des grottes :

De nombreux scientifiques pensent que les microorganismes isolés à partir des sites vierges, non explorés et rarement visités sont probablement des nouveaux taxons qui produisent des métabolites uniques d'intérêt (**Takahashi et Nakashima, 2018**). Les grottes constituent un de ces milieux importants et originaux, surtout avec leurs conditions et leur géologie. D'autre part, les conditions écologiques permettant aux microorganismes de la grotte de produire des composés antimicrobiens ne sont pas claires

Les habitats négligés s'avérant être une source particulièrement intéressante de nouveaux actinomycètes qui produisent de nouvelles molécules, comme les études rapportées par plusieurs chercheurs sur des actinomycètes isolés du désert de la rhizosphère du milieu marin, lichens et des grottes.

8 Les microorganismes pathogènes

8_1 Enterococcus faecalis :

Est une bactérie commensale c'est-à-dire qui vit avec d'autres germes. Elle se retrouve notamment dans le tube digestif des humains et autres mammifères. Elle peut également se rencontrer dans l'environnement (dans des eaux usées, l'eau douce, sur les sols).

Cette bactérie peut causer des infections, notamment des infections nosocomiales. Elle est particulièrement surveillée, d'autant qu'elle présente de nombreuses résistances aux antibiotiques. Nous faisons le point. (**Figure4**)



Figure4 :observation microscopique *Enterococcus faecalis*(Camille, 2007).

8_2 *Bacillus subtilis* :

est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet qui forme des spores résistantes à la chaleur. On le trouve couramment dans le sol. Il est non pathogène. Il a reçu son nom en 1872 de Ferdinand Cohn, qui a également démontré sa capacité à former des spores résistantes à la chaleur. Elle produit plusieurs produits commercialement importants, notamment des protéases et des amylases. En partie à cause de son importance commerciale, et plus à cause de la facilité de sa manipulation génétique, *B. subtilis* a été intensivement étudié. Il a un seul génome circulaire (chromosome) (Figure5). (Bouziza, 2015).

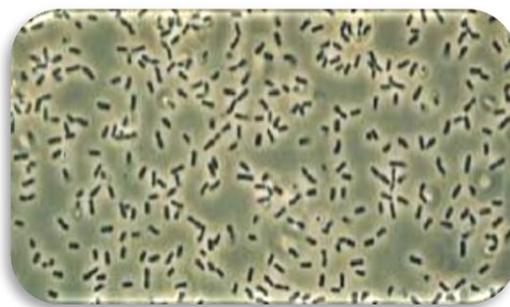


Figure5 Observation microscopique de *Bacillus subtilis* (Bouziza, 2015).

8_3 *Escherichia coli* :

est une bactérie naturellement présente dans la microflore digestive de l'Homme et des animaux à sang chaud. Si la plupart des souches d'*Escherichia coli* sont sans danger pour l'Homme, certaines souches comme les *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC sont

responsables d'infections, parfois sévères, principalement chez les jeunes enfants et les personnes âgées (figure 6). (Camille, 2007).

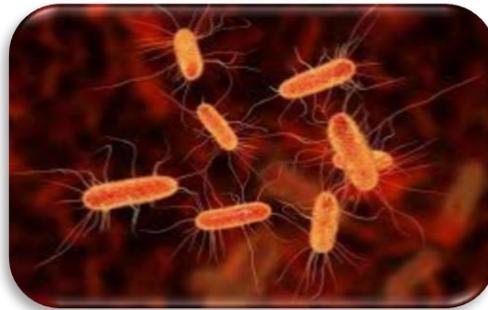


Figure6 Escherichia coli, vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement (Camille, 2007).

8_4 Klebsiella pneumoniae :

et est à la fois une bactérie commensale de l'organisme, et un agent pathogène responsable d'infections variées. Elle est présente naturellement dans le tube digestif et les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux. Elle se retrouve également couramment dans l'eau, les sols et la poussière. Par ailleurs, *Klebsiella pneumoniae* est à l'origine d'infections respiratoires communautaires survenant surtout chez des sujets fragilisés (personnes âgées, diabétiques ou alcooliques) et d'infections opportunistes chez des malades hospitalisés (figure 7).

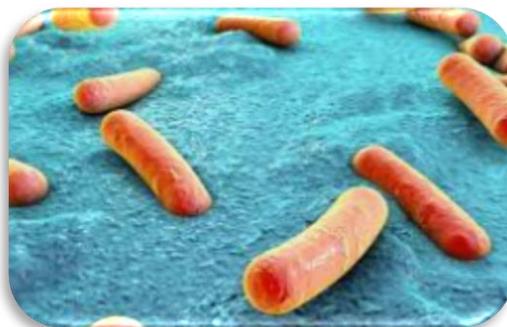


Figure7 :observation microscopique de Klebsiella pneumoniae(Janda et Abbott, 2006).

8_5 Staphylocoque aureus :

Staphylococcus aureus (ou staphylocoque doré) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom (Figure 8). (Antibio_responsable.fr)



Figure 8 : observation microscopique *Staphylocoque aureus* (Antibio_responsable.fr)

8_6 Candida albicans :

Le *Candida albicans* est un organisme mycosique, c'est-à-dire qu'il fait partie de la famille des **champignons**. Il est présent depuis toujours sur nos muqueuses, notre peau, ou bien encore dans notre intestin. Lors d'un déséquilibre immunitaire ou hormonal, il prolifère et devient pathogène en libérant des toxines. On parle alors de "candidose". Une candidose provoque des mycoses, habituellement bénignes mais qui peuvent être graves chez le sujet immunodéprimé (Figure 9). (Camille, 2007).



Figure 9 : Candida albicans vue au microscopique et colorée (Camille, 2007).

