

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Isolement des Actinomycètes à partir des insectes et évaluation de leurs activités biologique

Présenté par :

- Ben amar Ikram
- Chorana Karima

Devant le jury :

Président	Mr. Zarrouk Salim	Université Amar Telidji Laghouat
Examineur	Mr. Zerrouki Med Houcine	Université Amar Telidji Laghouat
Rapporteur	Mr. Messaoudi Omar	Université Amar Telidji Laghouat

Année universitaire : 2019/2020

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Isolement des Actinomycètes à partir des insectes
et évaluation de leurs activités biologique**

Présenté par :

- Ben amar Ikram
- Chorana Karima

Devant le jury :

Président	Mr. Zarrouk Salim	Université Amar Telidji Laghouat
Examineur	Mr. Zerrouki Med Houcine	Université Amar Telidji Laghouat
Rapporteur	Mr. Messaoudi Omar	Université Amar Telidji Laghouat

Année universitaire : 2019/2020



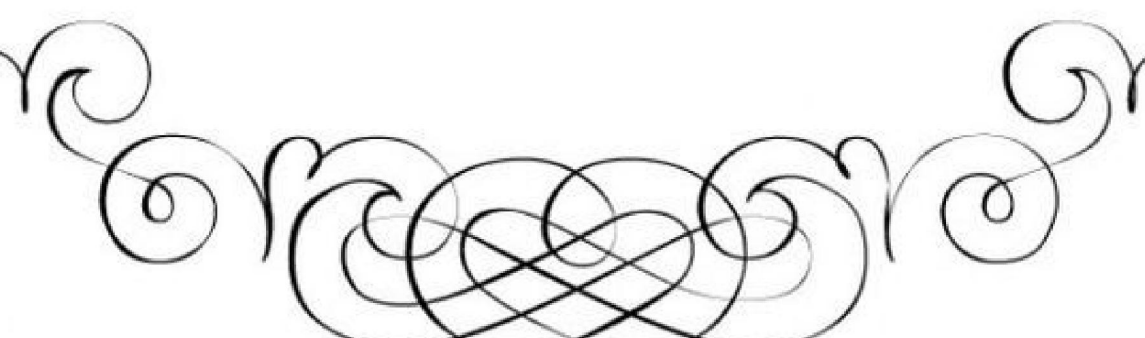
Remerciements

En tout premier lieu, on tient à remercier «Allah» qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

On exprime nos profonds remerciements à notre directeur de mémoire, Monsieur Messaoudi Omar pour l'aide compétente qu'il nous 'a apportée, pour sa patience et son encouragement. On veut vraiment vous remercier car on a eu beaucoup de chance de vous avoir comme directeur de mémoire de fin d'étude.

On tient à remercier aussi les ingénieurs du laboratoire Sciences Biologiques pour leur aide, ainsi que toutes les personnes qui ont participé à l'avancée de notre travail et à la réalisation des études expérimentales.

Enfin on remercie nos familles et surtout nos parents, sans oublié tous nos amis.





Dédicace

Je dédie ce modeste travail
à ma mère aucun hommage
ne pourrait être à la hauteur de l'amour
Dont ils ne cessent de me combler.
Que dieu lui procure bonne santé et longue vie.

A celui que j'aime beaucoup
et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé *Omar*

Et bien sur à mes chères tantes et oncles,
Et surtout mon oncle *Mohammed* et sa femme
Sans oublié ma grand-mère que j'aime beaucoup.

A toute ma famille, et mes amis,
A mon binôme *Karima*
Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin
pour que ce projet soit possible,

Je vous dis merci.

Ikram



Dédicace

Avec toute ma gratitude,
je dédie cet humble travail de mes études,
en exprimant ma profonde gratitude à tous mes proches.

Particulièrement :

A

Ma Mère adorée pour tous ses bienfaits, sa tendresse,
ses sages conseils dont je toujours bénéficie.

A

Mon père pour sa tendresse, et ses conseils.

A

Mes chères frères et sœurs

A

Toute ma famille.

A

Ma chère amie IKRAM pour ses encouragements,
pour sa bon compagnonnage
du début du parcours universitaire
jusqu'au ce jour.

Karima



ملخص

يهدف هذا البحث إلى عزل سلالات الفطريات الشعاعية من القناة المعوية للحشرات وتقييم نشاطها البيولوجي. جمعت 20 عينة من نحل العسل والدبابير من منطقة زراعية بجمدة، الأغواط، تم تعقيم العينات خارجياً لإزالة الميكروبات السطحية ليتم عزل الفطريات الشعاعية من القناة الهضمية للحشرات، بعد سحق الحشرات المدروسة، يتم زراعة 1 مل من المستخلص على وسط HV و CAA. تهدف خطوات العمل التالية بشكل أساسي إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات للسلالات التي تم الحصول عليها باستخدام تقنية أسطوانة أجار مقابل السلالات المرجعية، ثم السلالات التي تمثل نشاط بيولوجي مثير للاهتمام، سيتم بعد ذلك استخلاصها من المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجياً، بعد النمو على الوسط السائل. يتم إجراء تقييم النشاط المضاد للميكروبات، وكذلك حساب الحد الأدنى للتركيز المثبط للمستخلصات الخام المحضرة، بواسطة طريقة التخفيف في 96 طبقاً.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الشعاعية، مكروبات أمعاء الحشرات، نشاط مضاد للميكروبات، عزل واستخراج.

Résumé

Cette présente recherche vise à isoler des souches d'Actinomycètes à partir de microbiote intestinal des insectes, et l'évaluation de leur activité biologique.

Un total de 20 échantillons d'abeilles mellifères et guêpes ont été collectés à partir d'un champ agricole à Hamda, Laghouat. Les échantillons subissent un lavage de stérilisation externe pour éliminer la flore microbienne superficielle. L'isolement des actinomycètes à partir de tube digestif des insectes, est réalisé après l'écrasement des insectes étudiés, puis l'ensemencement de 1 ml de l'extrait sur les milieux HV et CAA.

Les étapes suivantes du travail visent surtout à évaluer l'activité antimicrobienne des souches obtenues par la technique des cylindres agar contre des souches de référence, ensuite les souches qui possèdent une activité biologique intéressante, vont subir ensuite une extraction de leurs métabolites secondaires bioactives, après une croissance sur le milieu liquide. L'évaluation de l'activité antimicrobienne, ainsi que le calcul de la concentration minimale inhibitrice des extraits bruts préparés, est réalisé par la méthode de dilution dans des plaques de 96 puits.

Mots clés : Microbiote intestinale des insectes, Isolement, Actinomycète, Activité antimicrobienne, Extraction.

Abstract

This research aims to isolate strains of Actinomycetes from the intestinal tract of insects, and the evaluation of their biological activity.

A total of 20 samples of honey bees and wasps were collected from an agricultural farm in Hamda, Laghouat. The samples were externally sterilized to remove surface microbial flora. The isolation of actinomycetes from the digestive tract of the insects, is carried out after crushing the insects studied, then inoculating 1 ml of the extract on the HV and CAA media.

The following steps of the work are mainly aimed to evaluate the antimicrobial activity of the strains obtained by the agar cylinder technique against reference strains, then the strains that possess an interesting biological activity, will then be extracted from their bioactive secondary metabolites, after growth on the liquid medium. The evaluation of the antimicrobial activity, as well as the calculation of the minimum inhibitory concentration of the prepared crude extracts, is performed by the dilution method in 96-well plates.

Key words: Insect intestinal microbiota, Isolation, Actinomycete, Antimicrobial activity, Extraction.

Liste des abréviations

ATCC: American type collection culture
CAA: Milieu caséine amidon agar.
CaCO₃ : carbonate de calcium
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
FeSO₄ 7H₂O : sulfate de fer sept fois hydraté.
G+C: Coefficient de Chargaff.
HCl : acide chlorhydrique.
HV: acide humique vitamine.
KH₂PO₄ : phosphate monopotassique.
K₂HPO₄ : phosphate dipotassique.
KCl: chlorure de potassium.
KH₂PO₄ : phosphate monopotassique.
KH₂PO₄ :potassium dihydrogen phosphate.
MgSO₄ 7H₂O : sulfate de magnésium sept fois hydraté.
NaCl : Chlorure de sodium.
PBS : phosphate Buffered Saline
pH : potentiel d'hydrogène.
Tpm : tours par minute.
UFC : Unité Formant Colonie
µm micromètre

Liste des figures

Figure 1	Images de microscope électronique à balayage de (a) cocci de <i>Micrococcus luteus</i> , (b) bâtonnets de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , (c) hyphes ramifiées de <i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> , (d) mycélium fragmentaire de <i>Nocardia asteroides</i> et (e) hyphes aériennes ramifiées de <i>Streptomyces mangrovisoli</i> .	04
Figure 2	Différentes organisations de spores dans les <i>Actinobactéries</i> . (a) <i>Saccharomonospor aglauca</i> , (b) <i>Microbispora corallina</i> , et (c) <i>Streptomyces sp.</i>	05
Figure 3	Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulés.	07
Figure 4	Un arbre phylogénétique basé sur le génome pour 97 séquences du génome du phylum <i>Actinobacteria</i> .	10
Figure 5	Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons	15
Figure 6	A : ruche des abeilles mellifères, B : nid des Guêpes.	15
Figure 7	Rangées et numéros d'une plaque à 96 puits.	21

Liste des tableaux

Tableau 1	Nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon dans le milieu HV	22
------------------	--	-----------

Table des matières

Remerciements	I
Dédicace	II
ملخص	III
Résumé	III
Abstract	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Définition des Actinomycètes	3
2. Historique	3
3. La structure cellulaire des <i>Actinobactéries</i>	4
3.1 Diversité de la morphologie cellulaire chez les <i>Actinobactéries</i>	4
3.1.1 Mycélium	4
3.1.2 Formation des spores	5
4. Exigences en matière de croissance	6
5. Cycle de vie des Actinomycète	6
6. Les facteurs physiologiques et la distribution des Actinobactéries	7
7. Classification et taxonomie d'Actinobactéries	8
7.1 Situation actuelle de la taxonomie des actinobactéries	8
7.2 Critères classiques en matière de taxonomie	8
7.3 La classification actuelle	9
8. Les <i>Actinobactéries</i> comme sources des produits naturels	10
8.1 Les <i>Actinobactéries</i> comme sources d'antibiotiques	10
8.2 Les <i>Actinobactéries</i> comme sources d'insecticides	11
8.3 Les <i>Actinobactéries</i> comme sources de bioherbicide et de bioinsecticide	12
8.4 Les <i>Actinobactéries</i> comme sources d'antifongiques	12
Matériels et Méthodes	
1. Collecte des échantillons	15
2. L'isolement des Actinomycètes	15
2.1 Le traitement des échantillons	15

2.2	Préparation de la suspension de dilution	16
2.3	Les milieux de cultures.....	16
2.4	L'isolement	16
3.	Caractérisation des souches d'Actinomycètes.....	16
3.1	Observation macroscopique.....	17
3.2	Observation microscopique	17
3.3	La Purification.....	17
3.4	Conservation	17
4.	Activités biologiques des Actinomycètes.....	18
4.1	Activités antibactériennes	18
4.1.1	Les souches tests.....	18
4.1.2	Préparation de l'inoculum.....	18
4.1.3	La méthode des cylindres d'agar.....	18
5.	L'extraction des métabolites secondaire.....	18
6.	Criblage antibactériennes via la méthode de concentration minimale d'inhibition	19
6.1	Préparation des suspensions bactériennes	19
6.2	La microdilution sur la plaque à 96 puits	19
Résultat et discussion		
1.	Résultats.....	22
1.1	Résultats d'isolements des actinomycètes	22
1.2	Aspects macroscopiques	22
1.3	Aspects microscopiques	22
2.	Discussion	22
Conclusion		25
Références Bibliographiques.....		27
Annexes		34

Introduction

Introduction

Dans les dernières décennies le monde a vu une propagation rapide de la résistance aux antimicrobiens chez les agents pathogènes et peu de nouvelles molécules bioactives ont été découvertes au cours de cette période, se transformant en une crise de santé mondiale. En effet, la principale source des molécules bioactives est produite par des *Actinobactéries* cultivées à partir du sol. Cependant, les études sur cette source autrefois si utiles sont devenues inutiles à cause de la redécouverte de composés connus, pour ce fait il y a un besoin critique d'explorer des sources microbiennes alternatives et découvrir de nouvelles molécules bioactives (Marc *et al.*, 2019).

