

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saida Dr MOULAY Tahar



كلية علوم الطبيعة والحياة

N° d'Ordre

Faculté des Sciences de la nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Étude du potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés des biotopes semi-arides de la région de Saida, Algérie

Présenté par :

- Mme : GUENNOUN Kheira
- Mme : DJEMAA Refka Rekia

Soutenu le : 22/06/2025

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BENREGUIEG Mokhtar

Pr Université USMT

Examineur

Mme. BELGACEM Habiba

MCB Université USMT

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCA Université USMT

Année universitaire 2024/2025

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر

Université de Saida Dr MOULAY Tahar



كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Étude du potentiel antimicrobien des actinomycètes isolés des biotopes semi-arides de la région de Saida, Algérie

Présenté par :

- Mme : GUENNOUN Kheira
- Mme : DJEMAA Refka Rekia

Soutenu le : 22/06/2025

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BENREGUIEG Mokhtar

Pr Université USMT

Examineur

Mme. BELGACEM Habiba

MCB Université USMT

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCA Université USMT

Année universitaire 2024/2025

Dédicaces

Avant tout, je rends grâce à Dieu Tout-Puissant, pour Ses innombrables bienfaits, pour Sa guidance et pour la force qu'Il m'a donnée tout au long de ce parcours. Sans Sa volonté, rien n'aurait été possible.

À la mémoire de mon cher grand-père,

Que Dieu te couvre de Sa miséricorde et t'accorde une place dans Son vaste paradis.

Tu as toujours cru en moi, tu m'as encouragée à poursuivre mes études malgré les difficultés, J'ai tenu ma promesse, et c'est à toi que je dédie ce diplôme, avec tout mon amour et ma reconnaissance.

À mes chers parents,

Vous êtes la source de ma force et la lumière de mon chemin.

Grâce à vos prières, vos sacrifices et votre amour inconditionnel, j'ai pu surmonter les épreuves.

Ce succès est le vôtre autant que le mien.

Je vous remercie du fond du cœur, et je prie Dieu de vous accorder une longue vie en bonne santé.

À mes chères sœurs, Nacera, Mokhtaria, Aridj

Votre amour et vos mots réconfortants ont toujours allégé mes moments de fatigue.

Merci d'avoir été là, tout simplement.

À mon frère bien-aimé, Kada

Ton soutien m'a donné la force d'avancer, et je te suis profondément reconnaissante.

À mon amie Imane,

Merci pour ton soutien, ton amitié et ta présence précieuse tout au long de ce parcours.

À mon amie et partenaire dans ce mémoire, Refka

Merci pour ton engagement, ta patience et ta sincérité.

Travailler à tes côtés a été une belle expérience, riche en efforts et en réussites partagées, Ce mémoire est le reflet de notre complicité et de notre persévérance.

Dédicaces

Je remercie Dieu, le Tout-Puissant, qui a tracé le chemin de ma vie, et m'a donné la force, la patience et la volonté de réaliser ce travail. Ce travail, je le dédie :

À mes chers parents,

Vous êtes la lumière de ma vie et la source de ma force.

Ce diplôme est le fruit de vos prières, de vos sacrifices et de votre amour inconditionnel.

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Ce succès est aussi le vôtre.

Puisse le Tout-Puissant vous accorder santé, bonheur et longue vie, afin que je puisse vous combler à mon tour.

À mes agréables et aimables sœurs et frère :

Djawed, Rim, Hamouda

À ma meilleure amie Radjaa,

Merci d'avoir été là, dans les moments faciles comme dans les plus difficiles.

Ton soutien, ton écoute et ta présence ont fait toute la différence.

Ce succès, je le partage avec toi, de tout cœur.

À mon fiancé Abdou,

Merci d'avoir cru en moi, même quand j'en doutais.

Merci pour ton soutien, ta patience et ton amour inestimable.

Ce diplôme, je te le dédie aussi, car derrière chaque réussite, il y a un cœur qui soutient en silence... et ce cœur, c'est le tien.

À tous les membres de ma grande famille :

Cousins, cousines, tantes et oncles

À ma chère amie et partenaire dans ce projet, Kheira,

Merci pour ton engagement, ta créativité et ta précieuse collaboration.

Travailler à tes côtés a été une expérience enrichissante et inoubliable.

Ce succès est le fruit de notre belle complicité. Bravo à nous !

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à *Monsieur Taha Ahmed Benabbou*, mon encadrant, pour sa disponibilité, son accompagnement constant, ses conseils précieux et sa confiance tout au long de la réalisation de ce mémoire. Sa rigueur scientifique et son soutien bienveillant ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également les membres du jury, *Monsieur Benreguiég et Madame Belgacem*, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire, ainsi que pour leurs remarques et suggestions constructives qui ont contribué à enrichir la qualité de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à *Monsieur Gacem*, pour son aide précieuse et son soutien dans la partie pratique de ce projet. Son implication nous a grandement facilité la réalisation de l'aspect expérimental.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont encouragé(e), soutenu(e) et inspiré(e) tout au long de ce parcours universitaire.

Liste des abréviations

GC% : Pourcentage de guanine-cytosine

ADN : Acide désoxyribo nucléique

P/V : Poid/Volume

ARN 16 S : Acide ribonucléique ribosomique 16 Sous-unité

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium de substrat

DAP: Acide diaminopimélique

SCA: Starch Casein Agar

GYM: Glucose Yeast Malt extract

Mcf : MacFarland

Covs : Composés organiques volatils

MCP : mort cellulaire programmée

RAM : La résistance aux antimicrobiens

Liste des tableaux

Tableau1 : Répartition des Actinomycètes dans la nature .	5
Tableau2 : Classification des actinobactéries selon le « Bergey's Manual de Systematique Bactériologic ».	15
Tableau3 : Type de paroi chez les actinomycètes	17
Tableau4 : sucre cellulaire totaux des actinomycètes.	18
Tableau5 : représentation des critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes.	19
Tableau6 : les antibiotiques produits par les actinomycètes.	24
Tableau7 : Classification d'après le spectre d'action des antibiotiques.	25
Tableau8 : Classification des aminosides.	27
Tableau9 : Les principaux macrolides	27
Tableau10 : Tétracycline naturelles et semi-synthétiques.	29
Tableau11 : Classification des antifongiques selon la cible.	33
Tableau12 : Quelques agents antifongiques produits par les actinomycètes.	36
Tableau13 : Principaux milieux de culture et réactifs utilisés	39
Tableau14 : Caractères phénotypiques des 10 souches d'actinomycètes isolées.	48
Tableau15 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar (diamètre de la zone d'inhibition en mm)	51
Tableau16 : Activité antibactérienne des extraits bruts d'actinomycètes par la méthode de diffusion en puits (diamètre de la zone d'inhibition en mm).	54
Tableau17 : Activité antifongique des extraits bruts d'actinomycètes par la méthode de diffusion en puits (diamètre de la zone d'inhibition en mm).	56

Liste des figures

Figure 1 : La coupe transversale d'une colonie d'actinobactéries qui se développant sur gélose	7
Figure 2 : Les classes morphologiques de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivé en milieu liquide	8
Figure 3 : Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B)	10
Figure 4 : Le cycle de vie de <i>Streptomyces</i>	13
Figure 5 : Classification phylogénétique (séquençage de l'ARNr 16S) des Actinobacteria.....	16
Figure 6 : Origine des antibiotiques	23
Figure 7 : Mode d'action des antibiotiques (beta-lactamines).....	30
Figure 8 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative.....	32
Figure 9: Endroits de prélèvement à Sidi Marzoug.....	41
Figure 10: Test de mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar.....	44
Figure 11: Morphologie de quelques colonies d'actinomycètes isolées sur milieu solide (SCA)	47
Figure 12: Observation microscopique à l'état frais des souches A : RSK10 B : RDK09, C : RDK04, D : RSK05.....	49
Figure 13: Observation microscopique après coloration de Gram des souches A : RSK10, B : RDK09, C : RDK04, D : RSK05	49
Figure 14: Exemples représentatifs des résultats du test d'activité antimicrobienne des isolats RSK07, RDK06, RSK10, RDK09 et RSK08, évalués par la méthode du cylindre sur gélose, contre les souches de référence <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	52
Figure 15: Cartographie de l'activité antimicrobienne des sept isolats d'actinomycètes les plus actifs.....	59

Résumé

Dans le contexte de la résistance croissante aux antimicrobiens, les actinomycètes des sols arides constituent une source précieuse de nouveaux composés bioactifs. L'objectif de cette étude est d'isoler et de caractériser des souches d'actinomycètes issues de sols de l'écosystème semi-aride de la région de Saïda (Ouest algérien), puis d'évaluer leur potentiel à produire des substances antimicrobiennes. Au total, dix souches d'actinomycètes ont été isolées à partir de deux échantillons de sol prélevés dans la localité de Sidi Merzouk. Suite à un criblage antimicrobien, sept isolats ont été sélectionnés pour leur activité inhibitrice prononcée.

Ces sept isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique préliminaire et leur spectre d'activité a été déterminé vis-à-vis d'un panel de micro-organismes pathogènes et d'altération : les bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 25921), les bactéries à Gram-négatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae*) et les champignons (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium* sp.).

L'activité antagoniste a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (technique des puits). Les résultats ont permis de sélectionner sept souches particulièrement actives, désignées RSK01, RDK02, RDK04, RSK05, RSK08, RDK09 et RSK10.

Cette étude confirme que les sols inexplorés de la région semi-aride de Saïda constituent un réservoir précieux pour l'isolement d'actinomycètes producteurs de métabolites secondaires bioactifs, offrant ainsi des perspectives intéressantes pour la recherche de nouveaux antibiotiques.

Mots-clés : Actinomycètes, *Streptomyces*, activité antimicrobienne, activité antifongique, antibiotiques, métabolites secondaires, sols arides, Saïda (Algérie).

Abstract

In the context of growing antimicrobial resistance, actinomycetes from arid soils represent a valuable source of novel bioactive compounds. The objective of this study was to isolate and characterize actinomycete strains from the semi-arid ecosystem soils of the Saïda region (Western Algeria), and to evaluate their potential to produce antimicrobial substances. In total, ten actinomycete strains were isolated from two soil samples collected in the Sidi Merzouk area. Following an antimicrobial screening, seven isolates were selected for their pronounced inhibitory activity.

These seven isolates underwent preliminary phenotypic characterization, and their activity spectrum was determined against a panel of pathogenic and spoilage microorganisms: Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 25921), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae*), and fungi (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium* sp.).

Antagonistic activity was evaluated using the agar well diffusion method. The results led to the selection of seven particularly active strains, designated RSK01, RDK02, RDK04, RSK05, RSK08, RDK09, and RSK10.

This study confirms that the unexplored soils of the Saïda semi-arid region constitute a valuable reservoir for the isolation of actinomycetes that produce bioactive secondary metabolites, thus offering promising prospects for the discovery of new antibiotics.

Keywords: Actinomycetes, *Streptomyces*, antimicrobial activity, antifungal activity, antibiotics, secondary metabolites, arid soils, Saïda (Algeria).

ملخص

في ظل أزمة مقاومة مضادات الميكروبات المتنامية، تمثل الأكتينوميسيتات المعزولة من التربة القاحلة مصدرًا قيمًا للمركبات الجديدة النشطة حيويًا. كان الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتوصيف سلالات الأكتينوميسيتات من تربة النظام البيئي شبه القاحل في منطقة سعيدة (غرب الجزائر)، وتقييم قدرتها على إنتاج مواد مضادة للميكروبات. تم عزل ما مجموعه عشر سلالات من الأكتينوميسيتات من عيني تربة تم جمعها من منطقة سيدي مرزوق. بعد إجراء عملية مسح مضاد للميكروبات، تم اختيار سبع عزلات بناءً على نشاطها التثبيطي الواضح.

خضعت هذه العزلات السبع لتوصيف ظاهري أولي، وتم تحديد طيف نشاطها تجاه مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة الممرضة والمُفَسِّدة: البكتيريا موجبة الجرام (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 25921) والبكتيريا سالبة الجرام (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35061)، والفطريات (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium* sp.).

تم تقييم النشاط التضادي باستخدام طريقة الانتشار في حفر الأجار. أدت النتائج إلى اختيار سبع سلالات ذات نشاط عالٍ بشكل خاص، وهي RSK01, RDK02, RDK04, RSK05, RSK08, RDK09, RSK10.

تؤكد هذه الدراسة أن التربة غير المستكشفة في منطقة سعيدة تمثل مستودعًا ثمينًا لعزل سلالات الأكتينوميسيتات المنتجة للمستقلبات الثانوية النشطة حيويًا، مما يفتح آفاقًا واعدة لاكتشاف مضادات حيوية جديدة.

الكلمات المفتاحية: الأكتينوميسيتات، ستربتوميسيس، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للفطريات، مضادات حيوية، مستقلبات ثانوية، تربة قاحلة، سعيدة (الجزائر).

Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Résumé	x
Abstract.....	xi
ملخص.....	xii
Table des matières	xiii

PARTIE I. INTRODUCTION..... 1

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 4

II.1. GENERALITES SUR LES ACTINOMYCETES.....	5
II.1.1. DEFINITION	5
II.1.2. L'HABITAT	5
II.2. CARACTERES MORPHOLOGIQUES :	6
II.2.1. LES MYCELIUMS :	8
II.2.2. FORMATION DES SPORES :	9
II.3. MATERIEL GENETIQUE DES ACTINOBACTERIES :	10
II.4. PHYSIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT :	10
II.5. CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES ACTINOMYCETES :	12
II.6. CLASSIFICATION DES ACTINOBACTERIES :	14
II.7. / TAXONOMIE ET IDENTIFICATION :	16
II.7.1. LES CRITERES MORPHOLOGIQUES :	17
II.7.2. CRITERES CHIMIO TAXONOMIQUE :	17
II.7.3. CRITERES PHYSIOLOGIQUES :	18
II.7.4. CRITERES MOLECULAIRES :	19
II.8. IMPORTANCE DES ACTINOMYCETES :	20
II.9. LES MOLECULES BIOACTIVES PRODUITE PAR LES ACTINOMYCETES :	20
II.9.1. LE METABOLISME DES ACTINOMYCETES :	20
II.9.1.1. Le métabolisme primaire :	21
II.9.1.2. Le métabolisme secondaire :	22
II.9.2. LES ANTIBIOTIQUES :	22

II.9.2.1. Définition :	22
II.9.2.2. Origine des antibiotiques :	22
II.9.2.3. Les antibiotiques produits par les actinomycètes :	23
II.9.2.4. Classification des antibiotiques :	24
II.9.2.5. Mécanismes d'action des antibiotiques :	29
II.9.2.6. Résistance aux antibiotiques :	31
II.9.2.6.1. Types de résistance	31
II.9.2.6.1.1. Résistance naturelle	31
II.9.2.6.1.2. Résistance acquise	31
II.9.3. LES ANTIFONGIQUES :	32
II.9.3.1. Historique :	32
II.9.3.2. L'origine des substances antifongique.....	33
II.9.3.3. Classification des antifongiques	33
II.9.3.4. Mode d'action des antifongiques	33
II.9.3.5. Mécanisme de résistance des substances antifongique	34
II.9.3.6. Les antifongiques produits par les actinomycètes	36

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES 37

III.1. MATERIEL.....	38
III.1.1. MATERIEL BIOLOGIQUE :	38
III.1.2. APPAREILLAGE ET VERRERIE DE LABORATOIRE	38
III.1.3. MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS CHIMIQUES.....	38
III.2. METHODES :	39
III.2.1. ÉCHANTILLONNAGE.....	39
III.2.2. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL	40
III.2.3. ISOLEMENT DES ACTINOMYCETES PAR LA METHODE DES DILUTIONS EN SERIE.....	40
III.2.4. PURIFICATION :	41
III.2.5. CONSERVATION DES SOUCHES PURES :	41
III.2.6. IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS	41
III.2.6.1. Caractères macroscopiques :	42
III.2.6.2. Caractères microscopiques :	42
III.2.7. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ISOLATS	43
III.2.7.1. Préparation des inoculums des souches cibles	43

III.2.7.2. Criblage primaire par la méthode des cylindres d'agar (Plug Test) :.....	43
III.2.7.3. Criblage secondaire par la méthode de diffusion en puits.....	44
<u>PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....</u>	<u>46</u>
IV.1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES.....	47
IV.2. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS	47
IV.2.1. CARACTERES MACROSCOPIQUES	48
IV.2.2. CARACTERES MICROSCOPIQUES.....	48
IV.3. RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ISOLATS :.....	51
IV.3.1. CRIBLAGE PRIMAIRE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE PAR LA METHODE DES CYLINDRES D'AGAR :.....	51
IV.3.2. CRIBLAGE SECONDAIRE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE PAR LA METHODE DE DIFFUSION EN PUIITS	53
IV.3.3. ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS BRUTS.....	56
IV.3.4. ANALYSE COMPAREE ET IMPLICATIONS DES PROFILS D'ACTIVITE DES ISOLATS RDK09 ET RSK10.....	58
<u>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>61</u>
<u>PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>64</u>
<u>PARTIE VII. ANNEXE</u>	<u>71</u>

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

Depuis l'aube de la civilisation, les micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les moisissures sont exploités par l'Homme pour produire des aliments fermentés comme la bière, le fromage ou le pain. Ces micro-organismes, omniprésents dans notre environnement et notre microbiote, jouent un rôle crucial dans les équilibres écologiques et la santé humaine. Ils sont aujourd'hui un moteur essentiel du secteur des biotechnologies. Une attention particulière est accordée au groupe de bactéries connu sous le nom d'actinomycètes ou actinobactéries (Smaoui et al., 2010 ; Abbas, 2022).

La résistance aux antimicrobiens (RAM) représente aujourd'hui l'une des menaces les plus graves pour la santé mondiale, touchant aussi bien l'Homme que les animaux et l'environnement. Sous la pression sélective exercée par les antibiotiques, les micro-organismes peuvent développer des mécanismes biochimiques et des processus génétiques qui diminuent l'efficacité de ces molécules (Dunachie et al., 2020). Cette pression favorise l'émergence et la dissémination de la résistance au sein des populations bactériennes. Une dynamique similaire s'observe dans l'environnement, où des transferts de gènes de résistance peuvent survenir entre les micro-organismes résistants et la flore bactérienne autochtone (Lykov et al., 2021).