Matériel et méthodes

1 Lieu d'étude :

1_1 La grotte mystérieuse :

Creusée au pied de la colline occupée par le Ksar , la grotte mystérieuse naturelle s'enfonce de 80 m dans le grès tendre appelé « Tafza ». Large de 8 m et haute de 7 m en tête, elle se rétrécit au fur et à mesure que l'on y pénètre pour se terminer en forme de boyau. Fraîche en été et tiède en hiver, la grotte constitue un refuge appréciable contre les rigueurs climatiques (**Direction du tourisme et de l'artisanat de la wilaya d'Adrar, 2022**) Situé à une dizaine de kilomètres de la capitale de l'oasis rouge Timimmoun, le vieux Ksar d'Ighazer , puis ses spécificités patrimoniale et culturelles de sa position géographique, surplombant le lac de Timimmoun , entouré de verdoyantes palmeraies(**Bouzada Maroua Manel,2019**).

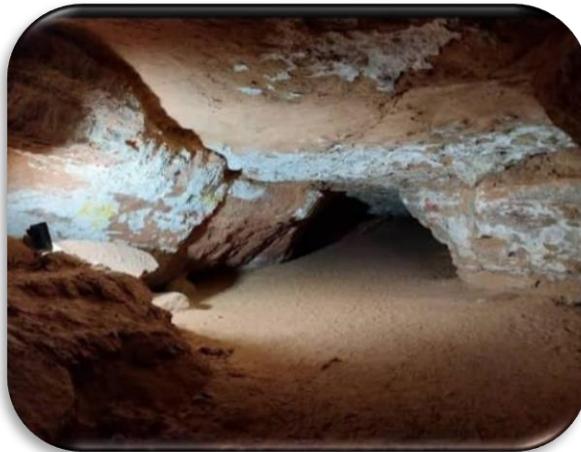


Figure10 : Grotte d'Ighazer (Photo personnel, 2023)

1_2 Le Ksar d'Ighezar :

Ighezar (commune d'OuedSaïd) se situe à 22 km au nord de Timimmoun. Ses voisins sont Ksar Kaddour au nord, Timimmoun au sud, OuledSaïd à l'ouest et Tinerkouk à l'est. Ighezar doit son nom au mot berbère Ghazir qui signifie Oued. Les traces de l'oued qui a donné son nom au ksar sont encore visibles aujourd'hui..(amistiminoun.free.fr)(**Direction du tourisme et de l'artisanat de la wilaya d'Adrar, 2022**.(**Bouzada Maroua Manel,2019**). (Figure 11).



Figure(A)



Figure (B)

Figure11 : Photo de Ksar Ighzar 2022(A) : hors de la grotte(B) : au dessus de la grotte.

2 Principaux sites touristiques :

Le ksar d'Ighezar dont la fondation par Sidi Mansur remonte au début du 15^{ème} siècle, a gardé la forme générale qu'il avait au moment de sa construction par les berbères et constitue donc un trésor architectural de grande valeur.

Le tombeau du wali Sidi Abderrahmane (**venu depuis Seguiat el Hamra avec les AtKha-lifa vers 1590**), protecteur des lieux, est situé au pied du ksar et de la nouvelle mosquée.

Le ksar Khali est proche de celui d'Ighezar et on le trouve à sa gauche en arrivant.

Le ksar de Mers qui doit son nom à un ancien port au bord de l'actuelle sebkha, s'accroche aux flancs du plateau proche.

Situation géographique de la station d'échantillonnage (figure12 et tableau).

Tableau 1 : Situation géographique de la station d'échantillonnage

Région	Altitude (mètres)	Température (°C)	Humidité	Étage bioclimatique
Timimoun	80 mètres	3,4° _ 46°	9% _ 78%	Semi-aride



Figure12 : Situation géographique de la station d'échantillonnage(Google earth2023)

3 Prélèvement :

Le prélèvement du sol et des rochers a été réalisé à partir d'une grotte dans la région de Timimoun. Durant le mois de Février (19et26/02/2023) dans des conditions d'asepsie à l'aide

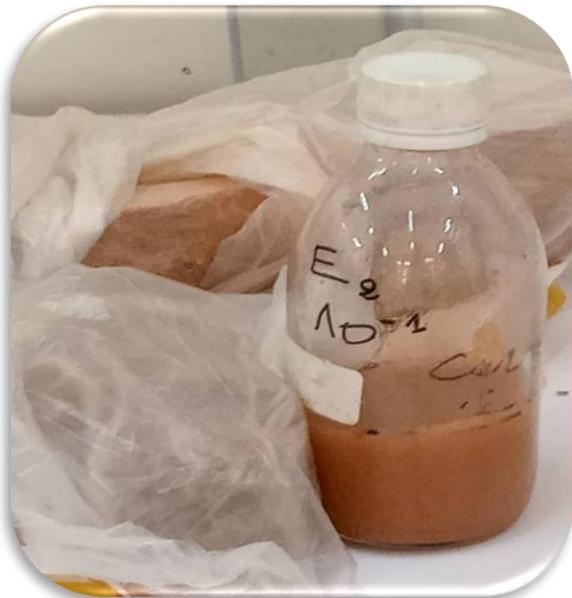
d'une spatule stérile. Le sol a été récupéré dans des sacs en plastiques stériles soigneusement fermés puis conservées au laboratoire à 4°C avant les analyses(les figures suivante