Les *Actinomycètes* sont des bactéries procaryotes très ubiquitaires, ils sont très répandus dans la nature (Lacey, 1973). Plusieurs études ont montré à plusieurs reprises l'isolement à partir de divers habitats naturels allant du sol (Oskay, 2004), des eaux (Boughachiche, 2005), des organismes marins (Kumar et Selvam, 2011), jusqu'aux endroits les plus extrêmes comme les sols arides (Zerizer, 2006). Ils peuvent aussi s'associer avec des plantes (Igarashi, 2002) et abondent en conséquence dans la matière organique en décomposition.

Ils font partie aussi du microbiote intestinal des insectes. La présence de microorganismes dans l'intestin est connue depuis plus d'un siècle et on a vite présumé qu'il existait une véritable symbiose entre l'organisme et cette flore, les bactéries formant le microbiote intestinal d'insectes jouent un rôle dans la digestion des nutriments et la régulation du système immunitaire. Ils joueraient aussi un rôle dans la protection contre les agents pathogènes chez une grande majorité des espèces d'insectes étudiées. Entraîner des perturbations supplémentaires de ce microbiote pourrait avoir des effets néfastes sur la santé des insectes, et serait possiblement un moyen de contrôle alternatif contre les insectes considérés comme nuisibles (Engel et Moran, 2013).

Dans notre étude, nous évaluons l'activité antimicrobienne des *Actinomycètes* isolés à partir des insectes en particulier les abeilles mellifères et les guêpes collectant d'un champ agricole dans la région de Laghouat.

Les métabolites secondaires produits par ces microorganismes représentent une large source de composés de diversité structurale très vaste tels que les antibiotiques, les vitamines, les hormones de croissance des plantes, les enzymes et les inhibiteurs d'enzymes ; Ils sont utilisés dans une grande variété de domaines dont la thérapeutique humaine et vétérinaire, l'industrie alimentaire (préservation et conservation des denrées alimentaires) et l'agriculture afin de lutter contre certains agents pathogènes et toxigènes pour l'homme, les animaux ou les végétaux (Tanaka et Omura, 1993).

Actuellement, les *Actinomycètes* demeurent un sujet très étudié dans les domaines de la recherche, principalement celui de la santé (fabrication des antibiotiques, antifongiques...) Les *Actinomycètes* associées aux insectes représentent des sources prometteuses de nouveaux composés bioactifs qui commencent seulement à être découverts et exploités (El-Shatoury, 2004)

Synthèse bibliographique

1. Définition des Actinomycètes

Etymologiquement, le mot *Actinomycète* a été dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants» (Lamari, 2006).

Les Actinomycètes sont des bactéries Gram-positives, aérobies et non mobiles qui possèdent des spores asexuées, ils sont caractérisés par leur teneur élevée en G +C plus de 70–80% (Anwasha et al., 2014).

Il était considéré comme un groupe intermédiaire entre les champignons et les bactéries, mais actuellement connu comme un organisme procaryote.

Il existe trois points qui rapprochent les Actinomycètes des champignons :

- Structure mycélienne présentant des ramifications chez les Actinomycètes typiques, avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium parfois employé pour désigner cette structure.
- Formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies qui se trouve aussi bien chez les Actinomycètes que les champignons.
- En culture, absence de la turbidité qui caractérise les bactéries unicellulaires et l'apparition des amas de cellules.

Les analogies entre les Actinomycètes et les champignons sont en fait superficielles ; il s'agit d'une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique, car une différence fondamentale les sépare : les Actinomycètes sont procaryotes alors que les champignons sont eucaryotes.

D'autres caractères rapprochent les Actinomycètes à des bactéries :

- Ils sont procaryotes.
- La morphologie typiquement bactérienne chez les formes simples (*Mycobacteriaceae*)
- La sensibilité aux attaques virales (Alexander, 1961).

2. Historique

Le premier isolement des actinomycètes à partir d'une source humaine ont été fait par Cohn en 1875(Williams et Wellington, 1984), après une autre isolement ont été fait a partir du sol par Waksman en 1943, après la découverte de l'Actinomycine ces bactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches et elles sont extrêmement exploitées durant les années 80 ; en conséquence, de nouvelles structures et surtout celles des antibiotiques sont continuellement isolées à partir de ce groupe bactérien. Ainsi, ces bactéries sont devenues les premiers fournisseurs de ces métabolites (Donadio, 2002).

Plus de 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde sont à l'origine des Actinomycètes filamenteux, Cependant, le nombre de nouvelles découvertes d'actinomycète isolées des sols des régions méditerranéennes et tempérées est en diminution remarquable, Par ailleurs, la résistance bactérienne aux antibiotiques connaît une augmentation inquiétante, Depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les bactéries n'ont pas cessé de s'adapter à l'environnement imposé par l'utilisation massive de ces substances, Face au problème de la résistance bactérienne, il faut ajouter l'incidence des infections nosocomiales, la recrudescence des maladies anciennes et l'apparition de nouveaux pathogènes (Decre et Courvalin, 1995).

3. La structure cellulaire des *Actinobactéries*

3.1 Diversité de la morphologie cellulaire chez les *Actinobactéries*

Les *Actinobactéries* présentent une grande variété de morphologies, allant des cocci aux *Micrococcus*(**Fig. 1a**), dans *Mycobacterium*(**Fig. 1b**), des hyphes ramifiées portant des spores telles que *Micromonospora*(**Fig. 1c**), et mycélium qui se fragmente en coccidies et en bâtonnets dans la *Nocardie* (**Fig. 1d**) aux *Actinobactéries* qui sont produites à partir des hyphes aériennes ramifiées de 0,5-2 μm de diamètre comme les *Streptomyces* (**Fig. 1e**)(**Qinyuan Li et al., 2016**).

Le cycle de vie d'*Actinobactérie* présente différentes morphologies dans la plupart des cas par exemple chez *Arthrobacter sp* qui est représenté dans la **figure 2**, la morphologie des cellules différer selon les conditions de culture, Ainsi, les *Acidothermes* se développent en filaments minces lorsque la source de carbone est le glucose ou le cellobiose, et il pousse en tiges courtes lorsque la source de carbone est la cellulose ou xylan (**Rosenberg et al., 2014**).

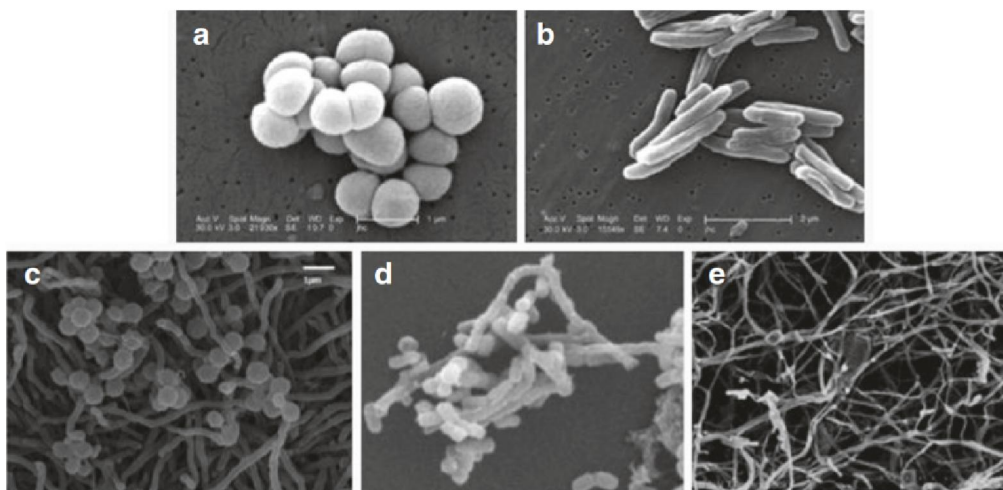


Figure 1 : Images de microscopie électronique à balayage de (a) cocci de *Micrococcus luteus*, (b) bâtonnets de *Mycobacterium tuberculosis*, (c) hyphes ramifiées de *Micromonospora schwarzwaldensis* (**Gurovic et al., 2013**), (d) mycélium fragmentaire de *Nocardia asteroides* (**Ribeiro et al., 2008**), et (e) hyphes aériennes ramifiées de *Streptomyces mangrovisoli* (**Ser et al., 2015**)

3.1.1 Mycélium

Il existe deux types de mycéliums développés par les actinomycètes : mycélium de substrat et mycélium aérien.

- Le mycélium de substrat ou mycélium végétatif s'est développé à partir des croissances d'une spore germinative qui se développe à la surface du milieu de culture pour absorber les nutriments. Certaines de ces structures peuvent produire des pigments responsables des couleurs du substrat et des mycéliums aériens qui peuvent également être utilisés pour l'identification des *Actinobactéries* (**Ensign, 1978**).

- Les hyphes aériens se développent dans l'air lorsque le mycélium végétatif atteint un certain stade et développera une hyphe reproductrice produisant des spores. Les hyphes aériens sont enfermés dans une fine gaine qui n'existe pas dans le mycélium du substrat ; Les *Actinobactéries* forment un mycélium de substrat à la fois en immersion et en culture solide tandis que les hyphes aériennes sont différenciées spécifiquement sur les surfaces solides (**Ensign, 1978**).

Les Actinomycètes classiques forment des mycéliums de substrat bien développés et développent des hyphes aériennes ramifiées sur le mycélium végétatif et peuvent produire des spores directement ou sous la forme d'ultra structures en forme de sac, ces spores peuvent être organisées en tant que spores uniques dans *Saccharomonospora* (**Fig. 2a**), bispores dans *Microbispora* (**Fig. 2b**), ou des chaînes spiralées de spores multiples comme dans *Streptomyces* (**Fig. 2c**). Cependant, dans certains genres comme *Nocardia*, *Mycobacterium*, et *Rhodococcus*, le fragment de mycélium développé en coccoïde ou en forme de bâtonne et éléments (**Locci, 2006**).

