



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Amira MOUSSI et Soumia KEDDAR

Le : lundi 28 juin 2021

Thème

**Caractérisation phénotypique et étude
préliminaire des activités enzymatiques et
inhibitrices des actinomycètes du sol**

Jury :

| | | | | |
|------|-----------------|-----|----------------------|------------|
| M. | ZEROUAL SAMIR | MCB | Université de Biskra | Président |
| Mme. | BABA ARBI Souad | MCB | Université de Biskra | Rapporteur |
| Mme. | DJOUAMAA MANEL | MAA | Université de Biskra | Examineur |

Année universitaire : **2020 -2021**

Remerciement

Merci a Dieu Le tout puissant qui nous a dotées de
volonté

Nous remercions madame BABA ARBI Souad
d'avoir accepté de diriger ce travail, pour sa patience et surtout ses
judicieux conseils

Nous remercions aussi les membres de juré pour avoir participé à ce jury et
pour efforts adressés à amélioré ce travail.

Un grand merci a tous ce qui ont contribué de prés ou de
loin pour que ce projet soit possible.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents, Pour leurs soutiens constants, leurs
amours et leurs mots d'encouragement

qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui

En ce jour votre fille espérée réaliser l'un de vos plus grands
rêves et couronner vos années de sacrifice et d'espoir.

Que Dieu tout puissants vous garde et vous procures santé,
bonheur et longue vie.

A ma sœur Hassna et mon frère Seif El Islam

A tous ceux qui m'ont soutenu Leila, Karim, Sara, Karima

A tous mes amis (es).

Amira

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers Parents que Dieu les protège.

Et à mes frères, Youssef ,Othman, Hamza, Yasser, Mohammed.

Et à ma sœur unique, Souad, et ses enfants : djida, Jahid, Adam.

Et à mon fiancé Khaled Fadel, que Dieu le protège

A toute la famille KEDDAR et FADEL.

A mes sœurs qui me les ont données pour étudier : Hana Mokeddem, Hajar
Arar, Imane Benkadi.

A mes très chères amies Surtout : Boutheina, Khawla, Wafa ,Manal .

A mon binôme Amira, je lui souhaite succès.

Soumia

Table des matières

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| Liste des tableaux | I |
| Listes des figures | II |
| Listes des abréviations | III |
| Introduction | 1 |
| Partie Théorique | |
| Chapitre1: Généralités sur les actinomycètes | |
| 1.1. Définition : | 2 |
| 1.2. Cycle de vie : | 2 |
| 1.3. Classification | 3 |
| 1.4. Taxonomie et critères d'identification..... | 3 |
| 1.4.1. Taxonomie phénotypique..... | 4 |
| 1.4.3. Taxonomie moléculaires : | 5 |
| Chapitre 2 :L'interet des actiomycètes | |
| 2.1. Importance des actinomycètes dans le domaine agronomique | 6 |
| 2.2. Production des substances biologiquement actives | 6 |
| 2.2.1. production antimicrobienne | 6 |
| 2.2.1.1. Les Antibiotiques | 7 |
| 2.2.1.2. Les Antifongiques | 7 |
| 2.2.2. Production des enzymes..... | 8 |
| Partie Expérimentale | |
| Chapitre 3 : Matériel et méthodes | |
| 3.1. Isolements | 10 |
| 3.2. Caractérisation phénotypique | 10 |
| 3.2.1. Activité antimicrobienne..... | 10 |
| 3.2.2. Autres méthode d'activité antifongique | 12 |
| 3.2.3. Activité enzymatique | 13 |
| 3.3. Caractérisation génotypique : Etude moléculaire..... | 14 |
| 3.3.1. Extraction de gène de l'ARN ribosomique16S..... | 14 |
| 3.3.2. Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose | 14 |
| 3.3.3. Séquençage de gène de l'ARN ribosomique 16S | 15 |
| 3.2.4. Analyse phylogénétique..... | 16 |

Chapitre 4 :Résultats et discussion

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1. Résultats et discussion de caractérisation phénotypique des isolats d'actinobactéries .. | 17 |
| 4.1.1. Activité antimicrobienne..... | 17 |
| 4.1.2. Activité enzymatique : | 20 |
| 4.2. Résultat et discussion de l'étude moléculaire..... | 23 |
| Conclusion..... | 26 |
| Bibliographie..... | 28 |
| Annexes | |
| Résumé | |

Liste des tableaux

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. Principaux caractères physiologiques des actinobactéries | 2 |
| Tableau 2. Classification des actinomycètes selon le manuel de Bergey, 2012 | 3 |
| Tableau 3. Exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes | 7 |
| Tableau 4. Exemples desQuelques actinobactéries producteurs d'enzymes. | 8 |
| Tableau 5. Séquencesdesamorcesutiliséesen PCR..... | 15 |
| Tableau 6. Activités antimicrobiennes | 17 |
| Tableau 7. Données générales sur l'uricase | 23 |
| Tableau 8. Résultats de l'analyse de similarité..... | 24 |

Listes des figures

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide | 3 |
| Figure 2. Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés | 4 |
| Figure 3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par méthode des cylindres d'agar | 11 |
| Figure 4. Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats des actinomycètes travaux entrepris sur l'hydrolyse de l'amidon par les actinomycètes confirment les résultats obtenus | 20 |
| Figure 5. Photographie présentant le résultat de la dégradation de l'amidon par des souches d'actinomycetes..... | 21 |
| Figure 6. Photographie présentant le résultat de l'activité cellulolytique de souche d'actinomycètes..... | 22 |
| Figure 7. Photographie présentant le résultat d'activité pectinolytique des souches d'actinomycètes..... | 22 |
| Figure 8. Photographies présentant le résultat positif de l'activité uricase de quelques souches actinomycétales étudiées sur le milieu contenant de l'acide urique. | 23 |

Listes des abréviations

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| MA: | Mycélium aérien |
| MS: | Mycélium de substrat |
| ISP: | The International Streptomyces Project |
| GYEA: | Glucose–YeastExtract-Agar |
| SCA: | Starch Casein Agar |
| ZI : | Zone d’inhibition |
| Sp : | Species (espèce). |
| PH : | Potentiel d’hydrogène |
| GC(%): | Pourcentage guanine et cytosine |
| ADN : | Acide Désoxyribonucléique |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| ADNr : | Acide désoxyribonucléique ribosomal |
| ARNr : | Acide ribonucléique ribosomal |
| ISP : | International Streptomyces Project (milieu de culture) |
| µm : | Micromètre |
| PCR : | Polymerase chain réaction |

Introduction

Les Actinomycètes représentent une partie importante de la population microbienne du sol, où ils sont trouvés de la surface jusqu'à plus de deux mètres de profondeur (Breton *et al.*, 1989). Ces bactéries sont des procaryotes très recherchés en divers domaines à cause de leur rôle important dans la production de substances biologiquement actives telles que les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (Boer *et al.*, 2005).

Ces métabolites bioactifs suscitent actuellement un intérêt grandissant, en raison de l'impact important de leurs utilisations pour des applications biotechnologiques. Des milliers de substances sont répertoriées, et la majorité d'entre elles sont destinées aux applications dans le domaine pharmaceutique. Mais certains composés sont également susceptibles d'être exploités dans divers domaines importants de la vie, notamment : alimentaire, agricole, cosmétique et enfin l'industrie des détergents (Boudjalal, 2012).

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des champignons et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques antibactériens et antifongiques qui jouent le rôle d'agents de contrôle de plusieurs pathologies (Toumatia, 2015). Ainsi ayant un potentiel pour les applications médicales (Benouagueni, 2012).

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes. En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases, des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Syed *et al.*, 2009).

Les travaux sur les actinomycètes et leur capacité dans la production des antibiotiques et enzymes dans la région aride sont rares, c'est pour ça qu'on a choisi d'étudier ce sujet.

Selon les études précédentes dans lesquelles ce travail actuel a été réalisé, les travaux des chercheurs ont été analysés à partir d'une étude comparative d'articles scientifiques pertinents pour notre thème, les objectifs de base ont été identifiés comme suit :

Criblage des souches d'actinomycètes produisant des substances à effet inhibiteur contre les bactéries et les champignons pathogènes, et étude de molécules bioactives telles que les activités enzymatiques, et enfin réaliser une étude phénotypique et des caractérisations préliminaires de ses souches d'actinomycètes.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les actinomycètes

1.1. Définition :

On peut définir les Actinobactéries comme des Eubactéries Gram positives à structure végétative de type mycélien (Stanier *et al.*, 1966 ; Pandey *et al.*, 2004 ; Rosilma *et al.*, 2016) Les actinobactéries sont l'un des phylums dominants de la bactérie, présentent un groupe à une teneur élevée en guanine et en cytosine (GC = 55%) (Ventura *et al.*, 2007 ; Hogan, 2010). Ils font partie de la flore microbienne de la plupart des substrats naturels (Hotam *et al.*, 2013).

Le mot « Actinomycètes » c'est l'ancien nom des actinobactéries provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». Cette expression utilisée pour les désigner en anglais (Ray fung), ce terme rassemble un grand groupe de bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire, des filaments à croissance centrifuge (Stackebrandt et Schumann, 2006 in Toumatia, 2015).

Les actinobactéries sont influencée par les conditions telles que l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la nature et l'abondance de la matière organique (Basilio,2003) (Tableau 01).

Tableau 1.Principaux caractères physiologiques des actinobactéries (Djaballah, 2010).

| Caractères physiologiques | Caractéristiques |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Taux d'humidité | Faible à modérés (Oskay <i>etal.</i> , 2004 ; Prescott <i>etal.</i> , 2010) |
| Température | Mésophile à thermophile 50 °C- 60 °C (Holt <i>et al.</i> , 1994) |
| PH | Neutrophile : 5 - 9 (Lee et Hwang, 2002) |
| O ₂ | 1-Aérobic (sol) 2- Fermentatif (cavité naturel homme animale) <ul style="list-style-type: none"> • anaérobic facultatif. • Anaérobic (Silini, 2012) |

1.2. Cycle de vie :

Les actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe, qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation cellulaire puis la mort (Tighidet, 2010 ; Danilenko *et al.*, 2005), leur cycle de vie commence par la germination des spores, ce processus nécessite la présence d'ions calcium. La germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (Figure 01) (O'gara *et al.*, 2008).