figure (A) :roche noire



figure(B) :roche noire



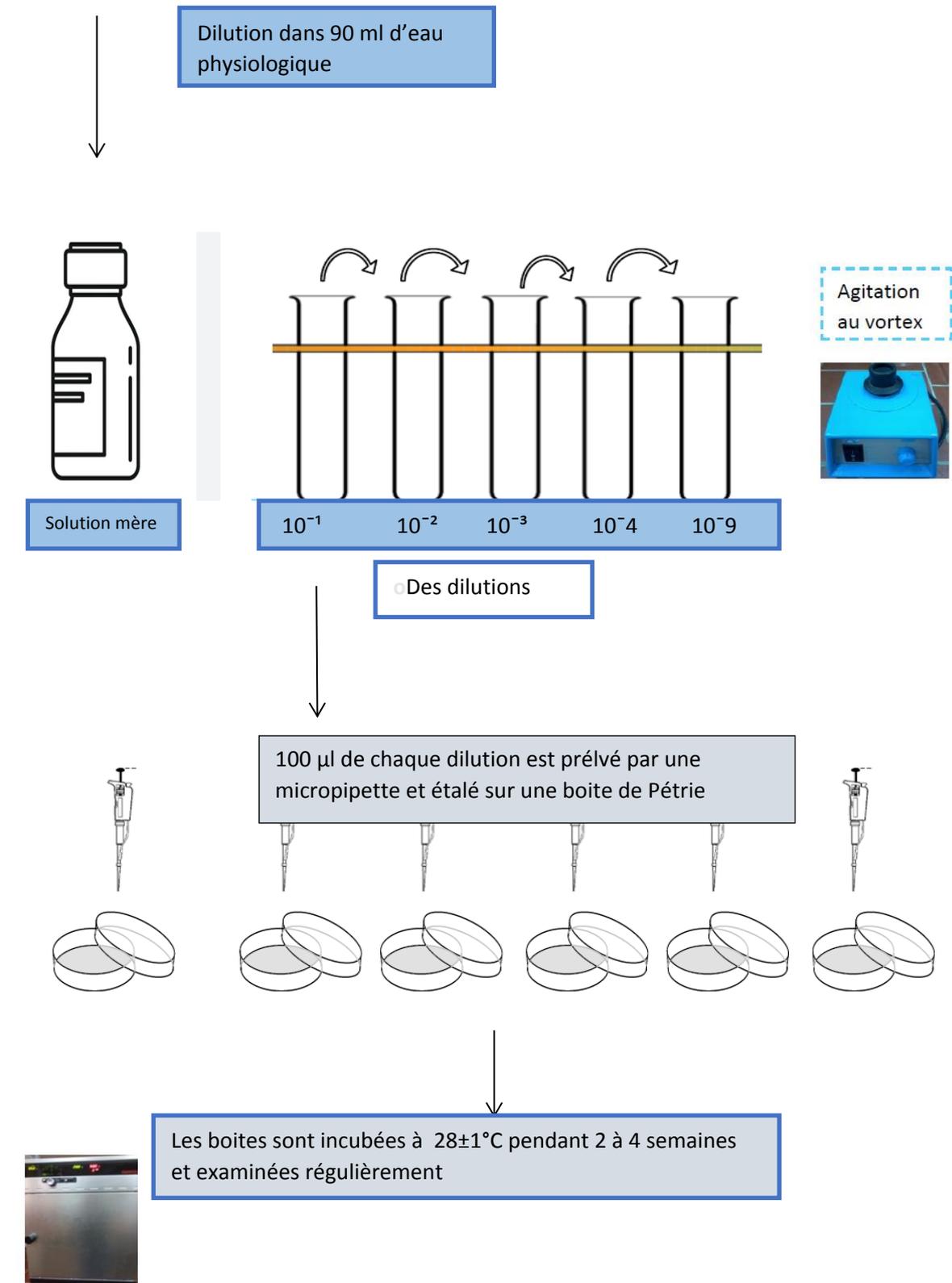
figure(C) : mélange échantillon et eau physiologie
Ph



figure(D) :mélange échantillon et E.

Figure 13 : Le prélèvement du sol et des rochers

10g d'échantillon



Figure(E) : la méthode d'incubation des échantillons.

Figure14 : Le prélèvement du sol et des rochers et la méthode d'incubation des échantillons

4 pH du sol :

20g du sable de chaque échantillon a été homogénéisé avec 50 ml d'eau distillée (2:5, P/V). Ce mélange doit être agité 2 minutes au moyen de l'agitateur magnétique (**Institut de Génie Rural, 1973**). On utilise un pH-mètre (marque Z OHAUS) où l'électrode a été insérée directement dans chaque échantillon, trois répétitions ont été réalisées (Figure 15).



Figure15 : Mesure du pH du sable.

5 Isolement des actinomycètes :

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons roches sont distribués dans des boîtes de Pétri stériles. Le prétraitement des échantillons de roche est une étape préliminaire permettant de sélectionner les Actinomycètes dans les échantillons de roche. Cette étape consiste à sécher les échantillons de sol à l'air libre pendant sept jours.

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions. On met en suspension 10g du roche sec dans 90 ml d'eau physiologique stérile ($\text{NaCl } 9 \text{ g.L}^{-1}$), ce qui représente la dilution 10^{-1} . Après homogénéisation au, on réalise des dilutions décimales dans L'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-9} (**Kitouni, 2007**), puis on étale 100 μL de chaque dilution à la surface des milieux de culture :

- Milieu de Bennett (**Jones, 1949 ; Wakisaka, 1982 in Bastide, 1986**);
- Milieu ISP2 (**Shirling et Gottlieb, 1966**) ;
- Gélose Trypticase de Soja (T.S.A) (**Krishnamurthi et Chakrabarti, 2013**)
- Plate Count Agar (P.C.A) (**Krishnamurthi et Chakrabarti, 2013**) ;

Tous les milieux utilisés dans cette étude contiennent un antifongique : la nystatine à une concentration de (50 µg/mL) (Belyagoubi, 2014 et 2018) et l'acide nalidixique(10µg/ml)(Aouar,2006).

