



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 :

Safa BOULEGROUNE

Le : mardi 28 juin 2022

Thème

Contribution à l'étude des actinomycètes dans le sol de l'Algérie

Jury:

M. Fethi BENBELAID	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. Souad BABA ARBI	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Hassina GHITTI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

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 Madame **BABA ARBI SOUAD** Maître de Conférences à l'Université Mouhmed Kholder-biskra, qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont encouragements, sérieuse, ses orientations et ses conseils.*

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté l'évaluation de mon travail.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Dédicace

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que
je dédie : A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me
ressourcer d'affection et de bénédictions durant toute ma vie ;*

A

Mes sœurs Turkia , Khadidja, Douaa, Neveu Imran et ma cousine

Chaima

A

La famille Boulegroune et Zidi

A

*Mes amies et surtout ma très proche et chère amie Amira ainsi que
Nidal, Sarab, Kaouther, Mansoura, Meriem, Malak et Manar
pour tous les bons moments que nous avons partagés.*

A

Mes amis de Pubg.

SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction Générale.....	1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : généralités sur les actinobactéries et leur application

1. Généralités sur les actinomycètes	2
1.1 Définition	2
1.2 L’habitat	2
1.3 La Morphologie	2
1.4 Classification des actinomycètes	3
1.5 Cycle de développement des actinomycètes	3
1.6 Les applications des actinomycètes	5
1.6.1 Dans les domaines médicaux, industriel.....	5
1.6.2 Dans le domaine agronomique.....	7

Partie expérimentale

Chapiter 2: matériel et méthodes

2. Isolement des souches d'actinomycètes.....	8
2.1 Etude de l’activité antifongique.....	9
2.1.1 La méthode des cylindres d’agar.....	9
2.1.2 La méthode de stries croisées	9

2.1.3 Autre méthode.....	10
2.2. Identification moléculaire et analyses phylogénétiques des souches d'actinomycètes sélectionnées	10
2.2.1 Extraction d'AND	10
2.2.2 Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose.....	11
2.2.3 Séquençage de l'ADNr 16S	12
2.2.4 Analyses phylogénétiques	12
2.2.5 Hybridation ADN-ADN	12
Chapitre 3 résultat et Discussions	
3.1. Résultats de l'activité antifongiques	13
3.2. Résultat de l'identification moléculaire	17
Conclusion	19
Références bibliographiques.....	20
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des dérivés naturels produits par des Actinobacteria (Prescott <i>et al.</i> , 2018)	5
Tableau 2: Les enzymes et leurs applications industrielles (Ranjani <i>et al.</i> , 2016).....	6
Tableau 3: Les champignons cible pour tester l'activité antifongique d'actinomycètes	8
Tableau 4: Les amorces utilisées en PCR	11
Tableau 5: Les résultats de l'activité antifongique.....	13
Tableau 6: Résultat de l'identification moléculaire et le pourcentage d'homologie.	18

Liste des figures

Figure 1: Classification phylogénétique des Actinobacteria basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi <i>et al.</i> , 2009).....	3
Figure 2 : Le cycle de vie de Streptomyces (Anne van der Meij <i>et al.</i> , 2017).....	4
Figure 3: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat PAL111 et les souches-types des espèces les plus proches du genre Streptomyces	17

Liste des abréviations

pH: Potentiel d'hydrogène

WYE: Water–Yeast extract–Agar

GLM: Glucose–Yeast extract–Malt

YMA: Yeast extract – Mannitol–Agar

ISP: International *Streptomyces* Project

ADN : Acide Désoxyribonucléique

HCl : Acide Chlorhydrique

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

NaCl : Chlorure de Sodium

ARNase : Acide Ribonucléique Ase

v/v : volume par volume

PCR : Polymerase Chain Réaction

UV : Ultraviolette

ADNr 16S : Acide Désoxyribonucléique Ribosomal 16S

ARNr 16S: Acide Ribonucléique Ribosomal 16S

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

TAE : Tris Acétate-EDTA

Introduction

Introduction Générale

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes, bactérie, levure et moisissures pour fabriquer des produits industriels. Ces microorganismes omniprésents dans notre environnement sont actuellement de remarquables agents producteurs de nombreuses substances bioactives, utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés (Demain, 2000), au cours des dernières années, la résistance des bactéries pathogènes potentiellement mortelles de différentes maladies constituent un problème de santé publique (Aslam *et al.*, 2018).

Devant ces problèmes, la recherche des nouvelles substances bioactives est nécessaire pour lutter contre ces maladies. Parmi les sources majeures de molécules bioactives, on trouve les bactéries, en particulier les Actinomycètes sont bien connus comme une source importante d'antibiotiques (Al-Dhabi *et al.*, 2018).

Aujourd'hui, la plupart des antimicrobiens connus ont été isolés à l'origine des actinomycètes, en particulier du genre *Streptomyces*. Les substances produites comprennent toutes les classes de médicaments importantes utilisées dans les cliniques, comme les β -lactamines, tétracyclines, macrolides, aminoglycosides ou glycopeptides (Yvonne et Stegmann, 2019).

Par ailleurs, en Algérie peu d'expériences sont réalisées sur des bactéries (Actinomycètes) du sol dans les régions arides. Se travaille consistera à faire une synthèse bibliographique sur quelques articles relié avec le sujet.

Alors, quelles sont les espèces des actinobactéries isole à partir des régions arides étudier, est ce que ces bactéries sont capable de produire des molécules d'intérêt biotechnologique

Afin, de réaliser notre objectif qui est l'étude de l'activité antifongique et les caractères phylogénique de ces bactéries, la démarche suivie comporte les étapes suivantes :

Première partie une synthèse bibliographique

Chapitre 1 Généralités sur les actinobactéries et leur application

Partie expérimentale qui comporte deux chapitres :

Chapitre 2 matériel et méthode

Chapitre 3 résultat et discussion.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : généralités sur les actinobactéries et leur application

1. Généralités sur les actinomycètes

1.1 Définition

Les actinomycètes sont des microorganismes procaryotes la plupart sont aérobie, universellement très répandus. Ils colonisent des milieux très divers, ainsi que leur adaptation et leur résistance à certaines conditions très hostiles (Badis *et al.*, 2006 ; Procop *et al.*, 2020). Les actinomycètes ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique, ils peuvent également être pathogènes et nuisibles (Badis *et al.*, 2006).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses appartenant au phylum *Actinobacteria* et ordre *Actinomycetales*. La majorité des actinobactéries sont des saprophytes avec un Gram positifs et un pourcentage élevé en G+C, un pH neutre ou peu alcalin. Ils sont mésophiles, ou thermophiles tolérant des températures jusqu'à 60°C (Omura, 1992). Elles sont des bactéries hétérotrophes, mais plusieurs autres espèces sont chimio-autotrophe (Ensign *et al.*, 1993).

1.2 L'habitat

Les *Actinobacteria* colonisent les milieux terrestres et aquatiques et forment l'une des principales populations de sol, où ils participent à la rotation des composants du sol en composants organiques par décomposition d'un mélange complexe de matière organique des plantes mortes, animaux et matériel fongique (Hazarika et Thakur, 2020).