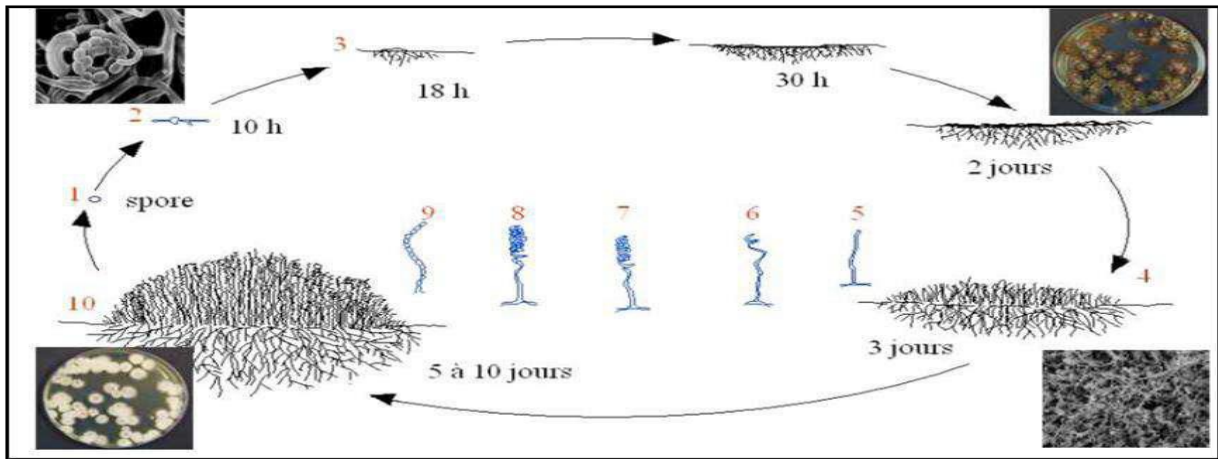


Figure 1. Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

1.3. Classification

Les actinomycètes sont classés dans le Règne des Procaryotes, le Domaine des Bacteria ou Eubacteria, le Phylum des Actinobacteria, la Classe des Actinobacteria, la Sous-classe des Actinobacteridae et l’Ordre des Actinomycetales (Euzéby, 2011). Selon (Goodfellow *et al.*, 2012), le phylum Actinobacteria est divisé actuellement en cinq classes qui sont elles même subdivisées en plus de 15 ordres. Les plus importants sont ceux des Actinomycetales et Streptomycetales.

Tableau 2. Classification des actinomycètes selon le manuel de (Bergey, 2012).

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

1.4. Taxonomie et critères d’identification

La taxonomie actuelle des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. La plupart des genres peuvent

être définis par des critères morphologiques et chimiques, tandis que la détermination des espèces repose sur les critères physiologiques et moléculaires (Bouazizi S, 2018), dans cette étude on basée sur les caractères morphologiques et moléculaires.

1.4.1. Taxonomie phénotypique

1.4.1.1. Caractères morphologiques

Les caractères macromorphologiques et culturaux des actinobactéries sont déterminés à partir :

1.4.1.1.1. Caractéristiques macromorphologiques

Il s'agit alors de noter :

- ✓ La présence ou l'absence de mycélium aérien (MA).
- ✓ La couleur du MA et du mycélium de substrat (MS).
- ✓ La production et la couleur des pigments diffusibles.
- ✓ La production ou non de pigments mélanoïdes.

Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.(Bouras *et al.*,2008) , La figure ci-dessous montre une coupe transversale d'une colonie d'actinomycète.

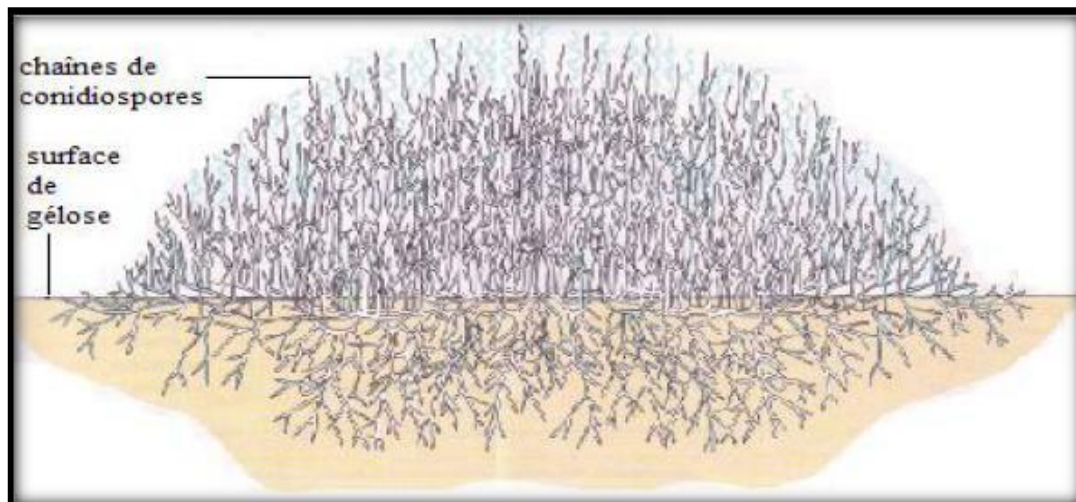


Figure 2. Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants(bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (Prescott *et al.*, 2003).

1.4.1.1.2. Caractéristiques micro morphologiques :

- ✓ Fragmentation ou non du MS.
- ✓ Présence de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges ainsi que la longueur des sporangiophores.
- ✓ 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.
- ✓ Mode de sporulation: spores porté par des sporophores ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en spores.
- ✓ Présence de spores mobiles ou non mobiles.
- ✓ Ornementation de la surface des spores (lisse, rugueuses, épineuses ou chevelues).
- ✓ Formation de structures particulières: faux sporanges, etc.. (Boudjalal, 2012 ; Harir,2018)

1.4.3. Taxonomie moléculaires :

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie des actinobactéries sont :

- ✓ Le séquençage du gène codant pour l'ARNr16s
- ✓ L'hybridation ADN-ADN
- ✓ La détermination du pourcentage de guanine-cytosine de l'ADN génomique.

Analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16s

L'ARNr 16s est un outil rapide et fiable pour la classification phylogénétique et l'identification des bactéries (Stackebrandt et Schumann,2006). Lorsque le taux de similarité entre les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16s de deux souches est inférieur à 98,65%, ces souches appartiennent à deux espèces différentes .Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 98,65%, le placement de deux souches dans une même espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN (Kim *et al.*, 2014).

Chapitre 2 :

L'interet des actinomycètes

2.1. Importance des actinomycètes dans le domaine agronomique

Dans l'agriculture, les actinomycètes influencent sur la croissance des plantes grâce à leurs activités antimicrobiennes au niveau du sol et augmentent la vitesse de synthèse et de minéralisation de la matière organique permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes (Yilma, 2008). Ils participent donc activement à la fertilisation des sols (Boudjalal, 2012).

Les actinobactéries jouent un rôle important dans le domaine agronomique. Ainsi, le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes, provoquant des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte (Zaitlinet Watson, 2006).

En plus ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité de dégrader des substances complexes et incapables d'être décomposés par les autres bactéries non mycéliennes et les champignons (Lamari, 2006).

Elles sont également capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par les champignons toxigènes et réduire ainsi leur teneur dans les produits fins en agro-alimentaire (Bouazizi, 2018).

2.2. Production des substances biologiquement active

Les actinomycètes sont connus pour leur production de substances biologiquement actives telles les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (Boer *et al.*, 2005).

2.2.1. Production antimicrobienne

Le plus grand intérêt des actinobactéries reste leur grande capacité à produire des antibiotiques qui peuvent potentiellement détruire ou inhiber divers microorganismes. Les antibiotiques secrets par les actinobactéries peuvent être à activité antibactériennes et/ou antifongiques (Mann, 2001).

La recherche de nouveaux actinomycètes due à la découverte de médicaments ont un large spectre d'activité biologique, tels que les antibiotiques antibactériens et antifongiques et des antioxydants cytotoxiques, des agents antitumoraux, antiviraux et anticancéreux (Newman et Cragg, 2007).

2.2.1.1. Les antibiotiques

Historiquement, la découverte de la pénicilline (Fleming, 1929) a ouvert la voie à d'autres recherches et elle a été rapidement suivie par la découverte d'un grand nombre d'antibiotiques à partir de microorganismes en particulier les actinomycètes.

La période des années 1940-1960 appelée "âge d'or des antibiotiques", fut marquée par la mise en évidence des principaux antibiotiques sécrétés par des actinomycètes, tels que : actinomycine (1940), streptothricine (1942), streptomycine (1943), griséine (1946), néomycine (1948), fradicine, candicidine, candidine, etc.... (Clardy *et al.*, 2009).

Ces produits naturels ont des potentialités de lutter contre certaines maladies majeures comme le cancer, le HIV, l'infections du protozoaires et d'inflammations sévères et autres (Hassan *et al.*, 2017).

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux. Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation pour augmenter les rendements zootechniques (Vijayakumar *et al.*, 2007 ; Khachatourians, 1998).

Ces antibiotiques peuvent agir à différents niveaux de la cellule(paroi, membrane plasmique, ribosomes, ADN, ARN, etc...) (Saker,2018).

Le genre *Streptomyces* est la source la plus importante de ces antibiotiques (Sanchez et Barana, 1996 ; Hwang *et al.*, 2001 ; Saadoun et Gharaibeh, 2003).

2.2.1.2. Les antifongiques

Les antifongiques représentent près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes (Berdy *et al.*, 1987) surtout par des actinobactéries ou des champignons (Breton *et al.*, 1989).

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques) dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux (Bastide *et al.*, 1986).

Tableau 3.Exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes (Louci K, 2010).

| Actinomycètes producteurs | Antibiotiques | Références |
|--------------------------------------|---------------|----------------------------------|
| 1 : Les agents antibactériens | | |
| <i>Micromonosporasp</i> | Clostomycine | (Takahashi <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>Streptomycesgriseus</i> | Candicidine | (Jin nez <i>et al.</i> , 2009) |

| | | |
|--------------------------------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Streptomyceslydicus</i> | Streptolydigne | (Liu <i>et al.</i> ,2007) |
| <i>Streptomyceslindensis</i> | Rétamycine | (Inoue <i>et al.</i> ,2007) |
| <i>Marinisorasp</i> | Marinomycines | (Sturdikova et sturdik,2009) |
| <i>Verrucosisporasp</i> | Abyssomycine | (Sturdikova et sturdik,2009) |
| 2 : Les agents antifongiques | | |
| <i>Streptomycesgriseochromogenes</i> | Blasticidine | (Fukunaga <i>et al.</i> ,2008) |
| <i>Streptomyceshumidus</i> | Phenylacétate | (Hwang <i>et al.</i> ,2001) |
| <i>Nocardiatransvalensis</i> | Transvalecine | (Mukai <i>et al.</i> ,2006) |
| <i>Streptomycesnodosus</i> | Amphotéricine | (Carle <i>et a.</i> ,2003) |

2.2.2. Production des enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (Theilleux, 1993).

Les actinomycètes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter des molécules complexes à l'intérieur de leurs cytoplasmes. Ils synthétisent des enzymes extracellulaires pour décomposer ces molécules en nutriments utiles et essentiels. Ces sources de substances bioactives possèdent une capacité hydrolytique extracellulaire importante, qui trouve des applications dans les industries, de textile, des bio-raffineries, d'agroalimentaires, papèteries et pharmaceutiques (Janaki, 2017). Le tableau ci-dessous présente quelques exemples d'enzymes produits par les actinobactéries.