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 28±1°C pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement. Les colonies qui présentent les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur le milieu Bennett (Figure15).

6 Conservation des actinomycètes :

La conservation a été faite à +4°C dans des tubes à essai en verre et à -20°C dans le glycérol à 30 % (v/v) (Bastide, 1986 ; Kitouni, 2007).

-Etude du pouvoir antimicrobien

1. Souches testées

Pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne, on a utilisé les souches de références qui sont mentionnées dans le **tableau 1**.

Tableau 2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	LVR
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	LVR
<i>Klebsiellapneumoniae</i>		ATCC700603	LAMAABE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	LVR
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAMAABE
<i>Enterococcusfaecalis</i>		ATCC 29212	LVR
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPSAB

LVR : Laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen ; **LAMAABE** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement ; **LAPSAB** : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie Synthèse et Activité Biologique.

7 Test d'activité antimicrobienne :

Méthode des cylindres d'agar

L'étude de la production des substances inhibitrices vis-à-vis des bactéries-tests à Gram Positif, à Gram négatif *Candida albicans* été faite après une incubation à $28\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 14 jours des souches d'actinomycétales qui sont ensemencées en stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Bennett gélosé.

Pour chaque microorganisme-test, un inoculum a été réalisé à partir d'une pré-culture d'environ 18-24 h d'incubation à 37°C , mis en suspension dans le bouillon B.M.H pour les bactéries et le bouillon B.S pour la levure afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance, de telle manière à obtenir une densité optique entre 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm (ce qui correspond à $\approx 10^8$ UFC/ml pour les bactéries et $\approx 10^6$ UFC /ml pour la levure).

Des boîtes Pétri coulées avec de la gélose Muller-Hinton à une épaisseur de 4 mm (20 mL) ont été ensemencées par écouvillonnage des suspensions bactériennes ou fongiques.

Par la suite, on dépose des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre coupés à partir du milieu Bennett gélosé.

Des disques d'ampicilline (10 μg), amoxicilline (25 μg) et de colistine (10 μg) ont été utilisés comme des contrôles positifs pour les bactéries et des disques de la nystatine (100 μg) pour la levure *Candida*. Figure16 :((A).(B).(C)et(D) les antibiotique utilisé)



Figure(A) ;Colistine



Figure(B) :Ampicilline



Figure(C) :Amoxicilline



Figure(D) :Nystatine

Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les disques.

Pour la lecture, on mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition dans les deux directions perpendiculaires autour des disques à l'aide d'une règle graduée sur le fond de la boîte.

On compare les résultats de l'antibiogramme aux valeurs critiques selon le diamètre d'inhibition, puis on classe la bactérie dans l'une des catégories :**Sensible**, **Intermédiaire**, ou **Résistance (CASFM, 2022)**.

Criblage par la technique des puits :

Les souches d'actinomycètes sont mises en culture dans 5 ml du bouillon Bennett (belyagoubi 2014), puis incubées 14 jours à $28\pm 1^\circ\text{C}$ et agitées environ chaque 2 h. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible gelose Muller Hinton (Conda) pour les bactéries et gelose Sabouraud pour la levure.

100 μL de la culture d'actinomycète est déposée dans chaque puits sur les milieux Mueller Hinton et Sabouraud. Après 2 heures d'incubation à la température de 4°C , les boîtes de Pétri sont incubées à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h. Les diamètres de la zone d'inhibition sont mesurés (Lemriss et al., 2003 ; Valanarasu et al., 2010)

8 Identification de souches d'actinomycétales actives

Critères morphologiques

Macromorphologie et caractères cultureux

L'aspect phénotypique de la colonie et les caractères cultureux sont déterminés sur les milieux Bennett et Amidon-caséine.

Les inoculums sont ensemencés par la méthode de stries. Après 7 et 14 jours d'incubation à $28\pm 1^\circ\text{C}$, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur chaque milieu sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence de pigments diffusibles dans la gélose autre que les pigments mélanoides sont notés (Shirling et Gottlieb, 1966).

Etude micro morphologique

Observation au faible grossissement

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (Grossissement $\times 40$) (Suzuki, 2001).

Observation au fort grossissement

Il s'agit d'une observation au microscope optique (Grossissement $\times 100$), après coloration de Gram. C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Delarras, 2007 ; Duraipandiyan et al., 2010).

9 Critères physiologiques et biochimiques

Hydrolyse de la gélatine

La souche est cultivée sur milieu gélose nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine pendant 14 jours à $30\pm 1^\circ\text{C}$. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (Geraldine *et al.*, 1981).

Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de 10 % (P/V) de lait écrémé en poudre dans de l'eau Physiologique sontensemencés puis incubés à $30\pm 1^\circ\text{C}$. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation et la peptonisation (digestion totale) du lait provoquées par la souche (Williams et Cross, 1971). Figure 17: le lait écrémé



Figure 17 : lait écrémé

Utilisation du citrate comme seule source de carbone

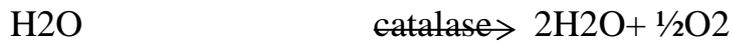
La pente du milieu de citrate de Simmons estensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette Pasteur stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à $30\pm 1^\circ\text{C}$. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (Marchal *et al.*, 1991).



Figure 18 : citrate de Simmons

Recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ 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 fraîche de H₂O₂ 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: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (**Delarras, 2007**).

Remarque :

La coloration de Gram, les tests de sensibilité aux antibiotiques et la recherche de catalase sont effectués pour les souches d'actinomycétales ainsi que pour les bactéries pathogènes.