1.3 La Morphologie

La germination des spores, l'allongement et la ramification du mycélium végétatif, la formation du mycélium aérien, la couleur du mycélium aérien et de substrat, la production de pigments et la mobilité, tous ces caractères morphologiques ont été utilisées pour identifier les *Actinobacteria* (Anandan *et al.*, 2016).

Les actinomycètes peuvent produire des filaments ramifiés de 0,5-1,0 um de diamètre, plus petite que celui des champignons et totalement différents aux ces dernier, leur croissance est lente (Bettache, 2013).

Toute la structure d'une cellule d'hyphes correspond à une organisation bactérienne : le cytoplasme contient des régions d'ADN génomique, des ribosomes et diverses inclusions, vraisemblablement des substances de réserve telles que des polyphosphates, des lipides ou des polysaccharides. Les actinomycètes classiques ont un mycélium radial bien développé. Selon la

différence de morphologie et de fonction, le mycélium peut être divisé en mycélium substrat et mycélium aérien. Certaines actinobactéries peuvent former des structures compliquées, telles que des spores, une chaîne de spores, des sporanges et les sporangiospores (Qinyuan *et al.*, 2016).

1.4 Classification des actinomycètes

Les séquences d'ARN ribosomique 16S ont fourni un arbre phylogénétique (Figure 1) qui permet d'étudier l'évolution des actinomycètes et fournit également une base pour la classification (Embley et Stackebrandt., 1994).

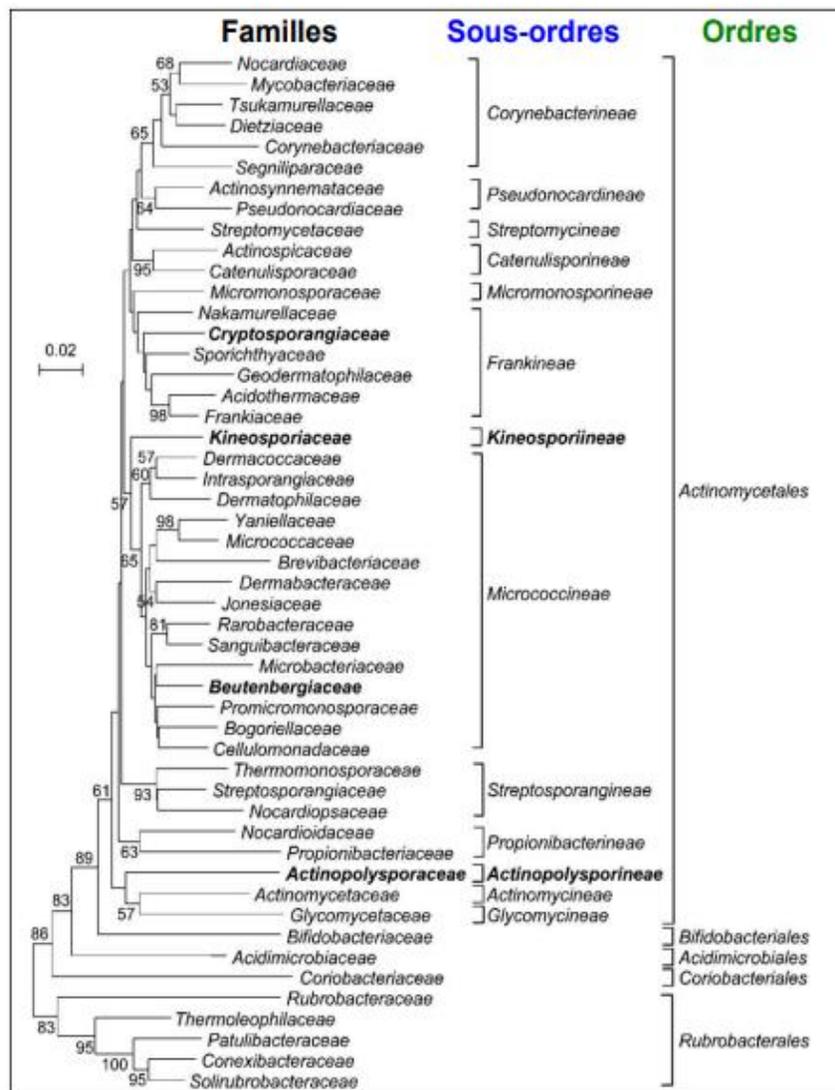


Figure 1: Classification phylogénétique des Actinobacteria basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi *et al.*, 2009).

1.5 Cycle de développement des actinomycètes

Le cycle de vie et de développement des actinomycètes est particulièrement complexe et implique un développement multicellulaire coordonné avec différenciation physiologique et morphologique de plusieurs types de cellules, aboutissant à la production de métabolites secondaires et à la dispersion de spores matures (Flårdh et Buttner, 2009 ; McCormick et Flårdh., 2012).

Le cycle de vie des *Streptomyces* commence par la germination d'une spore en faisant pousser un ou deux tubes germinaux qui se développent en hyphes. Les hyphes se développent par ramification et extension de la pointe, établissant ainsi un réseau d'hyphes qui forment conjointement le mycélium végétatif. En réponse à des stress tels que l'épuisement des nutriments, une partie du mycélium est sacrifiée, suite à une dégradation autolytique via la mort cellulaire programmée (MCP) ; cela conduit à la libération de nutriments dans l'environnement qui seront utilisés pour la formation d'hyphes aériens et de spores. Le début de la différenciation cellulaire coïncide avec la production d'antibiotiques, ce qui offre une protection contre les micro-organismes concurrents attirés par les nutriments libérés pendant la MCP (Anne van der Meij *et al.*, 2017).

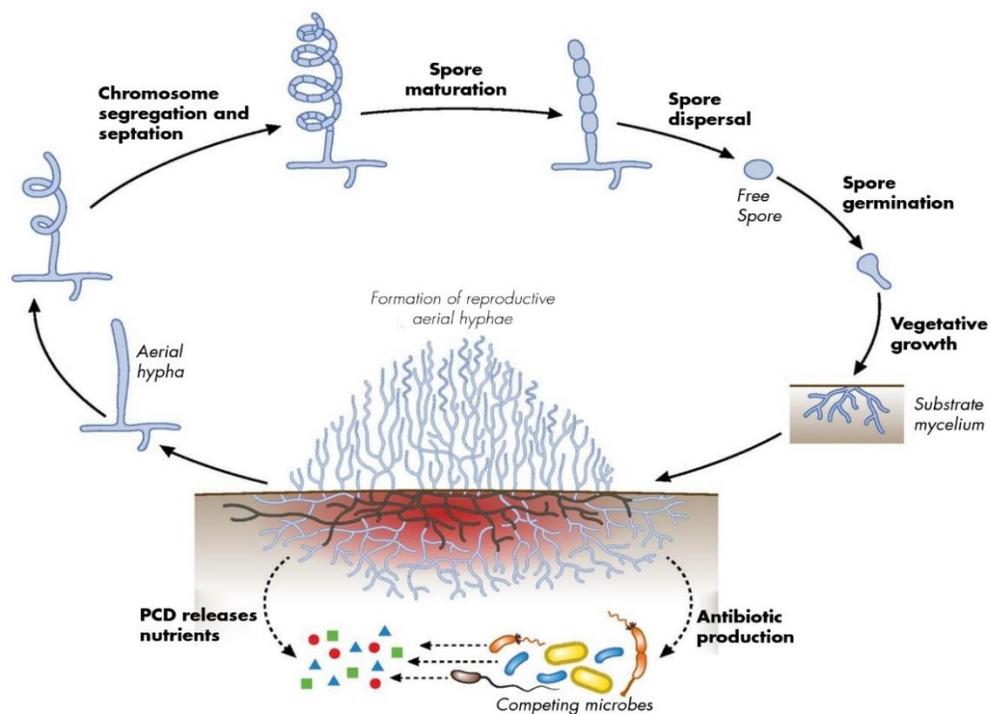


Figure 2 : Le cycle de vie de *Streptomyces* (Anne van der Meij *et al.*, 2017).