Tableau 4. Exemples des Quelques actinobactéries producteurs d'enzymes (Saci, 2012).

| Genre ou espèce d'actinomycète | Enzyme |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ✓ <i>Streptomyces</i> | Cellulases |
| ✓ <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> ✓ <i>Streptomyces viridosporus</i> ✓ <i>Streptomyces fusca</i> | Laccases |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ✓ <i>Micromonospora</i> ✓ <i>Microbispora</i> ✓ <i>Actinoplanes</i> ✓ <i>Streptosporangium</i> ✓ <i>Streptomyces</i> | Pectinases |
| ✓ <i>Streptomyces</i> ✓ <i>Promicromonospora</i> ✓ <i>Microbispora</i> ✓ <i>Micromonospora</i> ✓ <i>Thermomonospora</i> | Xylanases |
| ✓ <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> ✓ <i>Thermomonospora curvata</i> ✓ <i>Saccharomonospora viridis</i> ✓ <i>Streptomyces</i> | Amylases |
| ✓ <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> ✓ <i>Streptoverticillium</i> ✓ <i>Micromonospora chalcea</i> | Lipases |

Partie Expérimentale

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Des articles scientifiques pertinents sur notre thème Caractérisation phénotypique et étude préliminaire des activités enzymatiques et inhibitrices des actinomycètes du sol ont été lus et analysée pour réaliser cette travaille.

3.1. Isolements

Les isolats étudiés dans ce travail ont été prélevés à partir de différentes régions arides et semi-arides du sol.

Plusieurs échantillons d'actinomycètes du sol ont été prélevés à partir de différentes régions des Saïda ; Ouest de l'Algérie ; de Sebkh de Kenadsa ; de Bechar ; Beni Abbes ; de la Ghardaï ; différents sols de 7 sites du désert du Sahara algérien ; de Hoggar, Tamanrasset ; KwaZulu-Natal, Sud de l'Afrique et de Tamanrasset par Gacem *et al.*, (2020) ; Messaoudi *et al.* (2015) ; Badji *et al.*, (2006) ; Aouiche *et al.*, (2012) ; Selama *et al.*, 2014 ; Lahoum *et al.*, (2016) ; Okudoh et Wallis, (2007) ; Boubetra *et al.*, (2013).

La méthode de suspension-dilution est la plus utilisée dans l'isolement des différents souches à partir de diverses régions, a été préparée par un gramme de sol de chaque échantillon a été mise en suspension dans 9 ml d'eau distillée stérile et diluée en série jusqu'à l'obtention de la dilution (10^{-2} à 10^{-4}). Par la suite, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur un milieu d'isolement approprié. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C et observées quotidiennement, pendant 7-21 jours (Boubetra *et al.*, 2013 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Okudoh et Wallis, 2007 ; Lahoum *et al.*, 2016 ; Selama *et al.*, 2014 ; Messaoudi *et al.*, 2015 ; Leulmi, 2018 ; Gacem *et al.*, 2020).

3.2. Caractérisation phénotypique

3.2.1. Activité antimicrobienne

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la recherche de l'activité antimicrobienne des actinobactéries, telles que la :

3.2.1.1. Méthode de stries croisées

Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinobactérie en un seul trait à la surface du milieu solide ISP2(annexe 1) et en bordure de la boîte de pétri.

Après l'incubation des boîtes de pétri pendant 10 jours à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, les microorganismes cibles sont ensemencés perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie.

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et la souche cible, après 24h d'incubation pour les bactéries, et 48h et 72h respectivement pour les levures et les champignons (Boubetra *et al.*, 2013 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Okudoh et Wallis, 2007).

3.2.1.2. Technique de cylindre d'agar

Cette méthode consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries en stries très serrées à l'aide d'une anse stérile et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2, Bennett, ISP1 GYEA (annexe 1). Les boîtes sont incubées à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 14 jours (Lahoum *et al.*, 2016; Meklat, 2012 ; Hajar *et al.*, 2014 ; Selama *et al.*, 2014) .

Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont découpés aseptiquement à l'aide d'un emporte pièce puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton, préalablement ensemencé par les différentes souches cibles (Djinni, 2009).

Les boites ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h (Messaoudi *et al.*, 2015; Leulmi, 2018), avant d'être incubées à 37°C . Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 37°C .

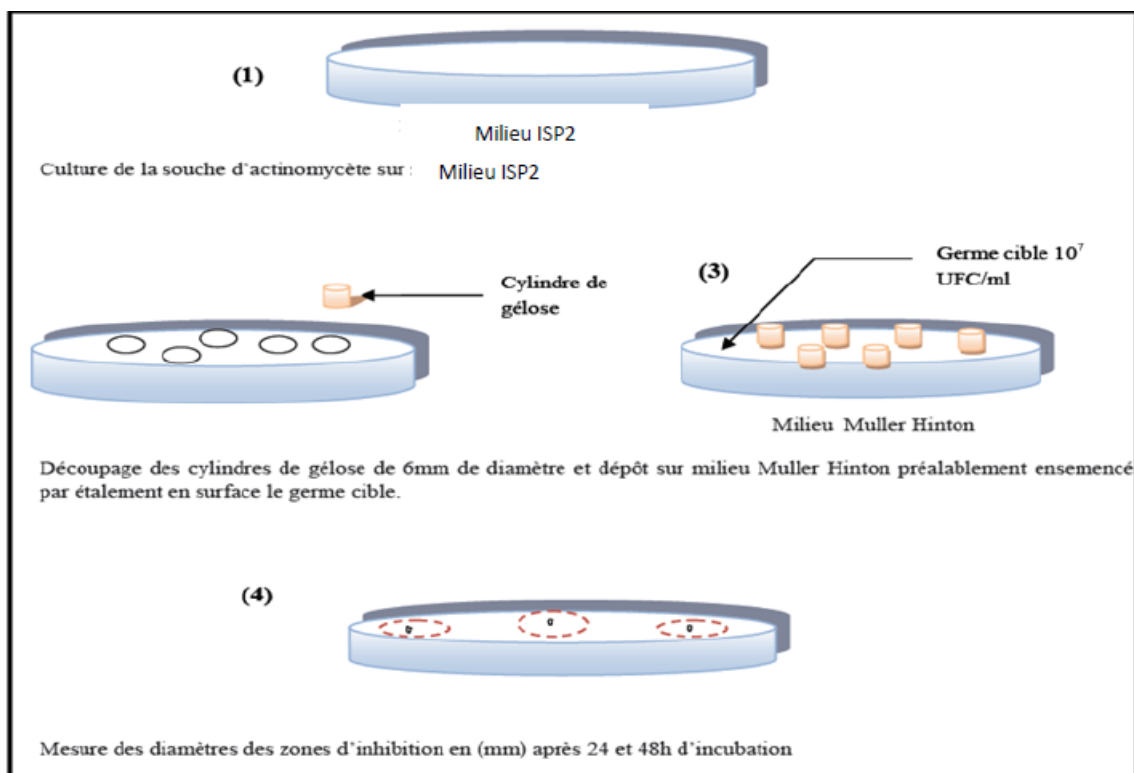


Figure 3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par méthode des cylindres d'agar (Bastide *et al.*, 1986 ; Lemriss *et al.*, 2003)

3.2.1.3. Technique de diffusion des puits

Toute la surface de la gélose est inoculée en répartissant un volume microbien. Ensuite, un trou d'un diamètre de 6 à 8 mm est perforé aseptiquement avec un alésage stérile ou une pointe, et un volume (20 à 100 µl) de l'agent antimicrobien ou de la solution d'extraction à la concentration désirée est introduit dans le puits.

Puis les plaques d'agar sont incubées dans des conditions appropriées en fonction du microorganisme d'essai. L'agent antimicrobien se diffuse dans le milieu gélose et inhibe la croissance de la souche microbienne testée (Balouiri *et al.*, 2016 ;Gacem *et al.*, 2020).

Après 24h d'incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des puits contenant les extraits d'actinomycètes contenant des antibactériens actifs contre la souche test. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, en utilisant une règle graduée. La présence de zones d'inhibition claires autour des puits, indique un résultat positif (Petrosyan *et al.*, 2003).

3.2.2. Autres méthode d'activité antifongique :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des actinobactéries vis-à-vis des champignons phytopathogènes, on peut utiliser les deux méthodes précédemment descriptifs cylindre d'agar et stries croisées, ainsi par la méthode suivante :

Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri

La capacité des souches bactériennes à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes a été testée par la méthode de confrontation directe en boîte de Pétri sur milieu PDA (Inam-ul-Haq *et al.*, 2003).

Le principe de la méthode est d'ensemencer la souche bactérienne en trait à l'aide d'une anse stérile. Après incubation à 30°C pendant 48h, une pastille mycélienne de 08 mm de diamètre prélevée au bord d'une jeune colonie fongique âgée de 7 jours puis déposée à environ 3 cm de la souche antagoniste testée.

L'incubation des boîtes est effectuée à 28± 2°C à l'obscurité pendant 10 jours. Pour chaque essai, le dispositif expérimental est répété trois fois.

Lecture des résultats :

L'inhibition de la croissance fongique a été évaluée par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne est estimée selon la formule suivante (Wang *et al.*,

2002) : (%) inhibition = (R1 témoin – R2 test)/ R1 témoin x100 OÙ, R1 témoin : distance radiale (en mm) de la croissance mycélienne en absence de la souche antagoniste (contrôle).

R2 test : distance radiale (en mm) de la croissance mycélienne en direction de la souche bactérienne. Il est à noter qu'à partir de 20%, on peut parler d'inhibition.

3.2.3. Activité enzymatique

3.2.3.1. Activité amylolytique (amylase)

Pour la recherche d'amylase a été effectué par réaction d'hydrolyse de l'amidon, les isolats de ont été inoculés sur milieux Bennett, ISP9, gélose de Gausse (annexe 1), additionné d'une concentration d'amidon de 1 à 2 %. et les plaques ont été incubées à 28°C pendant 4-7 jours.(Santos *et al.*, 2012; Gunasinghe *et al.*,2020 ; Praveen Kumar *et al.*,2015).

Après croissance des bactéries, 4 ml de solution d'iode ont été chargés sur chaque plaque et la zone de clairance observée autour des colonies a été observée. Les résultats ont indiqué la présence de l'enzyme amylase (Santos *et al.*, 2012; Gunasinghe *et al.*,2020 ; Praveen Kumar *et al.*,2015).

3.2.3.2. Hydrolyse de caséine

Ce teste est étudié sur une gélose contenant 5% de lait écrémé ou ISP9 (annexe 1) avec 20% de lait écrémé (Viswanathan *et al.*, 2015 ; Habbeche *et al.*, 2013 ; Jani *et al.*, 2012).

Après une période d'incubation de 7 jours à température 30 C°, l'hydrolyse de la caséine est témoignée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Gordon et Smith, 1953 ; Kitouni, 2007 ;Raval *et al.*, 2012 ; Roy *et al.*, 2014).

3.2.3.3. Hydrolyse de la cellulose

Une anse de culture d'actinobactéries isolées a été inoculée sur des plaques de carboxyméthyl cellulose et incubée à 30°C pendant 7 jours (Gunasinghe *et al.*,2020 ;Saini *et al.*, 2016; Jeffrey, 2008).

Afin de visualiser les zones hydrolysées, les plaques ont été inondées avec une solution de rouge Congo à 0,1% puis lavées avec du NaCl 1M (Sethi *et al.*, 2013) ou une solution de l'iode de Gram qui forme un complexe bleu-noir avec de la cellulose mais pas avec cellulose hydrolysée, donnant une zone nette et distincte autour du microorganisme producteur de cellulase en 3 à 5 minutes (Kasana *et al.*, 2008; Rathnan et Ambili, 2011).