Résultats et discussion

1 pH du sol :

Le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires par différents mycètes (**Dumenil et Sanglier, 1989**). De faibles variations de pH peuvent avoir des effets particuliers sur la productivité d'une souche (**Hata et al., 1971**). Le pH de notre échantillon est $7,81 \pm 0,042$ (figure18).



Figure18 : Mesure d pH du sable.

2 + Isolement des Actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique Caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat (**Belyagoubi, 2014**). Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu Bennett et incubées à 28 °C pendant 7 jours.

Les résultats montrent clairement, que les milieux ISP2et Bennett sont les plus favorable pour l'isolement des actinomycètes. 6 souches d'actinomycètes ont été isolées. Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc... (**Loqman, 2009**).

On constate que l'échantillon examiné représente un écosystème riche en glucides et matières organiques, ils se caractérisent par des pH légèrement alcalin.

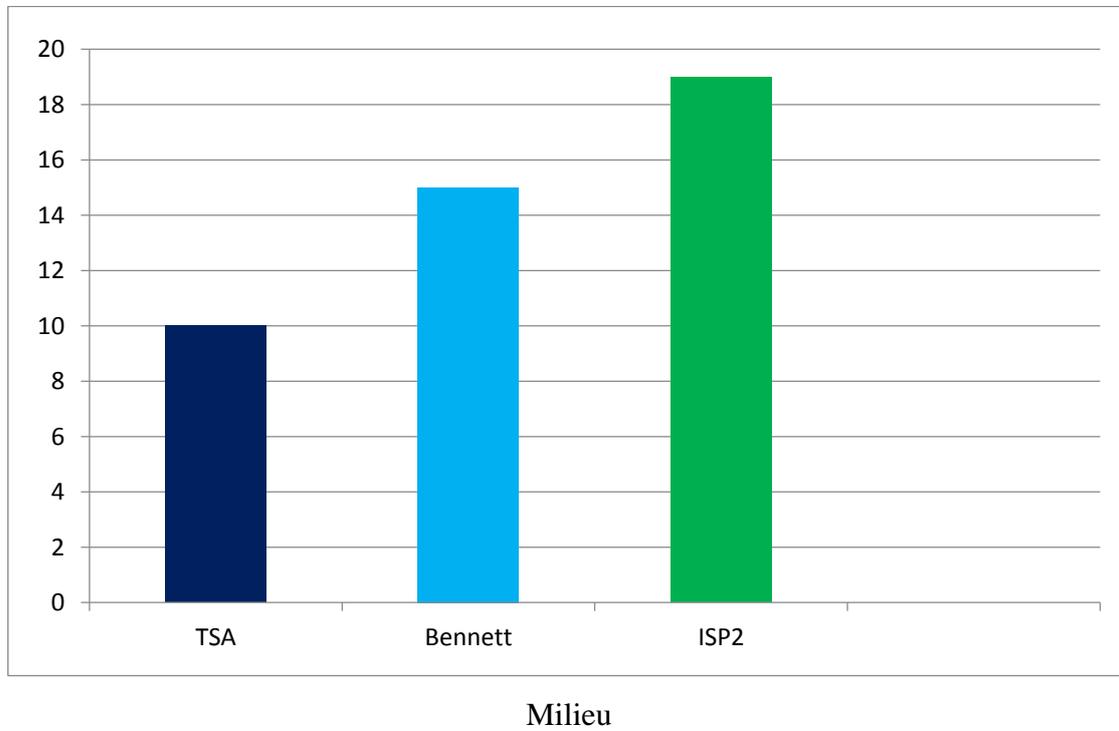


Figure19 : Nombre de souches isolées par milieu de culture

3 Observation microscopique

L'observation microscopique a été réalisée après une coloration de Gram, les résultats obtenus montrent que toutes les souches actinomycétales sont des Gram positif (figure 20)



Figure20 :Aspect des mycéliums sur milieu Bennett et ISP2, et Aspect du mycélium en verso sur milieu Bennett ,ISP2.

4 Identification des souches d'actinomycètes

L'identification morphologique, physiologique et biochimique a été effectuée pour les souches d'actinomycètes les plus actives sur les microorganismes pathogènes testés.

5 Etude morphologique

La caractérisation des souches est basée sur les critères morphologiques décrits dans le (tableau3)et (Figure21):

Tableau 3 : Origine d'isolement aspect des souches d'actinomycètes isolées.

Code de la souche	Source	Observations
A1	MilieuTSA_Ecoviant_Roche Noire2	Colonies blanche sec
A2	MilieuISP2_Ecoviant_RocheNoire	Une seule tâche blanche sec Une seule tâche vert
A3	MilieuTSA_Roche Noire	Plusieurs colonies vert et marron et une seule tâche blanche sec
A5	MilieuISP2_RocheNoire3	Des tâches vert au milieu des tâches blanches
A6	MilieuISP2_Ecoviant_RocheNoire2	Une seule tâche vert
A7	MilieuTSA_E3_10 ⁻⁷	2 tâches vert



Figure21 : Aspect macromorphologie des isolats d'actinomycètes étudiés.(les souches A1 et A2).

6 Étude physiologique et biochimique

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques de quelques souches actinomycétales testées sont réunis dans le tableau4. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de nos souches.

Tableau4 :Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales.