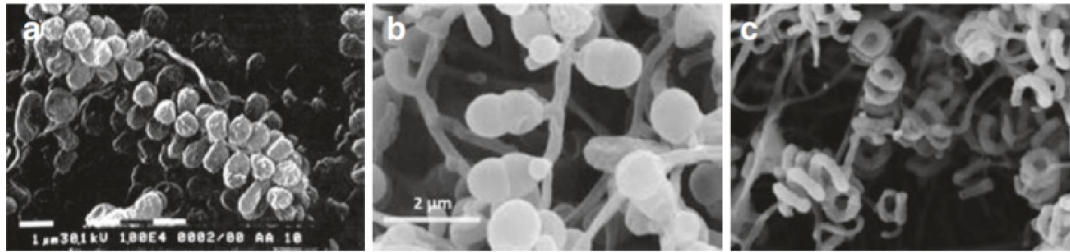


Figure 2: Différentes organisations de spores dans les Actinobactéries. (a) *Saccharomonospora aglauca* (**Greiner-Mai et al., 1988**), (b) *Microbispora corallina* (**Nakajima et al., 1999**), et (c) *Streptomyces sp.* (**Kumar et al., 2014**).

Généralement, les spores Actinobactériennes sont formées par une origine Hyphale qui est en outre classés en trois sous-types, à savoir,

- les arthrospores subdivision de l'hyphes gainée comme dans *Streptomyces*, *Actinopolyspora*, *Nocardia*, etc.
- Les aleuriospore subdivision d'hyphes sans gaine comme dans *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, etc.
- la fragmentation des spores de *Rhodococcus*, *Nocardiosis*, etc.

comme mentionné précédemment, quelques autres Actinobactéries des espèces de *Frankia*, en particulier, ont des vésicules spéciales appelées sporanges contenant qu'il s'agisse d'aplanospores (non mobiles) ou de planospores (mobiles) (**Locci, 2006**).

Les planospores ou les spores mobiles peuvent posséder un seul flagelle par spore (monotone) ou apparaître avec de multiples flagelles avec différentes dispositions autour de la cellule, les planospores peuvent être vu dans *Sporichthya*, *Ampullariella*, *Spirillospora*, et *Catenuloplanes*. Ces les spores mobiles possèdent une sorte de surface lisse, tandis que les aplanospores peuvent avoir différentes caractéristiques de la surface, qu'elle soit lisse ou rugueuse, avec des parties verruqueuses, poilues et épineuses, ou des ornements rugueuses. Les aplanospores sont également produites par *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Actinomadura* et *Microtetraspora* (**Locci, 2006**).

3.1.2 Formation des spores

La formation des spores est une réponse à un manque en éléments nutritifs, il y a deux groupes des spores des Actinomycètes classées selon leur mode de formation : exospores et endospores.

- **Les exospores** : la formation des exospores peuvent avoir des formes variables, ils se développent par septation des extrémités des filaments, La plupart de ces spores ne résistantes pas à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation, Ce dernier représente un important facteur adaptative (**Prescott, 2007**).

- **Les endospores** : Elles se forment à partir d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe produites par des Actinomycètes thermophiles, Les spores des *Thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique. Cet acide est associé à de grandes quantités d'ions calcium et magnésium, l'ensemble pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur (Sykes & Skinner, 1973).

La germination des spores est fait en quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et la croissance ; Les exospores germent après activation par un choc thermique ; quant aux endospores, elles ne germent qu'avec une activation spécifique de nature physique. (Leveau & Buix, 1993).

4. Exigences en matière de croissance

D'un point de vue écologique, les *Actinomycètes* présentent des capacités métaboliques uniques, ils sont capables d'exploiter à partir de leur sol et les milieux aquatiques des sources de nutriments complexes a cause de leur capacité à piéger les nutriments d'un environnement souvent limitant en glucides et en azote et pauvre en phosphore, ils jouent un rôle important dans la production de carbone et le renouvellement de l'azote en décomposant la matière organique, Ils sécrètent une grande diversité des enzymes extracellulaires telles que les cellulases, les chitinases, les lipases, les amylases et les protéases qui hydrolysent une large gamme de polysaccharides et de polymères organiques complexes insolubles (Chater et al.,2010), à cause de leur mode de vie saprophytique pour digérer les substrats polymères complexes et importer les monomères et oligomères à utiliser pour la production de biomasse et le développement d'un mycélium du substrat primaire (Williams, 1985), pour ce là les *Actinomycètes* présentent un cycle de vie complexe comprenant des étapes de différenciation associée au développement du mycélium fréquemment couplée à la production de métabolites secondaires (Chater, 1993 ; Goodfellow et Williams, 1983).

5. Cycle de vie des Actinomycète

Les *Actinobactéries* possèdent un cycle de vie unique chez les procaryotes, Le trait le plus distinctif dans le développement des *Actinobactéries* est observé dans les *Actinomycètes*, Ce taxon effectue leur croissance avec la formation d'hyphes ramifiées qui forment alors un mycélium, tandis qu'ils se dispersent par des spores qui se forment sur des structures des reproductions appelées hyphes aériennes. Ainsi, leur cycle de vie ressemble à celui des champignons filamenteux, prenons l'exemple du cycle de vie du genre *Streptomyces*, Lorsque la spore d'un *Streptomyces* est dans des conditions et des nutriments favorables, elle germe et a tendance à former des hyphes qui poussent par extension de pointe et forment finalement un substrat mycélium ; Lorsque les cellules ne disposent pas suffisamment de nutriments ou d'autres signaux sont rencontrés de nombreuses différenciations morphologiques se produiront. Par exemple, les des hyphes se forment. Les hyphes aériens sont ensuite divisés en chaînes de pré-spores par un processus contrôlé de division cellulaire ; Des spores matures à épaisses couches sont alors formées pour poursuivre le cycle de vie (Fig.6) (Genilloud, 2017).

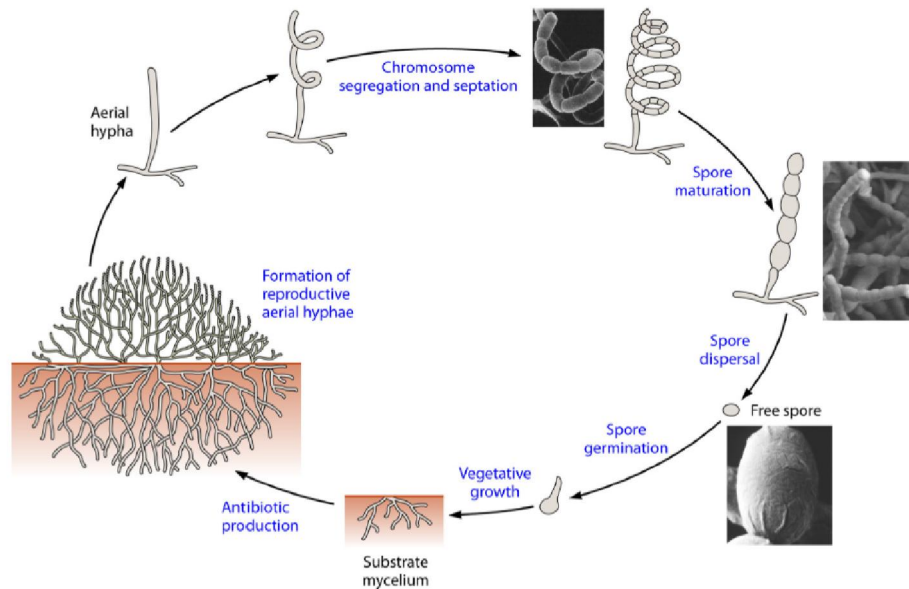


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulés.

6. Les facteurs physiologiques et la distribution des *Actinobactéries*

Les *Actinobactéries* sont indispensables dans la décomposition aérobie des matières organiques et jouent un rôle important dans la biodégradation et le cycle du carbone. Ils sont largement répandus dans les sols où ils jouent un rôle important dans le recyclage des nutriments et la dégradation des composés xénobiotiques. Les *Streptomyces* ont une distribution mondiale dans les sols et sont responsables de l'odeur de terre caractéristique du sol en produisant des substances volatiles appelées géosmines. On estime qu'environ 4000000 de colonies peuvent être obtenues à partir de seulement 1 g de terre. Les principaux facteurs écologiques influençant l'activité et la distribution des *Actinobactéries* dans le sol sont la disponibilité des nutriments, l'humidité, le pH, le rayonnement, la salinité et la température. La plupart des espèces sont neutrophiles et se développent entre un pH de 5,5 et 8,5 (pH optimal ~7,2). Les *Streptacidiphilus sp* qui se développent entre pH 3,5 et 6,5 mais pas à pH 7,0 sont courantes dans les sols, tandis que les *Streptomyces sp.* qui poussent à un pH élevé ont été isolés des sols alcalins. Il est intéressant que *Streptacidiphilus* et les Streptomycètes alcalophiles produisent des enzymes qui fonctionnent à respectivement inférieur ou supérieur aux enzymes produites par les souches neutrophiles (Genilloud, 2017).

Les espèces Actinobactériennes thermophiles sont communément rencontrées dans les composts, les fourrages et autres substrats où un réchauffement spontané se produit. Membres des genres *Streptomyces*, *Saccharomonospora* et *Thermomonospora* sont impliqués dans les activités complexes qui se déroulent dans les matériaux de compostage. *Subtercola frigoramans*, *Frigoribacterium faeni* et *Cryobacterium psychrotolérants* isolés des eaux souterraines froides, poussière de foin et un glacier, respectivement, sont des représentants des *Actinobactéries* (Genilloud, 2017).

Les *Actinobactéries* interagissent aussi étroitement avec les plantes, *Frankia* forme une relation symbiotique avec de nombreuses plantes à dicotylédones et fournit on estime que 15 % de l'azote biologiquement fixé dans le monde est dû à *Frankia*. Beaucoup des souches de *Micromonospora* ont été signalées comme fixant l'azote nodules de légumineuses et de plantes Actinorhizées (Trujillo et al., 2010 ;Carro et al., 2013).

Les *Actinobactéries* sont également présentes dans de nombreux milieux aquatiques. Elles ont été isolées des systèmes marins et d'eau douce, ainsi que dans les marais salés. Leur isolement de ces ne signifie pas nécessairement qu'ils sont activement qui y poussent, car les spores peuvent s'infiltrer à partir de milieux terrestres et persister dans les écosystèmes aquatiques pendant de longues périodes de temps. Cependant, un grand nombre de souches actinobactériennes (par exemple *Rhodococcus*, *Micromonospora* et *Salinispora*) isolées des sédiments marins sont maintenant considérés comme de véritables habitants de la mer. En eau douce, les *Actinoplanes* semblent incontestablement habiter milieux aquatiques, mais les preuves sont moins claires pour les autres genres. Bien que les rôles écologiques des *Actinobactéries* marines restent indéfinis, il est possible que, comme leurs homologues terrestres, elles soient impliquées dans la décomposition des matières organiques telles que la chitine, un biopolymère qui est particulièrement abondante dans la mer. Enfin, certaines *Actinobactéries* sont graves les agents pathogènes des animaux, y compris les humains et les plantes (Genilloud, 2017).

