

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre
Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ecosystèmes Arides-LVCEA

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par : - ZAGUI Houda

- BEN REMILI Fattoum safa

Thème

**Recherche dans des sols sahariens d'actinobactéries à
activité contre *Escherichia coli***

Soutenu publiquement, le 11 / 06/ 2024, devant le jury composé de :

M. BOURAS Nouredine	Professeur	Univ. Ghardaïa	Président
M. BELGHIT Said	Maitre de conférences A	Univ. Ghardaïa	Directeur de mémoire
M. IDER Soufian	Maitre de conférences B	Univ. Ghardaïa	Examineur 1

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements

Avant tous nous remercions **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et sur lequel nous nous appuyons avant toute chose.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Microbiologie
Université de Ghardaïa

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadrant **Dr. BELGHIT Saïd** Maitre de Conférences A à l'Université de Ghardaïa d'avoir accepté de diriger ce travail, et pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit ainsi que son aide, ses précieux conseils, sa disponibilité.

Nous tenons à remercier **Dr. IDER Sofian**, Maitre de conférences B à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté d'examiner et l'évaluation de ce mémoire et d'apporter ses remarques pour améliorer notre manuscrit.

Nous tenons à remercier **Pr. BOURAS Noureddine**, professeur à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté de présider ce jury.

Nous tenons également à remercier le responsable du laboratoire **MOULAY OMAR Ali** et l'ingénieur de laboratoire **BEN SALH Bachir** pour ses conseils et ses aides.

Dédicace

Avant tout, je remercie dieu le tout puissant

Je dédie ce mémoire à :

À mon cher père Abdelkader zagui pour ses efforts, ses sacrifices, ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours.

Ma chère Maman yamina Haj kouider

Quoi que je fasse ou que je dis, je ne pourrai pas t'exprimer ma gratitude à la manière qui s'impose Ta bienveillance m'accompagne et ta présence à mes côtés a toujours été ma force pour surmonter les divers défis.

À Mon frère Abdelhake et mes sœurs lina et ferial et safa aicha
pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse et de m'avoir encouragé

À toutes mes familles et mes amies.

Houda

Dédicace

La locomotive de recherche a rencontré de nombreux obstacles, mais j'ai essayé de les surmonter régulièrement avec la grâce et la faveur de Dieu.

J'offre mon dévouement à ma personne préférée, et pourquoi pas, elle s'est sacrifiée pour moi

Elle n'a ménagé aucun effort pour me rendre heureux tout le temps (Ma mère bien-aimée).

Nous marchons sur les chemins de la vie, et celle qui domine nos esprits dans chaque chemin que nous empruntons reste Le propriétaire d'un visage aimable et de bonnes actions.

Il n'a pas lésiné sur moi tout au long de sa vie (Mon cher père).

A ma sœur unique, mon amour

A mes frères bien-aimés, mon soutien et ma protection

A tous mes oncles et tantes

À la sœur unique de ma mère et à ma deuxième mère

A toute la famille Ben Remili

Aux honorables professeurs

A tous mes camarades de classe

Je vous dédie mon mémoire de fin d'études

Fattoum safa

بجث في أترية صحراوية عن بكتيريا هيفية نشطة ضد *Escherichia coli*

ملخص

يهدف العمل المنجز إلى عزل بكتيريا هيفية منتجة لمضادات حيوية ضد *Escherichia coli* من أترية صحراوية. ولهذا إخترا عينتين من التربة مأخوذتين من واحة نخيل وإقليم "رق" بولاية تيمون. باستخدام وسط الكيتين مع أو بدون إضافة مضادات حيوية إنتقائية، تمكنا من عزل عدد كبير من البكتيريا الهيفية. تم اختيار 100 عزلة على أساس معايير مورفولوجية، وبعد تنقيتها تحصلنا على 74 عزلة فقط. تم إختبار هذا العدد بطريقة الخطوط المتقاطعة ضد سلالات *E. coli* على الوسط ISP2 حيث أظهرت 3 عزلات نشاط ضد *E. coli* هذه العزلات هي: TR7 و TR14 و TP17 أظهرت دراستها المورفولوجية إحتمال إتماء TR7 و TR14 إلى جنس *Streptomyces* بينما TP17 إلى جنس *Streptoverticillium*. تم تسجيل نتائج سلبية بخصوص حركة إنتاج المضادات الحيوية في الوسط السائل، بينما أظهرت نتائج هذه الحركة على الوسط الصلب أقصى نشاط في اليوم الثاني من التحضين بقطر تثبيط 28 ملم للعزلة TR14 و 23 ملم للعزلة TR7، كما أظهر إختبار التضاد الحيوي للمستخلص الميثانولي للوسط الصلب قطر تثبيط بلغ 8 ملم.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الهيفية ، *Escherichia coli* ، المضادات الحيوية، التربة الصحراوية، النشاط ضد البكتيري

Recherche dans les sols sahariens d'actinobactéries à activité contre *Escherichia coli*

Résumé

Le travail effectué a pour objectif d'isoler, à partir de sols sahariens, d'actinobactéries productrices d'antibiotiques contre *Escherichia coli*. Pour cela, nous avons choisi deux échantillons de sol prélevés à partir d'une palmeraie et d'un reg de la wilaya de Timimoune. En utilisant un milieu à base de chitine, additionné ou non d'antibiotiques sélectifs, nous avons pu récolter un grand nombre d'actinobactéries. Ensuite, 100 isolats ont été sélectionnés en se basant sur des critères morphologiques, et après leur purification, nous en avons obtenu que 74. Le test de ce nombre par la méthode des stries croisées contre des souches *E. coli* sur milieu ISP2 a révélé que 3 isolats ayant une activité contre *E. coli*. Ces isolats sont TR7, TR14 et TP17. Leur étude morphologique a montré l'appartenance probable de TR7 et TR14 au genre *Streptomyces* tandis que, TP17 au genre *Streptovercillium*. Les résultats de la cinétique de production sur milieu liquide étaient négatifs alors que, ces résultats sur milieu solide ont montré une activité maximale au 2^e jour d'incubation avec un diamètre d'inhibition de 28mm pour l'isolat TR14 et 23mm pour l'isolat TR7. Le test d'antibiogramme de l'extrait méthanolique du milieu solide a révélé un diamètre d'inhibition de 8 mm.

Mots clés : Actinobactérie, *Escherichia coli*, Activité antimicrobienne, Sol saharien, Antibiotique.

Search in Saharan soils for actinobacteria active against *Escherichia coli*

Abstract

The work aims to isolate, from Saharan soils actinobacteria producing antibiotics against *Escherichia coli*. For this purpose, we chose two soil samples taken from a palm grove and from a reg in the wilaya of Timimoune. By using a chitin medium, with or without the addition of selective antibiotics, we were able to isolate a large number of actinobacteria. Then, 100 isolates were selected based on morphological criteria, and after their purification, we obtained only 74. The test of this number by the cross-streak method against strains of *E. coli* on ISP2 medium revealed only 3 isolates with activity against *E. coli*. These isolates are TR7, TR14 and TP17. Their morphological study showed the probable belonging of TR7 and TR14 to the genus *Streptomyces* while, TP17 to the genus *Streptoverticillium*. The results of the production kinetics on liquid medium were negative whereas, these results on solid medium showed maximum activity in the 2nd day of incubation with an inhibition diameter of 28mm for isolate TR14 and 23mm for isolate TR7. The antibiogram test of the methanolic extract of the solid medium revealed an inhibition diameter of 8 mm.

Key words: Actinobacteria, *Escherichia coli*, Antimicrobial activity, Saharan soils, Antibiotics.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Origine des germes cibles	15
Tableau 2 : Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés selon le sol, l'agent sélectif et la dilution.....	21
Tableau 3 : caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats choisis.....	23
Tableau 4 : Activité antimicrobienne par la méthode de stries croisées.....	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Echantillons de sol.....	12
Figure 02 : prétraitement physique et chimique des échantillons.	12
Figure 03 : préparation du milieu d'isolement.....	13
Figure 4 : Méthode des suspensions dilutions.....	13
Figure 5 : Colonies des actinobactéries.....	14
Figure 6 : repiquage des germes cibles.....	15
Figure 7 : Méthode de stries croisées.....	16
Figure 08 : préparation des précultures.....	17
Figure 9 : la méthode de diffusion des puits.....	17
Figure 10 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne (Méthode des cylindres d'agar). ..	18
Figure 11 . Etapes de l'extraction des métabolites sur milieu solide actifs et test d'antibiogramme.....	20
Figure 12 : Colonies d'actinobactéries isolées sur milieu Chitine.....	22
Figure 13 . Quelques isolats sélectionnés et purifiés.....	23
Figure 14 . Aspect macromorphologie des isolats TP17, TR7 et TR14.....	24
Figure 15 : Aspect micromorphologique des isolats TP17, TR7 et TR14 sous microscope x40.....	24
Figure 16 : Activité anti microbienne des isolats TR7, TR14 et TP17 (méthode de stries croisées)	26
Figure 17 : Cinétique de production sur milieu liquide (méthode des puits)	27
Figure 18 : cinétique de production des isolats TR7 et TR14 sur milieu solide	28
Figure 19 : Photos montrant l'activité des isolats TR7 et TR14 sur milieu solide.....	29
Figure 20 : Test d'antibiogramme de l'extrait méthanolique du milieu solide de la souche TR14 (la gentamycine témoin).....	29