Caractéristiques Les souches	Hydrolyse de gélatine	Coagulation du lait écrémé	Recherche de catalase	Utilisation du citrate comme seule source de carbone
A1	-	+	-	+
A2	-	-	-	+
A3	-	-	-	+
A5	-	-	-	-
A6	-	-	-	+
A7	-	-	-	-

(-) : Test négatif, (+) : Test positif

Les souches actinomycétales cultivées se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception de A5 et A7 qui n'ont pas pu utiliser le citrate(figure23), et les souches A1 A2 A3 A5 A6 et A7 qui n'a pas hydrolysé la gélatine(figure22). La souche A1 il ya une action sur le lait écrémé représentée par la coagulation, alors que l'action du reste des souches(A2 A3 A5 A6 et A7) sur le lait écrémé ont représentée par la peptonisation(figure25). Toutes les souches sont catalase négatif (figure 24).



Figure22 : Hydrolyse de la gélatine



Figure23 : Utilisation du citrate de



Figure24 : Recherche de la catalase



Figure25 : Action sur le lait écrémé

Figure 22a25 : Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques de quelques souches actinomycétales testées

7 Méthode des puits :

Concernant la méthode des puits aucune zone d'inhibition n'a été observée contre des germes cibles à l'exception de la souche *S. aureus* où il y a l'apparition d'une faible zone d'inhibition de 8 mm de diamètre obtenue par la souche A3. Les résultats des molécules de référence utilisées dans cette méthode sont présentés dans la figure 26.



Figure26 : Photos des tests d'activité antimicrobienne des actinomycètes sur les souches

Tableau 5 : Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests

Antibiotique	Ef	Ec	BS	Sa	Pa	Kp	Ca
Amp	30,7±1,2 S	22±2 S	33±1,7 S	22±1,7 S	00±0 R	00±0 R	-
Amx	26±2 S	21±1 S	23±1,7 S	17,7±1,2 I	00±0 R	00±0 R	-
Col	00±0 R	13,3±0,6 I	10,7±1 I	00±0 R	14±1 I	14,3±2 I	-
Nys	-	-	-	-	-	-	36,3±2 S

R : Résistant ; S : Sensible ; I : Intermediare

Les actinomycètes existent dans divers habitats en nature y compris le sol qui est considéré comme le réservoir principal de ces bactéries (Davies et Williams, 1970). Ils constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes. Le criblage des souches d'actinomycète d'origine terrestre présente une nouvelle voie de recherche d'antimicrobiens naturels. La plupart des criblages concernant la recherche des substances antimicrobiennes à partir des souches d'actinomycètes ont été effectués sur des échantillons du sol.

Depuis, la découverte de la streptomycine par l'équipe de Waksman en 1943 à partir de bactéries du sol du genre *Streptomyces* et l'isolement de la nystatine, premier antibiotique antifongique, par Hazen et Brown en 1951 à partir de *Streptomyces noursei* provenant aussi du sol, plusieurs recherches ont été entreprises sur des souches d'actinomycètes d'origine terrestre. Différents types de sol, même des milieux extrêmes (désert), ont été explorés dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches produisant des produits nouveaux (Oswald et al., 1968; Hacène et al., 1994; Chiba et al., 1999; Hwang et al., 2001; Lee et Hwang, 2002; Meklat et al., 2011, Suela Silva, 2013).

8 Test d'activité antimicrobienne des Actinomycète

Les résultats obtenus, il montre d'une part que l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre, et d'autre part que pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (Boughachiche et al., 2005)(tableau5)

Tableau6 :l'activité antimicrobienne des actinomycètes

	Bs	Ca	Kp	Sa	Ec	Ef
1 TSA A1	0,8	/	/	/	/	/
2 A2	/	/	/	/	/	/
3 A3	/	/	/	/	/	/
Col	11	31	13	/	/	/
Ax	27	/	/	/	/	22

Ap	34	/	/	/	/	/
-----------	----	---	---	---	---	---

- Caractères microscopiques L'observation microscopique :

(figure27)

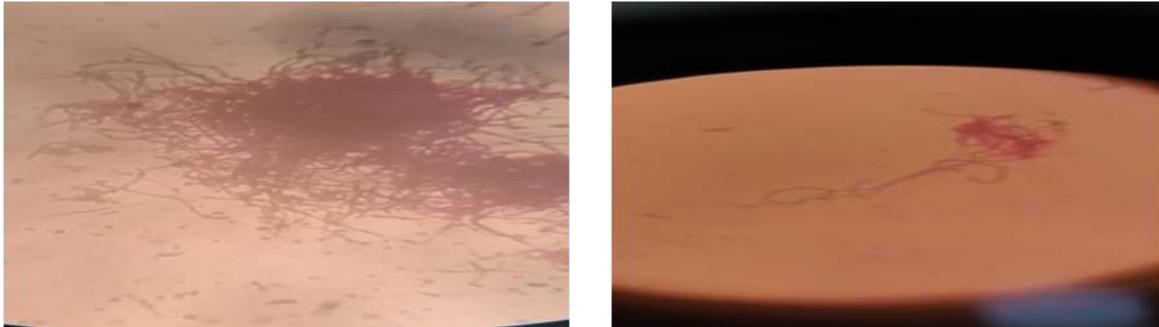


Figure27 : Observation des souches actinomycetales (G× 1000) après coloration de Gram.

Après coloration de Gram, et par la technique de culture sur la lamelle, a révélé l'appartenance de ces espèces aux bactéries Gram +.

Elles présentent un aspect filamenteux. Chez certains isolats le filament est constitué de spores qui forment des chaînettes plus ou moins longues, ayant également de spores dispersées ou rassemblées en amas ce qui les rapprochent de manière générale aux Actinomycètes filamenteux (**Flärdh et Bruttner, 2**)

9 Identification :

d'après les tests réalisés et l'observation microscopique les souches isolées sont probablement des *Streptomyces*.