3.2.3.4. Hydrolyse de pectine

Ce test est réalisé sur le milieu ISP9 ajouté de 1 % de pectine. Les colonies sont ensemencées par stries ou par touches puis incubé pendant 5 ou 7 jours à 28° C (Priyanka, 2019). Les boîtes sont recouvertes par la solution d'acétate de cuivre et laissées à température ambiante pendant quelques minutes.

L'apparition d'un halo clair indique la présence d'une activité pectinolytique (Priyanka, 2019) par contre, Des halos d'hydrolyse ont été détectés par inondation en utilisant une solution à 1% (p/v) de précipitant de polysaccharide bromure de cetyltriméthyle ammonium (CTAB), dissoutes dans une solution alcoolique à 15% et ensuite utilisées et reste pendant une heure (1h), les colonies produisant de la pectinase ont montré des zones claires contre une couleur opaque du milieu non hydrolysé selon (Saoudi *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2012).

3.2.3.5. Recherche de l'uricase

L'uricase a été recherchée sur une gélose contenant de l'acide urique selon la méthode Naggar, 2015.

L'ensemencement c'est fait par des stries de la souche à tester et l'incubation a été effectuée à 30°C. Après 3 jours, l'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de l'acide urique.

3.3. Caractérisation génotypique : Etude moléculaire

Les techniques moléculaires la plus utilisé dans l'analyse de fragments d'ADN des actinomycètes sont l'amplification par PCR, suivi par Séquençage de gène de l'ARN ribosomique 16S (Aouiche *et al.*, 2015).

3.3.1. Extraction de gène de l'ARN ribosomique 16S

L'ADN génomique est obtenu à partir d'une colonie d'actinobactérie cultivée sur milieu ISP2 (annexe1) solide et incubée à 30°C pendant 5 jours.

La méthode utilisée pour l'extraction est celle d'ébullition. Les cellules bactériennes ont été bouillies dans 300 ul d'eau distillée stérile pendant 15 minutes ; les surnageant ont été recueillis par centrifugation à (10000 g pendant 5min) (Badji *et al.*, 2006 ; Gacem *et al.*, 2020 ; Aouiche *et al.*, 2012) .

3.3.2. Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose

La séquence partielle de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR en utilisant un couple d'amorces universelle (Tableau 05).

Tableau 5.Séquences des amorces utilisées en PCR.

| Amorces | Séquences | Références |
|--------------|---------------------------|--------------------------------|
| 27f | 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 | (Badji <i>et al.</i> , 2006) |
| 1492R | 5-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3 | |
| 27F | 5-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' | (Gacem <i>et al.</i> , 2020) |
| 1492R | 5-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3 | |
| 27F | 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 | (Aouiche <i>et al.</i> , 2012) |
| 1492R | 5-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3 | |

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf, Mastercyclergradient) avec une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min. Puis (35) cycles d'amplification, avec une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, l'hybridation à 54°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 60 sec. Ensuite une étape d'extension finale est réalisée à 72°C pendant 05 min. (Badji *et al.*, 2006 ; Gacem *et al.*, 2020 ; Aouiche *et al.*, 2012)

Après PCR, les amplifiats obtenus sont visualisés sur gel d'agarose, ces derniers pour le but de séparer les fragments d'ADN, de vérifier leur qualité et déterminer leur taille.

En suite la purification a été effectuée à l'aide d'un kit de nettoyage (Badji *et al.*, 2006 ; Gacem *et al.*, 2020 ; Aouiche *et al.*, 2012) .

3.3.3. Séquençage de gène de l'ARN ribosomique 16S

Les séquences nucléotidiques des produits PCR ont été obtenues par la méthode de séquençage de Sanger, par GATC Biotech Inc. (Constance, Allemagne).

Les amorces utilisées pour déterminer la séquence nucléotidique étaient les mêmes que celles utilisées pour l'amplification PCR et pour l'analyse des produits séquencés.

En suite la séquence a été comparée pour la similarité avec les espèces de référence de bactéries contenues dans les banques de bases de données génomiques, en utilisant le NCBI BLAST disponible sur <http://www.ncbi.nih.gov/>. (Badji *et al.*, 2006 ; Gacem *et al.*, 2020 ; Aouiche *et al.*, 2012) .

3.2.4. Analyse phylogénétique

Les séquences de gène ARNr 16S des isolats de (Badji *et al.*, 2006 ;Gacem *et al.*,2020 ;Aouiche *et al.*, 2012) sont comparées, grâce au BLAST avec des séquences homologues des espèces de référence répertoriées dans les banques génomiques.

Ces séquences sont alignées grâce au logiciel Clustal W. Ce dernier permet d'aligner successivement les séquences les plus proches en procédant de façon hiérarchique et d'obtenir un arbre phylogénétique basé sur l'homologie entre ces séquences.

Les analyses phylogénétiques sont effectuées par la méthode de (Junkes et Cantor,1969) pour le calcul des matrices des distances d'évolution et l'algorithme du « Neighbors-Joining » et pour la construction des topologies des arbres phylogénétiques. La validation statistique des liens phylogénétique établis est effectuée par le test du Bootstrap à 1000 répétitions.

Chapitre 4 : **Résultats et discussion**

4.1. Résultats et discussion de caractérisation phénotypique des isolats d'actinobactéries

Les 200 isolats étudiés dans ce travail ont été isolés à partir des différentes régions arides et semi-arides.

4.1.1. Activité antimicrobienne

L'une des caractéristiques des actinobactéries est leur capacité à ralentir et/ou d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries et champignons pathogènes.

Les isolats d'actinobactéries libèrent leurs métabolites secondaires dans le milieu au cours de leur croissance.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6, ont montré que sur les 82 isolats testés se sont révélés actifs contre au moins deux microorganismes cibles.

Tableau 6. Activités antimicrobiennes.

| Nombre d'isolats | Souche cible | ZI (mm) | Références |
|------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 18 | <i>Escherichia coli</i> | 16 | (Messaoudi <i>et al.</i> , 2015) |
| 13 | Différentes souches tests | Diffère d'une souche à l'autre (+ou-) | (Selama <i>et al.</i> , 2014) |
| 15 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 | (Lahoum <i>et al.</i> , 2016) |
| | <i>Aspergillus carbonarius</i> | 25 | |
| Une seule souche | <i>Bacillus subtilis</i> | 31 | (Aouiche <i>et al.</i> , 2012) |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC4226 | 26 | |
| | <i>Fusarium culmorum</i> FC200 | 26 | |
| 20 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 25 | (Boubetra <i>et al.</i> , 2013) |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | 20 | |
| | <i>Escherichia coli</i> | 09 | |
| | <i>Aspergillus carbonarius</i> | 40 | |
| | <i>Penicillium expansum</i> | 45 | |
| | <i>Candida albicans</i> | 00 | |

| | | | |
|------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------------|
| 54 | <i>Staphylococcus aureus</i> | $0,195 \times 10^{-2}$ | (Gacem <i>et al.</i> , 2020) |
| | <i>Micrococcus luteus</i> | $0,195 \times 10^{-2}$ | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | $0,781 \times 10^{-2}$ | |
| une seule souche | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0,0625 | (Okudoh et Wallis, 2007) |
| | <i>Xanthomonas campestris</i> | 0,0025 | |

Les différents isolats d'actinobactéries montrent une importante action antibactérienne et antifongique vis-à-vis des micro-organismes testés.

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus sont variables, où l'actinobactérie montre une forte action antibiotique vis-à-vis des souches de *Bacillus subtilis*, *Fusarium culmorum* et *Saccharomyces cerevisiae* avec des zones d'inhibition de 31, 26 et 26 mm respectivement alors que le reste des souches testées se révèlent peu ou pas sensibles à l'antibiotique sécrété par cet isolat d'actinobactérie (Aouiche *et al.*, 2012).

Alors que ont trouvé une activité élevée de 40 mm ,45 mm ,25 mm,20 mm contre *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium expansum*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis* respectivement, ainsi ont trouvé une activité moyenne ou absence contre *Escherichia coli* et *Candida albicans* des zones d'inhibition de 09 et 00 (Boubetra *et al.*, 2013).

On trouve une activité de 10 mm contre *Staphylococcus aureus*, ainsi ont trouvé une activité antifongique de l'ordre de 25 mm contre *Aspergillus carbonarius* (Lahoum *et al.*, 2016).

Messaoudi *et al.*, (2015), ont trouvé une activité maximale de 16 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli*, alors que Selama *et al.* , 2014 diffère d'une Souches a l'autre (+ou-). Okudoh et Wallis, 2007 où ils ont estimé la CMI, dont le meilleur résultat est observé avec la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et *Xanthomonas campestris*, d'où la CMI est de l'ordre 0,0625 µg / ml et 0,0025 µg / ml. Pour chacun.

Pour la méthode des puits, où ils ont estimé la CMI, dont le meilleur résultat est observé avec la bactérie *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* d'où la CMI est de l'ordre 0.195×10^{-2} pour chacun alors qu'une activité moyenne a été enregistrée contre *Bacillus subtilis* où la CMI est $0,781 \times 10^{-2}$ (Gacem *et al.*, 2020) .

Les résultats obtenus sont variables, ils montrent un large spectre vis à vis les bactéries que les champignons, ainsi vis-à-vis une large gamme des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ainsi ces variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinobactérie peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes avec différents modes d'action selon la composition du milieu de culture et les différentes méthodes utilisées.

Dans cette étude, le pourcentage d'actinomycètes à activité antibactérienne est de plus de 70% contre la bactérie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*

Ces résultats suggèrent que l'actinobactérie possède un pouvoir antibiotique vis-à-vis des bactéries à coloration Gram positif.

Selon les travaux d'autres auteurs la sensibilité des bactéries Gram-positives aux sécrétions des actinobactéries par rapport aux bactéries Gram-négatives est due à la présence d'une membrane externe qui rend leur paroi beaucoup moins perméable. (Sabaou *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2002). Ainsi Selon l'étude de Denizci (1996), sur 356 espèces de *Streptomyces* isolés, 36% des isolats possèdent des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (20.78%), *Escherichia coli* (2.52%), *Micrococcus luteus* (18.25%), *Mycobacterium smegmatis* (22.47%) et *Bacillus subtilis* (12.07%).

D'autre part ces résultats ont montré une activité antifongique contre plusieurs champignons phytopathogènes tels que : *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*.

Selon les travaux des Badji *et al.*, 2005, ont montré que certains genres d'actinobactéries, produisent des composés antifongiques pouvant réduire efficacement l'effet inhibiteur des champignons phytopathogènes, donc cette activité antibiotique serait liée probablement à la sécrétion des substances antifongiques.

L'absence d'activité antibactérienne chez certains isolats d'actinobactéries vis-à-vis des germes testés pourrait être due au développement d'une résistance contre ces substances antimicrobiennes. En effet, la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques d'actinobactérie peut être attribuée à l'inactivation enzymatique de ces antibiotiques ou, à la diminution de la perméabilité membranaire des bactéries.