1.6 Les applications des actinomycètes

La différenciation morphologique des actinomycètes est accompagnée d'une différenciation métabolique (Bettache, 2013).

1.6.1 Dans les domaines médicaux, industriel

Depuis plusieurs décennies, les actinomycètes représentaient une source importante de divers métabolites antimicrobiens. Approximativement deux-tiers des antibiotiques naturels sont isolés des actinomycètes (Anansiriwattana *et al.*, 2006).

1.6.1.1 Les antibiotiques

Le tableau représente la liste des antibiotiques produits par diverses Actinobactéries et leur application antimicrobienne.

Tableau 1: Liste des dérivés naturels produits par des Actinobacteria (Loucif, 2010 ; Prescott *et al.*, 2018).

Applications	Produit naturel	Souche productive
Antibiotique	Clostomycine	<i>Micromonospora sp</i>
Antibiotique	Abyssomycine	<i>Verrucosipora sp</i>
Antibiotique	Tétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>
Antibiotique	Herbimycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Antibiotique	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Antifongique	Amphotéricine	<i>Streptomyces nodosis</i>
Antifongique	Nystatine	<i>Streptomyces noursei</i>
Antifongique	Transvalecine	<i>Nocardia transvalensis</i>
Anticancéreux	Bléomycine	<i>Streptomyces verticillus</i>

1.6.1.2 Les enzymes

Après les antibiotiques les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes (Bettache, 2013).

Tableau 2: Les enzymes et leurs applications industrielles (Ranjani *et al.*, 2016).

Enzyme	L'application industriel	Actinobacteria
Protéase	Aliments	<i>Nocardiopsis</i> sp.
Cellulase	Détergents	<i>Thermomonospora</i> sp.
Lipase	Laities	<i>Streptomyces griseus</i>
Xylanase	Pâtes à papier	<i>Actinomadura</i> sp.
Pectinase	Textile	<i>Streptomyces lydicus</i>
Amylase	Industries de l'amidon	<i>Streptomyces erumpens</i>
Phytase	Aliments pour les animaux	<i>Streptomyces luteogriseus</i> R10

1.6.1.3 Les probiotiques

Les probiotiques sont les substances microbiennes vivantes qui ont un effet bénéfique sur l'hôte par divers moyens, comme la modification de l'hôte associé ou de la communauté microbienne ambiante, en assurant l'utilisation améliorée de l'aliment ou en améliorant sa valeur nutritionnelle. En améliorant la réponse de l'hôte à la maladie ou en améliorant la qualité de son environnement ambiant (Ranjani *et al.*, 2016).

1.6.1.4 Les vitamines

La vitamine B12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des actinobactéries. L'isolement de la vitamine B12 à partir des fermentations d'Actinobactéries a suscité un intérêt considérable pour la production possible de vitamines par fermentations microbiennes. L'ajout de sels de cobalt aux milieux agit apparemment comme un précurseur pour que toutes les actinobactéries produisent de la vitamine. Les fermentations produisant les antibiotiques streptomycine, auréomycine, griséine et néomycine produiront également de la vitamine B12 si le milieu est complété par du cobalt sans apparemment affecter les rendements en substances antibiotiques (Ranjani *et al.*, 2016).

1.6.2 Dans le domaine agronomique

1.6.2.1 Bioherbicide

Une autre application intéressante des Actinobactéries est l'utilisation de leurs métabolites secondaires comme herbicides contre les herbes et les mauvaises herbes indésirables. *Streptomyces saganonensis* produit des herbicidines et des herbimycines qui contrôlent les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones (Xiliang, 1994).

1.6.2.2 Bioremédiation

Les actinobactéries possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour une application dans la bioremédiation des sols contaminés par des polluants organiques. Dans certains sites contaminés, les actinobactéries représentent le groupe dominant parmi les dégradeurs (Johnsen *et al.*, 2002). Ils jouent un rôle important dans le recyclage du carbone organique et sont capables de dégrader les polymères complexes (Sanscartier *et al.*, 2009).

1.6.2.3 Lutte contre les maladies des plantes

Les Actinobactéries, en particulier le genre *Streptomyces*, semblent être de bons candidats pour trouver de nouvelles approches pour lutter contre les maladies des plantes. L'agro-industrie montre un intérêt marqué pour *Actinobacteria* en tant que source de composés agro active de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et d'outils de lutte biologique (Tanaka et Omura, 1993 ; Behal, 2000).

Partie expérimentale

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Notre travail consiste à une synthèse d'articles étudiant les caractères et la classification des actinomycètes en Algérie.

2. Isolement des souches d'actinomycètes

L'isolement a été réalisé par technique de dilution (Hayakawa et Nonomura, 1987) sur un milieu contenant de la chitine-vitamine-B-agar (annexe 1), complété par de la gentamicine (10 µg/mL) et de l'amphotéricine B (50 µg/mL) (Souagui *et al.*, 2015) ou streptomycine (30 µg/L) et de l'amphotéricine B (50 µg/L) (Sarika *et al.*, 2021) ou rifampicine (5µg/mL) et de l'actidione (50µg/mL) ou pénicilline (25 mg/l), de cyclosérine (10 mg/l) et d'acide nalidixique (20 mg/l) et la nystatine à 30 mg/l, l'actidione à 50 mg/l pour inhiber la contamination bactérienne et fongique, respectivement et les plaques ont été incubées à 30 °C pendant 10 à 21 jours (Badji *et al.*, 2006) selon l'article.

Des autres milieux sont aussi utilisés dans l'isolement des actinobactéries (WYE), Bennett (annexe 1), (GLM) (annexe 1) (Boudemagh *et al.*, 2005).

Les souches d'actinomycètes sont subies à des tests préliminaire d'identification phénotypiques macro- et microscopique (morphologiques, biochimiques, physiologiques).

Les souches cibles sont utilisées pour le dépistage de l'activité fongique proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et de l'Unité de mycologie de l'Institut Pasteur (UMIP) (Boudemagh *et al.*, 2005).

Tableau 3: Les champignons cibles pour tester l'activité antifongique d'actinomycètes.