Les actinomycètes, bactéries filamenteuses à Gram positif, ont longtemps été confondus avec les champignons en raison de leur morphologie distinctive. En effet, ils forment un véritable mycélium ramifié, caractéristique souvent associée aux eucaryotes fongiques. Toutefois, leur structure cellulaire est de nature procaryote. Leur appartenance au règne bactérien est aujourd'hui clairement établie, notamment grâce à la caractérisation chimique de leur paroi cellulaire (riche en lipides spécifiques) et à la structure de leur peptidoglycane. Ce groupe présente un pourcentage élevé de guanine et cytosine (G+C) dans son ADN génomique, avec une teneur généralement supérieure à 55 % (Sullivan et Chapman, 2010 ; Gao et Gupta, 2012).

Les actinobactéries possèdent un métabolisme secondaire riche et diversifié, ce qui leur permet de produire une vaste gamme d'antibiotiques naturels et d'autres molécules bioactives. Dans l'environnement, elles jouent un rôle majeur dans le

processus de recyclage des composés organiques complexes. Elles sont largement utilisées dans de nombreuses applications biotechnologiques en raison de leur grande diversité métabolique et de leur capacité à produire une vaste gamme d'enzymes, d'immunosuppresseurs, d'inhibiteurs d'enzymes et de vitamines (Kumar et al., 2012 ; Genilloud, 2017). Parmi eux, le genre *Streptomyces* est particulièrement remarquable, étant à l'origine de plus des deux tiers des antibiotiques d'origine naturelle découverts à ce jour, incluant des molécules phares comme la néomycine et l'actinomycine (Lazzarini et al., 2000 ; Bérdy, 2005).

Dans ce contexte, et face à l'urgence de découvrir de nouveaux agents antimicrobiens, l'exploration de niches écologiques peu étudiées est primordiale. L'objectif principal de ce travail est donc d'isoler et de caractériser des souches d'actinomycètes provenant des sols de la région semi-aride de Saida, afin d'évaluer leur potentiel antagoniste. Plus spécifiquement, nos objectifs sont les suivants :

1. Isoler des souches d'actinomycètes à partir d'échantillons de sols et réaliser leur identification morphologique macroscopique et microscopique.
2. Évaluer *in vitro* l'activité antagoniste des isolats obtenus contre une collection de souches bactériennes et fongiques d'intérêt médical ou biotechnologique.

Cette étude vise ainsi à contribuer à la recherche de nouvelles souches d'actinomycètes capables de produire des substances bioactives potentiellement utiles pour lutter contre les germes pathogènes.

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Généralités sur les actinomycètes

II.1.1. Définition

Les actinomycètes sont des microorganismes procaryotes en grande partie aérobies, largement répandus à l'échelle mondiale. Ils s'installent dans une grande variété d'environnements et montrent une capacité d'adaptation et de résistance à des conditions extrêmement défavorables (Badis et al., 2006 ; Procop et al., 2020).

Les actinomycètes sont des bactéries en forme de filament qui appartiennent au phylum Actinobacteria et à l'ordre Actinomycetales. La plupart des actinobactéries sont saprophytes, présentent un caractère Gram positif et ont un pourcentage élevé en G+C, se développant dans un milieu neutre ou légèrement alcalin. Ils sont mésophiles ou thermophiles, capables de tolérer des températures atteignant 60°C (Omura, 1992). Il s'agit de bactéries hétérotrophes, mais plusieurs autres espèces sont chimio-autotrophes. (Ensign et al., 1993).

II.1.2. L'habitat

Les Actinobacteria s'installent dans les environnements terrestres et aquatiques et constituent l'un des groupes majeurs de la population du sol, contribuant à la transformation des éléments du sol en composants organiques par la décomposition d'un assortiment complexe de matière organique provenant de végétation morte, Animaux et matériel mycologique (Hazarika et Thakur, 2020).

Tableau 1 : Répartition des Actinomycètes dans la nature (Williams et al., 1984).

Actinobactéries	Habitats
<i>Actinoplanes spp</i>	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia spp.</i>	Nodules racinaires des non légumineuses, sol.
<i>Micromonospora spp.</i>	sédiments, sols (humides ou non).
<i>Nocardiaamarae</i>	Boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Foin moisi, sol
<i>Saccharomonospora</i>	Compost, sol...
<i>Streptomyces spp</i>	Sol, litière végétale, eau

II.2. Caractères morphologiques :

Les actinobactéries classiques possèdent un mycélium radial fortement développé. En fonction de leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, on peut classer le mycélium en mycélium de substrat et en mycélium aérien. Cette figure 01 illustre la morphologie typique des actinomycètes (Li et al., 2016).

Des structures complexes comme les spores, les chaînes de spores, les sporanges et les sporangiospores peuvent être produites par certaines actinobactéries. Les caractéristiques morphologiques essentielles pour classer les actinobactéries incluent la manière dont le mycélium du substrat se développe et se fissure, l'emplacement et le nombre de spores, les structures présentes à la surface des spores, la forme des sporanges, ainsi que la présence ou absence de flagelles sur les sporangiospores (Li et al., 2016).

- Texture : lisse, solide et pâteuse.
- Couleurs disponibles : blanc, jaune, orange, rose, rouge, violet, bleu, vert, le marron et le noir.
- Surfaces : lisses, rainurées, ridées, granuleuses ou squameuses.
- Aspect : compact ou mélange.
- Taille des colonies varie d'un millimètre à quelques centimètres de diamètre, selon
- l'espèce, l'âge et les conditions de culture. (Devanshi et al., 2021)
- Formes sont variées entre les différents genres des formes bâtonnets (*Mycobacterium*), Cocci comme *Micrococcus*, et polymorphes (*Nocardia*) jusqu'aux filaments ramifiés qui se (Erikson, 1949).

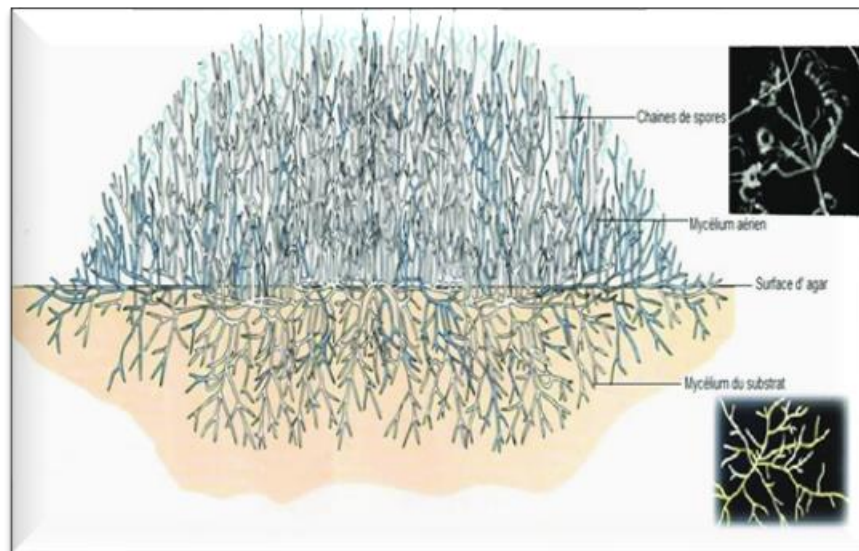


Figure 1 : La coupe transversale d'une colonie d'actinobactéries qui se développant sur gélose (Prescott et al., 2018)

Les actinomycètes forment des colonies qui,

- ❖ sur des supports solides, montrent divers aspects macroscopiques pouvant être classés en trois catégories :
 - des colonies poudreuses où des hyphes aériens sont solidement fixés au substrat
 - pâteuses qui se détachent aisément des milieux solides.
 - Dépourvues de mycélium de substrat, elles sont formées d'hyphes aériens qui sont fixés au milieu par des crampons.
- ❖ Dans une culture en milieu liquide « sans agitation », les hyphes qui se forment à la suite de la germination des spores viennent à la surface pour se développer au contact de l'air. Toutefois, dans un milieu liquide « avec agitation », la formation du mycélium aérien et des spores ne se produit pas. Initialement, les Streptomyces créent des filaments indépendants qui se divisent et s'unissent pour constituer des pellets (Aouar, 2012). La figure ci-dessous montre les différentes classes morphologiques de filaments en culture liquide.

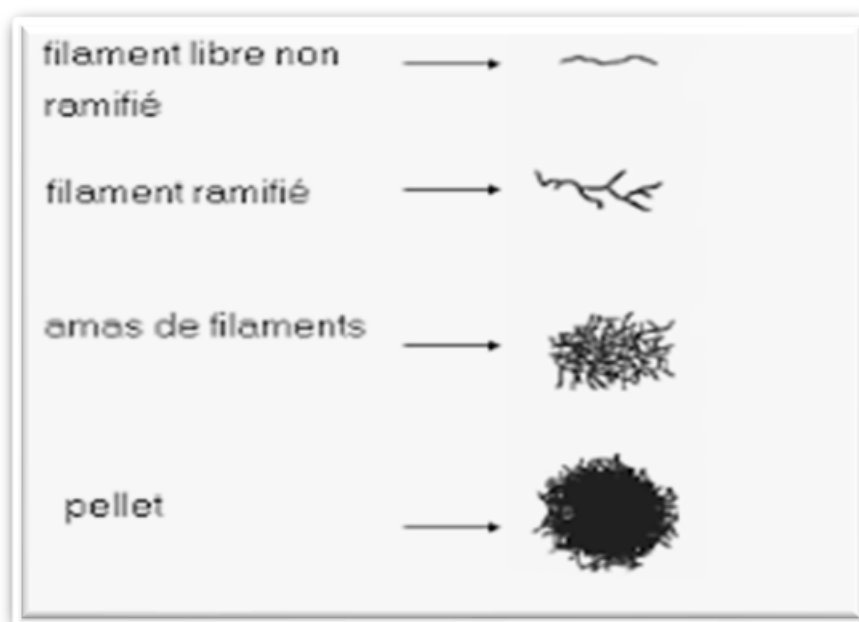


Figure 2 : Les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian et al., 2002).

II.2.1. Les mycéliums :

- Le mycélium du substrat ou mycélium primaire :

Cela se présente sous la forme d'un ensemble de filaments multi nucléaires dérivés du tube germinale (hyphes) provenant d'une spore. Cet hyphe s'étend par croissance apicale et se divise de multiples fois. Son développement, tant à la surface qu'à l'intérieur du milieu solide, donne lieu à de jeunes colonies qui se forment par des filaments fixés dans une matrice complexe (Miguel et al., 2000). Le mycélium de substrat est facultativement aérobique.

- Le mycélium aérien ou secondaire :

En règle générale, le mycélium aérien est plus dense et moins ramifié que celui du substrat qui présente des caractéristiques hydrophobes. Un mycélium aérien ou secondaire, constitué d'hyphes, se développe sur le mycélium primaire du substrat. Ils sont généralement pigmentés et sont contenus dans une enveloppe externe qui repousse l'eau. En revanche, le mycélium aérien est strictement aérobique (Kitouni, 2007).

II.2.2. Formation des spores :

Les endospores

Ces dernières sont générées par des actinobactéries thermophiles et présentent une ressemblance morphologique et chimique avec celles de la famille des *Bacillaceae*. Elles possèdent une paroi externe robuste, multicouche et résistante qui entoure le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes ainsi que le nucléoïde. Elles renferment également de l'acide dipicolinique. Les actinobactéries appartenant au genre *Thermoactinomyces*, responsables de leur production sur les hyphes, semblent avoir un lien de parenté avec ce groupe bactérien (Kitouni, 2007).

Les exospores

Elles se forment à partir des hyphes déjà présentes par la création de parois transversales. On effectue aussi une classification supplémentaire basée sur la présence ou l'absence d'une enveloppe qui couvre la paroi de l'hyphe sporogène. Par conséquent, la formation d'exospores à partir de la fragmentation d'hyphes enveloppés est le processus le plus courant. On l'observe notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*, qui se présentent généralement sous forme de deux à deux en disposition longitudinale (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*) ou en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être non ramifiées, droites, sinueuses ou en forme de spirale. En outre, elles peuvent se répandre autour des hyphes sporophores (*Streptoverticillium*) (Kitouni, 2007).

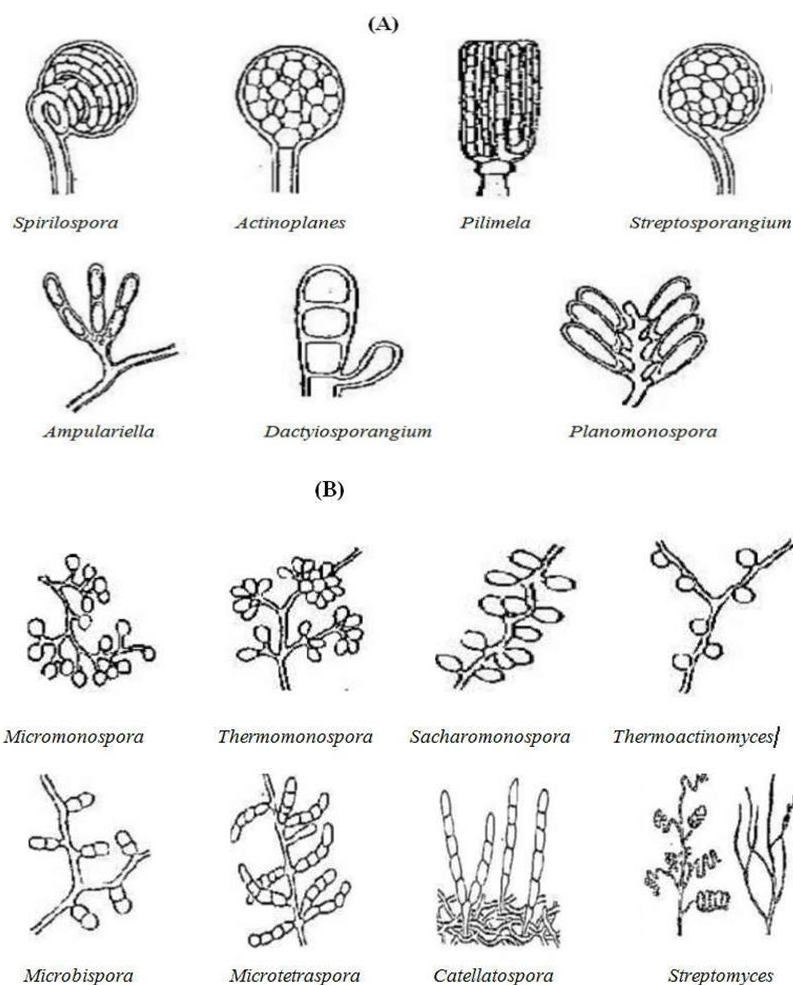


Figure 3 : Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton et al., 1989).

II.3. Matériel génétique des actinobactéries :

L'ADN chromosomique, ainsi que l'ADN plasmidique ou phagique dans certaines souches, compose le matériel génétique des actinobactéries. Un aspect notable est la présence significative d'environ 70 % de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la majorité des actinobactéries (Theilleux, 1993).

L'ADN des actinobactéries a une taille de 3,7 Méga Daltons, selon Larpent et al. (1989).

II.4. Physiologie du développement :

Plusieurs facteurs peuvent influencer la croissance des actinomycètes. Parmi ces facteurs, on peut citer :

Le pH :

Les actinomycètes se développent généralement dans un pH neutre et leur croissance s'opère entre pH 5 et 9, ou légèrement alcalin. Certains *Streptomyces* se développent dans une plage de pH de 3,5 à 6,5, ils prospèrent donc particulièrement bien dans les sols acides (Hana et Roufaïda, 2021).

L'oxygène :

Les actinobactéries peuvent être classées en deux catégories en fonction de leurs types respiratoires :

- ❖ Les formes anaérobies fermentatives, illustrées par le genre type *Actinomyces*, qui sont des commensaux obligatoires présents dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs. (Aouar & al, 2012).
- ❖ Les formes aérobies oxydatives, comme les *Streptomyces*, se retrouvent en grande quantité dans la nature, surtout dans le sol (Avril & al, 1992).

Température :

Les actinobactéries sont des micro-organismes qui se développent dans des conditions mésophiles. La température idéale pour un développement optimal se situe entre 25 et 30 degrés Celsius. Toutefois, certaines espèces sont thermophiles, principalement celles du genre *Thermoactinomyces* où la température idéale se situe entre 50 et 60°C (Rangaswami et al., 2004).

En règle générale, les actinomycètes se présentent comme des mésophiles. les actinomycètes thermophiles peuvent supporter des températures atteignant 60°C, (Holt et al., 1994).

Tolérance pour NaCl :

En fonction de leurs besoins en NaCl, les microorganismes se répartissent en deux catégories :

- Les halophiles : nécessitent du sel (NaCl) pour se développer, cette concentration peut fluctuer entre 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, et peut atteindre jusqu'à 15-30 % pour les fortement halophiles, (Nanjani, 2011).
- Les halotolérants : tolèrent des niveaux modérés de sel sans que cela soit indispensable pour leur croissance. On classe généralement les espèces selon leur tolérance au NaCl : les légèrement tolérants (qui supportent de 6 à 8% de NaCl (P/V) ; les modérément tolérants (qui supportent de 18 à 20% de NaCl (P/V) ; et les extrêmement tolérants (qui se développent jusqu'à saturation en NaCl). Cette tolérance n'est pas impérative pour leur développement (Nanjani, 2011).

Activité de l'eau :

On peut observer la germination des spores de la majorité des actinobactéries à des niveaux d'activité de l'eau supérieurs ou égaux à 0,67. l'activité d'eau idéale pour favoriser la croissance et le développement des actinomycètes est de 0,98, (Zvyagintsev & al, 2005).

II.5. Cycle de développement des actinomycètes :

Le processus de vie et de développement des actinomycètes est particulièrement complexe, comportant un développement multicellulaire coordonné qui entraîne une différenciation physiologique et morphologique de plusieurs sortes de cellules. Ce processus mène à la génération de métabolites secondaires et à la dissémination des spores matures (Flärdh et Buttner, 2009 ; McCormick et Flärdh, 2012).