D'après les travaux de nos collègues Benchikh Manel et Amara sarra, il a été obtenu les résultats suivants :

14 souches de moisissures ont été isolées à partir d'échantillons de grotte.

les genres prédominants sont *Aspergillus* et *penicillium* aucun résultat positif n'a été marqué dans la technique des puits

Le test d'activité antibactérienne des isolats a indiqué que 2 souches et qui présentent une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test et les souches S7, S10 ont propagées une activité contre *Bacillus subtilis*.

le colistine a un effet sur les microorganismes pathogènes avec de diamètres des zones d'inhibition entre 11.5 et 13 mm. Et l'ampicilline montre une sensibilité sur les souches pathogènes qui a des diamètres des zones d'inhibition entre 33 et 22 mm , et pour amoxiciline

qui a des diamètres des zones d'inhibition entre 14 et 27.5 mm contenant 2 souches résistantes, 5 souches sensibles et des souches intermédiaires.

La souche *Candida albicans* présente une sensibilité à la nystatine.

Ces résultats coïncident également avec celles rapportées par plusieurs auteurs qui mentionnent la présence constante de actinomycète dans la grotte de différentes régions dans le monde (Calvo et al., 1980).

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark and Zarnoch, 1992 ; Madigan et al., 1997 ; Subler and Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith et al., 2000).

Conclusion

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

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressive pour l'hôte semble toujours indispensable. Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

L'objectif de ce travail a été le criblage de souches d'actinomycètes à activité antibactérienne à partir des échantillons de la grotte d'Ighezer de la région de Timimoun. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des souches sur des microorganismes pathogènes par méthodes de cylindre d'agar et des puits.

Les résultats des tests morphologiques, physiologiques, biochimiques des bactéries étudiées montrent que les actinomycètes isolées de la grotte appartiennent *probablement* au genre *Streptomyces*.

Le test d'activité antibactérienne des isolats a indiqué que 2 souches et qui présentent une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test et les souches A1, A3 ont propagées une activité contre *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibition de l'ordre de 11.5 et 13 mm, respectivement .

Les compétences acquises dans ce domaine peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité des bactéries actinomycétales, des moisissures et leurs métabolites secondaires à activité biologique.

De même il serait très intéressant de réaliser une étude structurale et une identification complète des métabolites antimicrobiens produits par l'utilisation des techniques différentes notamment les spectres RMN ainsi que l'utilisation des méthodes d'analyses des substances bioactives qui doivent répondre à de nombreuses exigences: une grande sensibilité et surtout une très importante sélectivité.

Références bibliographiques

- **Abbott, S.L. (2007). Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM press,**
- **Abdelaziz, W. (2006). Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magister, option Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri de Constantine, Département des Sciences de la nature et de la Vie.**
- **Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. (2011).écologie microbienne de la grotte Lascaux.**
- **Alexander M. (1991). Introduction to soil microbiology, (edn) Willy .NewYork.**
- **Amanullah, A., Justen, P., Davies, A., Paul, G.C, Nienow, A.W., Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of Aspergillusoryzae and Penicilliumchrysogenum. BiochemEng J, 5**
- **Ameur. H & Ghoul. M & al. (2012). Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in Streptomyces sp. SF5. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Vol 3(3). Anonyme : Observation microscopique de Bacillus cereus, Disponiblesur internet : URL : <http://WWW.mybiolumix.com>.**
- **Anonyme : Observation microscopique de Klebsiellapneumoniae, Disponible sur internet : URL : <http://WWW.larevista.ec>.**
- **Aouar .L.(2006). Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Mémoire de magister :Microbiologie appliqué constantine, Algerie.**
- **Aouiche .A, Sabaou .V, Meklat .A, x Zitouni .A, Mathieu .F, Lebrihi .A. (2012). Antimicrobial activity of a Saharan Streptomyces spp. PAL111 strain againstvarious clinical and toxinogenic microorganisms resistant to antibiotics. Journal de Mycologie Médicale Baldacci, E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. Ann Soc.**
- **Bannerman, T., Peacock, S. J. (2007). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase Positive Cocci. In Murray, P.R., E. J., Baron, J. H., Jorgensen., Landry, M. L., M, A. Ed. Manual of Clinical Microbiology, (9th) Ed Washington, USA: ASM Press, Barnett, H. L. and Hunter, B.B.(1972).Illustred genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota(USA):3emeedition.**
- **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-polyeniquemircen J. 2**
- **Boudjella, H., Boutia, K., Zitounia, A., Mathieub, F., Lebrihib, A., Sabaoua N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of StreptosporangiumSg 10 isolated from a Saharan soil. MicrobiolRes,**
- **Belyagoubi, L.(2014) Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Th. doctorat : biologie : Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen.**

- Boudemagh, A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine. Algérie.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhah de Ain Mila. *Sciences & Technologie C*, 23 : 5– 10.
- Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M. F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*
- Camille Delarras (2007); microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Chaphalkar S.R. et Dey S. (1996) Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actinomycète*.
- Davies F. L., Williams S.T. (1970). Studies on the écologie of actinomycètes in soil. I. The occurrence and distribution of actinomycètes in a pine Forest soil. *SoilBiol. Biochem.*
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier
- Farris, M.H., Olson, J.B. (2007). Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *LettApplMicrobiol*,
- Gams, W. Haekstra, E.S. and Aptroot A. (1998). CBS. Course of mycology. Centralbureauvoor. SchimmelculturesBaarns. The Netherlabnd.
- HawksworthDL., Sutton B.C. ,Ainsworth gc (1995). Ainswoeth and Bisby's dictionary of the fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Hilali, L., Khattabi, A., Nssarlah, N., Malki, A., Finance, C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *RevBiolBiotech*
- Hapwood D.A.(1988). Toward's and understanding of gene switching i n *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. .R. .Soc.Land B.* 235: 121- 138.
- Hapwood D.A.(1988). Toward's and understanding of gene switching i n *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. .R. .Soc.Land B.* 235: 121- 138.
- Haslay C., Leclerc H. 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation.Lavoisier TEC &DOC. France
- Institut de Génie Rural, (1973). Travaux pratiques Guide de laboratoire. Suisse, 50 pages.
- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extremes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie.