Les champignons	
Les levures	Les moisissures
<p><i>Candida albicans</i> UMIP 48,72, <i>Candida albicans</i> UMIP 884,65, <i>Candida tropicalis</i> R2 UMIP 1275,81.</p> <p><i>Candida albicans</i>, <i>Kluyveromyces lactis</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</p> <p><i>Candida albicans</i> C2, C3, IPA200 et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226</p>	<p><i>Aspergillus fumigatus</i> UMIP 1082,74.</p> <p><i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 et <i>Fusarium oxysporum</i> UMIP 625.72. <i>Alternaria sp.</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, f.sp. <i>albedinis</i>, <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>, <i>Penicillium sp</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> M333, <i>Aspergillus flavus</i> AF3,</p>

<p><i>Candida albicans</i> M2 <i>Candida albicans</i> M3 <i>Candida albicans</i> IPA200.</p>	<p><i>Fusarium culmorum</i> FC200, <i>Fusarium graminearum</i> FG3 et <i>Penicillium glabrum</i> PGI. <i>Aspergillus brasiliensis</i> AB1 <i>A. carbonarius</i> AC1 <i>A. carbonarius</i> AC2 <i>A. flavus</i> NRRL 3251 <i>Fusarium culmorum</i> FC1 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> Foa1 <i>F. o. f. sp. radicyclopersici</i> Forl, <i>Rhizoctonia solani</i> AG3.</p>
--	--

2.1 Etude de l'activité antifongique

Différentes méthodes sont utilisées pour la recherche de l'activité antifongique d'Actinobactéries.

2.1.1 La méthode des cylindres d'agar

Des cylindres d'agar de milieu Bennett et GLM (Boudemagh *et al.*, 2005) (de 3 à 6 mm de diamètre) de cultures d'actinomycètes bien chargées sont coupés et placés sur le milieu casitone pour les champignons filamenteux (annexe 1) ou YMA pour les levures (annexe 1) ou l'extrait de malt (Souagui *et al.*, 2015) (annexe 1), déjà semé par les germes d'essai (microorganismes cibles). Après, les boîtes sont laissées 2-4 heures à 4 °C pour une bonne diffusion du métabolite antifongique, les plaques ont été incubées à 28 °C pendant 24 h pour *Candida. albicans* et 48 heures pour *Candida. tropicalis* R2 et les champignons filamenteux (Lemriss *et al.*, 2003). Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'actinomycète ont été mesurés comme indication de l'activité antifongique (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Boudjelal *et al.*, 2010 ; Messaoudi *et al.*, 2015 ; Souagui *et al.*, 2015).

2.1.2 La méthode de stries croisées

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur les milieux ISP2 (annexe 1) et Bennett par la méthode à stries croisées. La souche actinobactérienne a été inoculée en ligne droite sur un milieu de culture ISP2 et Bennett solide, puis incubée pendant 10 jours à 30 °C. Après la période d'incubation, les champignons cibles ont été ensemencés dans des bandes perpendiculaires qui

traversent la bande de l'isolat. Après une incubation ultérieure à 30 °C pendant 24 heures pour les levures, et à 25 °C pendant 36 à 48 heures pour les champignons filamenteux, l'activité antifongique a été déterminée en mesurant la distance d'inhibition entre les microorganismes cibles et la souche actinobactérienne (Boudjella *et al.*, 2006 ; Badji *et al.*, 2007 ; Mustafa 2009 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2012 ; Boubetra *et al.*, 2013 ; Bouras *et al.*, 2013 ; Lahoum *et al.*, 2019).

2.1.3 Autre méthode

Les isolats testés sont cultivés sur un milieu ISP2 pendant 8 jours à 28 °C. Ensuite, les plaques ont été recouvertes de 10 mL d'ISP2 contenant 10⁴ cfu/mL des champignons cible. Après 24 à 48 heures d'incubation à 28 °C, les plaques ont été examinées pour détecter l'activité antifongique dans une zone d'inhibition de la croissance fongique autour de l'isolat d'actinomycète (Badji *et al.*, 2006).

2.2. Identification moléculaire et analyses phylogénétiques des souches d'actinomycètes sélectionnées

2.2.1 Extraction d'AND

On distingue deux étapes essentielles pour l'extraction de l'ADN.

2.2.1.1 Destruction des cellules végétatives

L'isolat d'actinomycètes a été cultivé pendant 3 à 4 jours à 28 °C avec agitation dans des fioles de 500 mL contenant 100 mL de milieu ISP2. La biomasse a été récoltée par centrifugation (7000g, 10 min) et lavée deux fois avec de l'eau distillée ou bi-distillée (Badji *et al.*, 2006).

2.2.1.2 Purification d'ADN à partir des cellules végétatives perturbées

200mg de mycélium ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN comme suit : l'échantillon a été dispersé dans 80 µL de la solution de lyse thèques, 5 µL d'une solution ARNase de 50 mg/mL ont été ajoutés, et la suspension incubée à 37 °C pendant 60 min. Dix microlitres d'une solution de protéinase K (20 mg/mL) ont été ajoutés et la solution de lyse et réincubée à 65 °C pendant 30 min. Le lysat a été extrait avec un volume égal de phénol et centrifugé (7 000 g, 10 min). La couche aqueuse a été réintroduite avec du phénol (50 % (v/v)), puis du chloroforme (50 % (v/v)). L'ADN a été récupéré à partir de la phase aqueuse par l'ajout de NaCl (150 mmol/L).

concentration finale et de 2 volumes d'éthanol froid 95% (v/v) avant la centrifugation. L'ADN précipité a été nettoyé avec 50 µL d'éthanol à 70 % (v/v), centrifugé (7000g, 10 min), remis en suspension dans 50 µL de tampon TE et stocké à -20 °C. La pureté des solutions d'ADN a été vérifiée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm, et les quantités d'ADN ont été mesurées à 260 nm (Badji *et al.*, 2006).

2.2.2 Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose

L'amplification par PCR est réalisée dans un thermocycleur (Hybaid, Omnigene Teddington, Royaume-Uni) selon les conditions suivantes : un cycle de dénaturation initiale à 94- 98 °C pendant 3 à 10 min, 30 à 45 cycles comprenant du 30 s à 1 min de dénaturation à 94 °C, puis 30 s à 1 min d'hybridation à 53 à 58 °C et 30 s à 1 min d'allongement à 72 °C, suivi d'un troisième cycle de 5 à 10 min d'allongement final à 68-72 °C. À la fin du cycle, le mélange réactionnel a été maintenu à 72 °C pendant 5 min, puis refroidi à 4 °C (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 ; Souagui *et al.*, 2015).

Après l'amplification, les produits de la PCR sont analysés (séparer) par électrophorèse sur gel d'agarose 1µL d'échantillons (Ultrapure, Bio-Rad) et 0,5 µg ml⁻¹ de bromure d'éthydiu, dans un tampon TAE 1X, et a été visualisée par fluorescence (UV) pour voir les bandes d'ADN, et en présence d'un marqueur de taille. Après la migration, le gel est examiné sous la lumière (UV) pour repérer les bandes amplifiées (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 ; Souagui *et al.*, 2015 ; Messaoudi, 2020 ; Sarika *et al.*, 2021).

Tableau 4: Les amorces utilisées en PCR.

Amorces	Séquences	Références
ADNr 16S : 91E 16S2	5' CGGGGCGAGTTAAG KAAACT 3' 5' GCC CGG GAA CGT ATT CAC 3'	Boudemagh <i>et al.</i> , 2005
ADNr 16S : 27F 1492R	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' 5' GGTTACCTTGTTACG ACTT 3'	Badji <i>et al.</i> , 2006 ; Sarika <i>et al.</i> , 2021 ; Gacem <i>et al.</i> , 2020 ; Aouiche <i>et al.</i> , 2012.