Le cycle de vie des Streptomyces débute avec la germination d'une spore, qui entraîne la croissance d'un ou deux tubes germinaux évoluant en hyphes. Les hyphes s'étendent par division et croissance de la pointe, créant de ce fait un ensemble d'hyphes qui constituent collectivement le mycélium végétatif. Face à des stress tels que l'épuisement de nutriments, une portion du mycélium est sacrifiée par le biais d'une dégradation autolytique induite par la mort cellulaire programmée (MCP) ; ce processus entraîne la libération de nutriments dans l'environnement, qui seront exploités pour la génération d'hyphes aériens et de spores. La production d'antibiotiques commence en même temps que la différenciation cellulaire, fournissant une défense contre les micro-organismes rivaux attirés par les nutriments libérés au cours de la MCP (Anne van der Meij et al., 2017)

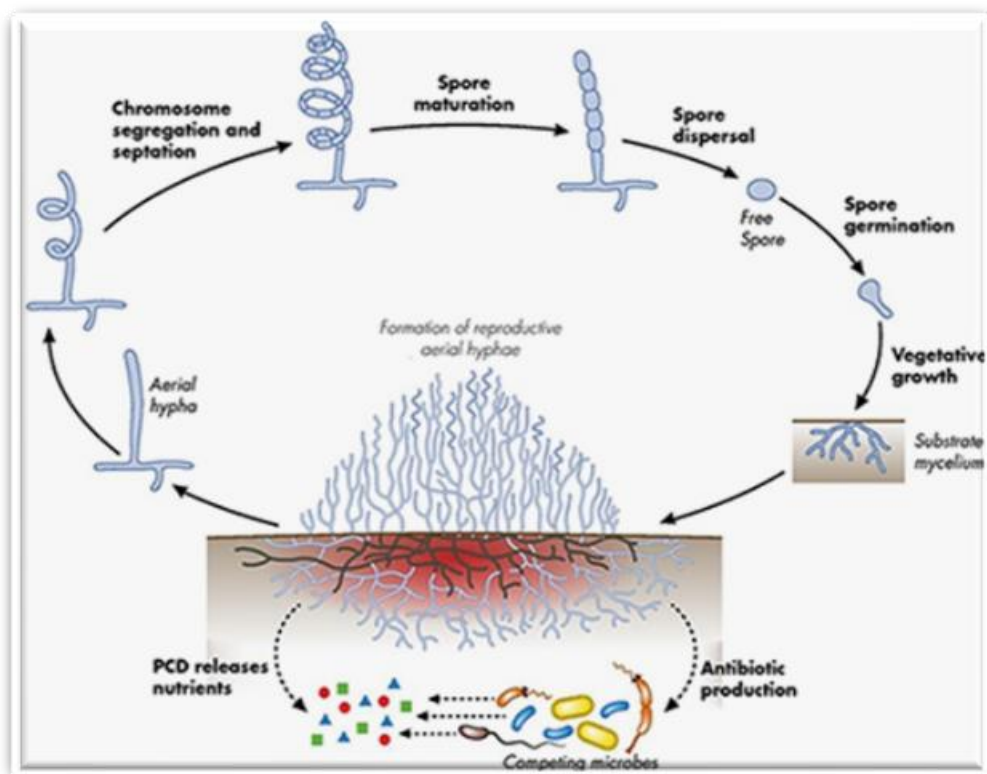


Figure 4 : Le cycle de vie de Streptomyces (Anne van der Meij et al.,2017)

II.6. Classification des actinobactéries :

Les actinobactéries figurent parmi les plus importantes unités de classification parmi les 18 grandes lignées actuellement identifiées dans le règne bactérien, englobant 6 classes, 22 ordres, 54 familles, 250 genres et pas moins de 3000 espèces.

L'ordre des actinobactéries, établi par Buchanan en 1917, fait partie de ce groupe de procaryotes (Law et al., 2020). Cette classification se fonde sur l'arbre ARNr 16S. Ainsi, ce phylum est subdivisé en six classes (tableau 2) : Rubrobacteria, Thermoleophilia, Coriobacteria, Acidimicrobiia, Nitrospirae et Actinobacteria (Ludwig et al., 2012 ; Law et al., 2020).

Les actinobactéries se classent dans le règne des procaryotes, plus précisément au sein de la division Firmicutes et de la classe Actinobacteria, qui englobe l'ordre Actinomycetales (Larvent, 2000). L'ordre Actinomycetales est divisé en 13 sous-ordres et comprend 42 familles (Figure 5). Par le biais de l'hybridation ADN-ADN, du séquençage de l'ADN ribosomique 16 S et du calcul du coefficient de Chargaff (G+C%), on peut retracer l'ensemble de la phylogénie des actinobactéries (Lamari, 2006).

Tableau 2 : Classification des actinobactéries selon le « Bergey's Manual de Systematique Bactériologic » (2012).

Domaine	Bacteria		
Phylum	Actinobacteria		
Classe	Nitriliruptoria	Acidimicrobiia	Actinobacteria
	Rubrobacteria	Coriobacteria	Thermoleophilia
Ordre	- Actinomycetales - Streptomycetales - Actinopolysporales - Bifidobacteriales - Catenulisporales - Corynebacteriales - Frankiales - Glycomycétales - Jianeasporiales - Kineosporiales - Micrococcales - Micromonosporales - Propionibacteriales - Pseudonocardiales - Streptosporangiales		
Famille	Actinomycetaceae		Streptomycetaceae
Genre	<i>Trueprella</i> <i>Actinobaculum</i>	<i>Varibaculum</i>	<i>Kitasatospora</i> <i>Streptoverticillium</i>

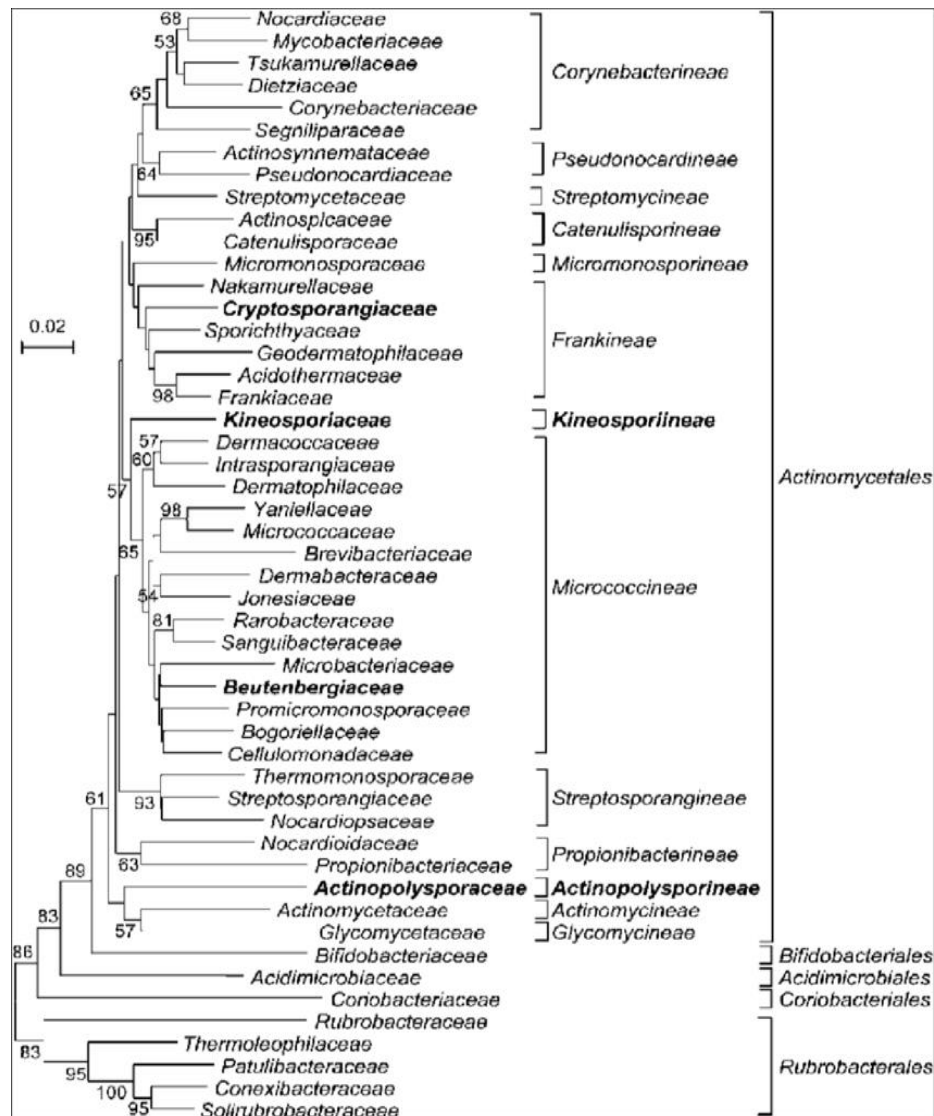


Figure 5 : Classification phylogénétique (séquençage de l'ARNr 16S) des Actinobacteria (Zhi,2009).

II.7. / Taxonomie et identification :

Plusieurs critères sont utilisés pour la classification des actinomycètes : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Les études morphologiques facilitent la détermination des genres, tandis que les critères moléculaires et physiologiques (comme l'hybridation ADN/ADN) permettent de distinguer les espèces (Loucif, 2011).

II.7.1. Les critères morphologiques :

La teinte et la sorte du mycélium aérien (MA) et/ou du mycélium de substrat (MS), Les spores jouent un rôle crucial dans la classification taxonomique des Actinobactéries, « elles se développent sur le mycélium du substrat ou le mycélium aérien et d'autres La présence de sporanges», la production et la couleur des pigments «pigments de la mélanine» (Ait baraka et al., 2016), ainsi que la mobilité constituent les critères morphologiques primordiaux à examiner chez les actinomycètes (Badji, 2006).

II.7.2. Critères chimio taxonomique :

Le principal caractère sur lequel est basée, la chimio taxonomie est la composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides.

Tableau 3 : Type de paroi chez les actinomycètes (Prescott et al.,2010).

Type de paroi	Isomère de l'acide diaminopimélique	Glycine dans le pont inter peptidique	Sucres caractéristique	Genre representatives
I	L, L	+	NA	<i>Nocardioides, Streptomyces</i>
II	méso	+	NA	<i>Micromonospora, pilimelia, Actinoplanes,</i>
III	méso	—	NA	<i>Actinomadura, Frankia</i>
VI	méso	—	Arabinose, galactose	<i>Saccharomonospora, Nocardia.</i>

NB : NA non applicable non déterminé

- L'acide diaminopimélique (DAP), qui peut parfois être substitué par la lysine, ainsi que la glycine, qui peut être présente ou absente, sont les deux acides aminés pariétaux les plus significatifs du point de vue taxonomique.

- Les couples de sucres tels que « arabinose-galactose »,

« xylose-arabinose », « rhamnose-galactose » ou encore le madurose sont d'une grande importance sur le plan taxonomique (Tableau04).

Tableau 4 : sucre cellulaire totaux des actinomycètes. (Prescott et al ; 2010)

Type de composition en sucre	Sucre caractéristiques	Genre représentatifs
A	Arabiose, galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Dermatophilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

L'identification des actinomycètes repose également sur l'analyse des lipides cellulaires, tels que les phospholipides, les acides mycosiques pariétaux (qui peuvent être présents ou absents) et les ménaquinones membranaires.

II.7.3. Critères physiologiques :

Les caractéristiques physiologiques servent de fondement pour la reconnaissance des espèces. Elles incluent des tests de décomposition de divers composés glucidiques, lipidiques, protéiques et des polymères complexes, tout comme la résistance à certains agents physiques (pH, température) et chimiques (phénol, tellurite de potassium, antibiotiques, etc.) (Lamari, 2006). Dans le tableau 05, on présente certains paramètres physiologiques (chimiques) des espèces pathogènes.

Tableau 5 : représentation des critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes (Ripert, 2013)

	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Actinomadura (Streptomyces) madurae</i>	<i>Actinomadura (Streptomyces) pelletieri</i>	<i>Streptomyces (Nocardia) somaliensis</i>
Acido-résistance	+	+	0	0	0
Hydrolyse de la caséine	0	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	0	+	+	+	+
Hydrolyse de l'ovalbumine	0	.	0	+	+
Hydrolyse de la paraffine	+	+	0	0	0
Utilisation de:					
Urée	+	+	+	+	0
SO ₄ (NH ₄) ₂	+	+	.	0	0
NO ₃ K	+	+	.	0	0
Utilisation de:					
xylose	0	.	+	0	0
galactose	0	+	.	0	0
maltose	0	.	.	0	+
amidon	0	.	+	0	0
mannitol	0	+	+	0	0

II.7.4. Critères moléculaires :

Actuellement il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par leur analyse génétique. Ces études génétiques ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes, de grouper ou de séparer des espèces entre elles ou fusionner des genres entre eux (Zitouni, 2005).

Les principales techniques moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes sont :

➤ **L'analyse de séquence de l'ADN codant pour L'ARNr 16S :**

Elle est actuellement couramment employée pour établir les liens phylogénétiques entre deux groupes de bactéries et définir la classification taxonomique de nombreux organismes (Boubetraet Biskri, 2013).

➤ **Hybridation ADN/ADN :**

Les analyses de réassociation ADN/ADN sont également employées pour classer les actinomycètes et identifier les différentes espèces. (Boubetraet Biskri, 2013).

➤ **Le coefficient de Chargaff ou GC% :**

C'est un critère essentiel non seulement pour identifier les genres, mais aussi les familles d'actinomycètes dont l'ADN présente un taux de G+C supérieur à 55% (Badji 2006).

II.8. Importance des actinomycètes :

Les actinomycètes, qui sont des producteurs d'antibiotiques (Donadio et al., 2010 ; Meena et al., 2013), jouent un rôle crucial dans l'écosystème marin. Ils ont un rôle essentiel dans la minéralisation de la matière organique, la capture d'éléments nutritifs minéraux, la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et l'amélioration des caractéristiques physiques (Dastager et al., 2013).

Divers types d'actinomycètes sont capables de générer des métabolites secondaires (Manivasagan et al., 2013). Effectivement, ils ont la capacité de produire une multitude de produits naturels tels que les alcaloïdes, les peptides, les stéroïdes et plus encore.

Selon (Hassan et al. 2017), ces produits naturels pourraient avoir la capacité de combattre des maladies graves telles que le cancer, le VIH, les infections à protozoaires et les inflammations sévères.

II.9. les molécules bioactives produites par les Actinomycètes :

II.9.1. Le métabolisme des actinomycètes :

La différenciation morphologique est associée à une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire s'installe, entraînant la biosynthèse de

composés présentant une diversité exceptionnelle de structures et d'activités biologiques (Choulet, 2006).

Parmi les caractéristiques les plus marquantes des actinomycètes figurent leur faculté à croître sur une grande variété de substrats et leur potentiel à produire un vaste éventail de métabolites bioactifs (Theilleux, 1993). Effectivement, la streptomycine a été le premier antibiotique dérivé d'une souche de *Streptomyces*.

Selon Tarkka et Hampp (2008), on peut diviser les métabolites secondaires des *Streptomyces* en quatre catégories distinctes basées sur leur activité biologique :

- Agents antagonistes, incluant des antibiotiques, des antifongiques, des antiparasitaires et même des antiviraux.
- Agents pharmacologiques tels que des inhibiteurs d'enzymes et des médicaments anti-tumoraux.
- Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides.
- Composés ayant une activité régulatrice, comme les facteurs de croissance.

Ces caractéristiques illustrent l'abondance tout à fait exceptionnelle du métabolisme cellulaire de ce groupe de microbes (Theilleux, 1993).

La diversité métabolique au sein de la famille des Actinomycetaceae découle de l'ampleur de leur génome, qui abrite des centaines de facteurs de transcription régulant l'expression génétique, ce qui leur confère la capacité de s'adapter à des exigences particulières (Singh et al, 2006).

II.9.1.1. Le métabolisme primaire :

Le métabolisme primaire des actinomycètes est comparable à celui d'autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux indispensables construisent la structure cellulaire et assurent le déroulement du métabolisme général (Theilleux, 1993).

II.9.1.2. Le métabolisme secondaire :

La particularité du métabolisme secondaire par rapport au métabolisme primaire réside dans le fait qu'il se concentre sur des métabolites qui ne sont pas directement liés à la croissance et à la survie de l'organisme (Theilleux, 1993). Généralement, le métabolisme secondaire est défini comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui ne semblent pas jouer de rôle direct dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

II.9.2. Les antibiotiques :

II.9.2.1. Définition :

Les antibiotiques (du grec anti, qui veut dire « anti » et bios, qui veut dire « vie ») sont des substances chimiques fabriquées par des micro-organismes (comme les bactéries et les champignons) ou synthétisées de manière artificielle (molécules similaires à des dérivés d'antibiotiques naturels). Ces derniers ont pour conséquence d'empêcher le développement des bactéries (effet bactériostatique) ou de les anéantir de manière précise (effet bactéricide) (Sadikalay, 2018).

Les actinomycètes sont des producteurs bien connus de métabolites bioactifs, avec plus de 10000 agents antimicrobiens à usage clinique (Demain, 2009).

II.9.2.2. Origine des antibiotiques :

Les produits issus des actinomycètes, spécifiquement ceux du genre *Streptomyces*, englobent toutes les principales catégories de médicaments employés en clinique actuellement, comme les β -lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides ou encore les glycopeptides (Mast et Stegmann, 2019).

Par ailleurs, divers micro-organismes sont responsables de la production d'antibiotiques. Environ 17% proviennent des bactéries non mycéliennes, 38% des champignons et près de 45% des actinomycètes filamenteux, dont environ 75% des métabolites sont produits par les espèces du genre *Streptomyces* (Solecka et al., 2012).