LISTE DES ABREVIATIONS

UFC: Unités Formant Colonies	DAEC : <i>Escherichia. coli</i> à adhérence diffuse
G+C: Guanine et Cytosine	ATCC : American type culture collection .
ADN: Acide désoxyribonucléique	CaCO ₃ : carbonate de calcium
DAP: l'acide diamino pimélique	ARNr 16S : Acide Ribonucléique codant pour la sous unite ribosomique 16S
NaCl : chlorure de sodium,	ETEC : <i>Escherichia. coli</i> enterotoxinogènes
ANI: indice de similarité moyenne des nucléotides	EPEC : <i>Escherichia. coli</i> entéro pathogènes
MDR: multidrug-resistant	EHEC: <i>Escherichia. coli</i> entérohémorragiques
PNR: la peptide synthétase non ribosomique	EIEC : <i>Escherichia. coli</i> entéroinvasifs
PKS: la polycétide synthase	ExPEC : <i>Escherichia coli</i> à l'origine de infection Extra-Intestinales.
REC A: Recombination A protein	InPEC : <i>Escherichia coli</i> à l'origine de infection Intestinales
DDH: hybridation de l'ADN-DNA	MLST : le typage de séquences multilocus
TP: Timimoun palmerie	BMR : bactéries multirésistantes
TR: T imimoun reg	IDSA : l'Infectious Diseases Society of America
LPS: Lipopolysaccharides	FDA: Food and Drug Administration
H ₂ S: Sulfure d'hydrogène	SARM : <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
RMN :Résonance magnétique nucléaire	
CCM : Chromatographie sur couches minces	
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance	

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières.....	
Introduction.....	1
Matériel et méthodes.....	11
1.- Prélèvement des échantillons de sol	12
2.- Isolement d'actinobactéries.....	12
2. 1.- Prétraitement des échantillons de sol.....	12
2. 2.- Milieu d'isolement d'actinobactéries.....	12
2. 3.- Préparation de la suspension de dilution.....	13
2. 4.- Ensemencement et incubation.....	14
2. 5.- Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries.....	14
3.- Caractérisation morphologique des isolats.....	14
3. 1.- Caractérisation macromorphologique.....	14
3. 2.- Caractérisation micromorphologique.....	15
4.- Evaluation du potentiel antimicrobien des actinobactéries.....	15
4. 1.- Germes tests.....	15
4. 2.- Criblage des isolats actifs par la méthode de stries croisées.....	16
4.3.- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide.....	16
4.3.1-Préparation des précultures.....	16
4.3.2- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide.....	17
5.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu solide.....	18
6.- Extraction des métabolites actifs sur milieu solide et test d'antibiogramme.....	19
Résultats et discussion.....	21
1.1.- Isolement d'actinobactéries	21
1.2.- Purification	22
1.3.- Caractéristiques culturales et morphologiques des isolats.....	23

1.4.- Evaluation du potentiel antimicrobien des actinobactéries	25
1.5.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide.....	26
1.6.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu solide.....	27
1.7.- Extraction des métabolites actifs sur milieu solide et test d'antibiogramme.....	29
2. Discussion.....	30
Conclusion et perspective	33
Liste des références	34
Annexes.....	41

INTRODUCTION

Escherichia coli appartient au règne *Bacteria*, au phylum *Proteobacteria*, à la classe *Gamma Proteobacteria*, à l'ordre *Enterobacterales*, à la famille *Enterobacteriaceae*, et au genre *Escherichia* (Basavaraju et Gunashree, 2022). Elle est l'espèce la prédominante de la flore aérobie-anaérobie facultative du tube digestif chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales. La combinaison des antigènes de surface, flagellaires et capsulaires déterminent en théorie environ 700 000 *E. coli* différents. La grande majorité des *E. coli* appartiennent à la flore commensale digestive et certains peuvent acquérir des facteurs de virulence particuliers et donner soit des pathologies extra-intestinales (méningites, infections urinaires, du sang ou du système nerveux central) soit des pathologies intestinales (Kurkdjian et Bingen, 2012).

E. coli, également appelée colibacille, est une bactérie asporulée qui mesure entre 2 et 4 µm de long et 0,4 à 0,6 µm de large. Il s'agit d'une bactérie allongée et fine, avec des extrémités arrondies, qui est mobile grâce à une ciliature péritriche. Leur ciliature péritriche est utilisée pour les formes mobiles. Des formes capsulées sont parfois observées (Avril *et al.*, 2000).

En 24 heures, à une température de 37°C, elle se développe en produisant des colonies rondes, lisses, avec des bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, sans coloration. En général, les colonies présentent un lactose positif dans les milieux lactosés. Dans le milieu de gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (Avril *et al.*, 2000). Dans des conditions de laboratoire, les cellules *E. coli* peuvent se développer sur un support solide ou dans un milieu de croissance liquide. Elles peuvent se développer dans un milieu inférieur, qui contient du glucose comme source de carbone et d'énergie, des sels d'ammonium comme source d'azote, ainsi que d'autres sels et oligo-éléments (Elbing et Brent, 2019). En termes de caractéristiques antigéniques, *E. coli* peut être reconnu par la présence de l'antigène somatique O, de l'antigène flagellaire H et de l'antigène de surface K. L'antigène O se trouve dans les lipopolysaccharides de la paroi bactérienne des souches Gram négatives, tandis que l'antigène flagellaire H est un complexe protéique qui pénètre dans la structure du flagelle pour faciliter la migration. L'antigène flagellaire H est un complexe protéique qui pénètre dans la structure flagellaire pour faciliter la migration bactérienne. L'antigène K n'est pas toujours présent à la surface, mais s'il l'est, il empêche l'agglutination de l'antigène O (Ricard, 1993). Ces caractéristiques facilitent la reconnaissance des bactéries ainsi que l'identification moléculaire par les méthodes PCR, le typage de séquences multilocus (MLST), le ribotypage et le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Logue *et al.*, 2017). En plus quelques-unes des méthodes classiques utilisées, l'examen macroscopique (Rosai, 2011), et microscopique pour le diagnostic

(Boudellaa et Bougattoucha, 2010); et la galerie biochimique pour l'identification (Koneman *et al.*, 1997).

Même si la plupart des souches d'*Escherichia coli* sont commensales bénéfiques, certaines d'entre elles sont liées à des pathogénicités intestinales ou extra-intestinales très variées chez l'être humain (Montet, 2009), ainsi une meilleure adaptabilité et compétitivité peut encourager et favoriser la colonisation intestinale de bactérie et l'infection extra-intestinale par *E. coli* (Leimbach *et al.*, 2013). De plus, elle présente une résistance à divers antibiotiques tels-que amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline et céfazoline (Paterson et Bonomo, 2005).

Les pathogènes d'*E. coli* sont classées en deux grandes catégories de pathotypes (ou pathovars) : les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC, pathogène *E. coli* intestinal) et extra-intestinaux (ExPEC, pathogène *E. coli* extra-intestinal).

1- *E. coli* pathogènes intestinaux:

Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinales (InPEC) peuvent être regroupées en six catégories :

- *E. coli* entérotoxigène (ETEC)

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), fréquemment associées à la 'diarrhée du voyageur', sont des souches produisant des entérotoxines : toxine thermosensible (toxines LT), et/ou toxine thermostable (toxines ST). Lors de la colonisation de l'intestin, les entérotoxines provoquent la diarrhée. Les infections aux ETECs sont principalement trouvées chez les voyageurs, les nourrissons et les enfants dans les pays en voie de développement. Elles peuvent aussi être trouvées chez les animaux d'élevage (Kaper *et al.*, 2004)

- *E. coli* entéro-pathogène (EPEC)

Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) provoquent, elles aussi, des diarrhées de type persistantes. Toutefois elles ne produisent pas d'entérotoxine. Ces souches sont capables de s'attacher aux cellules intestinales et de réarranger le cytosquelette. Les EPECs provoquent principalement des gastro-entérites infantiles dans les pays développés (Clarke, 2003).

- *E. coli* entéro-invasive (EIEC)

Les *E. coli* entéro-invasives (EIEC) provoquent des diarrhées aqueuses et parfois la dysenterie. L'infection se fait dans la muqueuse du colon, les bactéries l'envahissent et se multiplient de façon intracellulaire. Les EIECs sont similaires à la bactérie *Shigella* (Pasqua *et al.*, 2017).

- **E. coli entérohémorragique (EHEC)**

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont associées aux colites hémorragiques et au syndrome urémique hémolytique (HUS) provoqués par la production de Shigatoxines (Stx). Les EHECs peuvent aussi provoquer une défaillance rénale. Les toxines inhibent la synthèse des protéines et provoquent la mort cellulaire. Les EHECs sont surtout trouvées chez les enfants, mais aussi dans la flore normale bovine. Les EHECs provoquent ce qu'on appelle la "maladie du hamburger" (Kaper *et al.*, 2004).

- **E. coli enteroaggrégative (EAEC)**

Les *E. coli* enteroaggrégatives (EAEC) causent des diarrhées aiguës et persistantes chez les adultes et les enfants. Les EAECs sont présentes, aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés. Les EAECs colonisent le colon et y sécrètent des entérotoxines et des cytotoxines (Kaur *et al.*, 2010).

- **E. coli adhérentes invasives (AIEC)**

Les *E. coli* adhérentes invasives sont majoritairement associées à la maladie de Crohn. Cette maladie est responsable d'infections importantes dans l'intestin. Les AIECs sont capables d'adhérer fortement aux cellules épithéliales de l'intestin et de les envahir. Le mécanisme impliqué dans ces actions consiste en la polymérisation de microtubules et le recrutement d'actine. L'action des bactéries induit une sécrétion inflammatoire de cytokine. Les AIECs sont aussi capables de survivre et de se répliquer dans des macrophages : ce qui induit une importante sécrétion de TNF- α (Agus *et al.*, 2014).

2- E. coli pathogènes extra-intestinaux

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), ne sont pas associés aux infections quand ces souches se trouvent dans le tractus intestinal. Cependant lorsqu'elles colonisent des tissus hors de l'intestin, elles peuvent causer des infections importantes (Johnson and Russo 2002). Les ExPECs peuvent être regroupées en quatre catégories

- **E. coli uropathogènes (UPEC)**

Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables de 80 % des infections des voies urinaires (UTI) soit environ 400 millions cas et 230 000 morts en 2019 dans le monde. Les UPECs touchent particulièrement les femmes de tout âge. Environ 60 % des femmes souffrent d'une UTI au moins une fois dans leur vie, et 25 % d'entre elles auront une récurrence. Les UTIs se produisent lorsqu'il y a contamination de la région urogénitale par la flore fécale. Les bactéries peuvent atteindre la

vessie et provoquer une cystite aiguë ou infecter les reins et provoquer une pyélonéphrite aiguë. Dans certains cas les UTIs peuvent mener à une septicémie (Whelan *et al.*, 2023).