ARNr 16S :	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	Souagui <i>et al.</i> , 2015
P1	5' AAGGAGGTGATCCAGCGC 3'	
P2		

K : C ou G

2.2.3 Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage est réalisé par la technique de Sanger automatisée (Boudemagh *et al.*, 2005).

Les mêmes amorces que sont dans (le tableau 4) et un séquenceur automatisé ont été utilisés à cette fin. La séquence a été comparée pour la similitude avec les espèces de bactéries de référence contenues dans les banques de bases de données génomiques, en utilisant le NCBI BLAST disponible à [http:// www.ncbi.nih.gov/](http://www.ncbi.nih.gov/) (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 ; ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Souagui *et al.*, 2015 ; Messaoudi, 2020 ; Sarika *et al.*, 2021).

2.2.4 Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques et évolutives moléculaires ont été effectuées à l'aide du logiciel inclus dans différents version de MEGA paquet. La séquence d'ADNr 16S des échantillons d'actinomycètes isolés a été alignée à l'aide du programme CLUSTALW contre des séquences nucléotidiques correspondantes de représentants du genre *Actinomadura* extraites de GenBank. Des matrices de distance évolutives ont été générées et un arbre phylogénétique a été déduit par la méthode de jointure voisine (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 ; ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Souagui *et al.*, 2015 ; Messaoudi, 2020 ; Sarika *et al.*, 2021).

2.2.5 Hybridation ADN-ADN

Le principe d'hybridation est de comparer l'ADN génomique de deux souches bactériennes, l'une est une espèce de référence connue et l'autre est une souche bactérienne isolée. Cette analyse est demandée dans le cas où les deux souches bactériennes partageant un pourcentage de similarité supérieur à la limite de (98.65%), fixée par (Kim *et al.*, 2014), pour différencier deux souches bactériennes proches. En effet, si le pourcentage de renaturation (après hybridation) mesuré entre les deux ADN est inférieur à 70 % cela veut dire que les deux souches appartiennent à deux espèces bactériennes différentes (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 ; ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Souagui *et al.*, 2015 ; Messaoudi, 2020 ; Sarika *et al.*, 2021).

Chapitre 3 Résultats et Discussions

Dans cette partie on présente les résultats rapportés dans les travaux étudiés concernant les parties relatives à la recherche de l'activité antifongique des Actinobactéries contre certaines souche cible et l'étude phylogénique de ces bactéries.

3.1. Résultats de l'activité antifongiques

Le tableau 5 résume les résultats des 30 Actinobactéries isolés des différentes régions sur différents milieux de culture et par différentes méthodes ainsi les différentes espèces fongiques cibles.

Tableau 5: Les résultats de l'activité antifongique.

Nombre d'isolats	Région	Souche cible	Activité observé	Références
Une seule souche	Ghardaïa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	+++	Aouiche <i>et al.</i> , 2012.
		<i>Candida albicans</i> C2	++	
		<i>Candida albicans</i> C3	+++	
		<i>Candida albicans</i> IPA200	+++	
		<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	+++	
		<i>Aspergillus flavus</i> AF3	++	
		<i>Fusarium culmorum</i> FC200	+++	
		<i>Fusarium graminearum</i> FG3	+++	
		<i>Penicillium glabrum</i> PG1	+++	
Une seule souche	Beni-Abbes (Bechar)	<i>Candida albicans</i>	++	Badji <i>et al.</i> , 2006.
		<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	
		<i>Alternaria</i> sp	+++	

		<i>Fusarium oxysporum, f.sp. albedinis,</i>	+++	
		<i>Fusarium. oxysporum f.sp. lini,</i>	+++	
		<i>Penicillium sp</i>	+++	
27	Ouargla, Biskra et El-Oued.	<i>Candida albicans UMIP 48,72</i>	GLM ++	Boudemagh <i>et al.</i> , 2005
			Bennett -	
		<i>Candida albicans UMIP 884,65</i>	GLM ++	
			Bennett -	
		<i>Candida tropicalis R2 UMIP 1275,81</i>	GLM ++	
			Bennett -	
		<i>Aspergillus fumigatus UMIP 1082,74</i>	GLM +	
			Bennett +	
		<i>Aspergillus niger ATCC 16404</i>	GLM ++	
Bennett +				
<i>Fusarium oxysporum UMIP 625.72</i>	GLM ++			
	Bennett +			
Une seule souche	Adrar	<i>Candida albicans M2</i>	ISP2 +++	Lahoum <i>et al.</i> , 2019.
			Bennett +++	
		<i>Candida albicans M3</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Candida albicans IPA200</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Saccharomyces cerevisiae ATCC 4226</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Aspergillus brasiliensis AB1</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Aspergillus carbonarius AC1</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
<i>Aspergillus carbonarius AC2</i>	ISP2 +++			

			Bennett +++	
		<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Fusarium culmorum</i> FC1	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> <i>Foa1</i>	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> Forl	ISP2 +++	
			Bennett +++	
		<i>Rhizoctonia solani</i> AG3	ISP2 +++	
			Bennett +++	

D'après ces résultats on peut estimer que les actinomycètes ont une propriété importante dans la production de certains composants particulièrement les antibiotiques. Une grande majorité des antibiotiques ont été isolés dans des nombreux programmes testés pour la recherche de nouveaux agents chimio-thérapeutiques contre diverses bactéries (Sarika *et al.*, 2021).

Selon les résultats de Aouiche *et al.* (2012), l'activité antimicrobienne de l'isolat de Ghardaïa est forte à très forte contre les champignons filamenteux toxigènes et moyenne contre les trois souches de *Candida albicans* et très forte contre *Saccharomyces cerevisiae*.

Badji *et al.* (2006), ont trouvé une activité antimicrobienne à large spectre. Il était fortement actif contre les champignons tels que *Alternaria* sp. *Penicillium* sp. Toutefois, il était modérément actif contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium. oxysporum* f.sp. *lini* et faiblement actif contre les levures.

Alors que dans le travail de Boudemagh *et al.* (2005), montre une absence totale de l'activité contre les levures dans le milieu Bennett et faible contre les moisissures avec une activité forts à remarquable dans le milieu GLM pour les deux types de souche cible.

Selon cette étude, le milieu GLM est le plus favorable à l'isolement et la production des molécules antimicrobiennes des actinomycètes des sols sahariens de ces régions.

Par ailleurs, Lahoum *et al.* (2019), rapporte une activité très forte et remarquable contre tous les champignons cible et dans les différents milieux (Bennett, ISP2), la souche ABH26 a montré une forte capacité à inhiber la croissance des levures et des champignons filamenteux.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Tabelsi *et al.* (2016), qui présente des nouvelles espèces des *Streptomyces* isolés à partir du sol de notre voisin Tunisie.

De même, l'étude de Ouhdouch *et al.* (2001), réalisée dans le Maroc montre qu'entre 32 isolats d'actinobactérie antifongique ont été isolés de différents écosystèmes 40% de ces isolats sont obtenus à partir du sol rhizosphérique de *Poenix dactylifera L.* et *argania. spinosa*.