7. Classification et taxonomie d'*Actinobactéries*

7.1 Situation actuelle de la taxonomie des *Actinobactéries*

Il existe six classes dans le phyla *Actinobactéries*, à savoir

- *Acidimicrobiia* (Norris, 2013),
- *Actinobactéries* (Stackebrandt et al., 1997),
- *Coriobactéries* (König, 2013),
- *Nitriliruptoria* (Ludwig et al., 2013),
- *Rubrobactéries* (Suzuki, 2013),
- *Thermoleophilia* (Suzuki et Whitman, 2013).

5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres (Ludwig et al., 2012).

Le développement récent des données sur les séquences du génome a permis de comprendre en détail l'évolution du génome et a facilité de catégorisation des micro-organismes au niveau des genres et la famille avec précision.

La classe *Actinobactéries* est constituée d'ordres qui étaient auparavant organisés en sous-ordres dans l'ordre *Actinomycetales* tels que *Bifidobacteriales* et *Jiangellales* (Zhi et al., 2009 ; Tang et al., 2011). Dans la classe, deux embranchement sont présentes ; le premier embranchement comprend les ordres *Actinopolysporales*, *Glycomycetales*, *Corynebacteriales*, *Micromonosporales*, *Jiangellales*, *Propionibacteriales* et *Pseudonocardiales*, et le second embranchement est constitué des ordres *Actinomycetales*, *Kineosporiales*, *Bifidobactériales*, et *Micrococcales*. En outre, l'ordre *Frankiales* n'est pas considéré comme un embranchement et forme des lignées indépendantes à la base de l'arbre, y compris familles *Frankiaceae*, *Acidothermaceae*, *Cryptosporangiaceae*, *Nakamurellaceae*, *Geodermatophilaceae*, et *Sporichthyaceae* (Ludwig et al., 2012).

7.2 Critères classiques en matière de taxonomie

La classification des *Actinobactéries* étaient basées principalement sur les caractéristiques phénotypiques comme les caractéristiques morphologiques, chimiques et physiologiques, la morphologie de la colonie, la chaîne de spores, la couleur du substrat et du mycélium aérien, et les pigments diffusibles, ce sont des facteurs importants dans la différenciation des genres, mais ne fournissent pas des informations pour la classification de ce phylum (Genilloud, 2017).

7.3 La classification actuelle

Actuellement la classification dépend sur la taxonomie polyphasique qui base sur la combinaison entre les informations phénotypiques, chimiotaxonomiques et génotypiques (**Schleifer, 2009**).

Les méthodes phénotypiques utilisés pour l'analyse taxonomiques base sur la morphologie, les caractéristiques antigéniques, la zone de croissance, la production métabolique, la pathogénèse, et l'écologie des microorganismes. Par contre l'utilisation de la taxonomie polyphasique a permis d'améliorer la résolution taxonomique du phylum Actinobacteria (**Girard et al., 2013**).

Les séquences des génomes bactériens entiers ont fourni des informations précises sur la systématique des bactéries, le seuil de descriptions des membres des espèces a été proposée à 70 % du sondage, En outre, des critères taxonomiques génétiques alternatifs ont été recommandés comme l'identité moyenne des nucléotides et le typage de séquence multilocus (**Konstantinidis et Tiedje, 2005 ; Goris et al., 2007**).

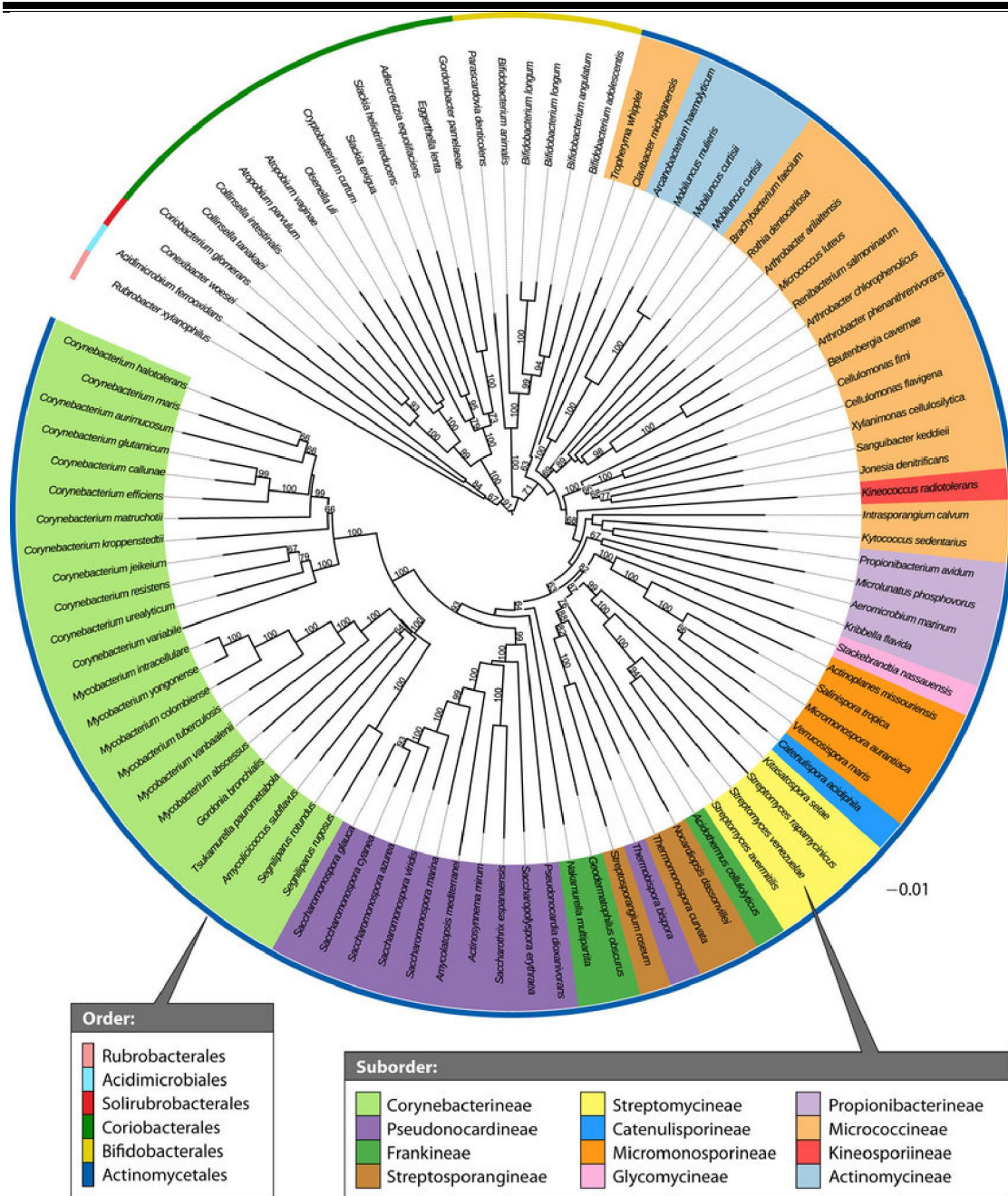


Figure 4 : Un arbre phylogénétique basé sur le génome pour 97 séquences du génome du phylum *Actinobacteria* (Barka et al., 2016).

8. Les *Actinobactéries* comme sources des produits naturels

8.1 Les *Actinobactéries* comme sources d'antibiotiques

Les *Actinobactéries* jouent un rôle très important dans le domaine de la biotechnologie, en tant que producteurs des métabolites secondaires bioactifs avec de nombreuses applications industrielles, médicales et agricoles. En particulier, Les *Actinobactéries* produisent la majorité des antibiotiques. Les premiers antibiotiques découverts dans les *Actinobactéries* étaient de l'actinomycine provenant d'une culture de *Streptomyces antibioticus* en 1940 (Waksman et Woodruff, 1940), la streptothricine de *Streptomyces lavendulae* en 1942 (Waksman et Woodruff, 1942), et la streptomycine de *Streptomyces griseus* en 1944 (Schatz et Waksman, 1944), qui ont tous été découverts par Waksman et ses collègues. Les *Streptomycètes* ont été la principale source d'antibiotiques

cliniques et sont responsables de plus de 80 % de tous les antibiotiques de la famille des *Actinobactéries* (Ilic et al., 2007).

La Streptothricine est présente dans environ 10 % de tous les *Streptomycètes* isolée au hasard dans le sol et la Streptomycine est présente dans 1% des Actinomycine à 0,1 %, tandis qu'inversement, l'Erythromycine et la Vancomycine se trouve dans environ 105 isolats du sol, et la Daptomycine n'est trouvé qu'à une fréquence d'environ 107 isolats (Baltz, 2007). Principalement les classes d'antibiotiques cliniques produites par les Actinomycètes sont les suivants : Aminoglycosides (Néomycine, Kanamycine, Streptomycine (Busscher et al., 2005 ; Vakulenko et Mobashery, 2003) les Angucyclines (Auricine ; également, les agents antitumoraux comme la Landomycine et la Moromycine (Kharel et al., 2012), les Ansamycines (Rifamycine, Geldanamycine) (Kang et al., 2012), les Anthracyclines (principalement des agents antitumoraux, par exemple, Daunorubicine) (Minotti et al., 2004 ; Nitiss, 2009) Lactamase (Céphamycines) (Liras, 1999) et également l'important inhibiteur de Lactamase, l'acide Clavulanique (Jensen et Paradkar, 1999 ; Saudagar et al., 2008), Chloramphénicol (Vining et Stuttard, 1994), Glutarimides (cycloheximide) (Kominek, 1975), Glycopeptides (Vancomycine, Teichoplanine) (Butler et al., 2014 ; Van Bambeke, 2006), lipopeptides (Daptomycine) (Baltz, 2010), Lantibiotiques (Mersacidine, Actagardine) (Willey et van der Donk, 2007), les macrolides (Clarythromycine, Erythromycine, Tylosine, Clarithromycine) (Gaynor et Mankin, 2003 ; Poehlsgaard et Douthwaite, 2003), Oxazolidinones (Cyclosérine) (Mulinos, 1955), Streptogramines (streptogramin) (Johnston et al., 2002), et Tétracyclines (Okami et Hotta, 1988).

La capacité productrice des actinomycètes peut également varier énormément, Certaines espèces de *Streptomyces* produisent un seul antibiotique, tandis que d'autres produisent toute une série de composés différents et les classes composées ; Outre les antibiotiques, les *Actinobactéries* produisent également une grande variété d'autres métabolites secondaires ayant une activité comme herbicides (Tindall et al., 2006), antifongiques, les médicaments antitumoraux ou immunosuppresseurs, et les anthelminthiques agents (Behal, 2000). Des exemples sont donnés ci-dessous.