- **Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. (2005). Isolation of actinomycètes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. J Med Mycol,**
- **Williams, S. T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D. I., Kuznetsov, V. D., Monnien F. J., Long, P. F., Maycroft, K. A., Palma, R. A., Petrolini, B., Quaroni, S., Todd, J. I., and West, M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. Res Microbiol,**
- **S. A. Waksman (1959), Ferdinand Cohn**
- **Institut de Génie Rural, (1973). Travaux pratiques Guide de laboratoire. Suisse,**
- **Zermane, F. (2008).Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organique de synthèse. Mémoire magister :Microbiologie appliquée, Université Mentouri Constantine.**

Annexes

Annexe 01

Composition des milieux de culture

Bennett

Extrait de levure 1g

Extrait de viande 1g

Peptone pancréatique de caséine 2g

Glucose 10g

Agar 15g

Eau distillée 1000 mL

pH 7,2

Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine 10g

Glucose 20g

Eau distillée 1000mL

pH 7.81

Sabouraud

Peptone de gélatine 10g

Glucose 20g

Agar 17g

Eau distillée 1000 mL

pH 17g

TSA (Gélose Trypticase de soja)

Trypticase 17 g

Soytone 3 g

Chlorure de sodium 5 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000ML

pH 7,2

ISP2

Extrait de levure

Extrait de malt

Glucose

Agar

Eau distillée

pH 7±0,2

4g

10g

4g

20g

Q.S.P 1000mL

Annexe 2

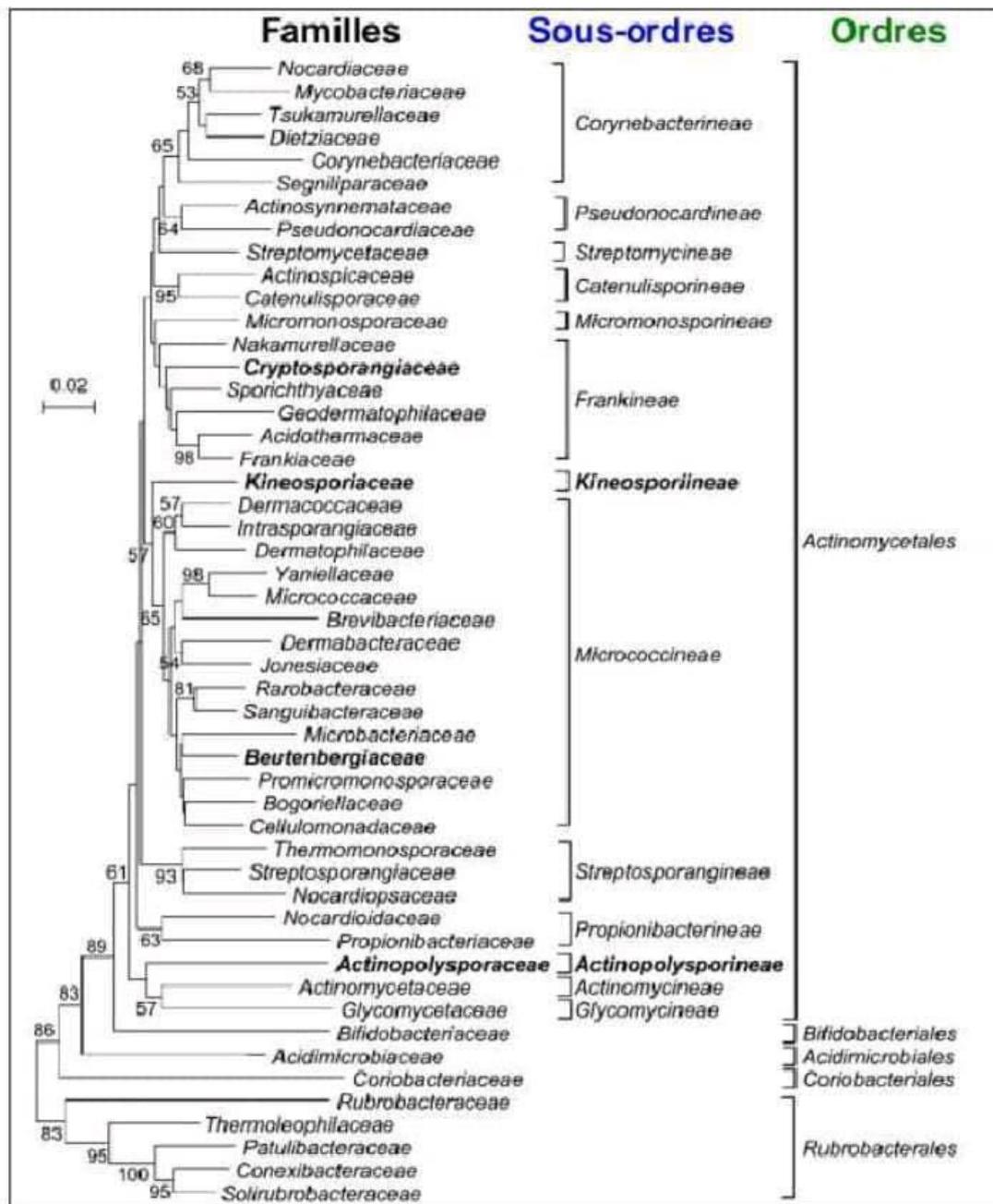


Figure 27 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).