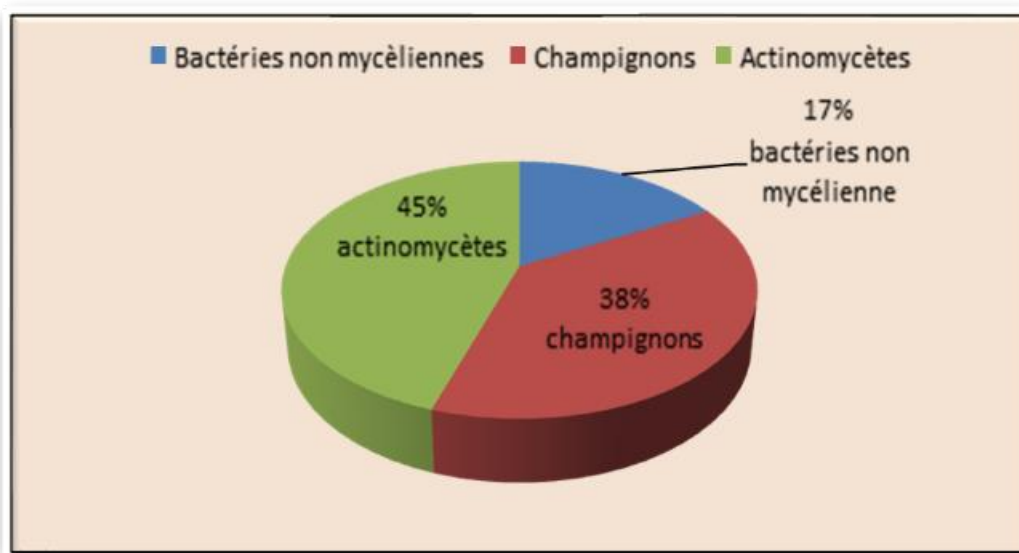


Figure 6 : Origine des antibiotiques (Solecka et al., 2012)

II.9.2.3. Les antibiotiques produits par les actinomycètes :

En 1940, le premier antibiotique, l'actinomycine, a été isolé de *Streptomyces antibioticus* (Kresge et al., 2004 ; Mast et al., 2020). Après cela, de nombreux antibiotiques ont été découverts à partir de différentes espèces d'actinobactéries cités dans le tableau suivant (Barka et al., 2016 ; Risdian et al., 2019).

Tableau 6 : les antibiotiques produits par les actinomycètes (Risidian et al., 2022).

Les actinomycètes	L'antibiotique produit	Famille de l'antibiotique	Mécanisme d'action
<i>Streptomyces griseus</i> (Waksman <i>et al.</i> , 1946)	Streptomycine	Aminosides	Ils inhibent la synthèse protéique des bactéries en bloquant la sous-unité du ribosome 30S (de Lima Procópio <i>et al.</i> , 2012).
<i>Micromonospora purpurea</i> (Weinstein <i>et al.</i> , 1963)	Gentamicine	Aminosides	
<i>Streptomyces erythraeus</i> (McGuire <i>et al.</i> , 1952 ; Sanchez <i>et al.</i> , 1984)	L'érythromycine	Macrolide	Ciblant la sous-unité ribosomale 50S entraînant une inhibition de la synthèse protéique de bactéries (Jelić et Antolović, 2016).
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycine	Glycopeptidiques	Inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne en se liant à sa structure peptidoglycane (Zhang <i>et al.</i> , 2018 ; Nielsen <i>et al.</i> , 1982).
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocétine	Glycopeptidiques	

II.9.2.4. Classification des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être catégorisés en fonction de divers critères : source, composition chimique, mode d'action et spectre d'activité. Parmi les

nombreuses classifications envisageables, celle qui est la plus répandue est celle basée sur la famille (Yala et al., 2001).

➤ **Classification selon leur origine :**

Les antibiotiques peuvent être synthétisés (provenant du génie chimique), cependant la majorité sont naturellement produits par des microorganismes (notamment des champignons, des bacilles ou *Streptomyces*) (Opatowski, 2020).

➤ **Classification selon leurs compositions chimiques :**

Très variable, elle repose souvent sur une structure de base (ex : cycle β -lactame) (Yala et al., 2001).

➤ **Classification selon leur spectre d'action :**

Le spectre d'activité d'un antibiotique est la liste des espèces sur lesquelles il est actif (Guindo, 2007).

Tableau 7 : Classification d'après le spectre d'action des antibiotiques (Boudjelal, 2012)

spectre d'action	Les antibiotiques
Spectre très large	Céphalosporines Tétracyclines Chloramphénicol
Spectre large	rifampicine Streptomycine Fosfomycine
Spectre moyen	Pénicilline Erythromycine Lincomycine Novobiocine
Spectre étroit (sur les bactéries) spectre étroit (sur les champignons)	Vancomycine, polymyxines cycloheximide, amphotéricine B et nystatine

➤ **Classification selon leur mode d'action :**

Selon Sadikalay, (2018) les principales cibles des antibiotiques sont :

- L'inhibition de la production de la paroi bactérienne, tels que les β -lactamines, glycopeptides et fosfomycine.

- L'inhibition de la production de protéines chez les bactéries, par exemple : tétracyclines, macrolides, aminosides, phénicolés, acide fusidique, oxazolidinone.
- La synthèse des acides nucléiques est inhibée par certains médicaments, tels que : les quinolones, les fluoroquinolones et la rifampicine.
- L'inhibition de la production de la membrane cytoplasmique, tels que : colimycine, daptomycine.

➤ **Classification par familles :**

On distingue cinq classes principales d'antibiotiques pour certaines divisées en sous classes :

 β -lactamines :

Selon Livermore (1995), ils représentent le groupe d'antibiotiques le plus significatif, aussi bien en termes de variété et de quantité de molécules exploitables que d'applications thérapeutiques. On trouve des sous-familles au sein de cette famille. Cette famille, qui se divise elle-même en sous-groupes, est caractérisée par la présence d'un cycle de β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales qui peuvent varier (Gadou, 2019). On les segmente en trois catégories :

- Catégorie I : comprend le cycle β -lactame et un cycle thiazoline (par exemple : spectre étroit peni M et peni V),
- Catégorie II : contient un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine (par exemple : spectres larges peni A),
- Catégorie III : renferme un noyau restreint au cycle β -lactame (par exemple : céphalosporines, etc.).

Au-delà de ces trois catégories, on trouve des inhibiteurs de β -lactamases comme l'Augmentin, qui est une combinaison d'amoxicilline et d'acide clavulanique, et qui cible les bactéries productrices de pénicillinase (Yala et al., 2001).

Les aminosides :

Ce sont des petites molécules, polarisées, très hydrosolubles et peu lipophiles. Ils peuvent être divisés en deux groupes : naturels et semi-synthétiques.

Tableau 8: Classification des aminosides (Gallet, 2019).

Origine naturelle (bactéries)		Origine semi-synthétique
<i>Streptomyces</i> (mycine)	<i>Actinomyces</i> (micine)	
Streptomycine	Gentamicine	Amikacine
Tobramycine	(Sisomycine)	Netilmicine
Néomycine		Isepamicine
Kanamycine		

Les macrolides :

Les macrolides sont constitués d'un noyau lactone à 14, 15 ou 16 atomes de carbone.

Tableau 9 : Les principaux macrolides (Bégué et Astruc, 1999).

Les noyaux lactone	Les antibiotiques
C14	Erythromycine Oléandomycine Roxithromycine Clarithromycine
C15	Azithromycine
C16	Josamycine

Les quinolones et fluoroquinolones :

Les quinolones représentent une des familles d'antibiotiques les plus significatives découvertes récemment et sont largement employées en médecine, grâce à leur vaste spectre d'activité (Hooper et Rubinstein, 2003).

Les fluoroquinolones sont des variantes de la quinolone obtenues par modification chimique, plus spécifiquement En ajoutant un atome de fluor, on obtient une plus grande gamme que les quinolones (Sadikalay, 2018).

On les utilise pour combattre les infections causées par des bactéries. Les quinolones, étant entièrement synthétiques, se distinguent comme de véritables antimicrobiens artificiels, contrairement aux antibiotiques qui proviennent de produits naturels (Millanao et al., 2021). Essentiellement, les quinolones peuvent être classées selon la portée de leur spectre antibactérien et la présence ou l'absence de fluor dans leur structure (Ball, 2000) :

- Quinolones de première génération : l'acide nalidixique et l'acide oxolinique,
- Les fluoroquinolones de seconde génération, telles que la ciprofloxacine, la norfloxacine, l'ofloxacine et la fluméquine, sont des quinolones.
- Les fluoroquinolones de troisième génération incluent la gatifloxacine, la grepafloxacine, la levofloxacine, la moxifloxacine ainsi que la sparfloxacine, la danofloxacine, l'enrofloxacine, la difloxacine, l'orbifloxacine, l'ibafloxacine et la marbofloxacine.
- Les fluoroquinolones de quatrième génération : la gémifloxacine et la trovafloxacine.

Les tétracyclines :

Les molécules de tétracycline sont constituées d'un noyau tétra cyclique fusionné linéaire, auquel sont fixés divers groupes fonctionnels (Chopra et Roberts, 2001). Ils ont des propriétés bactériostatiques et s'introduisent efficacement dans les cellules. Ces molécules sont fortement homogènes. On fait la distinction entre les cyclines naturelles et les cyclines semi-synthétiques (tableau 10) (Yala et al., 2001) :

Tableau 10: Tétracycline naturelles et semi-synthétiques (Yala et al., 2001)

Cyclines naturelles	Cyclines semi-synthétiques
Chlortétracycline (auréomycine) Tétracycline base (tétracyne).	Oxytétracycline (Terramycine), Doxycycline (Vibramycine), Minocycline (Mynocine).

II.9.2.5. Mécanismes d'action des antibiotiques :

Accès à la cible bactérienne : avant que les antibiotiques puissent agir, il est essentiel qu'ils atteignent leur cible moléculaire. Les cibles se trouvent soit dans la paroi bactérienne, soit à l'intérieur de la cellule. Pour conquérir ces lieux, les antibiotiques utilisent des systèmes spécialisés dans le transport de substances nutritives (porines), ou ils se diffusent à travers les structures pariétales en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques (affinité pour l'eau ou les lipides) (Fauchère et al., 2002).

❖ Action sur la membrane plasmique

Les polyènes créent des complexes avec les stérols de la membrane plasmique des cellules eucaryotes, ce qui conduit à une réduction de la perméabilité membranaire. Ainsi, le métabolisme cellulaire est perturbé suite à la libération de certains composants intracellulaires essentiels (Michel et al., 1989).

❖ Action sur la paroi

Ex : Glycopeptides

Les glycopeptides, tels que la vancomycine et la téicoplanine, sont des molécules de grande taille qui ne peuvent pas franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les glycopeptides ciblent les bactéries Gram positif en se liant aux précurseurs du peptidoglycane qui contiennent le dipeptide D-alanyle-D-alanine. Les glycopeptides se lient à un complexe formé de dipeptides D-alanyl-D-alanine présents dans la paroi en construction. Les décarboxylases, les transglycosylases et les transpeptidases qui participent à la synthèse de la paroi

cellulaire sont inhibées par effet stérique. Selon Mammeri et Amiens (2013), les glycopeptides possèdent une action bactéricide.

❖ Inhibition de la synthèse des protéines

Plusieurs antibiotiques recommandés, comme l'érythromycine, le chloramphénicol et les tétracyclines, agissent sur les ribosomes afin d'entraver la synthèse des protéines. À cette étape, ils sont capables de bloquer la translocation et la transpeptidation, ainsi que l'attachement de l'ARN de transfert portant des acides aminés. Par ailleurs, la streptomycine induit des erreurs de lecture du code génétique. La kasugamycine se fixe sur la sous-unité 40S des ribosomes chez les eucaryotes, ce qui interrompt la synthèse des chaînes polypeptidiques. (Gale, 1981)

❖ Action sur l'ADN bactérienne

En freinant la production ou même les processus liés aux acides nucléiques de différentes manières, selon le type d'antibiotique utilisé, soit en inhibant la réplication de l'ADN, en entravant la transcription de l'ARN polymérase ou en diminuant la synthèse des précurseurs nucléotidiques (Gouari, 2021).

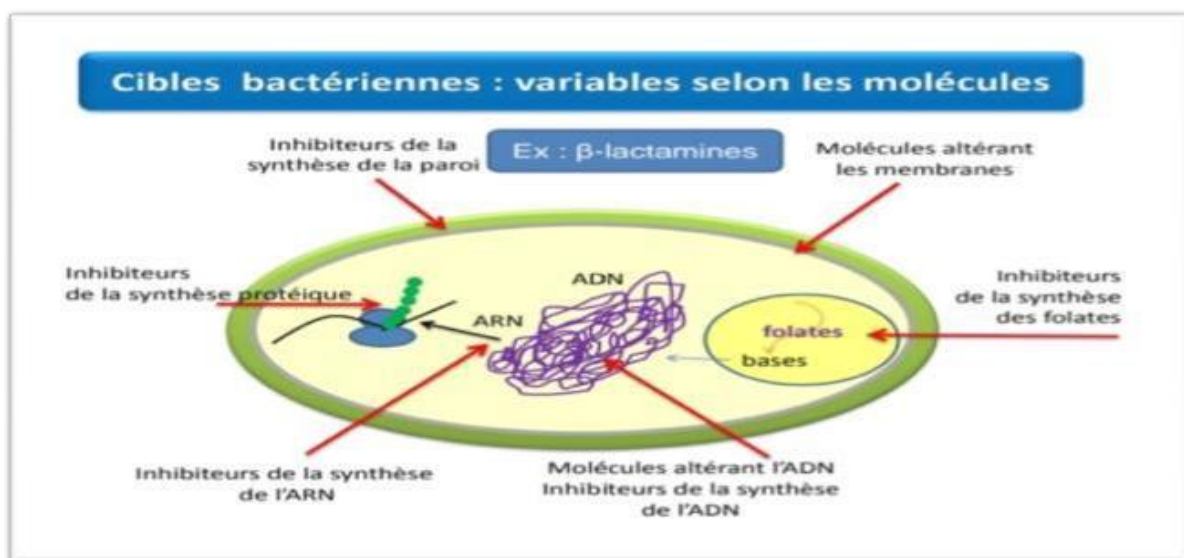


Figure 7 : Mode d'action des antibiotiques (beta-lactamines) (Lozniewski et Rabaud, 2010)

II.9.2.6. Résistance aux antibiotiques :

La résistance antimicrobienne désigne la faculté d'un microorganisme à se défendre contre l'effet d'une concentration habituellement efficace d'un agent antimicrobien. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques peut accroître le poids de la maladie en raison d'une morbidité et d'une mortalité accrues. La progression plus lente de la maladie peut également entraîner une augmentation des coûts de santé globaux liés au traitement de ces infections (Levy et Marshall, 2004). L'usage prolongé des antibiotiques peut entraîner une transformation radicale de l'écologie microbienne, alors que les populations initiales se voient remplacées par des populations résistantes. (Oberlin et White, 2006).

Les bactéries ont mis en place une multitude de stratégies de résistance pour éviter l'impact généralisé des antibiotiques, accompagnées d'un haut degré d'intelligence génétique pour assimiler et propager ces mécanismes (Yahia, 2001).

II.9.2.6.1. Types de résistance

II.9.2.6.1.1. Résistance naturelle

Toutes les souches d'une espèce bactérienne donnée possèdent une résistance naturelle par la production d'une protéine naturelle qui empêche l'antibiotique d'atteindre sa cible. À l'instar du cas d'E. coli face à la Vancomycine, (Madigan et al., 2012). Les antibiotiques hydrophobes rencontrent des difficultés à traverser la membrane externe de la paroi des bactéries Gram négatives, qui sont donc intrinsèquement résistantes à ces substances. Les mycoplasmes, qui sont des bactéries sans parois, démontrent une résistance innée aux lactames. Cela s'explique par le fait que l'action de cette classe d'antibiotiques se base sur l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. (Normak et Normak, 2002)

II.9.2.6.1.2. Résistance acquise

La résistance acquise est une caractéristique qui ne concerne généralement qu'une (ou parfois plusieurs) souches moins stables, cependant elle se dissémine souvent de façon importante dans l'univers bactérien. Elle résulte d'une altération du génome bactérien qui autorise une tolérance à un taux d'antibiotique plus élevé

que celui requis pour désactiver ses récepteurs sensibles, et on a observé cela dès l'amorce du traitement antibiotique (Lozniewski et Nancy, 2010).

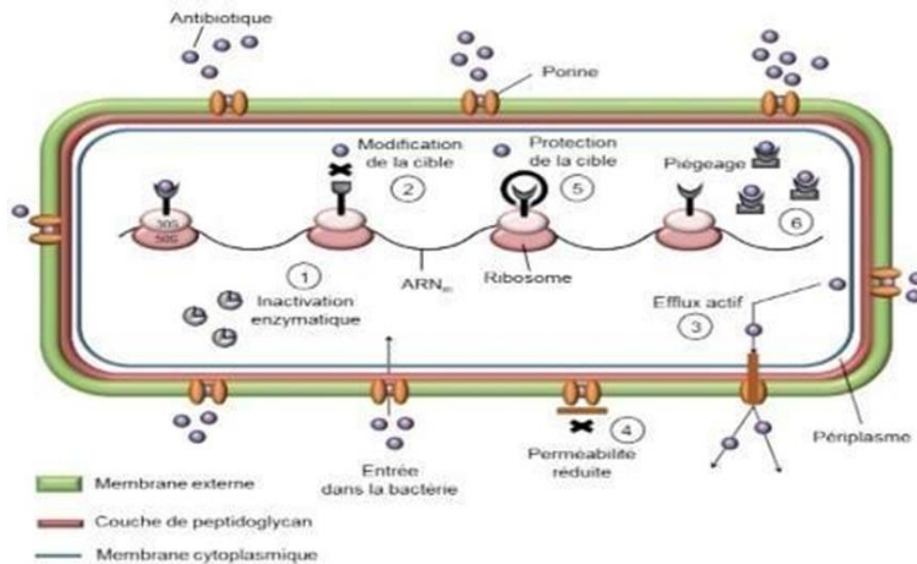


Figure 8 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative (Guardabassi -Courvalin, 2006).