Par contre, Arafat *et al.* (2016), qui ont fait leur étude sur la région de Saudia, indiquent une absence de l'activité de *Streptomyces* NBR vis-à-vis deux champignons filamenteux, *Aspergillus niger ATCC16404* et *Aspergillus flavus ATCC16883* avec une activité très forte contre *Candida albicans*.

L'absence de l'activité antifongique chez certaines Actinobactéries contre certains germes cible en particulier *Candida albicans* peut être due à l'évolution de la résistance de ces germes vis-à-vis ces molécules antifongiques.

En revanche, on peut remarquer que les résultats de recherche d'activité antifongique réalisés par la méthode de stries croisées selon Aouiche *et al.* (2012) et Lahoum *et al.* (2019), sont plus élevés par rapport aux résultats des autres méthodes appliquées.

Ces travaux suggèrent qu'il y'a plusieurs méthodes utilisées pour la mise en évidence de l'activité antifongique des Actinobactéries mais les deux méthodes les plus utilisées sont la méthode des cylindres d'agar et la méthode de stries croisées respectivement. On note que cette dernière est moins appliquée car elle permet de donner une mauvaise observation des zones d'inhibition.

Ainsi, plusieurs milieux de culture sont utilisés dans le même objectif mais on peut remarquer que le milieu ISP2 est le plus favorable pour la production des substances antimicrobiennes.

3.2. Résultat de l'identification moléculaire

Les résultats de la caractérisation moléculaire ont été effectuée par amplification par PCR.

Dans l'identification des actinomycètes, la séquence du gène de l'ADNr 16S a joué un rôle vital, ce qui est évident par des nombreux travailleurs (Al-Ansari *et al.*, 2020, Daigham et Mahfouz, 2020).

Cette méthodologie est simple, rapide et permet de réduire considérablement les tests phénotypiques en limitant à quelques caractères discriminants capables de séparer et d'identifier les actinomycètes. Cette approche semble très indiquée lors d'un dépistage rapide d'un grand nombre de souches afin d'identifier le genre actinomycète présent dans les différents isolats (Boudemagh *et al.*, 2005).

Dans l'étude de Aouiche *et al.* (2012), la séquence partielle du gène codant pour l'ARN 16S (1464 pb) est déterminée et déposée au niveau du GenBank sous le numéro d'accèsion (JN225875). L'identification moléculaire de l'isolat d'actinomycètes a permis de rapprocher l'isolat PAL111 de l'espèce *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 avec un taux de similarité de 99,7 %. La position phylogénétique de cet isolat vis-à-vis des espèces les plus proches du genre *Streptomyces* est représentée sur la Figure 3.

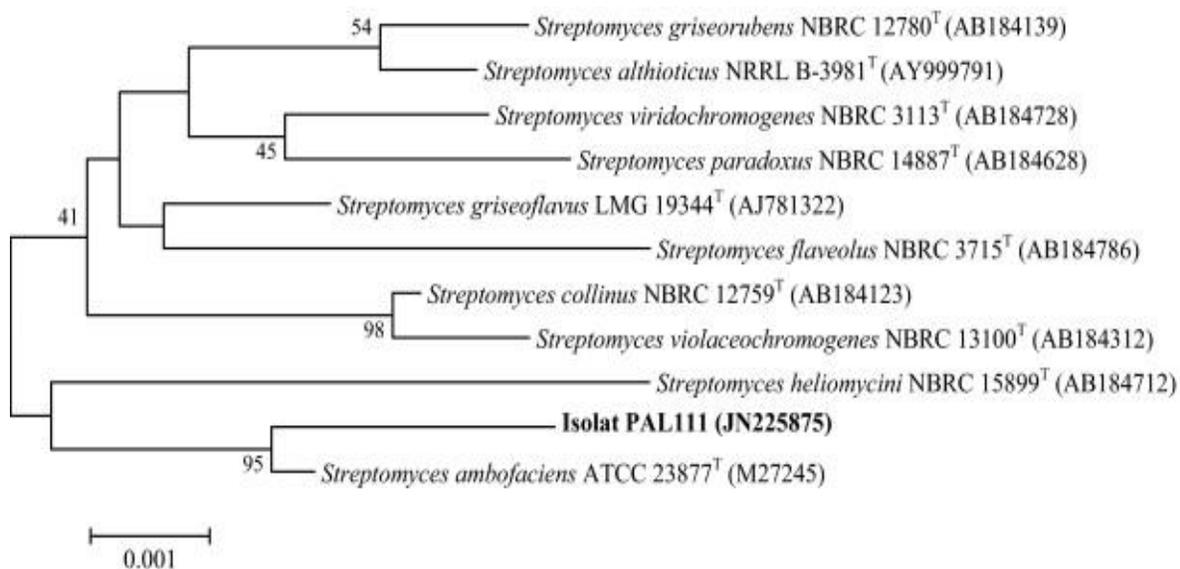


Figure 3: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat PAL111 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

Autre étude réalisée par Souagui *et al.* (2015) dans le sol de la région de Boussaâda montre que la souche étudiée peut être étiquetée comme *Streptomyces sp.* SY-BS5. Les valeurs de similitude les plus élevées ont été trouvées entre les séquences de *Streptomyces sp.* SY-BS5 et *Streptomyces cyaneofuscatus* (JCM4364T) (99 %).

Les résultats du séquençage des souches d'actinomycètes C3 et 30 (El Oued) dans le travail de Boudemagh *et al.* (2005) ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes (comme indique le tableau 6) bruts sous le logiciel Chromas. Ces séquences sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast, pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque de données (GenBank).

Tableau 6: Résultat de l'identification moléculaire et le pourcentage d'homologie.

Isolat	Résultat du Blast	Pourcentage d'homologie
30 (El Oued)	<i>Streptomyces caviscabies</i> , <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces setonii</i>	100%
C3 (El Oued)	<i>Streptomyces himgiriensis</i> , <i>Streptomyces virginiae</i> , <i>Streptomyces lavendulae</i> <i>Streptomyces subbrutilus</i> .	99%

En outre, les résultats de Boudemagh *et al.* (2005), dans les trois régions nous donnent une idée que le sol rhizosphérique de la région de Biskra offre le plus grand nombre d'actinomycètes avec 52%, contre les deux sols non rhizosphériques d'El-Oued et d'Ouargla, avec, respectivement, 18% et 30%. Mais la présence d'un grand nombre d'actinomycètes dans le sol rhizosphérique ne justifie pas une recherche juste pour ce type de niche écologique. Ces recherches indiquent que les deux seules souches présentant une activité antifongique ont été isolées du sol non rhizosphérique de la région d'El-Oued.

Également, de nombreuses études réalisées dans ce sujet (Boudjella *et al.*, 2006 ; Badji *et al.*, 2007 ; Boudjelal *et al.*, 2010 ; Meklat *et al.*, 2013 ; Boubetra *et al.*, 2015 ; Lahoum *et al.*, 2019) sur différentes régions (en particulier les sols arides) rapportent que le sol d'Algérie est une niche écologique de divers espèce d'Actinobactéries.

Conclusion

Conclusion

La propagation des maladies causées par des champignons pathogènes constitue une préoccupation sanitaire majeure dans nos jours, l'exigence de la recherche des nouvelles substances bioactive contre ces champignons pathogènes est un pas essentiel pour éliminer ces maladies.