La méthode la plus utilisée pour estimer les activités antimicrobiennes, est la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis différentes souches pathogènes, bactéries et champignons.

La technique des stries croisées donne uniquement une idée générale des potentialités des isolats d'actinobactéries, leurs résultats sont souvent difficiles à interpréter et considérés comme éléments préliminaires. En revanche, les activités antimicrobiennes des isolats sont mieux exprimées par la méthode des cylindres d'agar. Elles sont d'avantage ciblées et permettent d'apprécier plus précisément le pouvoir antibiotique des isolats d'actinobactéries. Cette technique permet aussi une meilleure visualisation et une bonne observation des zones d'inhibition (Sabaou, 1998 ; Toumatia *et al.*, 2014).

L'étude des caractéristiques phénotypiques des souches d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres des actinobactéries.

4.1.2. Activité enzymatique

4.1.2.1. Hydrolyse du l'amidon

Le test d'hydrolyse d'amidon est positif pour 16 isolats qui donné 29,1 % par rapport les enzymes produit par l'actinomycètes (Gunasinghe *et al.*, 2020) . L'absence de coloration bleue autour des colonies bactériennes, signifie que l'amidon est hydrolysé dans cette zone. Cette hydrolyse est due à la présence des amylases dans le milieu qui sont sécrétés par les bactéries (Stamford *et al.*, 2001 ; Santos *et al.*, 2012).



Figure 4. Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats des actinomycètes travaux entrepris sur l'hydrolyse de l'amidon par les actinomycètes confirent les résultats obtenus (Stamford *et al.*, 2001).

4.1.2.2. Hydrolyse de la caséine

Autour de chaque souches des actinomycètes, on voit la présence d'un halo d'éclaircissement autour de la culture signifie que les résultats sont positifs pour toutes souches étudié des actinomycètes. Cette dégradation de caséine est due à des synthèses extracellulaires des caséinases de différentes souches dans le milieu caséine-amidon.

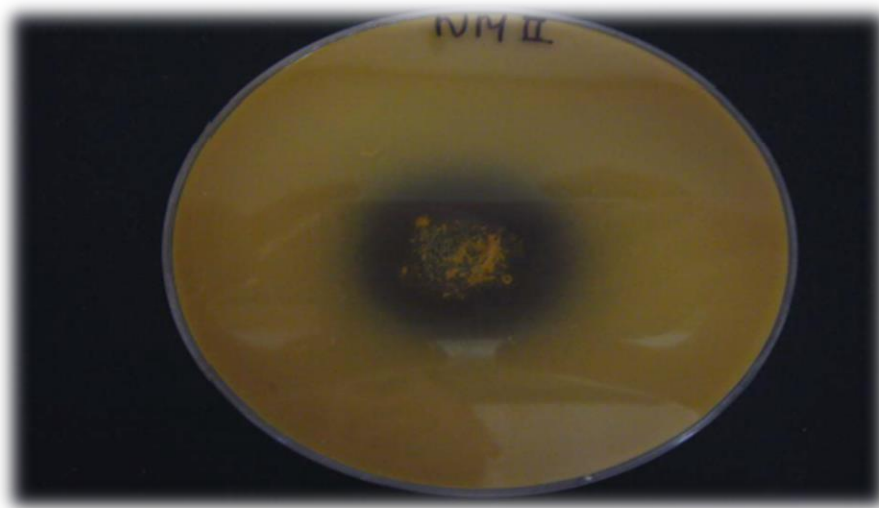


Figure 5. Photographie présentant le résultat de la dégradation de la caséine par des souches d'actinomycètes (Ammara Nariman,2009).

La présence de ces zones claires signifie que la caséine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée les enzymes des actinomycètes. Plusieurs travaux réalisés sur les actinomycètes prouvent que la plupart de ses souches peuvent hydrolyser les caséines du lait (Mihaela *et al.*, 2011 ; Ara *et al.*, 2012 ; Palaniyandi *et al.*, 2013). et autres travaux réalisés sur les actinobactéries prouvent que la plupart des souches *Streptomyces sp* peuvent hydrolyser les caséines du lait (Mihaela *et al.*, 2011 ; Palaniyandi *et al.*, 2013 ; Boughachiche *et al.*, 2016).

4.1.2.3. Résultat de dégradation de cellulose : recherche de cellulase

Cette activité se traduit par l'apparition d'un halo clair entourant la colonie après l'ajout du « Rouge Congo à 1% » (Figure 6) et 14 isolats qui sont positifs et donnent 25.5% par rapport aux enzymes produits par l'actinomycètes (Gunasinghe *et al.*, 2020).

Différentes cellulases ont été mises en évidence dans différents genres appartenant aux actinomycètes, il s'agit principalement de *Streptomyces* (Jang and Chenks, 2003 ; Loliam *et al.*, 2013), *Micromonospora* (De Menezes *et al.*, 2008, 2012), *Cellulomonas* (Saratale *et al.*, 2010) et (Stutzenberger , 1988).

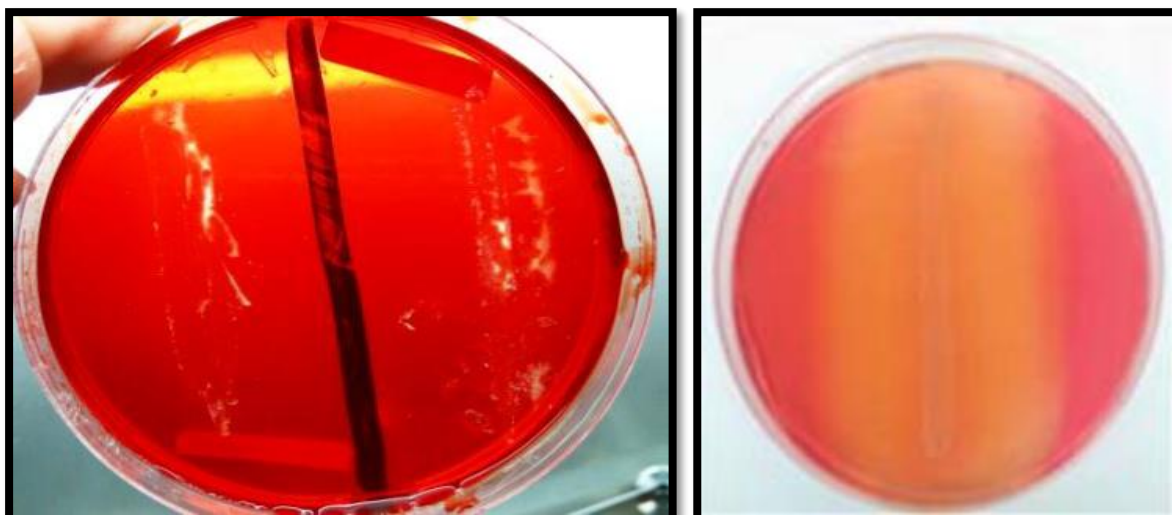


Figure 6. Photographie présentant le résultat de l'activité cellulolytique de souche d'actinomycètes (Zulfa *et al.*, 2021).

4.1.2.4. Résultat de la recherche de Pectinase :

Les souches positives ont été entourées d'un halo clair après l'ajout d'une solution « d'acétate de cuivre à 10% ».

L'activité pectinolytique fut l'une des premières activités décelées chez les actinomycètes. Plusieurs espèces se sont montrées productrices de pectinases. Telles que *Streptomyces viridochromogenes* (Agate *et al.*, 1962) et *Thermomonospora fusca* (Stutzenberger, 1987).

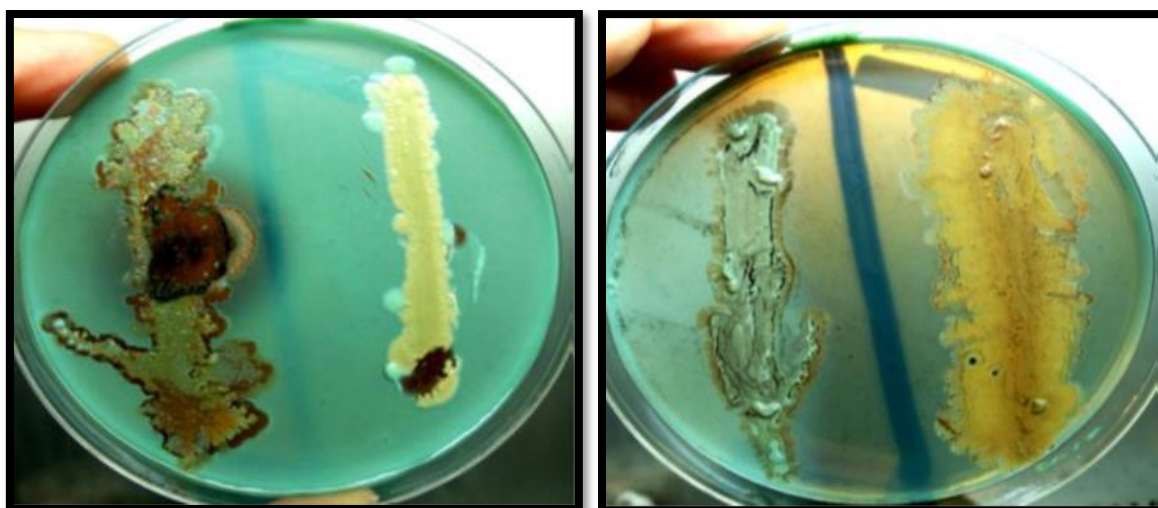


Figure 7. Photographie présentant le résultat d'activité pectinolytique des souches d'actinomycètes. (Mohamed HARIR, 2018).

4.1.2.5. Dégradation de l'acide urique

D'après résultat, on remarque totalité des souches d'actinomycètes étudiées capables de dégrader l'acide urique à l'exception de quelques souches. L'activité uricasique se traduit par la présence d'une zone d'hydrolyse claire autour de la colonie après 3 jours d'incubation.

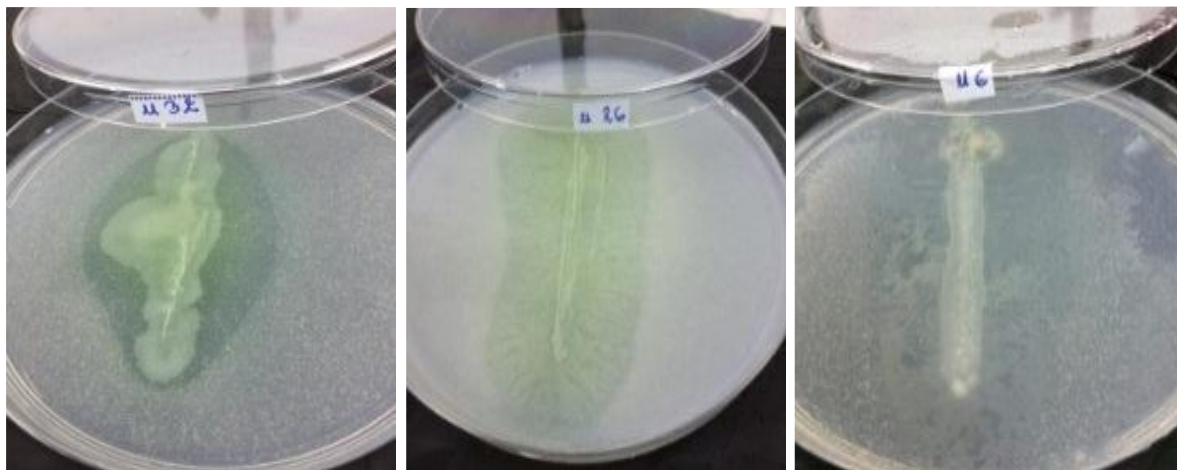


Figure 8. Photographies présentant le résultat positif de l'activité uricasique de quelques souches actinomycétales étudiées sur le milieu contenant de l'acide urique (CEDAH Mardjana, 2018).