II.9.3. Les Antifongiques :

II.9.3.1. Historique :

L'ère de l'antibiothérapie antifongique a été inaugurée par la découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, un polymère à activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*. Par la suite, plus de 200 molécules d'antibiotiques polyéniques ont été découvertes. Cependant, les défis liés à la solubilité, à l'absorption et à la toxicité ont limité l'utilisation de ces composés en thérapeutique (Tighidet, 2011). Le développement de molécules antifongiques pour la médecine humaine n'a réellement débuté que vers 1980 (Boubetra-Biskri, 2013).

On utilise actuellement les antifongiques dans trois secteurs majeurs : en médecine humaine et vétérinaire (antifongique systémique ou local), dans le secteur alimentaire (comme conservateur) et dans l'alimentation animale, pour prévenir et soigner les infections fongiques touchant plantes, bois de construction ou autres matériaux (Tighidet, 2011).

II.9.3.2. L'origine des substances antifongique

Ces substances antifongiques ont deux origines : ce sont soit produits du métabolisme secondaire de divers microorganisme, soit des produits chimiques de synthèse (Tighidet, 2011). Selon la nature des molécules antifongique, nous distinguons deux groupes :

Les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques des structures non polyénique pouvant être antifongique uniquement ou plus souvent antifongiques antibactériens à la fois. (Boubetra-Biskri,2011).

II.9.3.3. Classification des antifongiques

Bien que l'identification de nouvelles cibles cellulaires soit constamment poursuivie, le répertoire thérapeutique à notre disposition pour combattre les infections fongiques demeure assez restreint, car seules quatre catégories de composés, qui visent trois voies métaboliques différentes, sont actuellement employées en clinique : les fluoropyrimidines, les Polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008).

II.9.3.4. Mode d'action des antifongiques

Les différentes modes d'action résumée dans le tableau suivants :

Tableau 11 : Classification des antifongiques selon la cible (Geursen et al., 2008).

Structure	Mode d'action	Exemple
Azolés	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Imidazoles,ketonazole, Triazoles,fluconazoles, Itraconazole
Allylamines	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Terbinafine, butenafine
Pyradone	Rupture de la membrane et de la paroi	Ciclipiroxolamine

Morpholine	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Amorolfine
Pyrimidine fluorée	Inhibition de la synthèse de Thymidylate.	Flucytosine
Echinocandine	Inhibition de la synthèse du glucane.	Caspofungine, Anidulafungine
Autres	Anti-mitotique, rupture du fuseau cellulaire.	Griséofulvine

II.9.3.5. Mécanisme de résistance des substances antifongique

- **Les polyènes**

Les polyènes n'ont pas besoin d'intervenir à l'intérieur de la cellule pour exercer leur activité lytique, car ils se fixent à la membrane plasmique du côté externe. Ainsi, ils sont soustraits à une possible métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux, dont l'activité excessive est la cause principale de la plupart des résistances aux antifongiques azolés. Par conséquent, la seule façon pour la cellule fongique de résister à l'effet des polyènes est de changer sa cible, l'ergostérol. Étant indispensable à la préservation de l'intégrité de la membrane et, par conséquent, à la viabilité cellulaire, les options pour le remplacer sont restreintes (Vandeputte, 2008).

- **La résistance aux échinocandines**

C'est un événement assez inhabituel ; on évalue à plus de 99% la proportion d'isolats sensibles à ces antifongiques parmi les espèces du genre *Candida*. Toutefois, plusieurs recherches ont démontré une résistance aux échinocandines et ont identifié le mécanisme moléculaire responsable de cette résistance, particulièrement chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Dans tous les scénarios, on observe une mutation spécifique au niveau des gènes *FKS1* ou *FKS*. L'examen de toutes les mutations ponctuelles identifiées a conduit à l'identification de deux zones essentielles pour la fonction de l'enzyme, connues sous le nom de « hot spots ». Des mutations dans les « hotspots » ont aussi été identifiées chez d'autres espèces, y compris chez *C. glabrata*. *C. neoformans* ne montre pas de résistance

innée aux échinocandines en relation avec une mutation des gènes FKS1 et FKS2. Effectivement, la synthétase du β (1-3) -glucane de *C. neoformans* est inhibée par les échinocandines, bien que cet organisme puisse se développer en présence de concentrations élevées de l'antifongique (Vandeputte, 2008).

- **Les Azolés**

On a beaucoup étudié les processus moléculaires responsables de la résistance aux antifongiques azolés, principalement chez les levures du type *Candida* et *S. cerevisiae*. Ils se classent en quatre catégories :

La résistance peut être due à une réduction de l'affinité des azolés pour leur cible. Ainsi, une altération ponctuelle du gène *ERG11*, qui entraîne un changement dans la séquence d'acides aminés de la lanostérol 14 α -dé méthylase, est suffisante pour bloquer l'association entre le médicament antifongique et l'enzyme. Plusieurs mutations, dont l'impact sur la résistance a été prouvé expérimentalement, ont été repérées, en particulier chez *Cryptococcus neoformans*.

L'augmentation du nombre de copies de 14 α dé méthylase peut aussi causer une résistance aux antifongiques azolés. Dans ce contexte, les azolés ne sont pas présents en nombre suffisant pour bloquer complètement la transformation du lanostérol en stérol 14 α dé méthylé. Donc, une surexpression du gène *ERG11*, via une duplication chromosomique ou un changement de promoteur, comme l'allongement de la demi-vie des ARNm, peut conduire à la résistance.

Un phénomène moins courant chez les souches cliniques résistantes aux antifongiques azolés est l'inhibition de la voie de biosynthèse de l'ergostérol suite à l'action de l'enzyme codée par *ERG11*.

Finalement, la résistance peut résulter d'une réduction de la concentration intracellulaire en antifongique, due à l'expression excessive des protéines d'efflux. Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires largement répandus qui ont pour mission de chasser une multitude de substances hors des cellules (Vandeputte, 2008).

II.9.3.6. Les antifongiques produits par les actinomycètes

Quelques agents des antifongiques produits par les actinomycètes présentent dans le tableau suivant :

Tableau 12: Quelques agents antifongiques produits par les actinomycètes.

<i>Streptomycesgriseochromogenes</i>	Blasticidine
<i>Streptomyceshumidus</i>	Phenylacétate
<i>Nocardiatransvalensis</i>	Transvalencine
<i>Streptomycesnodosus</i>	Amphotéricine B

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

L'objectif expérimental de cette étude était d'isoler et de purifier des souches d'actinomycètes à partir d'échantillons de sol de la région semi-aride de Saida, puis de cribler les isolats obtenus pour leur activité antimicrobienne contre une collection de souches bactériennes et fongiques.

Toutes les manipulations ont été réalisées au sein du laboratoire de microbiologie de l'Université Dr. Moulay Tahar de Saida.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel biologique :

Les souches microbiennes cibles utilisées pour les tests d'antagonisme sont les suivantes :

- Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 25921.
- Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae*.
- Champignons filamenteux et levures : *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium* sp.

III.1.2. Appareillage et verrerie de laboratoire

La liste complète du matériel de laboratoire standard (autoclave, étuve, incubateur, hotte à flux laminaire, microscope optique, verrerie diverse, etc.) est détaillée en Annexe.

III.1.3. Milieux de culture et réactifs chimiques

Les principaux produits et milieux de culture utilisés au cours de cette étude sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. La composition détaillée de chaque milieu de culture est présentée en Annexe.

Tableau 13 : Principaux milieux de culture et réactifs utilisés

Type de produit	Produit	Utilisation principale
Milieux de culture	Gélose Mueller-Hinton (MHA)	Réalisation des antibiogrammes (tests de sensibilité)
	Gélose Amidon-Caséine (SCA)	Isolement sélectif des actinomycètes
	Milieu GYM solide (Glucose-Yeast-Malt)	Repiquage et purification des souches d'actinomycètes
	Milieu GYM liquide (Glucose-Yeast-Malt)	Culture liquide pour la production de métabolites (fermentation)
	Milieu de production 5294	Culture pour la production de métabolites
	Gélose Sabouraud Dextrose (SDA)	Culture et repiquage des souches fongiques
	Gélose Nutritive (GN)	Culture et repiquage des souches bactériennes cibles
Réactifs (Coloration)	Lugol, Fuch sine de Ziehl, Violet de Gentiane, Alcool à 90%, Huile à immersion	Réalisation de la coloration de Gram
Solvants	Eau distillée stérile	Préparation des milieux et des solutions
	Acétate d'éthyle	Extraction des métabolites secondaires du filtrat de culture
	Méthanol	Solubilisation des extraits secs
Solutions et Tampons	Eau physiologique (NaCl à 9 g/L)	Préparation des suspensions microbiennes
	Chlorure de sodium (NaCl)	Préparation de l'eau physiologique
	Acide sulfurique (H ₂ SO ₄) et Chlorure de baryum (BaCl ₂)	Préparation de l'étalon de turbidité de McFarland (0.5)

III.2. Méthodes :

III.2.1. Échantillonnage

Deux échantillons de sol rhizosphérique ont été prélevés sur des sites distincts de la localité de Sidi Marzouk (commune de Sidi Boubkeur, Wilaya de Saida, Algérie). Les prélèvements ont été réalisés comme suit :

- Le premier échantillon (codé S) a été prélevé au niveau de la rhizosphère de *Ziziphus spina-christi*.
- Le deuxième échantillon (codé D) a été prélevé au niveau de la rhizosphère de *Pistacia lentiscus*.

Pour chaque échantillon, la couche superficielle du sol (environ 2-3 cm) a d'abord été écartée. Ensuite, à l'aide d'une spatule stérile, environ 100 g de sol ont été prélevés à une profondeur comprise entre 10 et 20 cm. Chaque échantillon a

été déposé dans un sac en polyéthylène stérile, hermétiquement scellé, identifié et acheminé rapidement vers le laboratoire pour analyse (Alef & Nannipieri, 1995).

III.2.2. Prétraitement des échantillons de sol

Au laboratoire, les échantillons de sol ont d'abord été séchés à l'air libre pendant 48 heures, puis broyés délicatement à l'aide d'un mortier stérile et tamisés (maille de 2 mm) afin d'éliminer les débris végétaux et les pierres et d'obtenir une poudre fine et homogène. La poudre de sol a ensuite été soumise à un traitement thermique à sec dans une étuve (four Pasteur) à 110°C pendant 10 minutes. Ce choc thermique vise à éliminer la majorité des bactéries végétatives non sporulantes et à favoriser sélectivement la croissance des actinomycètes, qui sont plus résistants grâce à leurs spores (Hacène et al., 2004).

III.2.3. Isolement des actinomycètes par la méthode des dilutions en série

Pour chaque échantillon de sol traité, une suspension mère a été préparée en ajoutant 5 g de sol à 45 ml d'eau physiologique stérile (0,9 % de NaCl), ce qui correspond à la dilution 10^{-1} . Le mélange a été vigoureusement agité au Vortex pendant 2 minutes pour assurer la remise en suspension des microorganismes.

À partir de cette suspension mère, une série de dilutions décimales a été réalisée en transférant 1 ml de la suspension dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, et ce, de manière successive jusqu'à l'obtention des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} .

Un volume de 100 μ L de chaque dilution (10^{-3} à 10^{-5}) a été étalé à la surface de boîtes de Petri contenant le milieu d'isolement sélectif SCA (Starch Casein Agar). Le milieu SCA avait été préalablement stérilisé par autoclavage (121°C, 20 minutes) et supplémenté, après refroidissement à environ 50°C, avec un agent antifongique, le cycloheximide, à une concentration finale de 50 μ g/mL.

Les boîtes ensemencées ont été incubées à l'étuve à 28°C. Les colonies ont été observées et dénombrées régulièrement pendant deux semaines.



Figure 9: Endroits de prélèvement à Sidi Marzoug

III.2.4. Purification :

Les colonies présumées d'actinomycètes, sélectionnées sur la base de leur aspect caractéristique sur le milieu SCA, ont été purifiées afin d'obtenir des cultures axéniques. Chaque colonie sélectionnée a été repiquée par la technique de l'épuisement par stries sur une nouvelle boîte de Pétri contenant le milieu SCA. Après une première incubation, le processus a été répété au moins deux fois sur le milieu de culture GYM pour garantir la pureté de chaque isolat. La pureté de la culture finale et la morphologie de type actinomycète ont été systématiquement vérifiées par un examen microscopique après coloration de Gram.

III.2.5. Conservation des souches pures :

Les souches pures ont été conservées à court et moyen terme sur des tubes de gélose inclinée du milieu GYM. Les tubes ont été ensemencés par une strie centrale, incubés à 28°C pendant 7 à 10 jours pour permettre une croissance et une sporulation abondantes, puis conservés au réfrigérateur à 4°C.

III.2.6. Identification phénotypique des isolats

L'identification préliminaire des isolats a été réalisée sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques, en s'inspirant des critères décrits dans le cadre du Projet International sur les *Streptomyces* (ISP).

III.2.6.1. Caractères macroscopiques :

La caractérisation macroscopique a été effectuée par l'observation directe des colonies après 7 et 14 jours de croissance sur les milieux GYM et SCA. Les critères suivants ont été évalués (Shirling et Gottlieb, 1966) :

- La morphologie de la colonie : aspect général (crayeux, cotonneux, poudreux), forme (circulaire, irrégulière), élévation (plate, bombée, convexe) et contours (réguliers, filamenteux).
- La texture : description de la consistance de la colonie (ex: coriace, pâteuse).
- La pigmentation : la couleur du mycélium aérien (spores), la couleur du mycélium de substrat (le "revers" de la colonie), et la production de pigments diffusibles solubles dans le milieu de culture.
- La sporulation : évaluation de l'abondance de la production de spores (absente, faible, modérée, abondante).

III.2.6.2. Caractères microscopiques :

L'étude de la micromorphologie a été réalisée à partir de cultures jeunes (7 jours) sur milieu GYM.

- Examen à l'état frais : Une petite portion du mycélium aérien a été prélevée délicatement, montée entre lame et lamelle dans une goutte d'eau physiologique, puis observée au microscope optique (objectifs 40x et 100x à immersion) pour apprécier la structure des filaments et des chaînes de spores.
- Coloration de Gram : Réalisée pour confirmer la nature Gram positif des isolats.
- Morphologie des sporophores : Une attention particulière a été portée à la structure des hyphes portant les spores (sporophores), un critère taxonomique majeur. Les isolats ont été classés selon que leurs chaînes de spores étaient droites ou flexueuses (section *Rectiflexibiles*), ou bien spiralées (section *Spirales*).

III.2.7. Criblage de l'activité antimicrobienne des isolats

III.2.7.1. Préparation des inoculums des souches cibles

Pour chaque souche microbienne cible, un inoculum standardisé a été préparé comme suit :

- Pour les bactéries : À partir d'une culture pure de 18-24h sur gélose nutritive, quelques colonies ont été mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile (0,9 % de NaCl). La turbidité a été ajustée par comparaison avec un étalon de 0.5 McFarland (environ 1.5×10^8 UFC/mL).
- Pour les levures (*Candida albicans*) : Le protocole est identique à celui des bactéries, en utilisant une culture de 24-48h sur gélose Sabouraud.
- Pour les champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Penicillium*) : Les souches ont été cultivées sur gélose Sabouraud à 28°C pendant 14 jours. Une suspension de spores a été préparée en raclant la surface de la culture à l'aide d'un écouvillon stérile dans de l'eau physiologique. La turbidité de la suspension de spores a été ajustée à une valeur équivalente à l'étalon 0.5 McFarland (CLSI, 2017).

La suspension microbienne finale a été utilisée pour ensemercer la surface des milieux de test par écouvillonnage afin d'obtenir un tapis microbien uniforme.

III.2.7.2. Criblage primaire par la méthode des cylindres d'agar (Plug Test) :

Un premier criblage qualitatif a été réalisé pour détecter la production de métabolites diffusibles. Les souches d'actinomycètes ont été ensemençées en strie centrale sur milieu GYM et incubées à 28°C pendant 7 à 10 jours. Après incubation, des cylindres de gélose de 8 mm de diamètre ont été découpés aseptiquement et déposés sur les milieux de test (Mueller-Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour les champignons) préalablement ensemençés avec les souches cibles (Figure 9).

Après une prédiffusion à 4°C pendant 2 à 4 heures, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28°C pendant 48-72 heures pour les champignons. L'activité a été révélée par la présence d'une zone

claire d'inhibition de la croissance autour du cylindre, dont le diamètre a été mesuré en millimètres (mm).

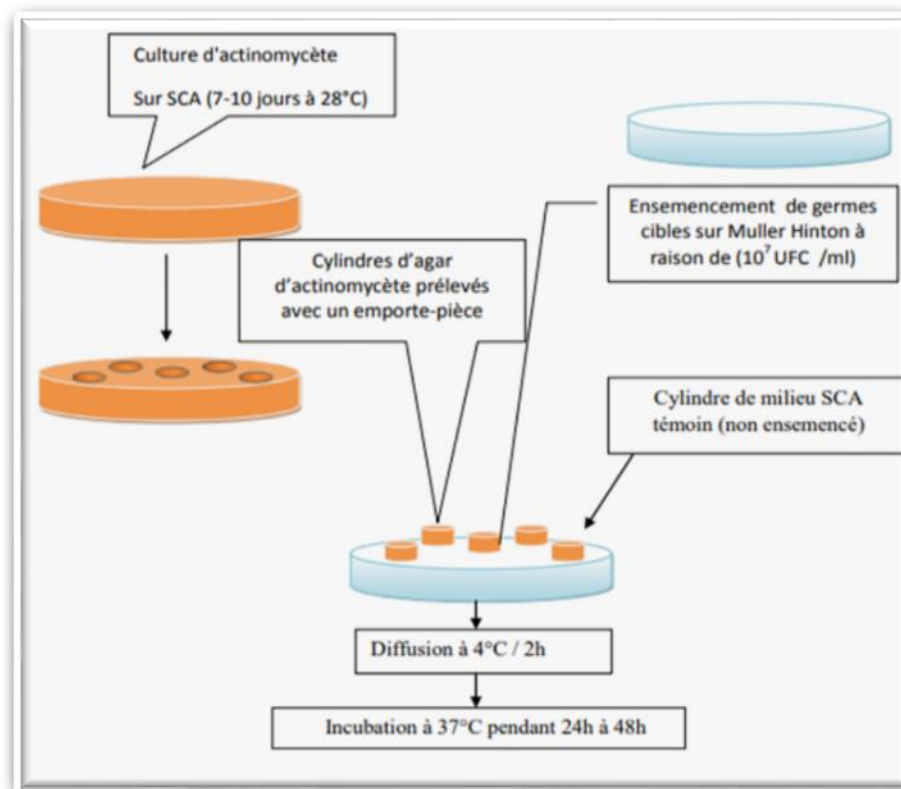


Figure 10: Test de mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar (Haia et Mechehat, 2022).