8.2 Les *Actinobactéries* comme sources d'insecticides

Les macrotétrolides sont actives contre les acariens, les insectes (Jizba et al., 1991 ; Sagawa et al., 1972), les coccidies (Sakamoto et al., 1978) et les helminthes (Nippon et al., 1981), et ils montrent également des signes d'immunosuppression effets (Shichiet al., 1989). Ils sont produits par une variété de *Streptomyces*. Cependant, avec en ce qui concerne la composition du complexe des macrotétrolides, seul *Streptomyces aureus* S-3466 (Ando et al., 1971), qui produit un mélange de Tétranactine (le membre le plus actif du groupe de composés) avec la Dinactine et la Trinactine (Oishi et al., 1970 ; Ando et al., 1971), a été utilisée à des fins commerciales (Misato, 1982). La Tétranactine, un antibiotique cyclique produit par *Streptomyces aureus* dont la structure moléculaire est apparentée à celle de la cyclosporine, est utilisé comme émulsion contre les acariens carmin des fruits et du thé. Une véritable réussite en termes d'anthelminthiques est l'Ivermectine (Omura et Crump, 2014), qui est un déshydrodérivé de l'Avermectine produit par *Streptomyces avermitilis*. Après apparue à la fin des années 1970, l'Ivermectine a été le premier endectocide au monde, qui était à l'époque une toute nouvelle classe d'antiparasitaires avec une forte activité à large spectre contre les agents les nématodes et arthropodes internes et externes. Récemment, Le prix de physiologie ou de médecine 2015 a été décerné à Satoshi Omura et William C.

Campbell pour leur découverte de l'Avermectine, conjointement avec Youyou Tu pour la découverte du médicament antipaludéen l'Artémisinine.

8.3 Les *Actinobactéries* comme sources de bioherbicide et de bioinsecticide

La Mildiomycine, est un métabolite antifongique isolé à partir de cultures de *Streptovercillium rimofaciens Niida*, est fortement actif contre plusieurs l'oïdium sur diverses cultures (**Harada et Kishi, 1978**) et inhibe les biosynthèse des protéines (**Feduchi et al., 1985**). Les principaux sites d'action de ces antibiotiques se trouvent à des endroits où la synthèse de la chitine se produit dans la paroi de cellule, il y a une fuite de cations de la mitochondrie, la biosynthèse de l'inositol ou des sites de synthèse de protéines et d'ADN. Le site des composés mentionnés ci-dessus est quelques exemples d'agroactifs des composés isolés d'*Actinobactéries*.

La Validamycine A était commercialisée par Takeda pour le contrôle des agents pathogènes dans le riz et d'autres plantes et comme outil pour amortir les maladies dans des semis. D'autre part, certains métabolites sécrétés sont cytotoxiques et peut inclure des structures chimiques telles que les macrolides, pyrones, lactones, indoles, terpènes et quinones (**Dharmaraj, 2010**).

Par exemple, la Résistomycine, un antibiotique apparenté à la quinone, a une structure et présente une activité bactéricide et vasoconstrictive basée sur l'inhibition de la synthèse de l'ARN et des protéines (**Arora, 1985 ;Barac et al., 2004**).

Les séquences du génome d'importantes espèces d'*Actinobactéries* ont été signalées à ce jour, indiquent que jusqu'à 90 % du potentiel chimique de ces organismes reste à découvrir et que les mécanismes codés par nombre de ces loci génétiques peuvent être activable dans des conditions de laboratoire (**Wu et al.,2012**). Le système prédictif des modèles de Watve et al. (**Watve et al.;2001**) ont suggéré que plus de 150 000 les métabolites des membres du genre *Streptomyces* seuls dans cet ordre attendent toujours d'être découverts (**Baltz, 2005; Baltz, 2006**).

Des techniques moléculaire telles que la biosynthèse combinatoire peuvent conduire à la découverte de médicaments introuvables dans la nature et de produits biosynthétiques des composants qui peuvent être échangés et modifiés pour produire des produits bioactifs aux propriétés uniques.

8.4 Les *Actinobactéries* comme sources d'antifongiques

La Kasugamycine est un métabolite bactéricide et fongicide sécrété par *Streptomyces kasugaensis* (**Umezawa et al., 1965**) qui agit comme un inhibiteur de la protéine et la biosynthèse dans les microorganismes mais pas chez les mammifères.

Le kasugamycine systémiquement active, a été commercialisée pour lutter contre la pyriculariose du riz et les maladies bactériennes *Pseudomonas* dans plusieurs cultures. En 1965, Isono et al (**Isono et al.,1965**) ont isolé les premiers membres d'une nouvelle classe de fongicides naturels, les polyoxines B et D, des métabolites de *Streptomyces cacaoi*. Ces substances agir en interférant avec la synthèse de la paroi cellulaire des champignons en inhibant la chitine synthase (**Endo et Misato, 1969**).

La polyoxine B est appliquée contre un certain nombre de champignons les agents pathogènes dans les fruits, les légumes et les plantes ornementales, tandis la polyoxine D est utilisée pour contrôler l'agent causal de la gaine du riz (le mildiou), *Rhizoctonia solani* (**British Crop Protection Council, 1994**)

En 1968, la famille des Validamycines a été détectée par des chercheurs de Takeda Chemical Industries dans un essai en serre pour le traitement de la maladie de la brûlure de la gaine des plants de riz causée par le champignon *Rhizoctonia solani*. La Validamycine A, la principale et la plus active composant du complexe, a été isolé de *Streptomyces hygrosopicus*. Au sein de la cellule fongique, la Validamycine est convertie à la Validoxylamine A, un inhibiteur particulièrement puissant du tréhalose qui supprime la dégradation du tréhalose intracellulaire **(Kameda, 1987)**.

Le tréhalose est bien connu comme hydrate de carbone de stockage, et la tréhalase joue un rôle essentiel dans le transport du glucose chez les insectes et les champignons **(Elbein et al., 2003)**.

Ce mode d'action donne à la Validamycine A, a une sélectivité biologique favorable, puisque les vertébrés ne dépendent pas l'hydrolyse du tréhalose, un disaccharide, pour leur métabolisme **(Elbein et al., 2003)**.

Matériels et Méthodes

1. Collecte des échantillons

Les échantillons des insectes ont été collectés d'un champ agricole à Hamda, Laghouat (**Figure 5**), 10 échantillons d'abeilles mellifères *Apis mellifera* (**Figure 6.A**) sont collectés d'après une ruche et 10 échantillons des guêpes *Polistes dominulus*, sont collectés d'après un nid (**Figure 6.B**), les échantillons ont été placés dans des pots stériles.



Figure 5: Carte géographique indiquant le site de prélèvement des échantillons (Source: Google Earth)



Figure 6 : A : ruche des abeilles mellifères.



B: nid des Guêpes.

2. L'isolement des Actinomycètes

La croissance lente des Actinomycètes et leur faible nombre dans les échantillons des insectes risquent d'être masqués par les bactéries et les champignons à croissance rapide lors de l'isolement. Par conséquent, l'utilisation d'un milieu spécifique (CAA, HV) additionné d'antibiotiques combiné à des traitements des échantillons facilite l'isolement de ces groupes de microorganismes. Quatre étapes sont utilisées pour isoler les Actinomycètes à partir des échantillons des insectes : un traitement des échantillons, une dilution en cascade, un isolement et une purification.

2.1 Le traitement des échantillons

Cette étape préliminaire consiste à réaliser un lavage de stérilisation externe pour l'isolement des Actinomycètes à partir de tube digestif des insectes seulement.

Un lavage de stérilisation implique le transfert des échantillons dans un flacon de Qui contient 10mL d'éthanol à 70% (1ml pour chaque spécimen d'insectes), le tout est mélangé doucement pendant 1 min. Les déchets d'éthanol sont ensuite éliminés, puis 10ml de l'eau de Javel avec une solution de tween20 à 0,1 %, est ajoutée. On mélange doucement pendant 30 s par inversion a été appliqué. Le surnageant, et ensuite éliminé, puis enfin l'échantillon est rincé 3 fois par 10ml d'une solution tampon PBS. Après en utilisant un scalpel chirurgical stérile pour retirer les parties de chaque spécimen et gardé seulement le tube digestive (**Marc et al., 2019**).

Après la stérilisation externe, 10ml de PBS a été ajouté dans un flacon stérile, et les spécimens sont ensuite broyés à l'aide d'un pilon stérile à l'intérieur du flacon.

2.2 Préparation de la suspension de dilution

Des dilutions en série de l'échantillon traité ont été préparées dans une solution PBS stérile La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 1 ml des spécimens traité à 9 ml de Tampon PBS stérile. La suspension subit une agitation pendant 10 minutes par un vortex, ce qui constitue la dilution 10^{-1} . À partir de cette suspension mère on prépare les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} jusqu'à 10^{-6} (**Kumar & al, 2010**).

2.3 Les milieux de cultures

Deux milieux de cultures ont été utilisés pour l'isolement des actinomycètes :

- Milieu caséine amidon agar (CAA)
- Milieu acide humique vitamine agar (HV)

La composition de chaque milieu et le protocole de l'extraction de l'acide Humique est développée en Annexe.

La gélose à l'acide humique et aux vitamines il s'agit d'un milieu contenant du d'acide humique comme source de carbone. Un antifongique à 50mg/l de Cycloheximide a été ajoutés pour réduire la contamination des champignons. La solution des vitamines a été préparée séparément, stérilisée et ajoutée après que le milieu a été autoclave.

Avant utilisation, les milieux de culture sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes dans un autoclave. La verrerie est stérilisée à 180°C dans une étuve universelle pendant 30 minutes. Il est à noter que toutes les manipulations microbiologiques sont effectuées dans des conditions stériles, c'est-à-dire autour de la flamme d'un bec Bunsen.

2.4 L'isolement

Un volume de 1 ml de la dilution 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} est ensemencé par inondation à la surface de milieu de culture coulé sur des boîtes pétries, Les boîtes sont mises dans un incubateur réglé à la température de 28°C, et ils sont vérifiés régulièrement pendant 21 jours (**Rahman & al, 2011**).

3. Caractérisation des souches d'Actinomycètes

Pour prédéterminer les genres d'Actinomycètes, trois caractéristiques sont largement utilisés : caractéristiques morphologiques, microscopique et macroscopique. Les caractères morphologiques sont considérés comme des caractères stables selon **Shirling et Gottlieb (1976)**. Leur étude est donc essentielle dans l'identification des souches d'Actinomycètes.

Pour la culture, des colonies apparaissent au bout de 24 heures. Ce fait est

caractéristique des Actinomycètes à croissance rapide. En effet, des études ont montré que les colonies de Streptomyces développent des hyphes aériens en 24 heures (Nodwell & Losick, 1998), Ces souches à croissance rapide peuvent donc être rapprochées du genre Streptomyces. Les premières colonies apparentes ont toutes un aspect pâteux sur les différents milieux. Ces premières colonies constituent le mycélium du substrat.

3.1 Observation macroscopique

Les souches des actinomycètes se différencient par leur aspect, leur forme, leur taille, la couleur du mycélium végétatif et la couleur du mycélium aérien ainsi que d'autres caractères comme la production de pigment diffusible. Parmi les colonies des microorganismes sur le milieu de culture d'isolement, les colonies d'Actinomycètes sont repérées d'après leur aspect macroscopique, les actinomycètes ont une caractéristique de colonies dures incrustées dans la gélose.

3.2 Observation microscopique

Les Actinomycètes sont repérés d'après leur aspect macroscopique, toutes les colonies ont une caractéristique dures incrustées dans la gélose sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple par le bleu de méthylène, L'observation au microscope optique est effectuée avec des grossissements gradués ($\times 10$, $\times 40$, $\times 100$) (Kalyani. & al. 2012).