- ***E. coli* associées à la septicémie (SEPEC)**

Ces souches provoquent non seulement des infections urinaires simples, mais également d'autres maladies dangereuses telles que la bactériémie ou la septicémie (Jama-Kmieciak *et al.*, 2020).

- ***E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC)**

Les *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC) provoquent des méningites chez les nouveau-nés, 15 à 40 % des nouveau-nés atteints décèdent. Bon nombre des survivants souffrent de défauts neurologiques graves. Les bactéries sont transportées par voies hématogènes (Kaper *et al.*, 2004).

- ***E. coli* pathogènes aviaires (APEC)**

Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) affectent les voies respiratoires de la volaille. Elles peuvent aussi causer des péricardites et des septicémies (Kaper *et al.*, 2004).

La transmission des pathogènes des *E. coli* survient majoritairement lors de la consommation d'aliments contaminés. Le réservoir naturel d'*E. coli* étant principalement le tube digestif des bovins, les produits alimentaires concernés sont généralement la viande crue ou insuffisamment cuite, les produits laitiers au lait cru, et plus rarement les produits végétaux crus. La contamination peut également survenir lors de la traite ou l'abattage de ces animaux. Les matières fécales des ruminants présents dans le sol et dans l'eau sont aussi une source possible de contamination. La transmission interhumaine de *E. coli* est également possible, mais elle survient plus rarement. Dans la majorité des cas, elle s'observe en milieu familial ou dans des collectivités (crèches par exemple).

Les adhésifs, les toxines et les enzymes hydrolytiques sont des facteurs qui accroissent la capacité des bactéries à infecter leurs porteurs (Brugère *et al.*, 2013).

Les symptômes provoqués par *E. coli* par exemple (*E. coli* entérohémorragiques) apparaissent entre 3 et 4 jours Il s'agit de douleurs abdominales et de diarrhées, lesquelles peuvent évoluer vers des formes sanglantes (colites hémorragiques). Des vomissements et de la fièvre peuvent aussi survenir. Si dans la plupart des cas, la guérison est spontanée, l'infection peut parfois aboutir à une forme sévère nommée syndrome hémolytique et urémique (SHU) et peut être mortelle.

Pour détecter la bactérie *E.coli*, le meilleur moyen est une analyse des selles du patient en laboratoire. Cet examen permet de détecter ou non la présence des *Escherichia coli* à l'origine de l'infection.

Pour traiter *E. coli*, différents antibiotiques sont employés, en fonction du siège de l'infection et de l'antibiogramme. Le traitement des infections à *E. coli* doit être commencé empiriquement en se basant sur le site et la gravité de l'infection (par ex., infection légère de la vessie, sepsis urinaire) et ensuite modifié en fonction du résultat de l'antibiogramme. De nombreuses souches résistent à l'ampicilline et aux tétracyclines, aussi d'autres médicaments doivent-ils être utilisés ; dont la pipéracilline, les céphalosporines, les carbapénèmes, la fosfomycine, la nitrofurantoïne, les aminosides, le triméthoprim/sulfaméthoxazole (TMP/SMX) et les fluoroquinolones. Outre le fait qu'il est résistant à l'ampicilline et à la tétracycline, *E. coli* est devenu de plus en plus résistant au TMP/SMX et aux fluoroquinolones. En outre, des souches multirésistantes qui produisent des bêta-lactamases à spectre étendu ont émergé comme une cause importante d'infection urinaire et de sepsis. Les bêta-lactamases à spectre étendu peuvent hydrolyser la plupart des bêta-lactamines, y compris les pénicillines et les céphalosporines et monobactames à large spectre, mais pas les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème, ertapénème); et de nouvelles bêta-lactamines/inhibitrices de bêta-lactamases doivent être utilisés contre les *E. coli* producteurs de bêta-lactamases à spectre étendu.

La résistance aux antibiotiques s'est progressivement développée et concerne aujourd'hui l'ensemble des bactéries pathogènes. Durant la dernière décennie, l'incidence des infections à bactéries multirésistantes (BMR), le nombre de décès engendrés ou encore le coût de prise en charge de ces patients (durée d'hospitalisation, coût des traitements...) n'ont cessé d'augmenter. Cette augmentation de l'antibiorésistance expose au risque d'impasse thérapeutique. Le traitement de ces infections nécessite régulièrement la prescription de « nouveaux antibiotiques ». Les incitations financières pour la recherche sur ces nouveaux antibiotiques, l'accélération des processus d'autorisation de mise sur le marché (AMM) par l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) et la durée d'exploitation avant d'autoriser les génériques (**Boucher et al., 2013**) sont autant de facteurs expliquant que le nombre d'antibiotiques approuvés chaque année par la Food and Drug Administration (FDA) ait triplé ces huit dernières années.

Depuis le début des années quatre-vingt-dix du 20^e siècle, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques (**Donadio et al., 2002**). La recherche

de molécules actives à partir du milieu naturel est l'une d'entre-elles. La plupart des antibiotiques issus du milieu naturel proviennent des microbes du sol (**Daniel, 2004**). Le sol, abrite une multitude d'organismes microscopiques dont les actinobactéries, Un gramme de sol peut contenir 10^6 à 10^9 UFC d'actinobactéries (**Barka et al., 2015**). Le phylum *Actinobacteria*, composé de bactéries filamenteuses Gram-positives à haute teneur en guanine+cytosine (G+C), est l'un des groupes bactériens les plus diversifiés (**Van Bergeijk et al., 2020**). Principalement mésophiles avec une croissance optimale à des températures comprises entre 25°C et 30°C.

Elles se développent mieux à un pH compris entre 6 et 9 (**Kim et al., 2003**). Elles se développent par une combinaison d'extension de la pointe et de ramification des hyphes (**Lechevalier, 1965 ; Zimmerman, 1980**). C'est ce qui leur a donné leur nom, qui dérive des mots grecs pour rayon (aktis ou aktin) et champignons (mukēs) (**Das et Khosla, 2009**),

La plupart des actinobactéries sont aérobies, mais il existe des exceptions. De plus, ils peuvent être hétérotrophes ou chimioautotrophes, mais la plupart sont chimiohétérotrophes et capables d'utiliser une grande variété de sources nutritionnelles y compris divers polysaccharides complexes (**Schmidt et al., 2019**).

Le phylum *Actinobacteria* (*Actinomycetota*) comprend 6 classes, 22 ordres, 54 familles, 250 genres et 3000 espèces (**Hazarika et al., 2020**).

Les actinobactéries ont un mycélium radial bien développé qui se divise en mycélium de substrat et en mycélium aérien au cours de leur cycle de vie. Le mycélium de substrat se développe dans le milieu pour assimiler les nutriments, puis le mycélium aérien se développe ensuite. Toutefois, lorsque les actinobactéries se développent dans un environnement appauvri, l'hyphes s'enroule et développe un septum. Après le développement du septum, des conidiospores se développent à l'intérieur de l'hyphes. À l'exception des *streptomyces*, dont les spores ont une longue chaîne (**Barka et al., 2016**), les spores sont libérées dans l'environnement et germent lorsque les conditions favorables sont réunies.

Au cours de l'étape de germination, la spore fait saillir des tubes germinatifs qui atteignent ensuite le stade de la croissance végétative et le cycle se répète (**Kieser et al., 2000 ; Qinyuan et al., 2016**). Les microbes sont largement répartis dans divers écosystèmes et habitats, y compris les habitats marins du sol et de l'eau douce, les animaux, les plantes, les insectes et les engrais (**Goodfellow et Williams, 1983 ; van der Meij et al., 2017**), sol (**Elbendary et al., 2018**), et sol désertique (**Busarakam et al., 2016**).

Les principales espèces d'actinobactéries présentes dans le sol sont : *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes*. (Mobolaji et Olubukola, 2012), La densité de leur population dans le sol est influencée par plusieurs facteurs tels que le pH du sol, la température du sol, le type de sol, la teneur en matière organique, la culture, l'aération et l'humidité (Jeya *et al.*, 2013). Les premiers systèmes taxonomiques pour les *Actinomycètes* reposaient principalement sur des caractères phénotypiques, La méthode morphologique consiste en une caractérisation macroscopique et microscopique. Sur le plan macroscopique, les isolats d'actinobactéries ont été différenciés par les caractéristiques de leurs colonies (taille, forme, couleur, consistance, etc.), ainsi que par la pigmentation des mycéliums aériens et des mycéliums de substrat inversé, et la présence de pigments diffusibles ont été examinés après une semaine de croissance à l'aide d'ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966).

Sur le plan microscopique, ils ont ensuite été observés pour leur structure mycélienne et la disposition des conidiospores et arthrospores sur les mycéliums au microscope (1000 x) (Kawato et Sinobu, 1979). La morphologie observée des isolats a été comparée avec la morphologie des actinobactéries fournie dans le manuel de Bergey's pour l'identification présomptive des isolats. Divers tests biochimiques effectués comprenaient les tests de catalase, d'oxydase, d'utilisation du citrate, de réduction des nitrates, d'hydrolyse de l'amidon, d'hydrolyse de l'urée, d'hydrolyse de la gélatine, de production d'acide à partir de sucre, d'indole et de lysine. Les tests physiologiques incluaient la motilité, la résistance au NaCl et la tolérance à la température (Dhananjeya *et al.*, 2010).

La chimiotaxonomie est l'utilisation de la distribution des composants chimiques pour regrouper les organismes en fonction des similitudes de leur chimie cellulaire (Goodfellow et Minnikin, 1985 ; O'Donnell, 1988). Les composants chimiques les plus couramment utilisés dans cette systématique sont les acides aminés de la paroi cellulaire, les lipides, les protéines, les ménaquinones, les types d'acide muramique, les sucres et la composition en bases de l'ADN (Goodfellow et O'Donnell, 1989 ; Williams *et al.*, 1989).