III.2.7.3. Criblage secondaire par la méthode de diffusion en puits

Les souches actives ont été sélectionnées pour une analyse plus approfondie de leurs métabolites extraits.

a) Production et extraction des métabolites : Une pré-culture a été réalisée en inoculant 100 ml de milieu GYM liquide avec trois disques de gélose (8 mm) d'une culture fraîche de l'actinomycète. Après 10 jours d'incubation à 28°C sous agitation, 10 ml de cette pré-culture ont été transférés dans 100 ml de milieu de production (Medium 5294) pour une seconde incubation de 10 jours dans les mêmes conditions. Le bouillon de culture a ensuite été centrifugé, et le surnageant a été extrait avec un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique a été évaporée à sec et le résidu a été redissous dans 1 ml de méthanol pour constituer l'extrait brut.

b) Test de diffusion en puits : Des puits de 8 mm ont été créés dans les milieux de test (MHA ou Sabouraud) préalablement ensemencés. Chaque puits a

été rempli avec 50 μ L de l'extrait brut méthanolique. Après incubation dans les conditions appropriées, l'activité a été quantifiée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Un diamètre supérieur à 8 mm a été considéré comme significatif (Balouiri et al., 2016).

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Isolement et purification des souches d'actinomycètes

À l'issue de l'ensemencement des échantillons de sol sur le milieu de culture sélectif SCA, un total de 96 colonies bactériennes a été dénombré. Parmi celles-ci, 20 colonies présentant une morphologie typique des actinomycètes (aspect poudreux, sec, croissance mycélienne et pigmentation variable) ont été sélectionnées pour une purification. Après plusieurs cycles de repiquages successifs, 10 isolats purs, présentant une croissance stable et homogène, ont été obtenus et conservés pour la suite de l'étude (Figure 11).

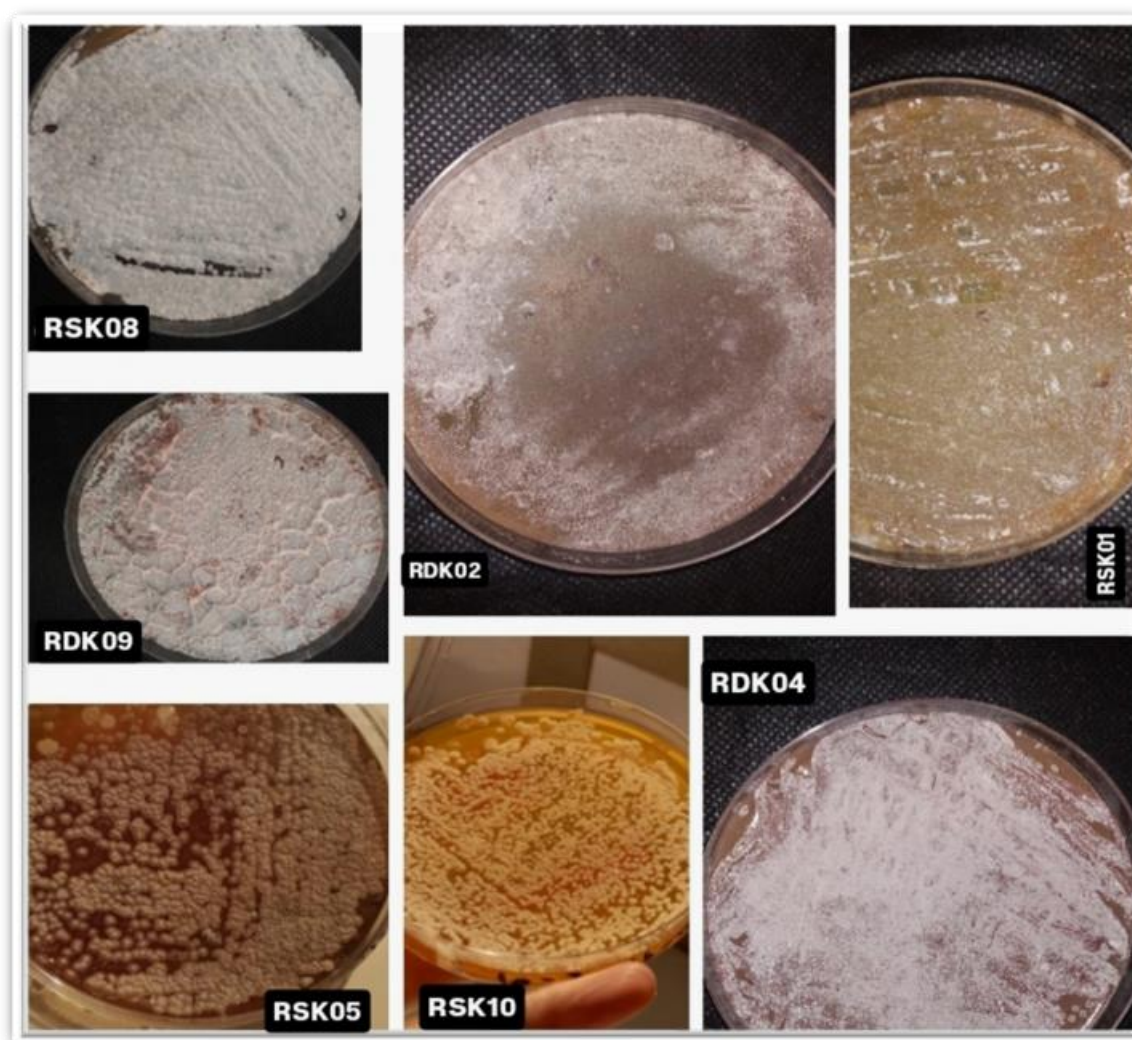


Figure 11: Morphologie de quelques colonies d'actinomycètes isolées sur milieu solide (SCA)

IV.2. Caractérisation phénotypique des isolats

Les 10 isolats purs ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique basée sur leurs caractères macroscopiques (sur milieu GYM) et microscopiques.

IV.2.1. Caractères macroscopiques

Tous les isolats ont développé des colonies à l'aspect caractéristique du genre *Streptomyces*, avec une texture coriace, une forte adhérence à la gélose et une surface sèche, poudreuse ou veloutée, témoignant d'une sporulation aérienne. Une hétérogénéité marquée a été notée concernant la pigmentation. Un groupe d'isolats (RSK01, RDK02, RSK03) présentait une morphologie classique, avec un mycélium aérien blanc à gris cendre et une absence de pigment diffusible. En revanche, 70 % des souches se sont distinguées par la production de pigments vifs et variés. L'isolat RSK08, par exemple, a produit un remarquable pigment bleu diffusant dans la gélose, tandis que RSK05 se caractérisait par un mycélium mauve et la production d'un pigment bordeaux. L'ensemble de ces observations est synthétisé dans le Tableau 16.

IV.2.2. Caractères microscopiques

L'examen microscopique a confirmé que tous les isolats étaient constitués de fins filaments ramifiés, caractéristiques d'un mycélium bactérien. La coloration de Gram a montré que tous les isolats étaient à Gram positif (Figure 13). L'observation à l'état frais n'a révélé aucune mobilité cellulaire (Figure 12). Les résultats de la caractérisation phénotypique complète sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 14 : Caractères phénotypiques des 10 souches d'actinomycètes isolées.

Code de souche	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat	Aspect de la surface	Mycélium aérien (abondance, structure)	Pigment diffusible
RSK01	Gris	Gris	Mate/Poudreuse	Abondant, filaments ramifiés	Non
RDK02	Gris	Gris	Mate/Poudreuse	Abondant, filaments fins	Non
RSK03	Blanc	Blanc	Mate/Poudreuse	Abondant	Non
RDK04	Gris	Gris	Mate/Poudreuse	Abondant, ramifié	Oui (Rouge)
RSK05	Mauve	Mauve claire	Poudreuse/sèche	Abondant, ramifié	Oui (Bordeau)
RDK06	Crème	Noire	Mate/Poudreuse	Abondant, ramifié	Oui (Noire)
RSK07	Jaune	Marron	Mate/Poudreuse	Abondant, ramifié	Oui (Jaune)
RSK08	Bleu	Bleu Pale	Poudreuse/compacte	Abondant, ramifié	Oui (Bleu foncé)
RDK09	Bleu/Blanc	Bleu/Blanc	Poudreuse/rugueuse	Abondant, ramifié	Oui (Marron)
RSK10	Crème	Crème	Mate	Abondant, ramifié	Oui (Miel)

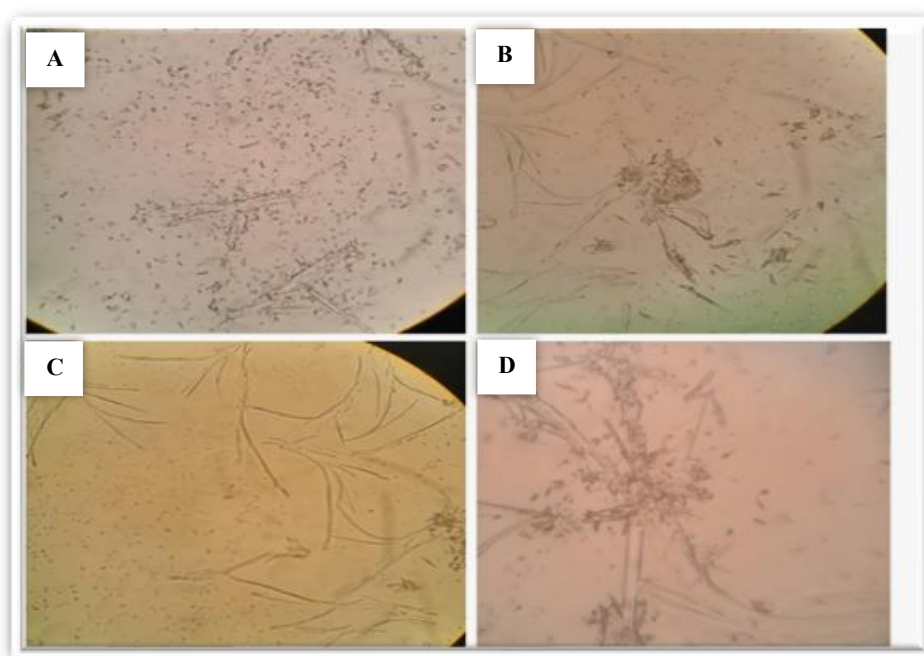


Figure 12: Observation microscopique à l'état frais des souches A : RSK10 B : RDK09, C : RDK04, D : RSK05.

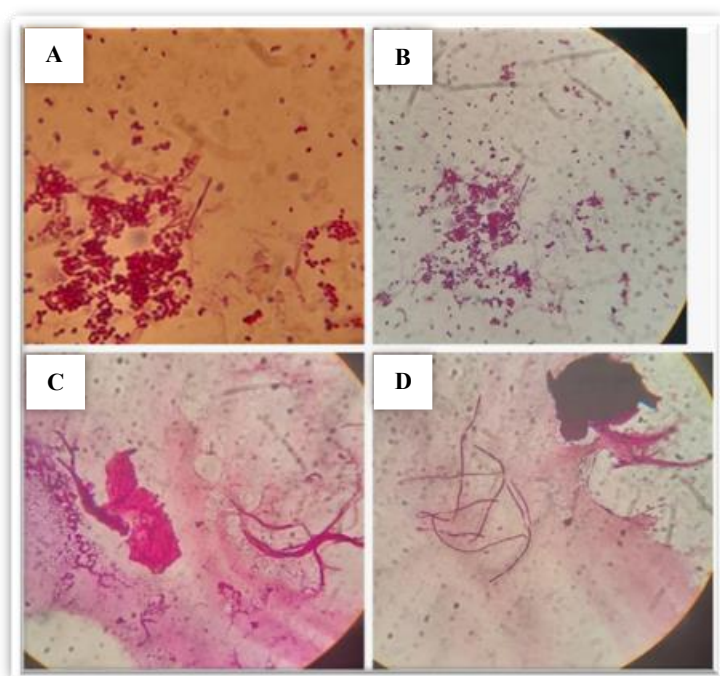


Figure 13: Observation microscopique après coloration de Gram des souches A : RSK10, B : RDK09, C : RDK04, D : RSK05

Le succès de l'isolement de 10 souches d'actinomycètes à partir de seulement deux échantillons de sol rhizosphérique de la région semi-aride de

Saida souligne la richesse de cet écosystème encore peu exploré. Le protocole de prétraitement par choc thermique (110°C) a probablement joué un rôle sélectif majeur, favorisant la germination des spores thermorésistantes, une caractéristique distinctive du genre *Streptomyces* et d'autres genres apparentés.

La diversité phénotypique observée est un indicateur très prometteur. La production de pigments est un trait particulièrement recherché, car elle est souvent corrélée à la production de métabolites secondaires bioactifs. Par exemple, le pigment bleu produit par l'isolat RSK08 est visuellement similaire à l'actinorhodine, un antibiotique bien connu produit par *Streptomyces coelicolor*, tandis que la pigmentation rouge-bordeaux des souches RSK04 et RSK05 pourrait être associée à des composés de la famille des prodiginines, également dotés d'activités antimicrobiennes et anticancéreuses (Wright & Tilley, 2016). La production d'un pigment noir par RSK06 suggère quant à elle la synthèse de mélanine, un polymère connu pour ses propriétés photoprotectrices et antioxydantes. Ces observations macroscopiques constituent donc une première étape d'orientation vers les souches les plus susceptibles de produire des molécules originales.

Sur le plan taxonomique, les caractères observés (Gram positif, aspect filamenteux, colonies sèches et crayeuses) convergent fortement vers le genre *Streptomyces*. Cependant, il est crucial de souligner une limitation de cette étude : l'absence de la caractérisation des chaînes de spores (sporophores). Ce critère microscopique, qui distingue les sections *Rectiflexibiles* (chaînes droites) et *Spirales* (chaînes en spirale), est fondamental pour une identification plus poussée au sein de ce genre (Shirling et Gottlieb, 1966). Par conséquent, l'identification de nos isolats au genre *Streptomyces* reste présomptive et nécessiterait d'être confirmée par une analyse microscopique plus détaillée ou, idéalement, par des méthodes moléculaires comme le séquençage de l'ARN ribosomique 16S.

Néanmoins, la diversité morphologique et pigmentaire de ces 10 isolats justifie pleinement l'étape suivante de l'étude : l'évaluation systématique de leur potentiel antimicrobien.

IV.3. Recherche de l'activité antimicrobienne des isolats :

IV.3.1. Criblage primaire de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar :

L'ensemble des 10 isolats d'actinomycètes purifiés a été testé pour leur capacité à produire des substances antibactériennes diffusibles. Les diamètres des zones d'inhibition observées contre les cinq bactéries cibles sont présentés dans le Tableau 15 et Figure 14.

Les résultats montrent que 7 des 10 isolats (70 %) possèdent une activité inhibitrice contre au moins une des souches bactériennes testées. L'activité est majoritairement dirigée contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*). Seul l'isolat RSK10 a montré une activité à large spectre, inhibant la croissance des cinq souches cibles, y compris les deux bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*). L'isolat RSK10 a également produit les plus grandes zones d'inhibition contre les bactéries à Gram positif, avec un diamètre atteignant 20 mm contre *S. aureus*.

Tableau 15 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

<i>Code de l'isolat</i>	<i>Staphylococcus aureus (SA)</i>	<i>Bacillus cereus (BC)</i>	<i>Bacillus subtilis (BS)</i>	<i>Escherichia coli (EC)</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (KP)</i>
RSK01	7	0	0	0	0
RDK02	10	7	10	0	0
RDK04	10	5	10	0	0
RSK05	0	8	11	0	0
RSK08	13	9	6	0	0
RDK09	0	9	11	0	0
RSK10	20	18	16	16	11

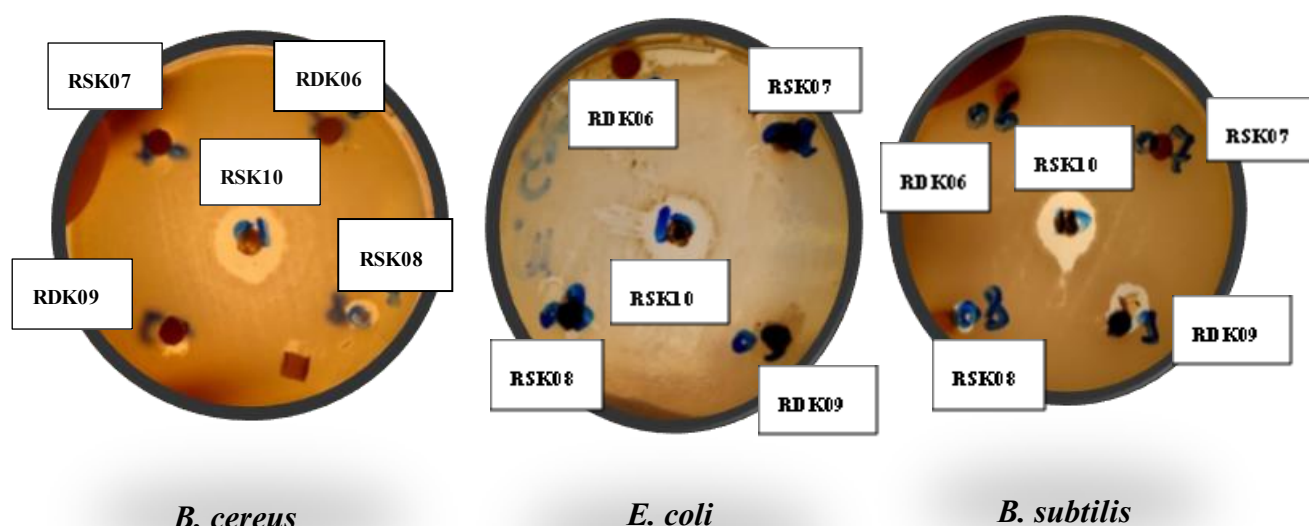


Figure 14: Exemples représentatifs des résultats du test d'activité antimicrobienne des isolats RSK07, RDK06, RSK10, RDK09 et RSK08, évalués par la méthode du cylindre sur gélose, contre les souches de référence *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

L'analyse préliminaire de l'activité antibactérienne a montré que la plupart des souches prélevées dans les sols de Saida présentent une activité biologique, attestant du potentiel de cet environnement comme réservoir de micro-organismes producteurs. L'activité prépondérante contre les bactéries à Gram positif, observée comme une tendance, est un résultat traditionnel et largement consigné pour les actinomycètes. Cette sélectivité est due à des différences structurelles essentielles entre les membranes des bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Pour de nombreux antibiotiques naturels, la paroi des bactéries Gram positif, qui est principalement composée d'une couche épaisse de peptidoglycane exposée, représente une cible plus accessible que la paroi complexe des bactéries Gram négatif, qui est protégée par une membrane externe lipopolysaccharidique agissant comme une barrière de perméabilité efficace (Silhavy et al., 2010). Ainsi, nos résultats coïncident parfaitement avec ceux d'autres recherches réalisées sur des actinomycètes provenant de sols arides (Benali et al., 2020).