La coloration de Gram aide aussi à la pré-identification des Actinomycètes, Elle est effectuée selon la méthode colorimétrique (Marchal, 1985) ; (Singleton, 1999). Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des Actinomycètes sont préparés, colorés puis observés sous microscope optique (grossissement $\times 100$). Les souches se différencient aussi par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes)

3.3 La Purification

Après observation macroscopique et microscopiques toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects aux Actinomycètes, sont purifiées pour obtenir des cultures pures.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un inoculum à partir des colonies de milieu d'isolement, qui sera ensuiteensemencé par épuisement sur le même milieu que celui d'isolement sous forme des stries. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures. La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage (Boussaber & al, 2012).

3.4 Conservation

Deux méthodes ont été utilisées pour conserver les souches pures d'Actinomycètes.

- Conservation à court terme

- Conservation sur gélose pente Dans des tubes à vis contenant le milieu ISP2 incliné, les souches pures obtenues ont été repiquées par des stries en zig zag de manière à avoir des colonies abondantes. Les tubes de collection sont ensuite enveloppés de papier aluminium et conservés à 4°C en évitant le plus possible tout risque de contamination. La durée de conservation est environ de 4 mois.
- Conservation de la souche pure dans le boîte de pétri Les boîtes de Pétri contenant une souche pure sont enveloppées de para film et conservées à 4°C en évitant tout risque de contamination. La durée de conservation est environ de 2 mois.

4. Activités biologiques des Actinomycètes

4.1 Activités antibactériennes

Les actinomycètes ont une particularité en ce qui concerne la production des Métabolismes secondaires.

Ces métabolismes assurent les activités biologiques des *Actinobacteria* qui possèdent un effet important sur les autres organismes vivants. Les Actinomycètes vivant dans le tube digestif des insectes ont une capacité à produire des composés actifs vis-à-vis des agents pathogènes, ou de produire des métabolites secondaires anticellulaires (**Higashide, 1984**).

L'étude de l'activité des extraits des Actinomycètes est conduite sur des souches de références composées par la méthode de diffusion sur gélose.

Les méthodes utilisées pour cette étude est celle des cylindres d'agar. Cette méthode permet de vérifier si une souche est active ou non, par observation de zone d'inhibition autour des souches. Cette inhibition est représentée par une zone claire ou zone d'inhibition sur la culture microbienne. La sensibilité des souches peut être également déterminée par la mesure des diamètres de ces zones d'inhibition ; plus le diamètre est grand, plus la sensibilité du germe vis-à-vis de la souche est importante.

4.1.1 Les souches de références

L'activité antimicrobienne, est réalisée contre des souches de références :

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Klebsiella pneumonia* (ATCC 70603) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Escherichia coli* (ATCC 25522), *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.1.2 Préparation de l'inoculum

Afin de réaliser l'activité antimicrobienne une suspension de microorganismes tests doit être préparé:

Des cultures jeunes de 18 heures, sont préparées après ensemencement des bactéries tests dans le bouillon de Muller Hinton, et les champignons dans le bouillon de Sabouraud. Après incubation, la densité optique de chaque suspension de microorganisme est ajustée entre 0.08 et 0.1, à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde de 600 nm.

4.1.3 La méthode des cylindres d'agar

Les souches ont été cultivées sur le milieu 5254 pendant 14 jours à 28°C. Puis des cylindre de 6 mm de diamètre ont été découpé et placé sur l'agar de Mueller Hinton pour les bactéries et le Gélose Sabouraud pour les champignons. Les boîtes sont d'abord été maintenues à 4°C pendant 2 à 4 heures pour permettre la diffusion de tout métabolite antimicrobien.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés après 24 h pour les souches bactériennes et 48 h pour *Candida albicans*.

S'il y'a une activité, une zone claire ou zone d'inhibition autour des cylindres d'agar est observée lorsque l'extrait ou la souche d'Actinomycètes est actif ; la mesure du diamètre du halo d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité de ces germes qui peut varier en fonction de la souche testée (**Duval et Soussy, 1990 ; Ferron, 1994 ; Lemriss et al., 2003 ; Mellouli et al, 2003 ; Kitouni et al., 2005**).

5. L'extraction des métabolites secondaire

Pour la culture liquide, une seule colonie d'actinomycètes est transférée dans un milieu liquide 5254 à l'aide d'une boucle d'inoculation stérile.

Les cultures sont incubées à 30°C pendant 5 à 10 jours à 160-180 tours/minute sur l'agitateur. Après la période d'incubation, la stérilité est déterminée par microscopie optique. Dans le cas d'une culture stérile, les procédures suivantes sont utilisées pour l'extraction:

- 20 ml d'une culture de 5 jours sont mélangés à 20 ml d'acétate d'éthyle dans un tube Falcon de 50 ml
- Après une agitation de 30 minutes, les tubes sont à nouveau mélangés pendant 10 minutes dans un agitateur rotatif
- Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 9000 tpm pendant 10 minutes et la phase supérieure est transférée dans un ballon à fond rond de 50 ml
- A environ 40°C, l'acétate d'éthyle s'est évaporé dans un évaporateur rotatif
- Enfin, l'extractible a été réalisé dans 1 ml acétate d'éthyle-méthanol (1:1:1) et centrifugé à 14000 tours/minute pendant 10 minutes.

6. Criblage antibactériennes via la méthode de concentration minimale d'inhibition (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance microbienne visible à l'œil nu.

Afin d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne, les extraits bruts produits sont criblés contre un ensemble de différents organismes de test, y compris des bactéries (gram positif / négatif) et levure, la méthode utilisée c'est la microdilution sur milieu liquide utilisant des plaques à 96 puits (**Gulluce et al., 2007**).

6.1 Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes ont été obtenues à partir des précultures par écouvillonnage de la surface des géloses et dispersion dans le bouillon Muller-Hinton, une dilution a été réalisée dans le bouillon MH pour l'obtention d'une concentration environ 10^6 - 10^8 bactéries/ml correspondant à une mesure de la densité optique comprise entre 0.08-0.1 DO.

6.2 La microdilution sur la plaque à 96 puits

L'ensemble de l'expérience est menée dans des plaques à 96 puits (**Fig 06**), dans un premier temps, un volume de 150 µl de suspensions bactériennes correspondant des souches test sont transférés dans chaque puits et 130 µl supplémentaires dans les puits de la première rangée (A).

Ensuite (A12) est utilisé comme contrôle négatif en ajoutant 20 µl de méthanol, tandis que les autres endroits de la première rangée sont inoculés avec 20 µl des extraits bruts (A1-11).

Ensuite, la première rangée est homogénéisée et 150 µl du mélange sont transférés dans la rangée suivante (B), Cette procédure est répétée jusqu'à la dernière rangée soit atteinte et que les 150 µl restants de milieu soient déchargés.

Après ces dilutions 1/2 les plaques sont incubées pendant 2 jours à 30 °C ou respectivement 37 °C et analysées concernant d'éventuelles inhibitions.

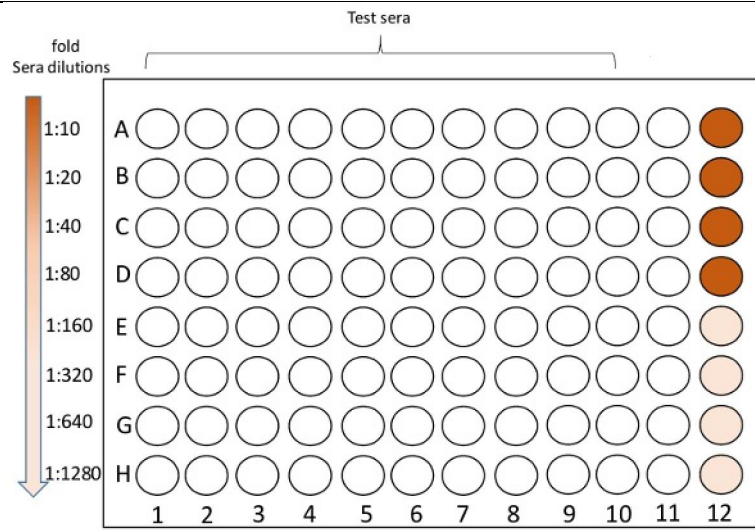


Figure 6 : Rangées et numéros d'une plaque à 96 puits.

Résultat et discussion

1. Résultats

1.1 Résultats d'isolements des actinomycètes

Après incubation à 30°C pendant 15 jours, les colonies d'actinomycètes sont observées sur les deux milieux d'isolements utilisés (HV et CAA), elles sont reconnues par leurs aspects macroscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose) et microscopiques (aspects filamenteux ramifié)

Les résultats d'isolement des colonies d'Actinomycètes à partir des dix échantillons d'abeille mellifère et de guêpes, sont présentés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Nombre de colonies d'Actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon dans le milieu HV.

dilutions	Abeille			Guêpes		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Nombres de colonies	0	0	0	2	1	1

1.2 Aspects macroscopiques

Les colonies obtenues sont opaques, de forme arrondie, à bords irréguliers et incrustées dans le milieu de culture. Mais elles se différencient par la couleur du mycélium aérien, celle du mycélium végétatif, par leurs tailles et par la production de pigments.

1.3 Aspects microscopiques

L'étude microscopique décrit les morphologies de chaînes de spores et les spores. Les souches ont un développement de mycélium aérien formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes portent des chaînes de spores de forme spirale.

Quant à la forme des spores, elles sont arrondies pour certaines souches cylindriques pour d'autres.

2. Discussion

Les Actinomycètes font partie du monde de microorganismes qui possèdent un effet bénéfique à leur environnement. Selon **Okami, (1988)** : « les Actinomycètes ont parmi les microorganismes producteurs d'antibiotique ». L'antibiotique peut être antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiviral ou antiparasitaire. Ces microorganismes sont très ubiquitaires ; ils sont très répandus dans la nature (**Lacey, 1973**) ; (**Porter, 1971**) ; (**Waksman, 1959**) ; (**Williams & Wellington, 1984**). En effet, les produits dérivés de microorganisme occupent une place importante dans le domaine de la recherche, notamment dans le domaine de la santé, et plus précisément pour lutter contre les maladies.

Les Actinomycètes ayant un temps de génération relativement long, la présence de substrats favorables à la multiplication des champignons et des bactéries à croissance rapide dans le microbiote intestinal des insectes complique leur isolement.

L'utilisation des milieux contenant de l'acide humique, des vitamines et de caséine conduit à un isolement sélectif des Actinomycètes lors que la croissance des bactéries et des champignons est faible; ce qui explique le choix du milieu HV et CAA pour l'isolement. Plusieurs travaux ont confirmé que le milieu CAA est efficace pour l'isolement sélectif des actinomycètes à partir d'écosystème varié (**Sharma & al., 2011**)

L'utilisation des milieux HV et CAA additionné des antibiotiques antibactériens et antifongiques est ainsi l'une des méthodes sélectives pour l'isolement des Actinomycètes. Ces antibiotiques, comme néomycine et polymyxine B inhibent totalement la croissance des bactéries Gram négatif; les autres agents sélectifs comme le cycloheximide (inhibiteur fongique) (**Wang, 1990**) ont été décrits pour l'isolement des colonies d'Actinomycètes.