Les critères chimiotaxonomiques tels que la détection d'isomères de l'acide diaminopimélique (DAP) sont l'une des propriétés. Les plus importantes de la paroi cellulaire des actinobactéries. La détermination des isomères de DAP sous forme LL (Levo) ou Méso est généralement suffisante pour caractériser les groupes d'actinobactéries (Messaoudi *et al.*, 2015 ; Amin *et al.*, 2017 ; Hasegawa *et al.*, 1983).

La taxonomie moléculaire est réalisée grâce à des protocoles techniques moléculaires permettant l'amplification de gènes tels que le 16S ARNr (**Tian *et al.*, 2007; Claridge et Campbell, 2004**). Les méthodes basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) sont largement utilisées pour détecter et identifier les microbes et le séquençage du gène ARNr16S étant un élément clé (**Tang et Persing, 1999**). Les données de séquence de l'ARNr 16S sont ensuite utilisées pour une analyse BLAST et l'arbre phylogénétique de vraisemblance maximale est construit à l'aide du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0 (**Tamura *et al.*, 2007**). Les valeurs DDH (Digital DNA-DNA hybridization) déterminent la parenté entre des espèces bactériennes étroitement apparentées, avec un seuil recommandé de 70 % (**Wayne *et al.*, 1987**). Les valeurs acceptables d'ANI (indice de similarité moyenne des nucléotides) et de dDDH pour de nouvelles espèces sont respectivement de 98,65 % et 70 %, une valeur de ≤ 70 % indiquant que l'organisme testé appartient à une espèce différente des souches de référence (**Meier *et al.*, 2013**).

L'ANI permet de définir des unités taxonomiques (clusters de génomes regroupés selon leur similarité). En général, la valeur seuil de définition de cette unité taxonomique se situe entre 94 et 96%, selon les auteurs. Ces unités taxonomiques sont définies de telle sorte qu'elles correspondent généralement à la définition d'espèce bactérienne (**Richter et Rosselló-Móra, 2009**).

Actuellement, il est impossible de revendiquer une nouvelle espèce sans une analyse génétique basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16 S et l'hybridation ADN-ADN, et même le séquençage du génome est devenu une pratique courante (**Euzéby, 1997**).

Plus des 23 000 métabolites microbiens bioactifs produits par les *Actinomycètes*, ce qui représente 45% de tous les métabolites bioactifs découverts (**Kalyani *et al.*, 2019**). Les tétracyclines sont classées dans les catégories des macrolides et des macropeptides, tandis que les aminoglycosides sont classés dans la catégorie des aminoglycosides. La néomycine, la streptomycine, la kanamycine, la céphamycine, la vancomycine, l'érythromycine et la tylosine font partie des antibiotiques développés à partir d'actinobactéries (**Mast et Stegmann, 2019**).

La plupart des infections microbiennes humaines ont été traitées avec des antibiotiques basés sur les nouveaux métabolites secondaires actinobactériens. La rifampicine et la cyclosérine sont utilisées pour traiter *Mycobacterium tuberculosis*, tandis que l'érythromycine dérivée de *Saccharopolyspora erythraea* est utilisée pour combattre la maladie des légionnaires. La

tétracycline cible le ribosome bactérien, qui est produit par *Streptomyces aureofaciens*. Les résistants à la vancomycine et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) sont traités par l'antibiotique daptomycine, qui a été développé par *Streptomyces roseosporus*. Le chloramphénicol inhibe la protéine synthèse chez *Streptomyces venezuelae* (Fatahi-Bafghi, 2019).

Plus de 70 % des bactéries pathogènes sont résistantes à au moins un des antibiotiques actuels, ce qui augmente le besoin de nouveaux médicaments ou d'approches alternatives pour contrer cette résistance croissante, Parmi les principales préoccupations se trouvent les pathogènes bactériens ESKAPE, qui sont résistants aux antibiotiques, comprenant *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* (Mancuso et al., 2021). À l'horizon 2050, il est prévu que les infections multimédicamenteuses (MDR) se multiplient. Selon (Tenebro et al., 2021), de nouvelles sources d'antibiotiques sont en cours d'étude pour traiter les souches bactériennes MDR.

Les micro-organismes Gram positifs et Gram négatifs sont considérés comme des micro-organismes test dans les screenings d'activité antimicrobienne et les micro-organismes test largement utilisés sont : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Saccharomyces cerevisiae*, etc (Raja et Prabakaran, 2011).

L'objectif principal de notre étude consiste en rechercher dans les sols sahariens d'actinobactéries qui possèdent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*.

Notre manuscrit est subdivisé selon la méthode IMRAD comme suit :

Le premier chapitre comprend une longue introduction où nous avons abordé des généralités sur *E. coli* et sa biorésistance croissante contre les antibiotiques utilisés, en plus des généralités sur les actinobactéries et leur utilisation pour la production des métabolites secondaires bioactifs.

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes utilisées pour l'isolement et le criblage des activités antimicrobiennes des actinobactéries isolées à partir des échantillons de sol prélevés de la région de Timimoun.

- Dans le troisième chapitre, les résultats sont présentés et discutés. Enfin, nous concluons le sujet par une conclusion et des perspectives qui achèveront le travail.

MATERIEL ET METHODES

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de Valorisation et Conservation des Ecosystèmes Arides (LVCEA) à la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre, université de Ghardaïa.

1.- Prélèvement des échantillons de sol

Les prélèvements ont été effectués à partir de deux échantillons de sol de la région Deldol, wilaya de Timimoun : le premier provient d'un sol rhizophérique situé dans une palmeraie, tandis que le deuxième est issu d'un sol de 'Reg'. Pour chaque prélèvement, les trois premiers centimètres de la couche superficielle du sol ont été écartés, et ensuite, 100 g ont été prélevés de manière aseptique à une profondeur d'environ 15 à 20 cm à l'aide d'une grande cuillère stérile. Les échantillons de sol ainsi obtenus ont été déposés dans des sacs stériles et transportés vers le laboratoire à température ambiante. Une fois au laboratoire, après avoir éliminé les gros débris (pierres, racine, etc.), , broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre. Enfin, ils ont été déposés dans des bocaux préalablement stérilisés et immédiatement conservés au réfrigérateur à une température de 4 °C jusqu'à leur utilisation (Fig. 1) (Messaoudi *et al.*, 2015 ; Sapkota *et al.*, 2020 ; Harir *et al.*, 2017).

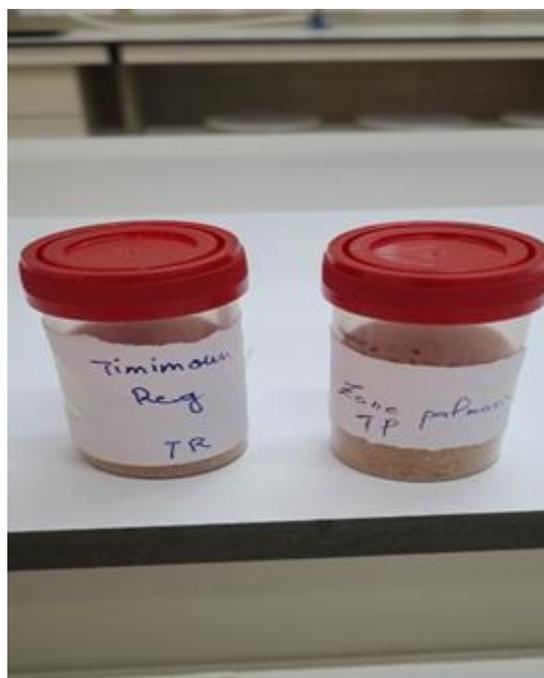


Figure 1 : Echantillons de sol

2.- Isolement d'actinobactéries

2. 1.- Prétraitement des échantillons de sol

Dix grammes de chaque échantillon sont pesés et mis dans du papier aluminium (Fig. 2). Ils sont ensuite soumis à un traitement thermique au four pasteur à 60°C pendant une durée de 120 minutes. Après, un traitement chimique est effectué en ajoutant 0,1 g de carbonate de calcium (CaCO_3) pour 1 g de chaque échantillon puis l'ensemble est incubé à une période de 7 jours. L'objectif de ces manipulations est de réduire le développement des autres bactéries (**Hayakawa et al., 2004**).



Figure 02 : prétraitement physique et chimique des échantillons.

2. 2.- Milieu d'isolement d'actinobactéries

Les souches d'actinobactéries ont été isolées sur milieu « chitine-agar » de **Hayakawa et Nonomura (1987)** (Annexe). Une quantité (1 L) de ce milieu est subdivisé en 4 lots de 250 mL (Fig.3). Chaque lot est supplémenté par un antibiotique sélectif parmi les suivants : la pénicilline (25 $\mu\text{g/ml}$), la rifampicine 10 $\mu\text{g/ml}$ et le chloramphénicol (25 $\mu\text{g/ml}$). Le 4^e lot est laissé témoin sans antibiotiques. Un antifongique (cycloheximide) (50 $\mu\text{g/ml}$) a été ajouté pour l'ensemble des lots afin d'inhiber tout développement fongique.

Il est à noter que ces agents sélectifs ont été stérilisés par filtration sur membrane millipore (0,22 μm de porosité) puis ajoutés aseptiquement en surfusion après autoclavage du milieu. Le choix du milieu chitine et les agents sélectifs avec leurs concentrations est basé sur les résultats obtenus par les chercheurs du laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) de Kouba, Alger (**Boudjella, 1994 ; Sabaou et al., 1998**).