L'isolat RSK10 se démarque clairement par son action à large spectre, entravant tant les bactéries Gram positif que Gram négatif. La faculté de générer

de tels composés est plutôt exceptionnelle et d'une importance thérapeutique considérable, compte tenu de l'augmentation de la complexité à combattre les infections provoquées par des agents pathogènes multirésistants à Gram négatif (Zhang et al., 2019). Cette souche RSK10, qui avait déjà attiré l'attention par sa pigmentation crème/miel, se présente donc comme le candidat le plus prometteur de cette étude en vue de la découverte de nouvelles molécules antibiotiques.

Finalement, le large éventail de profils d'activité (certaines variétés étant efficaces contre *S. aureus* mais pas *B. cereus* et vice versa) laisse supposer que les isolats distincts génèrent une panoplie de molécules diverses. Il est probable que cette diversité métabolique soit le résultat d'une vive concurrence microbienne dans l'environnement sec d'où elles sont originaires. Toutefois, l'étude comporte des limites, y compris le manque d'identification moléculaire précise des souches et la nature qualitative de cette première évaluation. Il est indispensable de procéder à des étapes supplémentaires pour quantifier l'activité (détermination des CMI) et identifier chimiquement les molécules actives produites par la souche RSK10 afin de valider son potentiel.

IV.3.2. Criblage secondaire de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits

On a cultivé des isolats d'actinomycètes dans un milieu liquide afin de mesurer la production de métabolites antibactériens stables et pouvant être extraits par solvant. La méthode de diffusion en puits a été utilisée pour tester les extraits bruts obtenus. Le Tableau 16 et la Figure 15 présentent les résultats de ce second criblage.

Sur les sept souches testées, six ont généré des extraits présentant une activité antibactérienne notable. Comme lors du premier criblage, l'activité est principalement ciblée sur les bactéries à Gram positif. Les souches RSK05 et RDK09 ont montré une activité remarquable contre *Bacillus cereus*, créant des zones d'inhibition de 65 mm et 60 mm respectivement. L'isolat RDK09 a également été reconnu pour avoir le spectre d'activité le plus vaste dans cette épreuve, en inhibant quatre des cinq souches ciblées, y compris *E. coli*. Tous les extraits testés ont été totalement résistants à la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau 16 : Activité antibactérienne des extraits bruts d'actinomycètes par la méthode de diffusion en puits (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Code de l'isolat	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	<i>Bacillus cereus</i> (BC)	<i>Bacillus subtilis</i> (BS)	<i>Escherichia coli</i> (EC)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)
RSK01	0	0	0	0	0
RDK02	26	30	23	0	0
RDK04	21	25	18	10	0
RSK05	20	65	20	0	0
RSK08	17	16	15	0	0
RDK09	45	60	35	15	0
RSK10	0	12	0	0	0

Le diamètre de la zone d'inhibition n'inclut pas le diamètre du puits (8 mm). Une valeur de 0 indique une absence d'inhibition

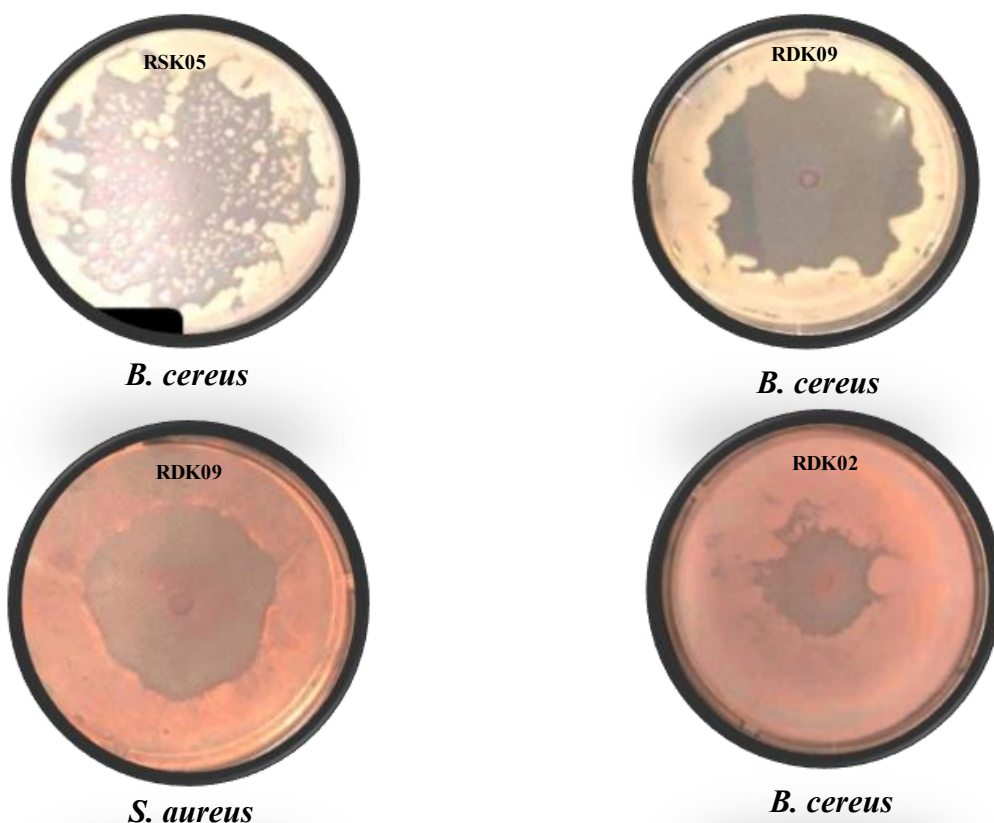


Figure 15 : Exemples représentatifs des résultats du test d'activité antimicrobienne des isolats RSK05, RDK09 et RDK02, obtenus par la méthode de diffusion sur gélose, contre les souches *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

Cette figure montre le résultat du test antimicrobien réalisé par la méthode de diffusion en gélose. Les souches d'actinomycètes RSK05, RDK09 et RDK02 ont été testées contre plusieurs bactéries pathogènes, à savoir *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. La présence de zones d'inhibition autour des points d'inoculation indique une activité antibactérienne potentielle de certaines souches.

Le test de diffusion en puits, en plus de confirmer l'activité antibactérienne des isolats de Saida, révèle aussi que cette activité résulte de métabolites secondaires stables qui peuvent être extraites à l'aide d'un solvant organique tel que l'acétate d'éthyle. Il est particulièrement notable d'obtenir des diamètres d'inhibition exceptionnellement grands pour les souches RSK05 (65 mm) et RDK09 (60 mm) face à *B. cereus*. Ces zones d'inhibition indiquent soit la production de composés d'une puissance exceptionnelle, soit une production à des concentrations extrêmement élevées dans les conditions de culture en milieu liquide employées. Ces valeurs, largement plus élevées que celles présentées dans plusieurs études de criblage, placent ces deux souches en tête de liste pour des recherches approfondies (Mann et al., 2021).

L'analyse comparative des deux techniques de criblage (cylindres d'agar contre puits) est très instructive. L'isolat RSK10, qui avait montré un grand potentiel lors du criblage initial grâce à son large spectre, a révélé une activité très faible après extraction. À l'inverse, les souches RDK09 et RSK05, montrant une activité moins intense lors du test direct, ont démontré un potentiel impressionnant en culture liquide. Cet écart est un phénomène habituel en biotechnologie et indique une régulation métabolique considérable qui dépend des conditions de culture. Pour RSK10, il est probable que les composés actifs soient majoritairement générés sur substrat solide plutôt qu'en culture immergée, ou qu'ils soient instables ou mal isolés par la méthode utilisée. Selon Bibb (2013), la culture en milieu liquide paraît être la méthode idéale pour la biosynthèse de leurs principaux composés antibactériens, RDK09 et RSK05.

Il n'est pas étonnant que *Klebsiella pneumoniae*, une entérobactérie reconnue pour sa virulence et ses mécanismes de multirésistance, présente une résistance globale. Grâce à sa membrane externe qui ne laisse pas passer l'eau et

possiblement à l'action de pompes à efflux actives, elle se défend redoutablement contre une multitude de produits naturels. Toutefois, l'action modeste mais significative des extraits de RDK04 et RDK09 contre *E. coli* prouve que la traversée de la barrière Gram-négatif n'est pas irréalisable et nécessite une étude ultérieure, par exemple, par le biais d'essais de synergie avec des agents de perméabilisation membranaire (Nikaido, 2003). Pour résumer, ce criblage secondaire a conduit à la classification des souches et à l'identification de RDK09 comme l'isolat le plus prometteur pour la fabrication de composés antibactériens extractibles à large spectre.

IV.3.3. Activité antifongique des extraits bruts

On a évalué l'activité antifongique des extraits bruts méthanoliques provenant des sept souches d'actinomycètes choisies, contre trois espèces de champignons d'importance médicale. Le Tableau 17 et la Figure 16 fournissent une description détaillée des résultats, indiqués en termes de diamètre de la zone d'inhibition.

Parmi les sept échantillons testés, cinq d'entre eux (71 %) ont démontré une activité d'inhibition contre au moins un des souches de champignons ciblées. On a constaté que l'activité la plus courante était dirigée contre *Penicillium sp.*, inhibée par quatre extraits distincts. La souche RSK10 a démontré être la plus puissante et celle ayant le plus vaste spectre d'activité, en entravant la croissance des trois champignons évalués avec des zones d'inhibition variant de 14 à 20 mm.

Tableau 17 : Activité antifongique des extraits bruts d'actinomycètes par la méthode de diffusion en puits (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

Code de l'isolat	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Candida albicans</i>
RSK01	0	0	0
RDK02	0	20	0
RDK04	15	0	0
RSK05	0	20	0
RSK08	0	0	0
RDK09	0	10	20
RSK10	14	20	18

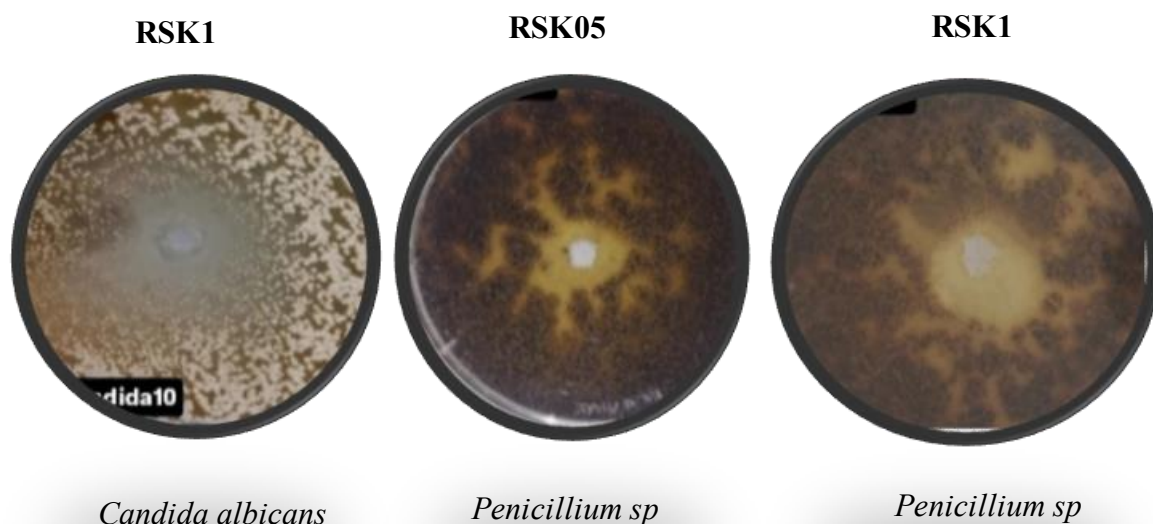


Figure 16 : Exemples représentatifs des résultats du test d'activité antifongique des isolats RSK10 et RSK05, obtenus par la méthode de diffusion sur gélose, contre *Candida albicans* et *Penicillium* sp. Les zones claires autour du point d'inoculation indiquent une inhibition de la croissance fongique, révélant une activité antifongique potentielle de certaines souches testées.

La mise en évidence d'une activité antifongique significative chez plusieurs de nos isolats est un résultat de grande valeur. La recherche de nouveaux agents antifongiques est un défi majeur en santé mondiale, souvent plus complexe que pour les antibiotiques, en raison de la nature eucaryote des cellules fongiques qui partagent de nombreuses similarités avec les cellules humaines, ce qui limite le nombre de cibles thérapeutiques spécifiques (Perfect, 2017). La capacité de nos souches, isolées d'un sol semi-aride, à produire de tels composés souligne une fois de plus le potentiel de ces niches écologiques extrêmes comme réservoir de molécules bioactives originales.

L'analyse de ces résultats révèle un profil d'activité particulièrement intéressant pour la souche RSK10. Alors que son extrait montrait une activité antibactérienne très faible, il se révèle ici être l'agent antifongique le plus puissant et à plus large spectre. Cette observation suggère fortement que la souche RSK10 produit un arsenal de métabolites secondaires diversifié, avec des molécules différentes dédiées à l'activité antibactérienne (probablement volatiles ou non-extractibles, comme suggéré par le test des cylindres) et à l'activité antifongique

(stables et extractibles par l'acétate d'éthyle). Une telle spécialisation métabolique est une stratégie de survie sophistiquée dans un environnement compétitif et fait de la souche RSK10 un candidat de choix pour des études de "bioprospecting" visant à isoler plusieurs types de molécules à partir d'une seule source microbienne (Genilloud, 2017).

La sensibilité variable des champignons cibles est également instructive. *Aspergillus niger* s'est montré le plus résistant, n'étant inhibé que par deux souches. Cette résistance est bien connue et peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment sa paroi cellulaire robuste et sa capacité à produire des pigments mélaniques qui le protègent contre les stress, y compris les agents chimiques (Jara et al., 2011). À l'inverse, l'activité prononcée contre *Candida albicans*, une levure pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales, et contre *Penicillium* sp., souligne le potentiel thérapeutique direct des composés produits par les souches RSK09 et RSK10.

IV.3.4. Analyse comparée et implications des profils d'activité des isolats RDK09 et RSK10

L'analyse comparée des profils d'activité des deux souches les plus prometteuses, RDK09 et RSK10, révèle des stratégies métaboliques distinctes et met en lumière le résultat le plus original de cette étude.

L'isolat RDK09 s'est imposé comme le meilleur producteur de composés antibactériens stables et extractibles. Son extrait brut a montré une activité puissante et un spectre relativement large, inhibant efficacement plusieurs bactéries à Gram positif ainsi qu'*E. coli*. Ces résultats corroborent ceux d'autres études menées sur des actinomycètes de sols arides, qui rapportent fréquemment l'isolement de souches productrices d'antibiotiques à forte activité contre les pathogènes à Gram positif (Elbendary et al., 2021 ; Zothanpuia et al., 2022). Cette souche représente donc un candidat classique mais très performant pour l'isolement d'antibiotiques conventionnels.

Le profil de l'isolat RSK10 est plus complexe et scientifiquement plus intrigant. Alors qu'il était le plus actif de tous dans le test de contact direct (cylindres d'agar), son activité antibactérienne a presque entièrement disparu après extraction par l'acétate d'éthyle. En revanche, son extrait a conservé une

excellente activité antifongique. Cette dissociation des activités suggère que RSK10 produit au moins deux types de composés : 1) des métabolites antifongiques stables et extractibles, et 2) des métabolites antibactériens qui sont soit instables, soit non extractibles par le solvant utilisé, soit, hypothèse la plus probable, des Composés Organiques Volatils (COVs).

La Figure 15 illustre clairement les profils d'activité distincts de ces deux souches, comparés à ceux des autres isolats étudiés. Le fort potentiel antibactérien de l'extrait de RDK09, en particulier contre *Bacillus cereus*, est bien visible. De même, l'activité antifongique notable de l'extrait de RSK10 ressort distinctement, contrastant avec sa faible activité antibactérienne après extraction.