Par conséquent, les antibiotiques ont été utilisés pour augmenter le nombre d'Actinomycètes isolés qui peut être masqués par les bactéries et les champignons présents dans les échantillons. Parallèlement à l'utilisation des inhibiteurs, le traitement des échantillons permet aussi la sélection des Actinomycètes. Ils sont plus résistants que les autres microorganismes. Par conséquent, le nombre des bactéries trouvé communément dans les échantillons est fortement réduit.

Conclusion

Ce travail de recherche a été effectué dans l'objectif d'obtenir des souches d'Actinomycètes à activités biologiques à partir du microbiote intestinales des insectes (d'abeilles mellifères, guêpes).

Pour réaliser ce travail plusieurs étapes ont été poursuivies :

1. Nous avons donné un aperçu complet des connaissances actuelles concernant la biologie des Actinomycètes et les applications de ses membres en médecine, en agriculture, et l'industrie. Distribué dans les écosystèmes terrestres et aquatiques.
2. Un pré-traitement des échantillons qui consiste à réaliser un lavage de stérilisation externe pour éliminer le plus possible nombre des microorganismes qui peut perturber l'apparition de notre résultats.
3. L'isolement d'une variété des souches d'Actinomycètes à partir les échantillons d'insectes et la caractérisation des morphologies par le biais des approches macroscopique et microscopique.
4. La mise en évidence des activités biologiques de souches; l'étude est commencée par la méthode de diffusion sur gélose technique des cylindres d'agar, ce test et réalise contre 7 souches de références, 3 bactéries Gram positive et 3 Gram négative et une levure : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Klebsiella pneumonia* (ATCC 70603) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Escherichia coli* (ATCC 25522), *Candida albicans* (ATCC 10231)
5. L'extraction des métabolites secondaire à partir les souches qui possède une activité antibactériennes a l'aide du solvant acétate d'éthyle-méthanol. Les extraits obtenu passe par un test pas la méthode de dilution dans des plaque de 96 puits pour le but de confirmer que notre extrait brut préparé à partir d'une souche d'actinomycètes possède des métabolites secondaires qui présentent une activité antimicrobienne, et aussi il nous permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice de notre extrait.

Les études portant sur les microorganismes associés au microbiote intestinal des insectes sont loin d'être accomplies et l'élucidation de leurs activités nécessite encore des recherches approfondies. Ainsi, ces travaux pourraient ouvrir à d'autres voies de recherches qui pourraient avoir des résultats très importantes.

Références Bibliographiques

- Alexander. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York.
- Ando K, Murakami Y, Nawata Y. 1971. Tetranactin, a new mitocidal antibiotic. II. Structure of tetranactin. *J Antibiot* 24:418–422.
- Ando K, Oishi H, Hirano S, Okutomi T, Suzuki K. 1971. Tetranactin, a new mitocidal antibiotic. I. Isolation, characterization and properties of tetranactin. *J Antibiot* 24:347–352.
- Antoine A., Jacqueline D. et Philippe T. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-Z-1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, volume 13 numéro 2 : 271- 280
- Anwasha .S , A. Isha , S. Purbasha , KSR Sathish , KV Bhaskara RaoAntioxydant, activité hémolytique de la L- glutaminase produisant des actinobactéries marines isolées du sol de la mare salée du littoral d'Andhra Pradesh Res J Pharm Tech , 7 (2014) , p. 544 – 549.
- Anwasha. S , A. Isha , S. Purbasha , KSR Sathish , KV Bhaskara RaoAntioxydant, activité hémolytique de la L- glutaminase produisant des actinobactéries marines isolées du sol de la mare salée du littoral d'Andhra Pradesh Res J Pharm Tech , 7 (2014) , p. 544 – 549.
- Arora SK. 1985. Molecular structure of heliomycin, an inhibitor of RNA synthesis. *J Antibiot* 38:113–115.
- Baltz RH. 2005. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 55:186–196.
- Baltz RH. 2006. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:507–513.
- Baltz RH. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe* 2:125–131.
- Baltz RH. 2010. Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *J Antibiot* 63:506–511.
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol* 22:583–588.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(1):1–43.
- Behal V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* 47:113–157.
- Boughachiche F., Reghioia S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A., (2005) Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de ain mlila Sciences & Technologie C - N°23,pp. 510.
- Boussaber. E, Kadmiri. I. M, Hilali. L, Hilali. A. 2012. Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. ScienceLib Editions Mersenne. Vol 4. N ° 121203. Pp : 1-21.
- Busscher GF, Rutjes FP, van Delft FL. 2005. 2-Deoxystreptomine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chem Rev* 105:775–791.
- Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MA, Halai R, Cooper MA. 2014.
- Carro L, Pujic P, Trujillo ME, et al. (2013) *Micromonospora* is a normal inhabitant of actinorhizal nodules. *Journal of Biosciences* 38: 685–693.
- Chater KF (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 47:685–711.
- Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34:171–198.
- Decre D. et Courvalin P. (1995) De l'intérêt d'antibiotiques nouveaux. *Bull.Soc. Fr.*
- Dharmaraj S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 26:2123–2139.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Massa P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio activity of secondary metabolites of endophytic actinomycetes. The abstract of 18th International Conference on Plant Growth Substances, p. 59.
- Duval and Soussy R. J. (1990). *Antibiothérapie*, 4^{ème} Ed. Paris: Masson. 188p.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17R–27R.

- El-Shatoury S.; Mitchell. J; Bahgat. M; and Dewedar. A. (2004). Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment. *Actinomycetologica*, 18 (1), 1-7.
- Endo A, Misato T. 1969. Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDPN-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun* 37:718–722.
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 699-735.
- Ensign JC (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev.*
- Feduchi E, Cosin M, Carrasco L. 1985. Mildiomycin: a nucleoside antibiotic that inhibits protein synthesis. *J Antibiot* 38:415–419.
- Ferron A. (1994). *Bactériologie médicale*, 15ème Ed, Paris : C et R ; 472p.
- Gadkari D, Schrickler K, Acker G et al (1990) *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO- and H₂-oxidizing obligate chemolithotroph. *Appl Environ Microbiol* 56:3727–3734.
- Gaynor M, Mankin AS. 2003. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* 3:949–961.
- Genilloud Olga (2017) *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp.151-180).
- Girard G, Traag BA, Sangal V, Mascini N, Hoskisson PA, Goodfellow M, van Wezel GP (2013) A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol* 3(10):130073.
- Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J Antibiot* 67:631–644.
- Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37:189–216.
- Goodfellow, M., and S. T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:189–216.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(1):81–91.
- Greiner-Mai E et al (1988) Taxonomic revision of the genus *Saccharomonospora* and description of *Saccharomonospora glauca* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 38(4):398–405.
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A& Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*,103: 1449-1456.
- Gurovic MSV et al (2013) *Micromonosporaschwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(10):3812–3817.
- Harada S, Kishi T. 1978. Isolation and characterization of mildiomycin, a new nucleoside antibiotic. *J Antibiot* 31:519–524.
- Hayakawa Masayuki et Nonomura Hideo, (1987) Humic Acid-Vitamin Agar, a New Medium for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. Vol. 65, No. 5, 501-509.
- Higashide E. (1984). "The macrolides: properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci.* 22, , pp. 452-508.
- Igarashi Y., Yoshida R., Miura S., and Furumai T. (2004). Plant growth promoting.
- Ilic S, Konstantinovic S, Todorovic Z, Lazic M, Veljkovic V, Jokovic N, Radovanovic B. 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Mikrobiologija* 76:480–487. (In Russian.).
- Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, Suzuki S. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agric Biol Chem (Tokyo)* 29:848–854.
- Jensen SE, Paradkar AS. 1999. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75:125–133.
- Jizba J, Sedmera P, Zima J, Beran M, Blumauerová M, Kandybin N, Samoukina G. 1991. Macrotetrolide antibiotics produced by *Streptomyces globisporus*. *Folia Microbiol (Praha)* 36:437–443.
- Johnston NJ, Mukhtar TA, Wright GD. 2002. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* 3:335–344.
- Kalyani. A.L.T. Ramya Sravani K. M. Annapurna J. B. 2012. isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from marine soil samples. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. Vol: 4. N°: 2. Pp: 109-112.

- Kameda Y. 1987. Validoxylamines as trehalase inhibitors. *J Antibiot* 40:563–565.
- Kang Q, Shen Y, Bai L. 2012. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat Prod Rep* 29:243–263.
- Kharel MK, Pahari P, Shepherd MD, Tibrewal N, Nybo SE, Shaaban KA, Rohr J. 2012. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat Prod Rep* 29:264–325.
- Kitouni. M., Boudemagh. A., Oulmi. L., Reghioua. S., Boughachiche. F., Zerizer. H., Hamdiken. H., Couble. A., Mouniee. D., Boulahrouf. A. and Boiron. P. (2005).
- Kominek L. 1975. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chem* 7:856–860.
- König H. Classe III. Classe de *coriobactéries* nov. *Dans*: Goodfellow M, Kämpfer P, H.-J. B, Trujillo ME, K.-I. S, Ludwig W, Whitman WB (eds), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2e éd., Vol. 5 (The *Actinobacteria*), partie B, Springer, New York, 2012, p. 1975.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7):2567–2572.
- Kumar S. M. and Selvam. K. (2011). Prospective efficacy of bioactive extract of novel actinomycetes against malignant cell and multidrug resistant bacteria. *Pharmacology on line*, 1: 1262-1290.
- Kumar V et al (2014) An actinomycete isolate from solitary wasp mud nest having strong antibacterial activity and kills the *Candida* cells due to the shrinkage and the cytosolic loss. *Front Microbiol* 5:446.
- Lacey J. (1973). *Actinomycetales: Characteristics and Practical importance*. Edited by G. Sykes and F. Skinner. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series. Academic Press London- New York No. 2.
- Lamari, L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycètes thèse de Doctorat. De Tizi Ouzou, Université Mouloud Mammeri.
- 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: 669-674.
- Letek M et al (2012) Cytoskeletal proteins of actinobacteria. *Int J Cell Biol* 2012:1–10.
- Leveau J.Y. et Buix M. (1993). Les Actinomycètes. Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. : 424-480.
- Lin L, Thanbichler M (2013) Nucleotide-independent cytoskeletal scaffolds in bacteria.
- Liras P. 1999. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75:109–124.
- Locci R (2006) Actinomyces spores. eLS Silhavy TJ et al (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5):a000414 Song H et al (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 88(6):526–544.
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whitman WB (2012) Road map of the phylum Actinobacteria. In: *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. Springer, New York, pp 1–28.
- Ludwig W, Euzéby J, Whitman WB. Classe IV. Classe de *Nitriliruptoria* nov. *Dans*: Goodfellow M, Kämpfer P, H.-J. B, Trujillo ME, K.-I. S, Ludwig W, Whitman WB (eds), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2e éd., Vol. 5 (The *Actinobacteria*), partie B, Springer, New York, 2012, p. 2000-2001.
- M. and Puglia A. M, (2002). Microbiol technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 99, 187-198.
- Marc Chevrette.G., Carlson, C.M., Ortega, H.E. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nat Commun* 10, 516 (2019).
- Marchal M. (1985). *Initiation à la microbiologie*. Paris : Bordas : 192p.
- Masayuki Hyakawa et Hideo Nonomura (1987), *J. Ferment. Technol.*, Vol. 65, No. 5, 501-509.
- Mellouli L., Ben Ameer-Mehdi R., Sioud S., Salem M. & Bejar S., 2003 – Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology*, 154: 345-352. *Microbiol.* 12(2), 160-175.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185–229.
- Misato T. 1982. Present status and future prospects of agricultural antibiotics. *J Pestic Sci* 7:301–305.