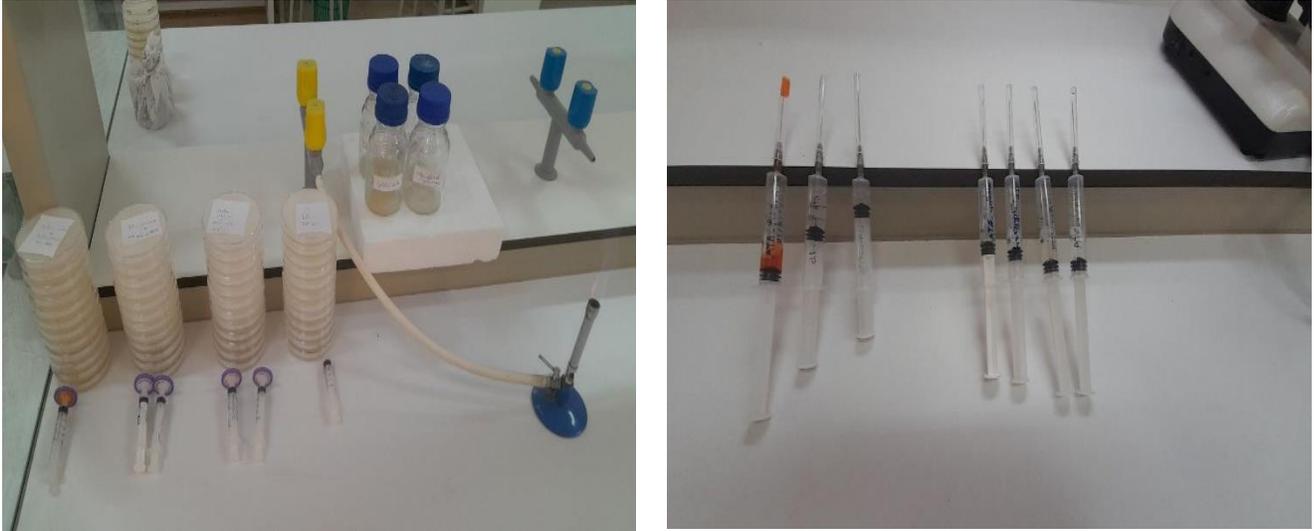


Figure 03 : préparation du milieu d'isolement

2. 3.- Préparation de la suspension de dilution

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions dilutions (**Rapilly,1968**). Un gramme de sol est suspendu dans 9 ml d'eau distillée stérile (dilution 10^{-1}). Après agitation vigoureuse (5 min) à l'aide d'un vortex, la suspension-mère ainsi obtenue est diluée décimalement dans l'eau stérile jusqu'à 10^{-3} . Par la suite, un volume de 100 μ L de chaque dilution est étalé sur le milieu chitine-agar précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (Fig. 4). Trois répétitions sont effectuées pour chacune des dilutions. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C durant 3 semaines.

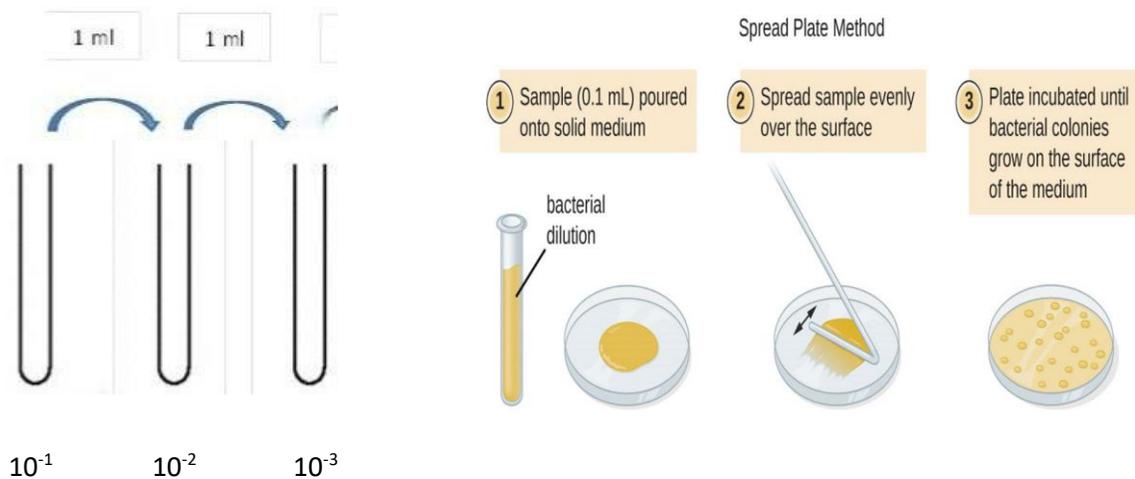


Figure 4 : Méthode des suspensions dilutions

2. 4.- Ensemencement et incubation :

Les boîtes sontensemencées à l'aide d'un râteau et incubées à 30°C durant 3 semaines. La reconnaissance des genres est effectuée par observation au microscope photonique (Zeiss) aux grossissements 100 et 400.

2. 5.- Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries

Les actinobactéries sélectionnées en se basant sur des critères morphologiques, sont prélevées à l'aide d'une pointe fine et stérile, puis sont déposées et purifiées par stries sur le milieu ISP2. La reprise de l'ensemencement des actinobactéries a été effectuée jusqu'à l'obtention de souches pures exemptes de toute contamination. L'incubation est faite à 30°C pour une durée de 15 à 21 jours. Les souches pures sont numérotées puis repiquées sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. Les souches sont ensuite conservées à 4°C dans un réfrigérateur. La composition du milieu de culture est donnée en annexe.

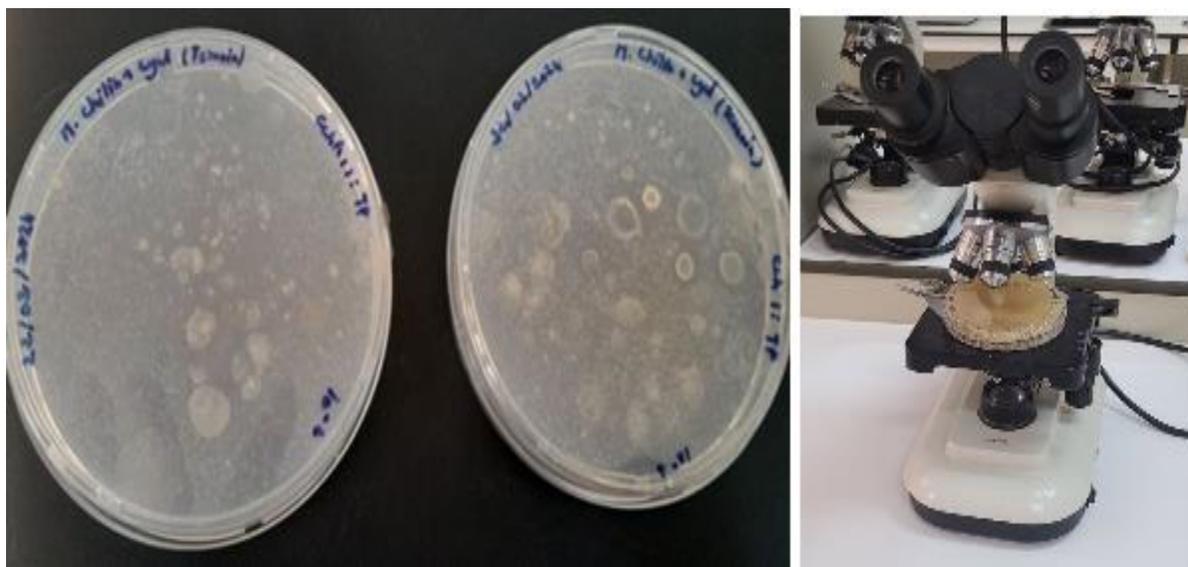


Figure 5 : Colonies des actinobactéries

3.- Caractérisation morphologique des isolats

3. 1.- Caractérisation macromorphologique

L'étude macromorphologique consiste à apprécier la croissance (faible, moyenne, bonne) et à déterminer la couleur des mycéliums aériens et du substrat ainsi que celles des pigments solubles s'ils sont sécrétés (Athalye *et al.*, 1981).

3. 2.- Caractérisation micromorphologique

Les colonies sont observées à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x10 et x40), l'observation est effectuée directement sur les boîtes de Pétri afin d'étudier les mycéliums sans modifier les structures existantes. Il s'agit également d'observer la sporulation typique des isolats choisis, ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat (**Williams et al., 1989**)

4.- Evaluation du potentiel antimicrobien des actinobactéries

4. 1.- Germes tests

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries, des germes cibles ont été obtenus à partir de plusieurs sources (tableau 1).

Tableau 1. Origine des germes cibles

Nom de la bactérie et la levure	Origine
<i>E.coli</i>	Laboratoire Essalem Bounoura -Ghardaia
<i>E.coli</i> ATCC 35218	Laboratoire d'université de Tlemcen
<i>E.coli</i> 2513	Laboratoire EL Andalou - Ghardaia
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Laboratoire de Biologie des systèmes Microbien (LBSM) Kouba- Alger
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Laboratoire d'université de Tlemcen

Une fois que les germes cibles sont ramenés au laboratoire, ils sont repiqués dans des boîtes de Petri et tubes contenant le milieu solide Mueller-Hinton, et ensuite sont incubées pendant 24 heures à une température de 37°C (Fig. 6).

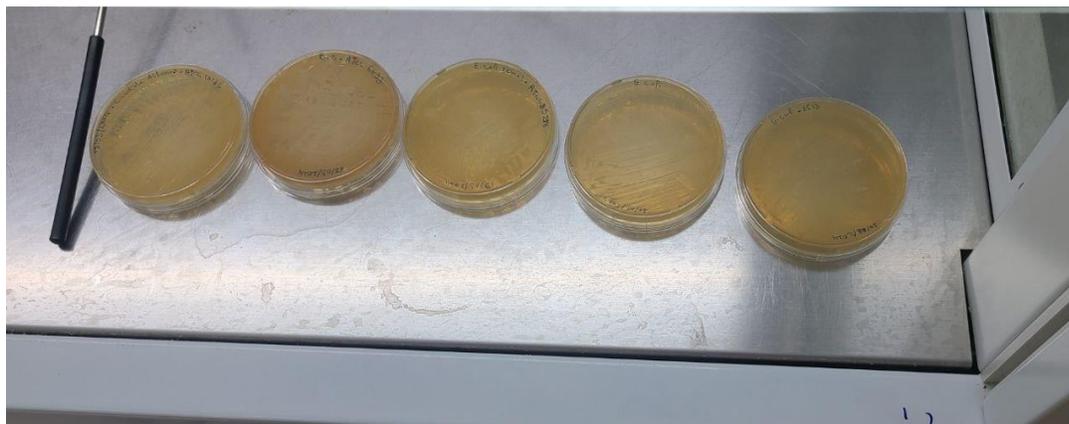


Figure 6 : repiquage des germes cibles

4. 2.- Criblage des isolats actifs par la méthode de stries croisées

L'objectif de cette étude est de sélectionner parmi les isolats, ceux présentant une activité antibiotique intéressante contre les germes-cibles

L'activité antimicrobienne de 74 isolats obtenus après l'étape de purification, est évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu solide ISP2 ; Cette méthode consiste à ensemencer les souches d'actinobactéries à tester sous forme d'un seul trait à la surface du milieu solide ISP2 en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 10 jours à 30°C, les souches cibles sont ensemencées perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h et la lecture des résultats s'effectue en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures des souches cibles et l'isolat d'actinobactérie (Fig. 7).