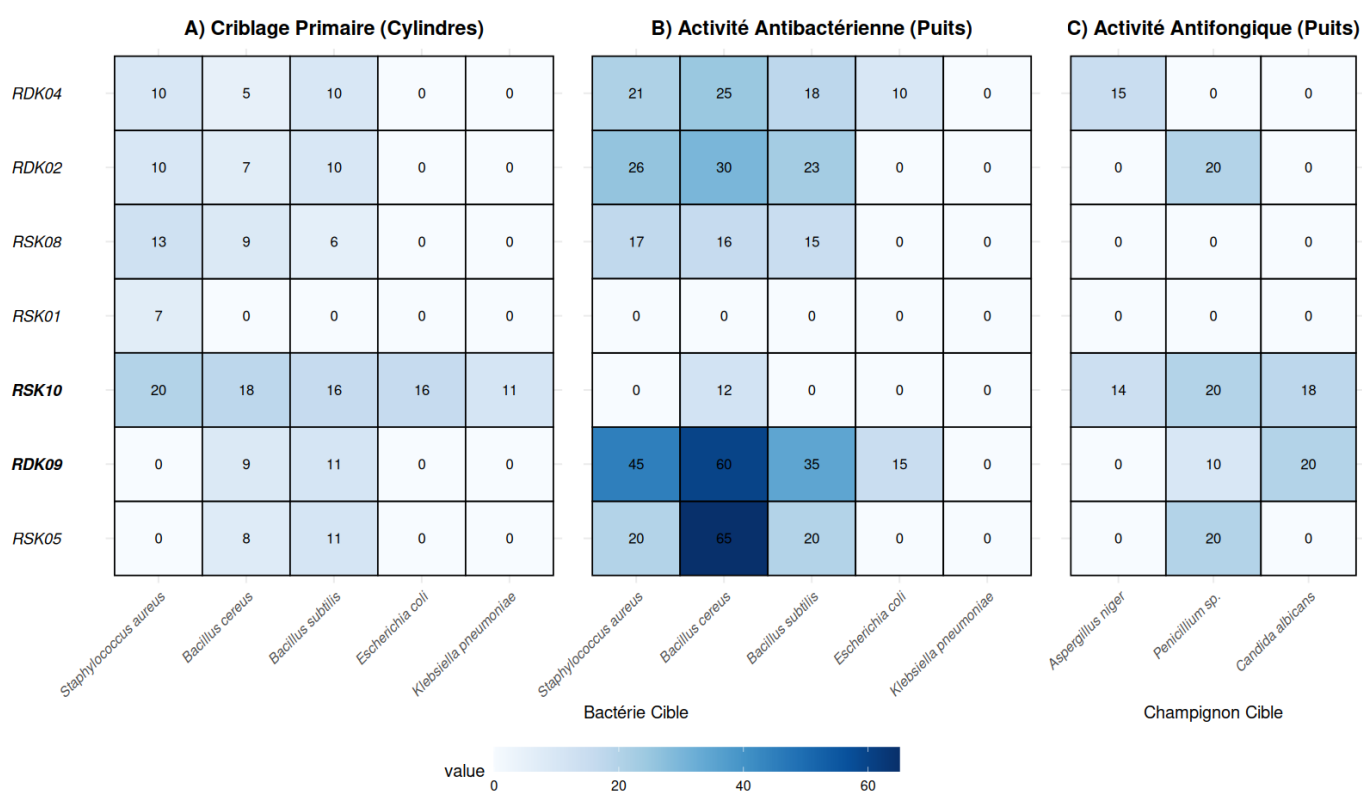


Figure 15: Cartographie de l'activité antimicrobienne des sept isolats d'actinomycètes les plus actifs

Cette figure présente une vue d'ensemble de l'activité antimicrobienne des sept isolats d'actinomycètes les plus performants, regroupés par similarité de profil.

Dans chaque panneau, la couleur et le chiffre indiquent le diamètre de la zone d'inhibition en millimètres. **Panneau (A)** montre l'activité en test direct (cylindres d'agar). **Panneau (B)** montre l'activité antibactérienne des extraits. **Panneau (C)** montre l'activité antifongique des extraits.

Cette dernière hypothèse [des COVs pour RSK10] est fortement soutenue par l'observation d'une "forte odeur nauséabonde" durant la culture de RSK10, un indice souvent associé à la production de COVs. Ces molécules, en raison de leur petite taille et de leur volatilité, agissent à distance par diffusion dans la phase

gazeuse et sont capables d'inhiber la croissance microbienne, mais elles sont perdues lors des étapes d'évaporation du solvant pendant l'extraction. La recherche sur les COVs produits par les actinomycètes est un domaine en pleine expansion, car ils représentent un arsenal chimique largement sous-exploré pour de nouvelles applications antimicrobiennes (Gond et al., 2020 ; Kumar et al., 2023).

Ainsi, le résultat le plus distinctif de ce travail réside dans la mise en évidence de ces deux profils complémentaires. Il souligne que le choix de la méthode de criblage est déterminant pour révéler le plein potentiel d'un isolat. Le test direct a permis de déceler l'activité globale de RSK10, tandis que le test sur extrait a révélé la nature spécialisée de ses métabolites. La souche RSK10 se présente donc comme une "usine cellulaire" à double compétence, capable de produire à la fois des antifongiques extractibles et de potentiels antibactériens volatils, ce qui en fait la découverte la plus originale de cette étude et une piste de recherche particulièrement stimulante.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Face à l'urgence de la crise mondiale de l'antibiorésistance, l'exploration d'écosystèmes peu étudiés, tels que les sols semi-arides, représente une stratégie primordiale pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens. L'objectif de ce travail était d'isoler des souches d'actinomycètes des sols de la région de Saida (Algérie) et d'évaluer leur potentiel à produire des molécules bioactives.

Cette étude a permis d'isoler et de caractériser dix souches d'actinomycètes phénotypiquement diverses, confirmant que cet environnement constitue un réservoir riche en biodiversité microbienne. Le criblage de l'activité antimicrobienne a révélé qu'une proportion élevée des isolats (70 %) était capable d'inhiber la croissance d'au moins un pathogène de référence. L'analyse approfondie des profils d'activité a surtout conduit à la mise en évidence de deux isolats aux profils exceptionnels et complémentaires :

- La souche RDK09, qui s'est révélée être une productrice robuste de métabolites antibactériens stables, extractibles et à large spectre, particulièrement active contre des pathogènes à Gram positif d'importance clinique.
- La souche RSK10, qui représente la découverte la plus originale de cette étude, possédant une double spécialisation : une forte activité antifongique due à des composés extractibles, et une activité antibactérienne à large spectre probablement médiée par des Composés Organiques Volatils (COVs), une classe de métabolites encore sous-explorée.

Ce travail a non seulement atteint son objectif initial, mais il a également permis d'identifier deux souches, RDK09 et RSK10, comme étant des candidats de premier ordre pour des investigations futures. Il souligne également l'importance capitale d'utiliser des méthodes de criblage variées pour révéler l'ensemble du potentiel métabolique d'un isolat.

Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à des perspectives de recherche claires et définies.

Les étapes futures devront logiquement inclure :

1. L'identification moléculaire formelle des souches RDK09 et RSK10 par séquençage du gène de l'ARNr 16S pour confirmer leur taxonomie.
2. L'optimisation des conditions de culture et la purification des composés actifs à partir des extraits de ces deux souches par des approches chromatographiques (HPLC).
3. L'élucidation de la structure chimique des molécules purifiées par des méthodes spectroscopiques (spectrométrie de masse, RMN).
4. L'investigation spécifique des COVs produits par RSK10 par des techniques de piégeage et d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Ce projet a ainsi posé les bases solides pour le développement potentiel de nouveaux agents antimicrobiens issus de la riche biodiversité algérienne.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abbas, S. Z. (2022). An overview of microbial biotechnology: A key to a sustainable future. In *Microbial Biotechnology: A Gateway to Sustainable Development* (pp. 1-17). Elsevier.
2. Alef, K., & Nannipieri, P. (Eds.). (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
3. Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A., & Beaulieu, C. (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(2), 165-176.
4. Avril, J. L., et al. (1992). *Bactériologie clinique* (2e éd.). Ellipses.
5. Badis, A., Sabaou, N., & Djibaoui, R. (2006). La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques. *Actes du séminaire international sur l'agriculture biologique et la protection des cultures*, 1167-1676.
6. Badji, B. (2006). *Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres Actinomadura et Nonomurea* [Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou].
7. Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(suppl_1), 17-24.
8. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluation of antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
9. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
10. Bastide, A., de Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M., & Duménial, G. (1986). Isolement et sélection de souche d'actinomycètes productrice de substance antifongiques de structure non-polyénique. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 453-466.
11. Bégué, P., & Astruc, J. (1999). *Pathologie infectieuse de l'enfant*. Masson.

12. Benali, M., Amrane, A., & Ouhdouch, Y. (2020). Diversity and antimicrobial activity of actinomycetes isolated from arid soils in North Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 789–802.
13. Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26.
14. Bibb, M. J. (2013). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 159(Pt_9), 1763–1775.
15. Boubetra-Biskeri, A. (2013). *Nouvelles espèces de Saccharothrix isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par Saccharothrix sp. SA 198* [Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique].
16. Boudjelal, F. (2012). *Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par Actinoalloteichus sp. AH97* [Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach].
17. Boukhalfa, H., & Benmoussa, A. (2017). Diversity and antimicrobial potential of *Streptomyces* from El Bayadh arid soils. *North African Journal of Food and Nutrition Research*, 1(1), 1-7.
18. Breton, A., Theilleux, J., Sanglier, J. J., & Vobis, G. (1989). Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In J.P. Larpent & J.J. Sanglier (Eds.), *Biotechnologie des Antibiotiques* (pp. 33-70). Masson.
19. Cavala, M., & Eberlin, T. (1994). Isolement des *Streptomyces* du sol. *L'operon*, XIX(4), 13-17.
20. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
21. Choulet, F. (2006). *Evolution du génome des Streptomyces : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques* [Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy 1].
22. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2017). *M38: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi* (3rd ed.). CLSI standard.
23. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2018). *M07: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (11th ed.). CLSI standard.

24. Colombié, V. (2005). *Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel* [Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse].
25. Dastager, S. G., & Damare, S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphate solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Current Microbiology*, 66(5), 421-427.
26. Demain, A. L. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Medicinal Research Reviews*, 29(6), 821-842.
27. Devanshi, S., Sutaria, S., Shah, K., Arora, S., & Saxena, S. (2021). Actinomycetes as an Environmental Scrubber. IntechOpen.
28. Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M., & Jabes, D. (2010). Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of Antibiotics*, 63(8), 423-430.
29. Dunachie, S. J., Day, N. P., & Dolecek, C. (2020). The challenges of estimating the human global burden of disease of antimicrobial resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 57, 95-101.
30. Ela, M. A., El-Shaer, N. S., & Ghanem, N. B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51(12), 993-995.
31. Elbendary, A., El-Hennawy, S., & El-Kewely, R. (2021). Bioactive potential of endophytic actinomycetes isolated from arid plants. *Letters in Applied Microbiology*, 72(4), 379-390.
32. Ensign, J. C., Normand, P., Burden, J. P., & Yallop, C. A. (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Research in Microbiology*, 144(8), 657-660.
33. Erikson, D. (1949). The morphology, cytology and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 3, 23-54.
34. Fauchere, J. L., et al. (2002). Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microbial Drug Resistance*, 8(1), 61-66.
35. Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.

-
36. Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10), 1203-1232.
37. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.). (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
38. Gond, S. K., Mishra, A., Sharma, V. K., & Kumar, A. (2020). Volatile organic compounds from endophytic actinomycetes and their biological activities. In *Actinobacteria* (pp. 1-20). IntechOpen.
39. Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2016). Actinomycetes from Moroccan arid soils: Taxonomy and bioactive potential. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 657–669.
40. Hazarika, S. N., & Thakur, D. (2020). Chapter 21 – Actinobacteria. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 443-476). Academic Press.
41. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Williams & Wilkins.
42. Ilić, S. B., Konstantinović, S. S., & Todorović, Z. B. (2005). UV/VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology*, 12(1), 44-46.
43. Jara, S., Vaca, I., & Cotoras, M. (2011). The role of melanin in the antifungal resistance of *Aspergillus niger* against the polyene antibiotic amphotericin B. *Mycoses*, 54(5), e529-e536.
44. Kumar, A., Singh, R., Yadav, A., & Singh, S. P. (2023). Volatile organic compounds (VOCs) from actinobacteria and their potential applications. In *Actinomycetes: Ecology, Diversity and Applications* (pp. 451-469). Springer, Singapore.
45. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(3-4), 399-405.
46. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. In *Actinobacteria-basics and biotechnological applications* (pp. 59-86). IntechOpen.
-

47. Livermore, D. M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557-584.
48. Lykov, I. N., Galemina, I. E., Zaitseva, N. S., & Kapinus, Y. A. (2021). Medical and environmental aspects of drug resistance of bacteria isolated from pets and their owners. *Problemy regional'noj ekologii*, (5), 37-41.
49. Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). Pearson Education.
50. Mann, S., Saini, R., & Gupta, D. (2021). Unravelling the potential of actinomycetes from extreme environments for novel drug discovery. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1083-1105.
51. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.
52. Omura, S. (Ed.). (1992). *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*. Springer-Verlag.
53. Patel, J. J., & Brown, M. E. (1969). Interactions of *Azotobacter* with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and Soil*, 31(2), 273-281.
54. Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(9), 603-616.
55. Procopio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471.
56. Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
57. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414.
58. Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Antagonistic activity of marine-derived *Streptomyces* sp. against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and its biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1930.
59. Smaoui, S. (2010). *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés* [Thèse de Doctorat, Université de Toulouse].

60. Sullivan, D. C., & Chapman, S. W. (2010). Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis and nocardiosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3), 216-221.
61. van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392-416.
62. Williams, S. T., Lanning, S., & Wellington, E. M. H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In M. Goodfellow, M. Mordarski, & S. T. Williams (Eds.), *The Biology of the Actinomycetes* (pp. 481-528). Academic Press.
63. Wright, G. D., & Tilley, E. (2016). The prodiginines, pro-apoptotic drugs with anticancer activity. In *Apoptosis and Cancer* (pp. 165-177). Springer, Cham.
64. Zothanpuia, Hmingthantluanga, & Passari, A. K. (2022). Assessment of antimicrobial and enzymatic activities of actinomycetes isolated from a semi-arid region of India. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10(1), 118-126.

PARTIE VII. ANNEXE

❖ **Matériels utilisés :**

Appareillage	Verreries	Autres
- Autoclave - Agitateur magnétique - PH mètre - Vortex - centrifuges - Bain marie - Balance de précision - Etuve (28°C) - Bec bunsen - Réfrigérateur - Microscope optique - Shaker	- Tubes à vis - Boîtes pétries - Epprouvettes - Erlenmeyer - Becher - Entonnoir - Flacons en verre de 200ml	- Pipette pasteur - Ecouvillons - Anse à boucle - Barreaux magnétique - Tige magnétique - Papier whatman - Micropipette 1000µl - Spatule, pissette, pourtoirs - Eppendorf - Pince métallique et pince en bois - Lames et lamelles - Règle - Papier aluminium, suitou. - cryotubes - Embout bleus et jaunes - Cuves de spectrophotométrie - Mortier - Tamis

❖ **Milieu SCA (Starch Casein Agar)****Composition typique (pour 1 L) :**

- Amidon soluble (starch) : 10 g
- Caséine (casein) : 0,3 g
- NaCl : 2 g
- KNO₃ : 2 g
- KH₂PO₄ : 2 g
- MgSO₄·7H₂O : 0,05 g
- CaCO₃ : 0,02 g
- Ferrous sulfate (FeSO₄) : traces
- Agar : 15-20 g
- pH : ~7,2

❖ **Milieu GYM (Glucose Yeast Malt Extract Agar)**

Composition (pour 1 L) :

- Glucose : 4 g
- Extrait de levure (Yeast extract) : 4 g
- Extrait de malt (Malt extract) : 10 g
- Agar : 15-20 g
- pH : ~7,2

❖ **Milieu Sabouraud (SDA : Sabouraud Dextrose Agar)**

Composition classique (pour 1 L) :

- Dextrose (glucose) : 40 g
- Peptones : 10 g
- Agar : 15-20 g
- pH : 5,6 (acide pour inhiber les bactéries)

❖ **Milieu Mueller-Hinton (MH)**

Composition (pour 1 L) :

- Infusion de viande (beef infusion) : 300 mL
- Caséine hydrolysée à l'acide : 17,5 g
- Amidon soluble : 1,5 g
- Agar : 17 g
- pH : $7,3 \pm 0,1$

❖ **Gélose nutritive (Nutrient Agar)**

Composition (pour 1 L) :

- Extrait de viande (meat extract) : 1 g
- Peptone : 5 g
- NaCl : 5 g
- Agar : 15-20 g
- pH : ~7,0

❖ **Coloration de Gram**

Préparation des frottis :

- On place une goutte d'eau physiologique stérile sur une lamelle en verre, puis, en utilisant une boucle bien stérilisée, on récupère une colonie de la souche à analyser et on l'étale sur la surface de la lamelle.
- Asséchez la lame en l'exposant à la chaleur de la flamme du bec Bunsen.

- Fixez le frottis en exposant la lame trois fois à la flamme du bec Bunsen, puis laissez refroidir.

Coloration

La méthode de Gram a été effectuée en respectant la procédure classique décrite par le bactériologiste danois Hans Christian Gram en 1884 (Lachal et Bouchkima, 2020).

- Mettez une couche sur la lame de violet de gentiane et patientez une minute.
- Administrez le Lugol (deux fois pendant 45 secondes), puis rincez à l'eau.
- Effectuez une décoloration avec de l'alcool à 90% pendant une durée de 10 secondes, puis procédez à un rinçage à l'eau.
- Application d'une fuschine pour une minute de recoloration.
- Lavez à l'eau.
- Utilisez du papier absorbant pour sécher la lame.
- Analysez en profondeur avec un grossissement de 1000 fois en pleine clarté, en appliquant une goutte d'huile d'immersion sur la lame.

❖ Préparation de la solution McFarland 0,5 :

- Matériel nécessaire :

- Solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 %
- Solution de sulfate de baryum ($BaCl_2$) à 1 %
- Eau distillée stérile
- Tube à essai propre

- Préparation :

- H_2SO_4 à 1 % : Diluer 100uL d'acide sulfurique concentré dans 10mL d'eau distillée.
- $BaCl_2$ à 1% : Dissoudre 1 g de chlorure de baryum ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) dans 100 mL d'eau distillée.
- Éliminé 50 μ L de solution H_2SO_4
- Ajouter 0,05 mL (50 μ L) de la solution de $BaCl_2$ à 9,95 mL de solution de H_2SO_4 à 1 %. Bien homogénéiser.