L'uricase (urate oxydase EC 1.7.3.3) est une enzyme qui participe à la voie de dégradation des purines, catalysant l'oxydation de l'acide urique en allantoiné et en peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène (Nishiya *et al.*, 2002).

Tableau 7. Données générales sur l'uricase (Nishiya *et al.*, 2002).

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Code International | EC 1.7.3.3 |
| Nom | Uricase |
| Classe | Oxydo-réductase |
| Réaction catalysée | $\text{urate} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} = 5\text{-hydroxyisourate} + \text{H}_2\text{O}_2$ |
| Substrats | urate, oxygène (O_2), eau (H_2O) |
| Produits finaux | 5-hydroxyisourate et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) |
| Actinomycète producteur | <i>Streptomyces cyanogenus</i> |

4.2. Résultat et discussion de l'étude moléculaire

L'objectif d'une caractérisation moléculaire est la connaissance plus précise de l'espèce des actinomycètes du sol.

Identification moléculaire des isolats (séquençage de gène de l'ARNr 16S)

Plusieurs techniques moléculaires d'analyses de fragments d'ADN d'actinobactéries sont utilisées avec succès sur différents micro-organismes. Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN des microorganismes. Les produits PCR ont été ensuite analysés par le séquençage.

D'après les articles étudiés seulement Aouiche, (2012) et Gacem, (2020) ont fait la caractérisation génotypique par séquençage de gène de l'ARNr 16S.

Le produit de séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S des trois isolats d'actinomycètes ont été analysés par l'outil "BLAST" dans le portail NCBI (national center of biotechnology information). Les résultats ont montré la relation entre l'isolat et les souches-types des espèces les plus proches et leur taux de similarité. (Aouiche *et al.*, 2012 ; Gacem *et al.*, 2020 ; Badji *et al.*, 2006).

Tableau 8. Résultats de l'analyse de similarité.

| I'isolat | Souche type laplusproche | Tauxdesimilarité | Références |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| PAL111 | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | 99,7 % | (Aouiche <i>et al.</i> ,2012) |
| V002 | <i>Streptomyces lasiicapitis</i> | 99 ,93% | (Gacem <i>et al.</i> , 2020) |
| | <i>Streptomyces spectabilis</i> | 98.96% | |
| AC104 | <i>Actinomadura cremea</i> | 97.5% | (Badji <i>et al.</i> , 2006) |

Trois isolats (PAL111, (V002) et AC10) ont fait l'objet de cette étude (Tableau 07). A partir la comparaison des séquences obtenues avec celles disponibles dans les banques de données internationales que a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces isolats.

Pour l'isolat PAL111, le degré de similarité 99,7 % avec la souche type est *Streptomyces ambofaciens*, alors quel'isolat V002, le taux de similarité est 99 ,93% et 98.96% avec *Streptomyces lasiicapitis* et *Streptomyces spectabilis* respectivement. D'autre part le taux de similarité pour l'isolat AC104 est 97.5% avec la souche type *Actinomadura cremea*.

Les résultats représentés par ces études montrent que 90% des isolats appartiennent au genre *Streptomyces* et 10 % au genre *Actinomadura cremea*.

Ce résultat confirme l'abondance des *Streptomyces* dans différents écosystèmes par rapport aux autres genres.

D'après les travaux des autres auteurs les espèces du genre *Streptomyces* qui est le genre le plus abondant, ont la capacité de produire une grande variété d'enzymes et d'antibiotiques ce qui peut expliquer leur grande capacité à coloniser différents environnements. L'absence des autres genres des isolats obtenus peut être expliquée soit par l'absence de ses genres dans les écosystèmes étudiés ou à cause des techniques d'isolement utilisées (Sabaou *et al.*, 1998).

Ainsi l'étude de Lamari, (2006) montrent que Les analyses moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces. Ces analyses ont permis de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles, et de proposer la création de nouvelles espèces.

Conclusion et perspectives

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la caractérisation phénotypique et moléculaire de différentes souches d'actinomycètes du sol des régions arides et semi-aride, ainsi la mise en évidence de leur biodiversité métabolique dans la production des enzymes et l'activité inhibitrices vis-à-vis de quelques bactéries et champignons pathogènes.

Dans ce travail l'isolement des souches des actinobactéries à partir de différents régions est faitesur le milieu Gausse.

Les résultats obtenus ont montré que les actinobactéries ont la capacité de dégrader divers composants complexes : l'acide urique, cellulose, caséine, l'amidon et pectine, ce qui indique qu'ils sont capables de produire des enzymes qui les aident à décomposer ces substrats (l'uricase, cellulase, caséinases, amylase, pectinase).

Pour l'activité antimicrobienne que effectue sur différents milieux de cultures à composition et concentration variables (Bennett, GLM et ISP) et se réalise par différentes méthodes (stries croisées, cylindre d'agar, des puits).

Les résultats d'activité antimicrobienne obtenus sont variable montrent un large spectre vis a vis les bactéries tels que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, et les champignons tels que *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, ainsi vis a vis une large gamme des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les variations des zones d'inhibition sont dues aufait qu'une souche d'actinobactérie peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes avec différents modes d'action.

La méthodes la plus utilisé pour estimer ces activités antimicrobiennes, est la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis différentes souches pathogènes, bactéries et champignons. Cette technique permet une meilleure visualisation et une bonne observation des zones d'inhibition.

les résultats de l'analyse moléculaire de l'ADNr 16S montrent l'abondance des *Streptomyces* dans différents écosystèmes par rapport aux autres genres. Ces caractérisation moléculaire sont très importantes permis de regrouper ou de séparer les espèces entre elles, et de proposer la création de nouvelles espèces.

Ainsi ces résultats montrent la grande importance des actinobactéries dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agro-alimentaire. Les actinobactéries sont des microorganismes d'intérêts industriels par

excellence. Pour cela ces microorganismes sont les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites secondaires

Les perspectives de ce travail sont:

- ✓ Recherche et mise en évidence de l'activité insecticide.
- ✓ Recherche et mise en évidence de l'activité antifongiques vis à vis de quelques espèces de levures (*Candida albicans*).

Bibliographie

A

Aouiche A ., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes clinique et toxigènes résistants aux antibiotiques journal de Mycology, vol. 22(n°1). Pp. 42-51.ISSN 1156-5233.

Ammara Nariman,2009.les actinobactéries thermo-halophiles : Isolement, systématique et production de métabolites bioactifs, universite des science et de la technologie Houari Boumadien, p75.

Ayari, A., Morakchi, H., & Djamila, K. G. (2012). Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 305-311.

B

Badis A., Sabaou N., Djibaou R., et Sarag M., 2006. La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques. *Revue : La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques.* Vol :74-76.

BadjiB.,(2005).Badji,B.,Riba,A.,Mathieu,F.,Lebrihi,A.,&Sabaou,N.(2005).Activitéantifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes ettoxigènes. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 15(4),211-219.

Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. et Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyéniques.*MIRCENJ Appl Microbiol Biotechnol*, 2(4).453–466.

Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006).Antimicrobial compounds Produced by*Actinomadura* sp. AC104, isolated from an Algerian Sahara soil. *Canadian journal ofMicrobiology*,52.(4), 373–382.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.

Berdy J., Aszalos A., and McNitt K.L. (1987). Handbook of antibiotic compound. XIII. Vols. 1, 2, 3. Microbial metabolites. CRC Press, Boca Raton, Fla. Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotic*, 58, 1–26. doi:10.1038/ja.2005.1.

Benouagueni S., (2012). Recherche De Nouvelles Souches D'actinomycètes Productrices De Molécules Antifongique (Cas Des Eaux Du Lac Mellah D'EL Kala). Thèse de Doctorat . Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie. 44p

Boer, W., L. B. Folman, R. C. Summerbell et L. Boddy. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol.* 29:795-811.

Bouaziz, S et B Saïd., (2018). Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes: isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives Thèse de doctorat en biologie. Université de Kasdi Merbah. pp16-22.

Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotic produced by *Saccharothrix SA198* isolated from a Sahara soil. *Microbiological research*, 168(4), 223-230.

Boudjelal-Bencheikh, F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus sp. AH97* (Doctoral dissertation). pp33-37

Boughachiche F ,Boulahrouf A., Rachedi K., Duran R., Lauga B., Karama S., B Lynda., Boulezaz S., Boukrouma M., Boutaleb H.,(2016). Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces sp.* strain isolated from saltpan environment. *african journal of biotechnology*. 15(26) :1401-1412.

Breton A. et al., (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In *biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. et Sanglier J. J. Masson, Paris. P. 32-70.

C

Clardy J., Fischbach M.A. and Currie C.R. (2009). - The natural history of antibiotics, *Cur. Biol.*, 19, 437-441. *Envir. Microbiol.* 67: 3739-3745.

D

Das A., Soudbakhsh M., Bhattacharya S., Hamedani k ., Suryan S., Prashanthi k. 2012. Enzymatic Screening, Antibacterial Potential and Molecular Characterization of Streptomycetes Isolated from Wayanad District in Kerala, India. *International Journal of pharmacy and biological science* 2(1):201-210 .

Denizci, A. A. (1996). Study on the detection and production of antibacterial antibiotics from actinomycetes which isolated from the soils of Aegean Eastern black sea regions of Turkey. Ph D. Thesis. Ege University. Institute of Science. Izmir.

Djaballah C., (2010). *Biodiversités des actinomycètes halophiles et halotolérantes isolées de la sebkha de Ain M'lila* .Mémoire de magister en Microbiologie, université frères Mentouri – Constantine.

Djinni I. (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Thèse de Magister, spécialité : Microbiologie Appliquée. Université A.Mira, Bejaia, p.46.

Dommergues Y., Mangenot F., 1970. *Écologie Microbienne Du Sol*. Paris, Masson et Cie. Pp 23,27, 29.

E

El-Naggar N. E, Moawad H, El-Shweihy N. M and El-Ewasy S. M(2015). Optimization of culture conditions for production of the antileukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *BioMed Res Int*. Pp 17.

F

Fleming A. (1929). - On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Experim. Patho*, 10., 226-236. In Alexander Fleming's miraculous discovery of penicillin. Derderian S.L. (2007). *J. Rivier. Academic*. 3, 1 -5.

G

Gacem, M. A., Ould-El-Hadj-Khelil, A., Boudjemaa, B., & Wink, J. (2020). Antimicrobial and antioxidant effects of a forest actinobacterium v 002 as new producer of Spectinabilin, Undecylprodigiosin and Metacycloprodigiosin. *Current microbiology*, 77(10), 2575-2583.