(Kumar *et al.*, 2014)

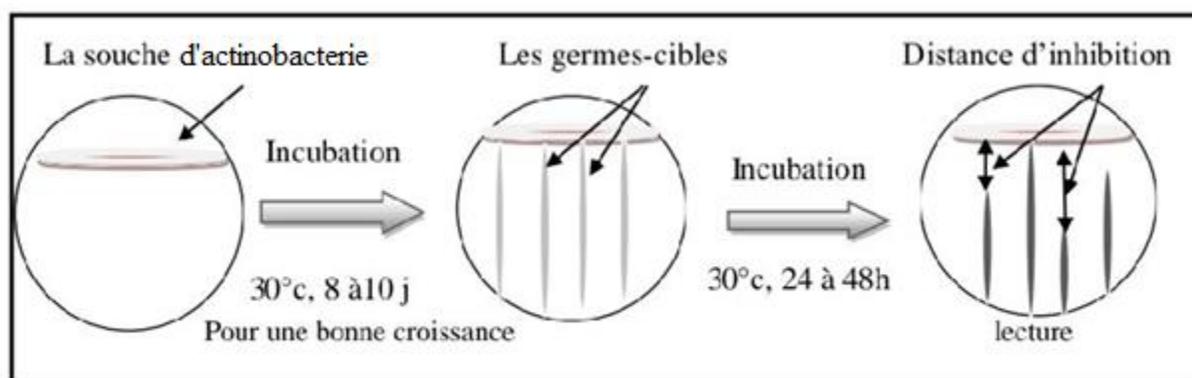


Figure 7 : Méthode de stries croisées

4.3.- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

Les expériences ont été menées avec les souches d'actinobactéries TR7 et TR14 présentant les meilleures activités antimicrobiennes par la méthode de stries croisées. Les milieux de culture liquides utilisés sont : l'ISP2 (à base d'extrait de levure, d'extrait de malt et de glucose) et le Bennett (à base d'extrait de viande, d'extrait de levure et de peptone). La composition de ces milieux est présentée en annexe.

4.3.1-Préparation des précultures

A partir des cultures des deux souches TR7 et TR14 sur milieu solide en boîtes de Petri âgées de 10 jours, les spores et les fragments mycéliens sont raclés aseptiquement à l'aide d'une anse à ensemencer et inoculés dans des tubes à essais qui contenant 3 ml du milieu liquide ISP2 ou Bennett. Les tubes ensemencés sont ensuite incubés en agitation rotative 180 rpm pendant deux jours à 30°C. les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production (Fig. 8).



Figure 08 : préparation des précultures

4.3.2- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

La cinétique de production des antibiotiques a été suivie pendant 10 jours, cette durée correspond à la production maximale des substances actives. Elle a pour but de déterminer le temps nécessaire pour qu'elle soit maximale. Pour cela, des erlenmeyers (de 500 ml) contenant chacune 100 ml de l'un des 2 milieux ISP2 ou Bennett, sont ensemencés par la préculture d'actinobactéries correspondante à raison de 3 % et incubés à 30 °C sous agitation rotative à 180 rpm. Des prélèvements quotidiens (200 µl) du surnageant sont effectués par filtrat afin de mesurer la production d'antibiotiques contre les bactéries-test utilisées.

La technique de mesure utilisée est celle des puits. Cette dernière a été réalisée grâce à un emporte-pièce en cuivre (de 10 mm de diamètre) stérile sur le milieu ISP2 semi solide (10g d'agar/L), coulé dans des boîtes de pétri et préalablement ensemencé en masse par l'*Escherichia coli*. Une fois les puits sont prêts, une quantité aliquote (200 µl) est déposée dans le fond du puits. Les boîtes de pétri sont mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives, tout en arrêtant momentanément la croissance des germes tests, puis incubées durant 24 heures à 30°C. Le diamètre des zones d'inhibition est alors mesuré par une règle millimétrée (Tortorano *et al.*, 1979).



Figure 9 : la méthode de diffusion des puits

5.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

La technique des cylindres d'agar, recommandée par (Bastide *et al.*, 1986), est une méthode d'évaluation du pouvoir antagoniste sur milieu solide. Dans notre cas, nous avons testé les actinobactéries ayant une bonne activité contre *E. coli* révélée lors des stries croisées. Cette méthode consiste à ensemencer les actinobactéries (TR7, TR14) en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 10 jours. Après incubation, chaque jour des cylindres de gélose de 10 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce à partir de ce milieu, déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par la suspension de germe cible (concentration ajustée en 0,5 MC Farland). Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C durant 2 h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 h d'incubation à 30°C.

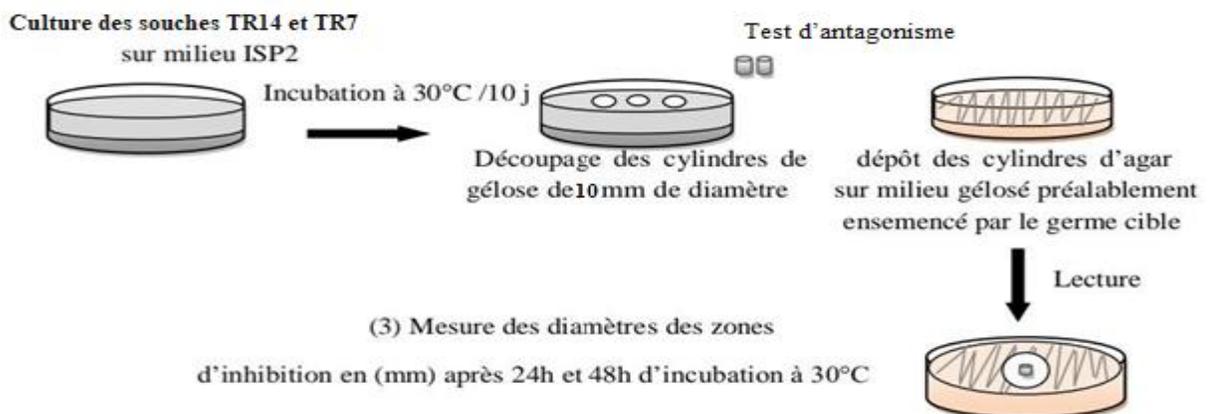


Figure 10 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne (Méthode des cylindres d'agar).

6.- Extraction des métabolites actifs sur milieu solide et test d'antibiogramme

La souche TR14 est ensemencée en stries serrées sur milieu ISP2, après incubation à 30°C pendant quatre jours. La gélose est fragmentée puis mise dans un erlenmeyer contenant 100 ml de solvant méthanol, nous avons utilisé comme solvant d'extraction le méthanol afin d'extraire la quasi-totalité des métabolites secondaires contenus dans le milieu de culture. L'erlenmeyer est ensuite laissé à température ambiante pendant 2 h avec une agitation vigoureuse (Fig. 11).

Les extraits sont filtrés par un filtre whatmann °1 afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits au méthanol sont ensuite évaporés sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur rotatif. Les résidus secs sont solubilisés dans un 1 ml de méthanol transversé dans des piluliers, puis séchés et conservés à 4 °C. L'activité est testée par antibiogramme sur des disques de papier whatmann °3 (6 mm). Ces derniers sont imbibés par 100 µl d'extrait organique, puis séchés totalement à froid à l'aide d'un séchoir. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min. Sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu ISP2 semi-solide, préalablement ensemencé par le germe cible (*E. coli* 40 µl).

L'inoculum des germes cibles est standardisé en utilisant la méthode des suspensions dilutions qui consiste en la mesure de la densité optique. Pour la suspension bactériennes de *E.coli* l'absorbance est lue à la longueur d'onde de 625 nm, de façon à obtenir une concentration finale de 10⁶ UFC/ml doit être comprise entre 0.08 et 0,1 ; ce qui correspond à l'étalon 0,5 de MC Farland. L'ajout d'un disque de gentamicine considéré comme témoin est indispensable. Les boîtes sont ensuite mises pendant 2h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des produits actifs, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h et consiste à déterminer le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque (**Boudemagh, 2007**).