L'objectif principal de ce travail est une étude bibliographique des travaux de recherches réalisés sur le sujet des Actinobactéries du sol aride de l'Algérie, et particulièrement l'étude de l'activité inhibitrice de ces dernier vis-à-vis quelques champignons pathogènes ainsi, les caractères phylogéniques de ces bactéries.

D'après les 30 isolats étudiés, on remarque que les résultats sont variés en raison de la production de métabolite secondaire qu'est variée d'une souche à un autre selon la composition de milieu de culture, de la méthode utilisée, et la souche cible (champignons filamenteux/ levure).

Aussi, on peut déduire que tous les souches d'Actinobactéries indiquées dans les travaux étudiés montrent une activité très forte contre des divers champignons filamenteux et faible à modéré contre les levures.

Les meilleurs résultats ont été observé dans la région d'Adrar, cet isolat a montré une activité à large spectre contre différentes souches des levures et des moisissures.

D'après les études présentées on peut conclure que les Actinobactéries présentent des caractères phénotypiques et génotypiques différents ainsi une variation dans l'activité inhibitrice et la fréquence d'isolement en fonction de l'origine d'isolement.

Cependant, le sol du Sahara de l'Algérie est riche de différent genre et espèces des Actinomycètes en particulier les *Streptomyces* capables de produire des molécules bioactives utilisés dans des plusieurs domaines biotechnologiques.

Enfin, il est à noter que malgré ces travaux, les études des caractères moléculaire sont encore au début et insuffisant dans l'Algérie.

Nous espérons dans l'avenir, d'identifier des souches actives notamment contre les espèces de *Candida* et analysées la nature des substances antimicrobiennes par des techniques performances (HPLC, RMN...).

Référence bibliographique

Références bibliographiques

A

Al-Dhabi N. A., Ghilan A. K. M., Arasu M.V. 2018. Characterization of Silver Nanomaterials Derived from Marine Streptomyces sp. Al-Dhabi-87 and Its In Vitro Application against Multidrug Resistant and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Clinical Pathogens. *Journal Nanomaterials*, 8(5): 279.

Anandan R., Dhanasekaran Dharumadurai D., Manogaran G. P. 2016. An Introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Edition by Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, pp. 4-38.

Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M. A., Alvi R. F., Aslam M. A., Qamar M.U., Salamat M. K. F., Baloch Z. 2018. Antibiotic 329 resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*, 11: 1645-1658.

B

Badis A., Sabaou N., Djibaou R., Sarag M. 2006. La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques. *Agriculture biologique et protection des cultures (Session 5)* pp 1167-1676.

Behal V. 2000. Bioactive products from Streptomyces, *Adv Appl Microbiol.* 47:113-156.

Bettache A. 2013. Les actinobactéries producteurs d'enzymes cellulolytique. Production d'endoglucanases : optimisation, caractérisation et purification. Paf, p.1,13,18.

D

Demain A. L. 2000. Microbial biotechnology. *Trends in biotechnology*, 18(1):26-31.

E

Embley T. M., Stackebrandt E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 48: 257-289.

Ensign J.C., Normand P., Burden J.P., Yallop C.A. 1993. Physiology of some actinomycete genera. *Research in Microbiology*, 144(8):657-660.

F

Flårdh K., Buttner MJ. 2009. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Journal Nature Reviews Microbiology*, 7:36-49.

H

Hayakawa, M. et H. Nonomura. 1987. Humic acid – vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* 65:501- 509.

Hazarika S. N., Thakur D. 2020. Chapter 21 – Actinobacteria. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*, 443-476.

J

Johnsen AR., Winding A., Karlson U., Roslev P. 2002 Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol*, 68(12):6106-6113.

L

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

Mccormick Jr, Flårdh K. 2012. Signals and regulators that govern Streptomyces development. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1):206-231.

Meij A., Sarah F. Worsley S. F., Hutchings M. I., Wezel G. P. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3):392-416.

O

Omura Satoshi. 1992. The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms. Springer Verlag, (New Yourk) P. 3.

P

Prescott L. M., Willey J. M., Sherwood B. 2018. Microbiologie de Prescott 5^{ème} édition, la les Actinobactéries : des bactéries Gram positive à haute teneur en G + C, p. 560.

Procop G. W., Deirdre L. Church D. L., Hall G. S., William M. Janda W. M. 2020. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 7^{ème} édition, Aerobic Actinomycetes, p. 961.

Q

Qinyuan L., Chen X, Jiang Y., Jiang Ch. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Edition by Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, pp. 59-86.

S

Sanscartier D., Zeeb B., Koch I., Reimer K. 2009. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. Cold Reg Sci Technol, 55(1):167-173.

T

Tanaka Y., Omura S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin, Annu Rev Microbiol. 47(1):57-87.

X

Xiliang J. 1994. The mechanism of agricultural antibiotic. Biol Control Aviso, 10 (2):76–81.

Y

Yvonne M., Stegmann E. 2019. Actinomycetes: The Antibiotics Producers. Journal antibiotics 8(3):105-109.

Z

Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (Pt 3):589–608.

Annexes

Annexes 1

- **Les articles utilisés**

1. **Al-Ansari M., Kalaiyarasi M., Almalki M.A., Vijayaraghavan P. 2020.** Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment. *J. King Saud Univ. Sci.* 32(3):1993–1998.
2. **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 toxinogènes résistants aux antibiotiques. *Journal Mycology*, 22(1):42-51.
3. **Arafat H. H., Elnaggar W. A., Abdelwahab M. F. 2016.** Biochemical and molecular identification and antimicrobial activity of antibiotic-producing *streptomyces* sp. isolated from Saudi Arabia. *International Journal of Biology Pharmacy and Allied Sciences*, 5(6):1215-1229.
4. **Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A, Mathieu F., Seguin E, Tillequin F. 2007.** Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(6) :403-412.
5. **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.
6. **Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A., Mathieu F. 2013.** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research journal* 168(4):223-230.
7. **Boudemagha A., Kitounia M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmia L., Reghioua S., Zerizera H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. 2005.** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*, 15(1):39-44.

8. **Boudjelal F., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2010.** Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Annals of Microbiology*, 61(2):299-305.
9. **Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2006.** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161(4):288-298.
10. **Bouras N., Meklat A., Toumatia O., Mokrane S., Holtz M. D., Strelkov S. E., Sabaou N. 2013.** Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25):3199-3208.
11. **Daigham, G.E., Mahfouz, A.Y., 2020.** Isolation, characterization, and screening of actinomycetes producing bioactive compounds from Egyptian soil. *Egypt. Pharmaceut. J.* 19, 381.
12. **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.
13. **Kim M., Oh H. S., Park S. C., Chun J. 2014.** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64: 346–351.
14. **Lahoum A., Sabaou N., Bijani Ch., Bouras N., Pont F., Snini S. P., Mathieu F. 2019.** Antimicrobial activities of novel bipyridine compounds produced by a new strain of *Saccharothrix* isolated from Saharan soil. *Saudi Pharmaceutical journal*, 27(1):56-65.
15. **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A., Boiron P. 2003.** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(11):669-674.
16. **Meklat A., Bouras N., Zitouni N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P., Sabaou N. 2013.** *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(1):301–307.