George M., Anjumol A., Mohamed Halta A.A. (2012). Distribution and bioactive potential of soilactinomycetes from different ecological habitats. *African journal of Microbiology Research*, 6(10),2265-2271.

Goodfellow M (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki KI, Parte A (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5, 2nd edn, The Actinobacteria, Part B. Springer, New York, pp 33–34.

Gordon R.E., R.E Smith.,(1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* 66:41-48.

Gunasinghe Y., Edirisinghe E. 2020. Industrially Important Enzyme and Plant Growth Promoter Potential of Soil Actinomycetes. Department of Microbiology, University of Kelaniya, SRI LANKA, Volume-7, <https://doi.org/10.31033/ijrasb.7.6.9>.

H

Habbeche A., Haberra S., Saudi B., Kerouaz B., Ladjama A. 2013. Keratinyase production from a thermophilic Actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *J Minerova Biotechnol* 25: 151-159 .

Hassan U. S. S., Anjum K., Abbas S. Q., Akhter N., Shagufta B. I., Shah S. A. A. et Tasneem U. (2017). Review Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol 49. Pp : 34–47.

Harir M. 2018. Caractérisation des molécules bioactive produits par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'Algérie. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella, Oran, 9p.

Hotam S., Chaudhary., Jayprakash Y., Anju R., Shrivastava., Smriti S., Anil K.S., Natrajan G., 2013. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* Jun; 4(2): 118-123.

Hwang G., Byung K., Lim S., WON, (2001). Isolation and in vitro and in vivo antifungal isolates. *Turk J Biol.* 27: 79-84.

I

Inam-ul-Haq, M., Mehmood, S., Rehman, H. M., Ali, Z. A. H. I. D., & Tahir, M. I. (2012). Incidence of root rot diseases of soybean in Multan, Pakistan and its management by the use of plant growth promoting rhizobacteria. *Pak. J. Bot*, 44(6), 2077-2080.

J

Janaki T., (2017). Enzymes From Actinomycetes. *International Journal of ChemTechResearc*.10(2) : 176-182

Jani S.A., Chudasama C.J., Patel D.B., et al.2012. Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant actinomycetes: *Saccharomonosporaviridis* SJ-21. *Bull Environ Pharmacol Life Sci* 1(6): 84–92.

Jeffrey L.S.H . 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak . *Afr Journal of Biotechnol* 7 (20): 3697-3702.

Jukes, T., Cantor, C., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21–32.

K

Kasana R.C.,Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on Agar plates using gram's iodine. *Curr Microbial* 55: 503–507.

Khachatourians G.G., (1998). Agricultural use of antibiotic and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association (CMAJ)*, 159 (9): 1129-1136.

Kitouni M., (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. p 170.

L

Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., Verheecke C., Klenk H-P., Sabaou N., Mathieu F.(2015). Activité antifongique d'une souche saharienne d'*Actinomadura* sp.

ACD1 contre des champignons toxigènes et autres microorganismes pathogènes. Journal de Mycologie Médicale, Modèles MYCMED-605; No. of Pages 8.

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pp45- 186.

Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J. M., S aintpierre-Bonaccio D., Rifali S., Fassouane A., Boiron P., (2003). Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Canadian Journal Microbiology, 2003 Nov., 49(11), 669-74.

Leulmi N., Sighel D., Defant A., Khenaka K., Boulahrouf A., Mancini I. (2019). Nigericin and grisorixin methyl ester from the Algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain: A computational study on their epimeric structures and evaluation of glioblastoma stem cells growth inhibition. Natural product research. 33(2). 266–273.

Loucif K., (2010). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection des souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. 139 :05-10.

M

Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'actinopolyspora. Thèse de Doctorat en sciences biologiques, spécialité: Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Pp. 40-48.

Messaoudi O., (2013). Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkhah de Kenadsa (Bechar). Mémoire Magister en microbiologie appliquée .pp 32,34, 35,36

Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D. E. (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotic secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkhah of Kenadsa, Algeria. *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, 5(6), 438-445.

Mihaela C., Teodor Gh., Negoita., Gabriela E., Bahrim., Peter Stougaard., (2011). Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. From antarctica. *Brazilian journal of microbiology*. 42: 868-877

Mann J. (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep.*, 18:417–430.

N

Newman D.J. and Cragg M.G (2007). - Natural products as sources of new drugs over the last 25years. *J. Nat. Prod.*, 70, 461-477p.

N V Zulfa, M Fitroh, I Santoso, A E Maryanto and Yasman,(2021).Antagonistic potential of *Streptomyces cellulosa* SM12 against *Ganoderma* sp. TB3 and *Ganoderma* sp. TB4N, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences (FMIPA), Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia, doi:10.1088/1742-6596/1725/1/012055.

O

Okudoh, V. I., & Wallis, F. M. (2007). Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African journal of science*, 103(5-6), 216-222.

P

Palaniyandi S.A., Yang S.H., and Suh J.-W., (2013). Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro13 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. *Applied Microbiology*.pp1364-5072.

Pandey B., Ghimire P., Agrawal VP., 2004. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *Acad. Sci Technol*, 4(3):1-4.

Petrosyan P, García-Varela M, Luz-Madriral A, Huitrón C, Flores ME. (2003 Jan). *Streptomyces mexicanus* sp. nov. a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* ; 53(Pt1):269-73.

Prescott L.M., Harley and Klein , (2002).VIII Ecology and Symbiosis. In *Microbiology*. Fifth edition. The Mc Graw–Hill Companies, p. 596-697.

Praveen Kumar P., Preetam Raj J.P., Nimal Christudas I.V.S., R. Sagaya Jansi R., Murugan N., Agastian P., Arunachalam C., Sulaiman Ali Alharbi. 2015. Screening of Actinomycetes for Enzyme and Antimicrobial Activities from the Soil Sediments of Northern Tamil Nadu, South India, Research Department of Plant Biology and Biotechnology, Loyola College, Chennai - 600 034, India ; Department of Microbiology, L&T Microbiology Research Centre, Sankara Nethralaya, Chennai, India ; Department of Botany and Microbiology, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia.

Priyanka S.B. 2019. Isolation, Purification and Characterization of Pectinase Enzyme from *Streptomyces Thermocarboxydus*. JBB MS 1(5).1-6.

R

Rathnan R.K., Ambili M. 2011. Cellulase Enzyme Production by *Streptomyces* Sp Using Fruit Waste as Substrate. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5(12): 1114–1118.

Raval K.M., Vasawani P.S., Mujumder D.R. 2012. Biotransformation of a single amino-acid L-tyrosine into a bioactive molecule L-Dopa. International Journal of scientific and research Publication 2: 2250-3153.

Rosilma O., Araujo- Melo., Igor F.A.C., Maria C.V., Janete M., Kêsia X.R.F., and Luana C. B. B. Coelho., 2016. Actinobacteria : Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application. British Biotechnology Journal. vol 15(4).

Roy S., Das I., Munjal M., Karthik I., Kumar G., Kumar S., Rao R.V.B. 2014. Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine anaerobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. Front. Biol. 9(4): 306-316.

S

Saadoun I., Gharaibeh R., (2003). The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotic active against antibiotic resistant bacteria. *J. Arid Environ.* 53: 365 – 37

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G., and Germain P. (1998). Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9, 147–153.

Saci .A (2012). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchet d'orange .Thèse de Magister : écologie. Constantine, Algérie : Université Mentouri. P21-10.

Sahin N., Ugur A., (2003). Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates. *Turk J Biol.* 27: 79-84.

Saini P., Gangwar M. , Kalia A. , Singh N and Narang D.2016. Isolation of endophytic actinomycetes from *Syzygium cumini* and their antimicrobial activity against human pathogens. *Journal of Applied and Natural Science* 8 (1): 416 – 422

Saker, R. (2018). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctoral dissertation. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Pp 36.

Saoudi B., Habbeche A., Kerouaz B., Haberra S., Romdhane Z.B., Tichati L., Ladjama A. 2015. Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. *Process Biochemistry* 50(12): 2259-2266.

Saoudi B., Ladjama A.2006. Screening and isolation of pectate lyase producing *Streptomyces* from Algerian saharian soil, *Biologia (Tunisia)* 4 : 121–122.

Sanchez L., Barana A. F., (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis insibanda t., leonard v., mabinya l-v, mazomba n., akinpelu da., bernard k., olaniran a-o., okoh. a-i. (2010). Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Molecular Sciences* .11. N° 7. Pp:2612–2623

Santos, H., Da Costa, M.S. (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments, *Environmental Microbiology*, 4(9): 501-509.

Selama O., Gregory C. A. Amos, Djenane Z., Borsetto CH., Rabah F .L. Porter D., Nateche F., Elizabeth M. H. Wellington, and Hocine H. (2014). Screening for Genes Coding for Putative Antitumor Compounds, Antimicrobial and Enzymatic Activities from Haloalkalitolérantes and Haloalkaliphilic Bacteria Strains of Algerian Sahara Soils. *BioMed Research International*, volume 2014, Article ID 317524, 11 pages.

Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimisation of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–7.

Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P.(2003). Carbon Source-induced modification in mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis*El.Application. Environment.Microbiology,69, 701.Streptomyces clavuligerus. Microbiology, 142: 1209-1220.

Stackebrandt E., and Schumann P., 2006. Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. Prokaryotes, 3, 297–321.

Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B., and Araujo J.M.,(2001). Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. Bioresource Technology.76(2) : 137–141.

Stanier W., (1966). Methods for characterization of streptomyces species. International journal of systematic bacteriology. 16(3) : 313-340.

Syed DG, Agasar D and Pandey A (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis* . Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 36,no.2, pp.189–194.

T

Theilleux. J, (1993);Les actinomycètes in Microbiologie industrielle: Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria. 612 : 425.

Toumatia Omrane., 2015. Étude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Ecole Normale de Kouba-Alger.

Trejo-Estrada SR, Paszczynski A, Crawford DL (1998). Antibiotic and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. J Ind Microbiol Biotechnol 21:81–90. Doi: 10.1038/sj.jim.2900549.

V

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., vanSinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev, 71(3): 495–548.

Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis : a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9: 113-148.

Vijayakumar R; Muthukumar. C; Thajuddin. N; Panneerselvam. A; and Saravanamuthu. R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica.*, 21(2):59-65.

Viswanathan K ., Jeyanthi Rebecca L., Arumugam P., Anbarasu K.2015. Isolation and screening of protease producing marine Actinomycetes from Chennai coastal region. *Int J Adv Res BiolSci*2(8): 153–157.

Y

Yilma, S.-S. B. (2008). Large-conductance cholesterol-amphotericineB channels in reconstituted lipide bilayers. *Biosensors Bioelectron.*, 1359-1367.

Z

Zaitlin, B., Watson, S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res (Research)*, 40(9): 1741–1753.