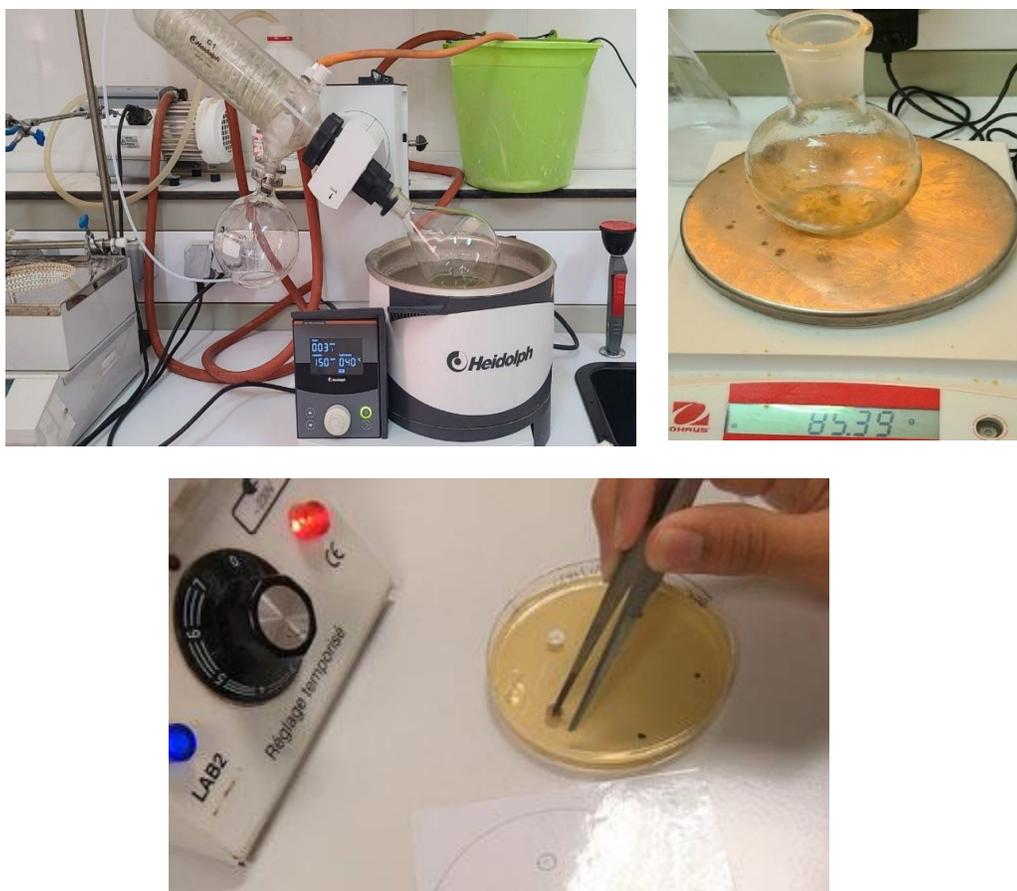


Figure 11. Etapes de l'extraction des métabolites sur milieu solide actifs et test d'antibiogramme

RESULTATS ET DISCUSSION

1.- Resultats

1.1.- Isolement d'actinobacteries

Les actinobactéries ont été isolées à partir des échantillons de sol provenant de la wilaya de Timimoun, depuis deux zones différentes : une zone rizosphérique de palmerie et une zone non rizosphérique de reg. Le milieu utilisé est le Chitine-agar additionné ou non des agents sélectifs. A partir d'un grand nombre de colonies d'actinobactéries constaté, 100 isolats ont été choisis sur la base de leur diversité culturelle macro et micromorphologique remarquée lors de l'observation des colonies à l'œil nu et au microscope optique sur le milieu d'isolement. le tableau 2 montre l'origine des isolats selon l'échantillon de sol, l'agent sélectif utilisé et la dilution.

Tableau 2 : Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés selon le sol, l'agent selectif et la dillution

Echantillon de sol	Milieu	Dilution	Agent sélectif			Témoin (cycloheximide)	Total
			Cycloheximide				
			Pénicilline	Rifampicine	Chloramphénicol		
Echantillon de Reg	Chitine	10 ⁻¹	TP1,TP2, TP3,TP4, TP5,TP49, TP50	/	TP12,TP13,TP14 TP15,TP16	TP37	13
		10 ⁻²	TP6,TP7, TP8,TP9, TP10, TP51	TP24,TP25, TP26,TP27, TP28,TP33	TP17, TP18, TP19	TP39, TP40, TP41	18
		10 ⁻³	TP11, TP52, TP53,	TP29,T P30, TP31, TP32	TP20,TP21, TP22, TP23	TP42, TP43 TP44, TP45 TP46, TP47 TP48	18
Palmeraie		10 ⁻¹	TR1,TR2, TR3	/	TR4, TR5, TR6, TR7, TR8, TR9, TR10, TR11, TR12, TR13, TR14, TR15, TR16	TR23, TR24, TR25	19
		10 ⁻²	/	TR18,TR33, TR34, TR35,TR36	TR15,TR22	TR26,TR27,TR28,TR29, TR30,TR31,TR32,TR33, TR34	16
		10 ⁻³	/	Tr17,tr18, Tr19,tr20, Tr21,tr22	/	Tr35,tr36, Tr37,tr38, Tr39,tr40, Tr41,tr42, Tr43,tr44	16
			19	21	27	33	100



Figure 12 : Colonies d'actinobactéries isolées sur milieu Chitine

1.2.- Purification

Après une période d'incubation de 21 jours (temps requis pour la croissance des actinobactéries), 100 colonies ont été sélectionnées en fonction de critères morphologiques (observation à l'œil nu et au microscope photonique (Zeiss) aux grossissements 100 et 400).

Ces colonies ont été repiquées et ensemencées à l'aide de la méthode d'épuisement sur un le milieu de culture ISP2 afin de les purifier. Parmi les 100 colonies sélectionnées, seules 74 isolats ayant réussi à se développer de manière pure et ont montré les caractéristiques macros et micromorphologiques des actinobactéries. Parmi les 26 isolats perdus, une partie a été contaminée et autre partie n'a pas réussi à croître probablement à cause du changement du milieu de purification.



Figure 13. Quelques isolats sélectionnés et purifiés

1.3.- Caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats

Les caractéristiques culturelles et morphologiques ont été étudiées pour les souches ayant montré la meilleure activité anti *E. coli* par la méthode des stries croisées. Il s'agit de TR7, TR14 et TP17.

L'isolat TP17 apparaît sur milieu ISP2 avec un mycélium aérien de couleur gris clair et un mycélium de substrat orange foncé. Les colonies sont de taille moyenne de bordures irrégulières et aspect poudreux. Sous microscope optique le mycélium aérien apparaît avec des chaînes de spores droites biverticillées. Une forme caractéristique pour le genre *Streptovercillium*.

A l'œil nu l'isolat TR7 apparaît avec des colonies de petite taille et un mycélium aérien de couleur blanche tandis que, le mycélium de substrat est de couleur jaune. Sous microscope le mycélium aérien avec des chaînes spiralées de type S caractérisant pour le genre *Streptomyces*.

L'isolat TR14 est apparu avec des colonies de moyenne taille. Le mycélium aérien est de couleur blanche alors que, le mycélium de substrat est de couleur jaune foncé. Sous microscope, les chaînes de spores sont droites à flexueuses de type RF, ce qui caractérise le genre *Streptomyces*. Le mycélium de substrat apparaît fragmenté. Le tableau 3 résume les caractéristiques morphologiques et culturelles des 3 souches. La figure 14 montre les couleurs mycéliales sur boîte. La figure 15 montre l'aspect micro-morphologique des isolats.

Tableau 3 : caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats choisis

Isolats d'actinobactéries	Croissance Sur ISP2	Couleur de MS	Couleur de MA	Chaînes de spores
TP17	MA : + MS : +++	Orange foncé	Gris clair	droites biverticillées
TR07	MA : +++ MS : +++	Jaune	Blanche	Chaînes spiralées de type S
TR14	MA : +++ MS : +++	Jaune foncé	Blanche	droites à flexueuses de type RF

Note: = MA : mycelium aerien ; MS : Mycelium de substrat ; + = croissance faible; ++ = croissance moyenne; +++ = bonne croissance

Les résultats des caractéristiques morphologiques nous ont permis de rattacher probablement les deux isolats TR7 et TR14 au genre *Streptomyces* tandis que, l'isolat TP17 au genre *Streptoverticillium*.