- Mulinos MG. 1955. Cycloserine: an antibiotic paradox. *Antibiot Annu* 3:131–135. 431. Johnston NJ, Mukhtar TA, Wright GD. 2002. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* 3:335–344.
- Nakajima Y et al (1999) *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(4):1761–1767.
- Nippon Kayaku Co Ltd, Chugai Pharm Co Ltd. 1981. Polynactins as anthelmintics. *Chem Abstr* 95:108 866n. Japan patent Kokai Tokkyo Koho 8157.714.
- Nitiss JL. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9:338–350.
- Nodwell J.R. and Losick R. (1998). Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180(5): 1334-1337.
- Norris PR. Classe II. Classe d' *acidimicrobiie* . nov. *Dans*: Goodfellow M, Kämpfer P, H.-J. B, Trujillo ME, K.-I. S, Ludwig W, Whitman WB (eds), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, 2e éd., Vol. 5 (The Actinobacteria)*, partie B, Springer, New York, 2012, p. 1968.
- Oishi H, Sugawa T, Okutomi T, Suzuki K, Hayashi T. 1970. Insecticidal activity of macrotetrolide antibiotics. *J Antibiot* 23:105–106.
- Okami Y, Hotta K. 1988. Search and discovery of new antibiotics, p 33–67. In Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M(ed), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Okami Y. and Hotta K. (1988). "Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». Academic Press, Orlando (Ed.), pp.33-67.
- Olga Genilloud (2017), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp.153-160)
- Omura S, Crump A. 2014. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Trends Parasitol* 30:445–455.
- Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 3(9), 441-446.
- Park SR, Park JW, Ban YH, Sohng JK, Yoon YJ. 2013. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* 30:11–20.
- Poehlsgaard J, Douthwaite S. 2003. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. *Curr Opin Investig Drugs* 4:140–148.
- Porter J.N., Wilhem J.J. and Tresner H.D. (1971). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 8:174.
- Prescott L. M., Harley J. P. and Klein .D. A. (2007). *Microbiologie*. Paris : De Boeck & Larcier., 1137p.
- Puech V et al (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* 147(5):1365–1382.
- Qinyuan Li XC, Jiang Y, Jiang C (2016) Morphological identification of actinobacteria.
- Rahman. M. A, Islam. M. Z & Ul Islam. M. A. 2011. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnology Research International*. Vol 2011. Pp: 1-6.
- Ribeiro MG et al (2008) Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50(3):177–185.
- Rosenberg E et al (2014) *The Prokaryotes: actinobacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg Rousseaux S et al (2001) Isolation and characterisation of new Gram-negative and Grampositive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol Ecol* 36(2–3):211–222.
- Sagawa T, Hirano S, Takahashi H, Tanaka N, Oishi H. 1972. Tetranactin, a new miticidal antibiotic. 3. Miticidal and other biological properties. *J Econ Entomol* 65:372–375.
- Sakamoto K, Asano T, Mizuochi K, Sasaki K, Hasegawa K. 1978. Makrotetrolid-Antibiotikum zur Bekämpfung der Geflügelkokzidiose. *Chem Abstr* 89:152 732r. German patent DE 28 02 455 C2.
- Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. 2008. Clavulanic acid: a review. *Biotechnol Adv* 26:335–351.
- Schatz A, Waksman SA. 1944. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 57:244–2.
- Schleifer KH (2009) Classification of bacteria and archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 32(8):533–542.

- Ser H-L et al (2015) Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Front Microbiol.* 6:854.
- Sharma. D, Kaur. T, Chadha. BS & Manhas. R. K. 2011. Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* December. Vol 10. N°: 6. Pp: 801-808.
- Shichi H, Tanouchi Y, Kamada Y. June 1989. Immunosuppressive agent. *Chem Abstr* 112:91 787g. US patent 4,843,092.
- Shirling. E.B; and Gottlieb. D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16 (3), 313-340.
- Singleton P. (1999). *Bactériologie 2e cycle*. 4e ed. Paris: Dunod. 414p.
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposition d'un nouveau système de classification hiérarchique, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47 : 479-491.
- Sutcliffe IC et al (2010) The rhodococcal cell envelope: composition, organisation and biosynthesis. *Biology of Rhodococcus*. Springer, Heidelberg, pp 29–71.
- Suzuki Ki, Whitman WB. Classe VI. Classe de *thermoléophilie* . nov. *Dans*: Goodfellow M, Kämpfer P, H.-J. B, Trujillo ME, K.-I. S, Ludwig W, Whitman WB (eds), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2e éd., Vol. 5 (The *Actinobacteria*), partie B, Springer, New York, 2012, p. 2010.
- Suzuki Ki. Classe V. Classe de *rubrobactéries* . nov. *Dans*: Goodfellow M, Kämpfer P, H.-J. B, Trujillo ME, K.-I. S, Ludwig W, Whitman WB (eds), *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2e éd., Vol. 5 (The *Actinobacteria*), partie B, Springer, New York, 2012, p. 2004-2005.
- Sykes G. and Skinner F.A.(1973) *Actinomycetales: Characteristic and practical importance*. Academic press. London. New York.
- Tanaka Y. T. et Omura S. (1993). Agroactive Compounds of Microbial Origin. *Ann. Rev. Microbiol*, 47 : 57-87p.
- Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Shi R, Lou K, Xu LH, Li WJ (2011) *Haloactinopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake, with proposal of Jiangellaceae fam. nov. and Jiangellineae subord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(1):194–200.
- Tindall BJ, Kämpfer P, Euzéby JP, Oren A. 2006. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2715–2720.
- Tortorano A.M., Cabrini E. and Viviani M.A. (1979). Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.* 8: 69-74.
- Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, et al. (2010) The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME Journal* 4: 1265–1281.
- Tul'skaya E et al (2011) Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes. *Biochem Mosc* 76(7):736–744.
- Umezawa H, Okami Y, Hashimoto T, Suhara Y, Hamada M, Takeuchi T. 1965. A new antibiotic, kasugamycin. *J Antibiot* 18:101–103.
- Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16:430–450.
- Van Bambeke F. 2006. Glycopeptides and glycodepsipeptides in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Curr Opin Investig Drugs* 7:740–749.
- van Keulen G, Siebring J, Dijkhuizen L (2011) Central carbon metabolic pathways in *Streptomyces*. In: Dyson P (ed) *Streptomyces: molecular biology and biotechnology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 105–123.
- Vining LC, Stuttard C. 1994. *Chloramphenicol, genetics and biochemistry of antibiotic production*. Butterworth-Heinemann, Boston, MA.
- Waksman S. A. (1959). *The Actinomycetes, nature, occurrence and activities*. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1: 29-46.
- Waksman SA, Woodruff HB. 1940. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 45:609.

- Waksman SA, Woodruff HB. 1942. Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *J Bacteriol* 44:373–384.
- Wang Y., Zhang Z. S. and Ruan J. S. (1999). Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 178-187.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus? *Arch Microbiol* 176:386–390.
- Willey JM, van der Donk WA. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61:477–501.
- Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1984). Ecology of actinomycetes. In: M. Goodfellow. *The biology of the actinomycetes*. London: 481-528.
- Williams ST (1985) Oligotrophy in soil: fact or fiction. In: Fletcher M, Floodgate GD (eds) *Bacteria in their natural environments*. Academic Press, London, pp 81–110.
- Wu MC, Law B, Wilkinson B, Micklefield J. 2012. Bioengineering natural product biosynthetic pathways for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 23:931–940.
- Zerizer H., Oulmi L., Boughachiche F., Reghioia S., Boudemagh A., Kitouni M. and Boulahrouf A. (2006). Identification d'une actinomycétale, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de Biskra. *Sciences Technologie*, 24 : 17-22.
- Zhi XY, Li WJ, 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(3):589–608.

Annexes

Annexes 1 : Milieux de cultures

Caséine amidon agar :

- Amidon.....10g
- Caseine0,3 g
- KNO₃.....2 g
- K₂HPO₄2 g
- NaCl.....2 g
- MgSO₄.7H₂O.....0,05 g
- CaCO₃0,02 g
- FeSO₄.7H₂O..... 0,01 g
- Agar.....18 g
- Eau distillée1 L
- pH = 7.3.

Milieu Muller-Hinton

- Infusion de viande.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17,5 g
- Amidon.....1,5 g
- Agar.....17 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,4

Milieu 5254

- Glucose15.0g /L
- Soymeal..... 15.0g /L
- Corn steep 5.0g/L
- CaCO₃ 2.0g/L
- NaCl..... 5.0g/L
- Eau distillée1000ml
- PH.....7.0

ISP 2

- Extrait de levure.....4 g
- Extrait de malt.....10 g
- Glucose4 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,3

Milieu Sabouraud

- Glucose.....40g
- Tryptone.....10g

-
- Agar.....18g
 - Eau distillée.....1000 ml
 - pH..... 5,6

Milieu Acide humique -vitamine agar.

- Acide humique1.0 g*
- Na₂HPO₄.....0.5 g
- KCl1.71 g
- MgSO₄.7H₂O..... 0.05 g
- FeSO₄.7H.....0.01 g
- CaCO₃..... 0.02 g
- B-vitamins **
- Cycloheximaide.....50 mg
- Agar.....18 g
- Eau distillée1 l
- PH..... .7.2

* diluer dans 10 ml de NaOH 0,2 N.

**** Les Vitamines**

- Thiamine-HCl.....0,5 mg
- Riboflavine.....0,5 mg
- Niacin.....0,5 mg
- Pyridoxine-HCl.....0,5 mg
- Inositol.....0,5 mg
- Ca-pantothénate.....0,5 mg
- Acide paminobenzoïque.....0,5 mg
- Biotine.....0,25 mg

- Les vitamines B et le cycloheximide ont été stérilisées par filtration et ajouté au milieu autoclavé.

Annexe 2 : Solutions

Tampon PBS (phosphate Buffered Saline)

- NaCl.....8g
- KCL.....200mg
- Na₂HPO₄1.44g
- KH₂PO₄..... 240mg
- PH.....7.4
- Eau distillée1 l

Préparation de l'acide humique

L'acide humique a été extrait d'un échantillon de sol agricole.

- L'échantillon de sol (500 g) a été mis en suspension dans 1 l de 0,5 % de solution de NaOH et laissée à température ambiante pendant une journée, en remuant de temps en temps.
- le précipité de la suspension a été enlevé par la centrifugation (7 000 tr/20min)
- le surnageant a été acidifié à un pH de 1,0 avec du HCl concentré.
- le précipité obtenu a été récupéré par centrifugation (3 000 tr/min, 20min), lavé 3 fois avec environ 150 ml d'eau par centrifugation,
- puis en suspension à nouveau dans 150 ml d'eau.
- La suspension a été gelée pendant la nuit (-20°C).
- Après la décongélation, l'acide humique granulé a été filtré, lavé et séché à l'air. (Hayakawa et Nonomur, 1987).