Annexes

Annexes 1

✚ Composition des milieux de cultures

1. Les compositions des milieux utilisés pour l'isolement des actinomycètes

➤ Le milieu Gausse (Morakchi, 2011)

| | |
|-----------------------------------------|---------|
| ✓ KNO ₃ | 1g |
| ✓ K ₂ HPO ₄ | 4 0,5g |
| ✓ MgSO ₄ | 4 0,5g |
| ✓ NaC..... | 1 0,5g |
| ✓ FeSO ₄ | 4 0,01g |
| ✓ Amidon..... | 20g |
| ✓ Agar | 30g |
| ✓ Eau distillée | 1000ml |
| ✓ pH= 7,4 | |

2. Les milieux utilisés pour les tests hydrolyses et activité antibactérienne

➤ Le milieu Caséine amidon agar

| | |
|---------------------------------------------|-------|
| ✓ Amidon..... | 10g |
| ✓ Caséine..... | 0,03g |
| ✓ KNO ₃ | 2g |
| ✓ K ₂ HPO ₄ | 0,02g |
| ✓ NaCl..... | 2g |
| ✓ MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 2g |
| ✓ CaCO ₃ | 0,05g |
| ✓ FeSO ₄ .7H ₂ O..... | 0.01g |
| ✓ Agar..... | 18g |
| ✓ Eau distillée..... | 1L |
| ✓ PH= 7.3 | |

➤ **Le Milieu Bennett (Shirling et Gottlieb,1966)**

- ✓ Extrait de levure.....1 g
- ✓ Extrait de viande.....1 g
- ✓ Peptone.....2 g
- ✓ Glucose.....10 g
- ✓ Agar.....20g
- ✓ Eau distillée.....1000 ml
- ✓ Ph=7.2

➤ **Gélose au lait écrémé**

- ✓ Peptone.....10 g
- ✓ NaCl0.....5 g
- ✓ Extrait de levure.....03 g
- ✓ Agar.....20g
- ✓ Eau distillée.....1000 ml
- ✓ Lait écrémé.....100 g
- ✓ La solution aqueuse de Rouge Congo à.....1%
- ✓ Rouge Congo.....01 g
- ✓ Eau distillée100 ml
- ✓ La solution du NaCl.....(1N)
- ✓ NaCl.....56,5 g
- ✓ Eau distillée1000 ml

➤ **Les milieux ISP : (Shirling& Gottlieb, 1966)**

• **Milieu ISP1**

- ✓ Tryptone.....5 g
- ✓ Extrait de levure3 g
- ✓ Agar20 g
- ✓ Eau distillés1000 ml
- ✓ pH=7,2

• **Le milieu ISP2 : (Shirling& Gottlieb, 1966)**

- Glucose4 g
- Extrait de levure4 g

| | |
|-----------------------|---------|
| Extrait de malt | 10 g |
| Agar | 20 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH= 7,2. | |

- **Milieu ISP9 (milieu de base)**

| | |
|-------------------------------------------|-------------------------|
| ✓ (NH ₄) ₂ SO..... | 42, 64 g |
| ✓ KH ₂ PO..... | 42, 38 g |
| ✓ K ₂ HPO | 45,65g |
| ✓ MgSO | 4, 7H ₂ O 1g |
| ✓ Solution saline..... | 1 ml |
| ✓ Eau distillée..... | 1000 ml |
| ✓ Agar..... | 20g |
| ✓ pH = 6-8-7. | |

- **Milieu Mueller-Hinton(Meklat, 2012)**

| | |
|--------------------------------|---------|
| ✓ Infusion de viande | 300 g |
| ✓ Hydrolysate de caséine | 17.5g |
| ✓ Amidon | 1.5g |
| ✓ Agar..... | 17g |
| ✓ Eau Distillée..... | 1000 ml |
| ✓ pH=5.6 | |

3. Milieu pour les champignons

- **Milieu PDA(Rapilly,1969)**

| | |
|----------------------------------|--------|
| ✓ Filtrat de pomme de terre..... | 500 mL |
| ✓ Glucose..... | 20 g |
| ✓ Agar..... | 20 g |
| ✓ Eau distillée..... | 500 mL |
| ✓ Ph=5,6 | |

Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 mL d'eau distillée.

Annexes 2

✚ Les articles utilisés

- **Aouiche A ., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. (2012).** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes clinique et toxigènes résistants aux antibiotiques journal de Mycology, vol. 22(n°1). Pp. 42-51.ISSN 1156-5233.
- **Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006).**Antimicrobial compounds Produced by *Actinomadura* sp. AC104, isolated from an Algerian Sahara soil. Canadian journal of Microbiology,52.(4), 373–382.
- **Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotic produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Sahara soil. *Microbiological research*, 168(4), 223-230.
- **Boughachiche F , Boulahrouf A., Rachedi K., Duran R., Lauga B., Karama S., B Lynda., Boulezaz S., Boukrouma M., Boutaleb H.,(2016).** Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment. african journal of biotechnology.15(26) :1401-1412.
- **Gacem, M. A., Ould-El-Hadj-Khelil, A., Boudjemaa, B., & Wink, J. (2020).** Antimicrobial and antioxidant effects of a forest actinobacterium v 002 as new producer of Spectinabilin, Undecylprodigiosin and Metacycloprodigiosin. *Current microbiology*, 77(10), 2575-2583.
- **Gunasinghe Y.,Edirisinghe E.2020.**Industrially Important Enzyme and Plant Growth Promoter Potential of Soil Actinomycetes. Département of Microbiology, University of Kelaniya, SRI LANKA, Volume-7,https://doi.org/10.31033/ijrasb.7.6.9.
- **Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., Verheecke C., Klenk H-P., Sabaou N., Mathieu F.(2015).** Activité antifongique d'une souche saharienne d' *Actinomadura* sp. ACD1 contre des champignons toxigènes et autres microorganismes pathogènes. Journal de Mycologie Médicale, Modèles MYCMED-605; No. of Pages 8.
- **Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D. E. (2015).** Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotic secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, 5(6), 438-445.

-
- **Mihaela C., Teodor Gh., Negoita., Gabriela E., Bahrim., Peter Stougaard., (2011).** Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. From antarctica. *Brazilian journal of microbiology*. 42: 868-877.
 - **N V Zulfa, M Fitroh, I Santoso, A E Maryanto and Yasman,(2021).** Antagonistic potential of *Streptomyces cellulosa* SM12 against *Ganoderma* sp. TB3 and *Ganoderma* sp. TB4N ,Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences (FMIPA), Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia, doi:10.1088/1742-6596/1725/1/012055.
 - **Nishiya Y, Hibi T and Oda J. A. (2002).** Purification method of the diagnostic enzyme *Bacillus uricase* using magnetic beads and non-specific protease. *ProteinExpres Purif* 25: 426–429.
 - **Okudoh, V. I., & Wallis, F. M. (2007).** Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African journal of science*, 103(5-6), 216-222.
 - **Palaniyandi S.A., Yang S.H., and Suh J.-W., (2013).** Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro13 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum* spp. *Applied Microbiology*.pp1364-5072.
 - **Praveen Kumar P., Preetam Raj J.P. , Nimal Christudas I.V.S., R. Sagaya Jansi R. , Murugan N., Agastian P., Arunachalam C., Sulaiman Ali Alharbi.2015.** Screening of Actinomycetes for Enzyme and Antimicrobial Activities from the Soil Sediments of Northern Tamil Nadu, South India , Research Department of Plant Biology and Biotechnology, Loyola College, Chennai - 600 034, India ;Department of Microbiology, L&T Microbiology Research Centre , Sankara Nethralaya, Chennai, India ;Department of Botany and Microbiology, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia.
 - **Priyanka S.B.2019.** Isolation, Purification and Characterization of Pectinase Enzyme from *Streptomyces Thermocarboxydus* .JBB MS 1(5).1-6.
 - **Roy S., Das I ., Munjal M., Karthik I., Kumar G., Kumar S., Rao R.V.B. 2014.** Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine anaerobic bacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment *Front. Biol.*9(4): 306-316.
 - **Santos, H., Da Costa, M.S. (2002)** Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments, *Environmental Microbiology*, 4(9): 501-509.

- **Selama O., Gregory C. A. Amos, Djenane Z., Borsetto CH., Rabah F .L. Porter D., Nateche F., Elizabeth M. H. Wellington, and Hocine H. (2014).** Screening for Genes Coding for Putative Antitumor Compounds, Antimicrobial and Enzymatic Activities from Haloalkalitolérantes and Haloalkaliphilic Bacteria Strains of Algerian Sahara Soils. *BioMed Research International*, volume 2014, Article ID 317524, 11 pages.
- **Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013).** Optimisation of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–7.
- **Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B., and Araujo J.M.,(2001).** Production and characterization of a thermostable $\alpha\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*.76(2) : 137–141.

Résumés

ملخص

يعتمد البحث الحالي على دراسة مقارنة لنتائج العمل على الخصائص المظهرية والجزئية للبكتيريا الشعاعية من 200 سلالة معزولة من تربة مختلف المناطق الجافة وشبه الجافة.

أظهرت عزلات الفطر أشعاعي نشاطاً مثبطاً قوياً ضد البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض ، مثل *الإشريكية القولونية* ، والمكورات العنقودية الذهبية ، والرشاشيات الكربونية، مما يؤكد أن لها نشاطاً مضاداً للميكروبات .

من ناحية أخرى ، أظهرت عزلات الاكتينومييسات القدرة على تحليل بعض المركبات (السليولوز ، النشا ، الكازين ، البكتين ، حمض البوليك) مما يدل على أن لديهم خلفية إنزيمية كبيرة.

بالنسبة للدراسة الجزئية التي أجراها تسلسل الحمض النووي الريبوزي 16 S ، أظهر أن معظم العزلات قريبة جداً وراثياً من جنس *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية : التربة، الفطريات الشعاعية، النشاط الأنزيمية، النشاط المضاد للميكروبات، دراسة النمط الظاهري

Résumé

La présente recherche est basé sur l'étude comparative des résultats des travaux sur les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des actinobactéries des 200 souches isolée à partir du sol de diverse régions aride et semi-aride.

Les isolats d'actinomycètes ont montré une forte activité inhibitrice contre les bactéries et les champignons pathogènes, tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus carbonarius*, ce qui confirme qu'il a une activité antimicrobienne.

D'autre part, les isolats d'actinomycètes ont montré la capacité de dégrader certains composés (cellulose, amidon, caséine, pectine, l'acide urique) ce qui montre qu'ils possèdent un bagage enzymatique important.

Pour l'étude moléculaire par séquençage de l'ARN 16S ont montré que la plus part des isolats sont très proche génétiquement de genre *Streptomyces*.

Mots clés : Sol, actinomycètes, activité enzymatique, activité antimicrobienne, étude phénotypique.

Abstract

The present research is based on comparative study of the results of the work on phenotypic and molecular characteristics of actinobacteria of 200 strains isolated from soil of various arid and semi-arid regions.

The isolates of actinomycetes showed a strong inhibitory activity against pathogenic bacteria and fungi, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus carbonarius*, which confirms that it has antimicrobial activity.

On the other hand, actinomycetes isolates have shown the ability to degrade some compounds (cellulose, starch, casein, pectin, uric acid) which shows that they have an important enzymatic background.

For molecular study by 16S RNA sequencing showed that most of the isolates are very close genetically to genus *Streptomyces*.

Key words: Soil, actinomycetes, enzymatic activity, antimicrobial activity, phenotypic study.