17. **Messaoudi O. 2020.** Isolement et caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir d'actinomycètes isolés du sol algérien. Thèse de doctorat d'état, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Pp 27-31
18. **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 sebkhia of Kenadsa, Algeria. *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, 5(6):438-445.
19. **Mustafa O. 2009.** Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology*, 8 (13):3007-3017.
20. **Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C. 2001.** Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 37(2):69-74.
21. **Kumara P.S., Duraipandiyan V., Ignacimuthua S. 2014.** Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 30(9) :435-446.
22. **Sarika K., Sampath G., Govindarajan R. K., Ameen F., Alwakeel S., Al Gwaize H. I., Komuraiaha T. R., Gangalla Ravi G. 2021.** Antimicrobial and antifungal activity of soil actinomycetes isolated from coal mine sites. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6):3553-3558.
23. **Souagui Y., Tritsch D., Grosdemange-Billiard Ch., Kecha M. 2015.** Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2):108-115.
24. **Trabelsi I., Oves D., Manteca A., Genilloud O., Altalhi A., Nour M. 2016.** Antimicrobial Activities of Some Actinomycetes Isolated from Different Rhizospheric Soils in Tunisia. *Current Microbiology*, 73, 220–227.

Annexes 2

Les milieux de cultures

• Les milieux d'isolement des actinomycètes

Milieu chitine-vitamines-B-Agar (Messaoudi. O 2020).

Chitine:	2 g/L
K ₂ HPO ₄ :	0,35 g/L
KH ₂ PO ₄ :	0,15 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O:	0,2 g/L
NaCl:	200 g/L
CaCO ₃ :	0,02 g/L
FeSO ₄ , 7H ₂ O:	0.01 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O:	0.001 g/L
MnCl ₂ , 4H ₂ O:	0.001 g/L
Agar:	18 g/L
Eau distillée :	1000 ml.

pH = 7,2.

Milieu WYE : modifié par Reddi et Rao (Boudemagh A et *al.*, 2005).

Extrait de levure oxoïde :	0,25 g l ⁻¹
Agar oxoïde:	18 g l ⁻¹

pH= 7,2

Les milieux d'isolement d'actinomycètes et de l'étude de l'activité antifongique

Milieu Bennett (Boudemagh A et *al.*, 2005).

Extrait de levure :	1 g l ⁻¹
Extrait de bœuf :	1 g l ⁻¹

Casaminoacide:2 g l⁻¹

Glucose:10 g l⁻¹

Agar:15 g l⁻¹

pH= 7,3

Milieu GLM:(Boudemagh A et al., 2005).

Extrait de levure :3 g l⁻¹

Extrait de malt :3 g l⁻¹

Peptone:5 g l⁻¹

Glucose:10 g l⁻¹

Agar:20 g l⁻¹

pH=7,2

Le milieu casitone

Bacto casitone:9 g l⁻¹

Extrait de levure : 5 g l⁻¹

Citrate de sodium : 10 g l⁻¹

Glucose : 20 g l⁻¹

Phosphate di-hydrogène de potassium :0,54 g l⁻¹

Phosphate di-sodium d'hydrogène : 3,34 g l⁻¹

Agar :18 g l⁻¹

Le milieu YMA

Base d'azote de levure :6,5 g l⁻¹

Asperges:1,5 g l⁻¹

Glucose:10 g l⁻¹

Agar:20 g l-

Le milieu ISP2: (Shirling., Gottlieb, 1966)

Glucose4 g

Extrait de levure4 g

Extrait de malt10 g

Agar20 g

Eau distillée..... 1000

ml

pH= 7,2.

Le milieu MEA

Extrait de malt : 30,0 g

Maltose :12,75 g

Dextrine :2,75 g

Glycérol :2,35 g

Peptone :0,78 g

Agar-agar :15,0 g

Ajuster le pH à 4,5 par addition d'une solution stérile d'acide lactique à 10%

Solution pour la purification d'ADN à partir des cellules végétatives perturbées

La solution de lyse thèques

Tris-HCl :100 mmol/L

EDTA:20 mmol/L

NaCl:250 mmol/L

SDS:2 % m/v

Lysozyme :1 mg/mL

pH=7

Tampon TE

Tris-HCl : 10 mmol/L

pH=7,4

EDTA : 1 mmol/L pH=8

Résumé

المخلص

يهدف هذا الموضوع لدراسة نشاط التثبيط لدى بكتيريا Actinomycète المعزولة من التربة الجافة من مناطق مختلفة في الجزائر ضد بعض الجراثيم الفطرية المستهدفة ودراسة الخصائص الجزيئية لهذه المعزولات.

النتائج المتحصل عليها من خلال البحث البيبليوغرافي توضح أن، بكتيريا Actinomycète لديها قدرة عالية على إنتاج جزيئات قادرة على تثبيط الجراثيم الفطرية المسببة لأمراض لدى الكائنات الحية، من بين الفطريات الخيطية المدروسة والخمائر التي أظهرت حساسية عالية جدا نجد (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavu* *Fusarium culmorum* *Fusarium graminearum*, *Penicillium glabrum*, *Alternaria sp*, *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae*) *Penicillium sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, *Rhizoctonia solani* بينما كانت الخمائر (*Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis*) أقل حساسية.

يشير التعريف الجزيئي عن طريق التسلسل الجيني للحمض النووي الريبي منقوص الاكسجين 16s ADNr إلى أن جميع العزلات التي تمت دراستها تنتمي وراثيا إلى جنس *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الشعاعية، النشاط المضاد للفطريات، الفطريات الخيطية، الخمائر، التربة الجافة.

Résumé

Le but de ce travail est l'étude bibliographique de l'activité inhibitrice d'Actinobactéries isolées de sol des régions aride d'Algérie vis-à-vis des germes fongiques cibles, et les caractérisations moléculaires de ces isolats.

Les résultats rapportés par les travaux étudiés montrent que les Actinobactéries ont une haute capacité à produire des molécules capables d'inhiber des germes fongiques très pathogène chez l'homme et l'environnement, les champignons filamenteux étudiés (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium glabrum*, *Alternaria sp*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, *Rhizoctonia solani*) et la levure *Saccharomyces cerevisiae* montraient une sensibilité très forte par contre les levures *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis* sont peu sensibles.

L'identification moléculaire par le séquençage du gène d'ADNr 16S indique que tous les isolats étudiés appartenaient génétiquement au genre de *Streptomyces*.

Mots clés : Actinobactéries, activité antifongique, champignon filamenteux, levures, sol aride.

Abstract

The interests of this subject, is the study of the inhibitory activity of Actinobacteria isolated from soil of arid regions of Algeria against target fungal germs, and the molecular characterizations of these isolates.

The results obtained by our bibliographic synthesis show that Actinobacteria have a high capacity to produce molecules capable of inhibiting highly pathogenic fungal germs in humans and the environment filamentous fungi studied (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium glabrum*, *Alternaria sp*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, *Rhizoctonia solani*) and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) showed a very strong sensitivity on the other hand yeasts (*Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis*) are not very sensitive.

Molecular identification by sequencing the 16S rDNA gene indicates that all the isolate studied belonged g-enetically to the *Streptomyces* genus.

Key words: Actinobacteria, antifungal activity, filamentous fungus, yeasts, arid soil.