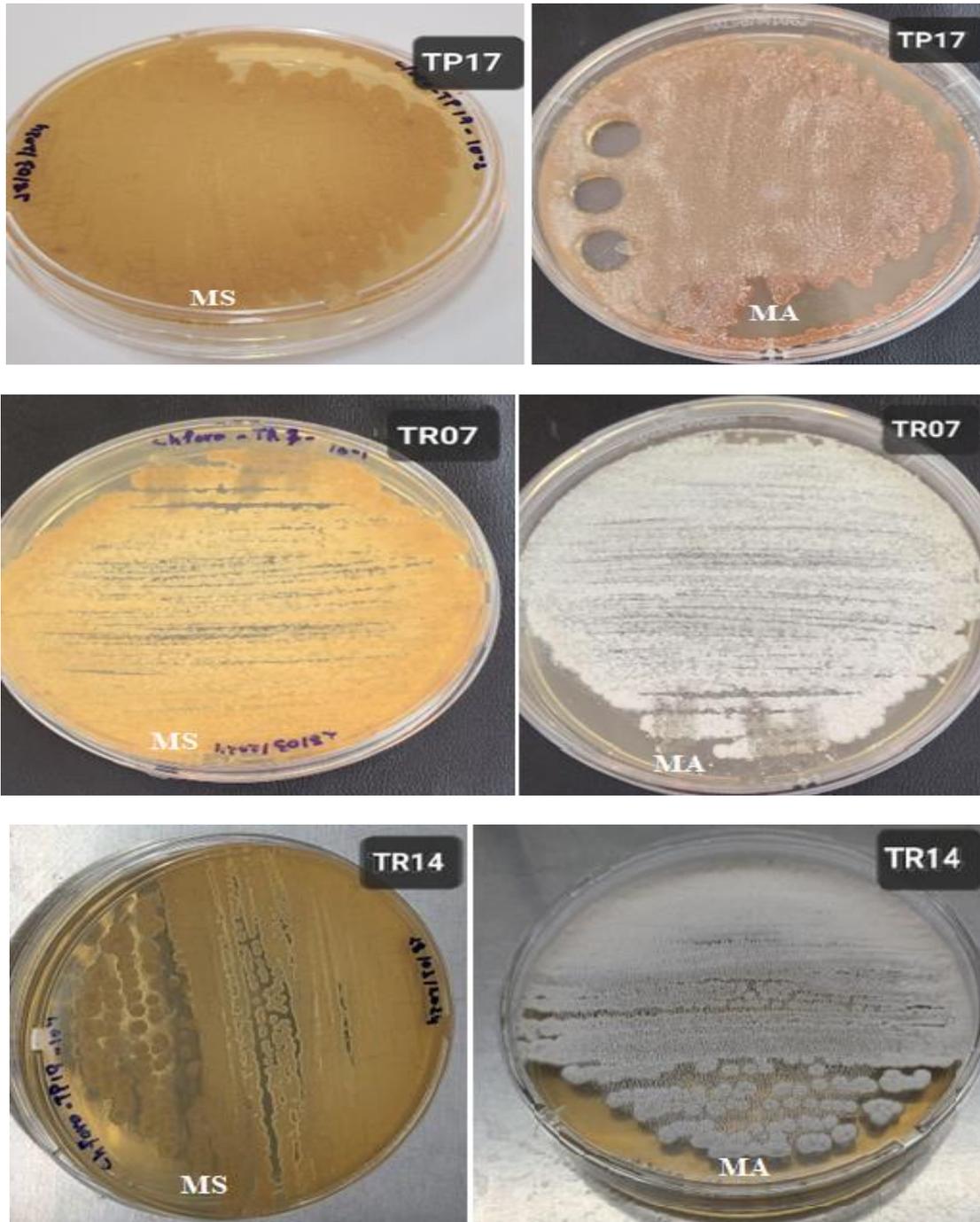


Figure 14. Aspect macromorphologie des isolats TP17, TR7 et TR14

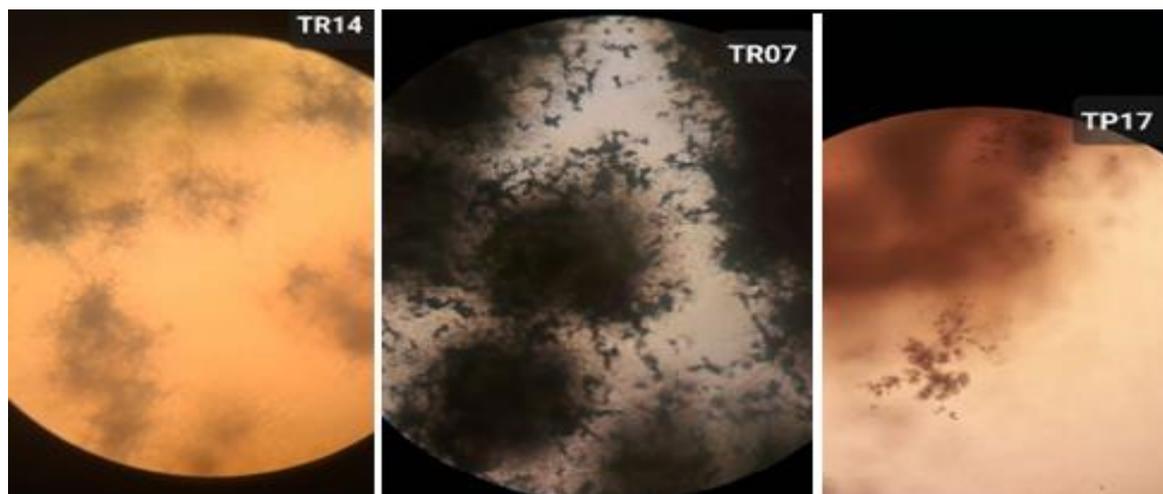


Figure 15 : Aspect micromorphologique des isolats TP17, TR7 et TR14 sous microscope x40

1.4.- Evaluation du potentiel antimicrobien des actinobactéries

La méthode utilisée pour évaluer l'activité des actinobactéries contre *Escherichia coli* est celle des stries croisées. Tous les 74 isolats sectionnés ont été testés par cette méthode contre 3 souches tests d'*E. coli* : *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* 2513 et *E. coli*. Et également, nous avons voulu juste prendre une idée sur l'activité de ces actinobactéries isolées contre la bactérie à Gram + et contre les levures. Ainsi, nous les avons testées contre *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Candida albicans* ATCC 10231. Les résultats ont montré que parmi les 74 seulement il n'y a que 3 souches ayant montré une activité contre au moins une souche test d'*E. coli*. Il s'agit des souche TR7, TR14 et TP17. Aucune activité n'a été enregistré contre *Candida albicans* ATCC 10231. Par contre, les actinobactéries ayant une activité contre *Bacillus subtilis* ATCC6633 sont nombreuses. Les résultats des distances d'inhibition en mm sont illustrés dans le tableau 4 et la figure 16.

Tableau 4 : Activité antimicrobienne par la méthode de stries croisées

Isolat	Distance d'inhibition contre les germes cibles en mm				
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 2513	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
TR07	15	13	10	10	00
TR14	12	11	10	07	00
TP17	02	00	08	06	00

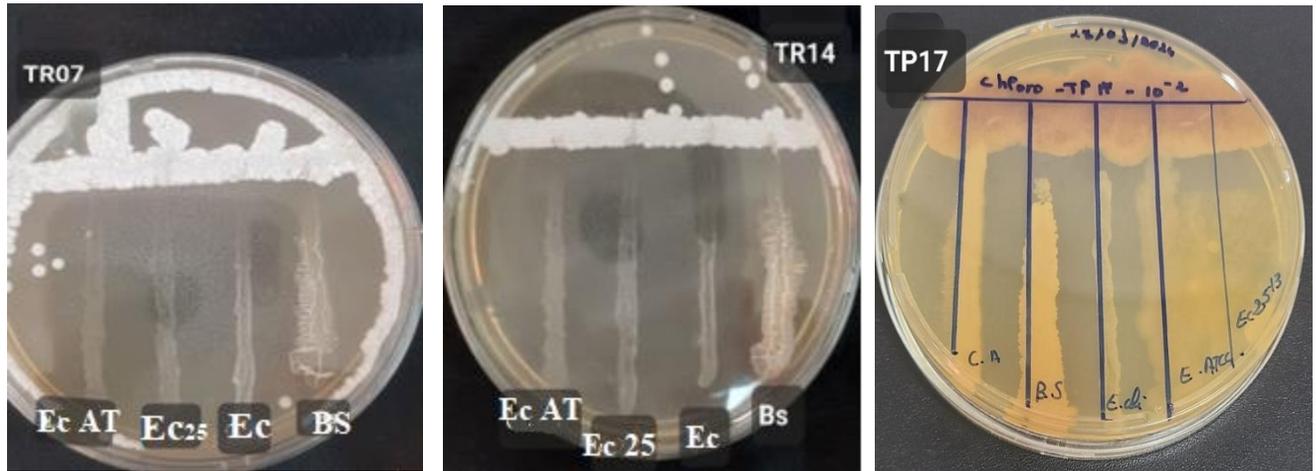
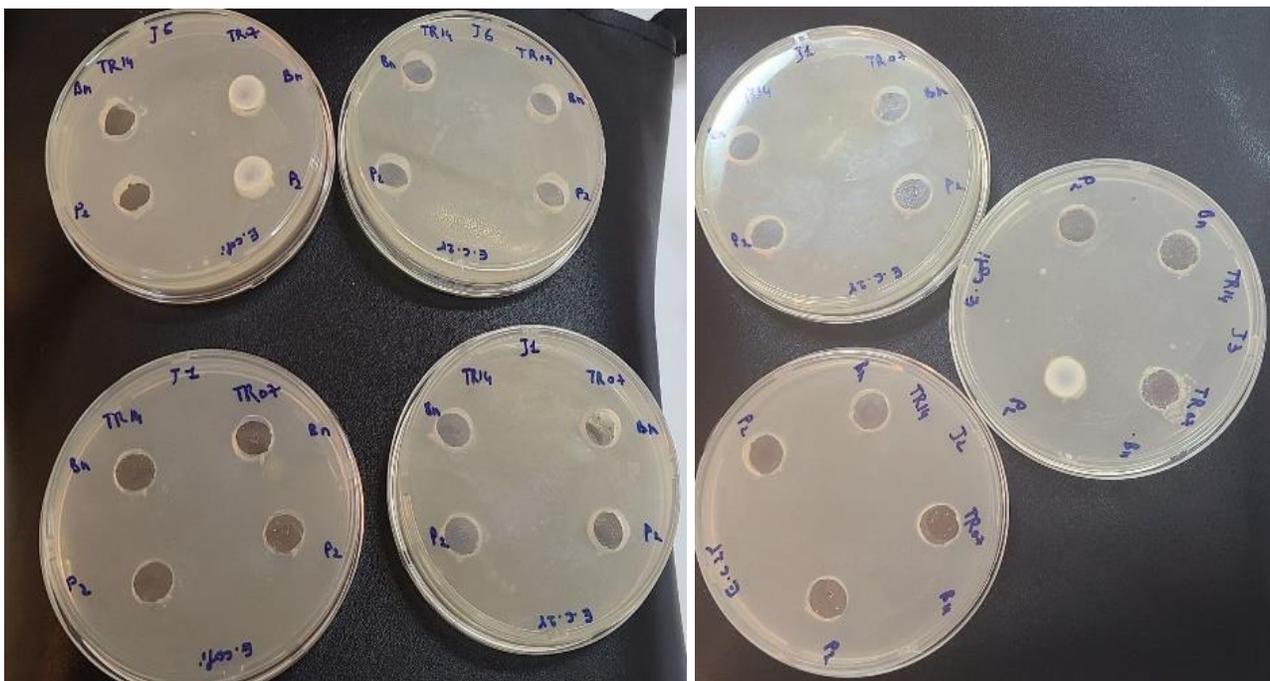


Figure 16 : Activité anti microbienne des isolats TR7, TR14 et TP17 (méthode de stries croisées)

1.5.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne sur milieu liquide, nous avons utilisé la méthode de diffusion des puits. La cinétique de production a été suivi pendant 10 jours. Les isolats choisis pour cette étude sont celles qui ont présenté les meilleures activités par stries croisées, il s'agit des deux isolats TR07 et TR14. Les souches tests utilisés sont les plus sensibles *E. coli* 2513 et *E. coli* obtenue du laboratoire Essalam. Aucune activité n'a été détecté pour les deux isolats pendant les 10 jours de cinétique (Fig. 17).



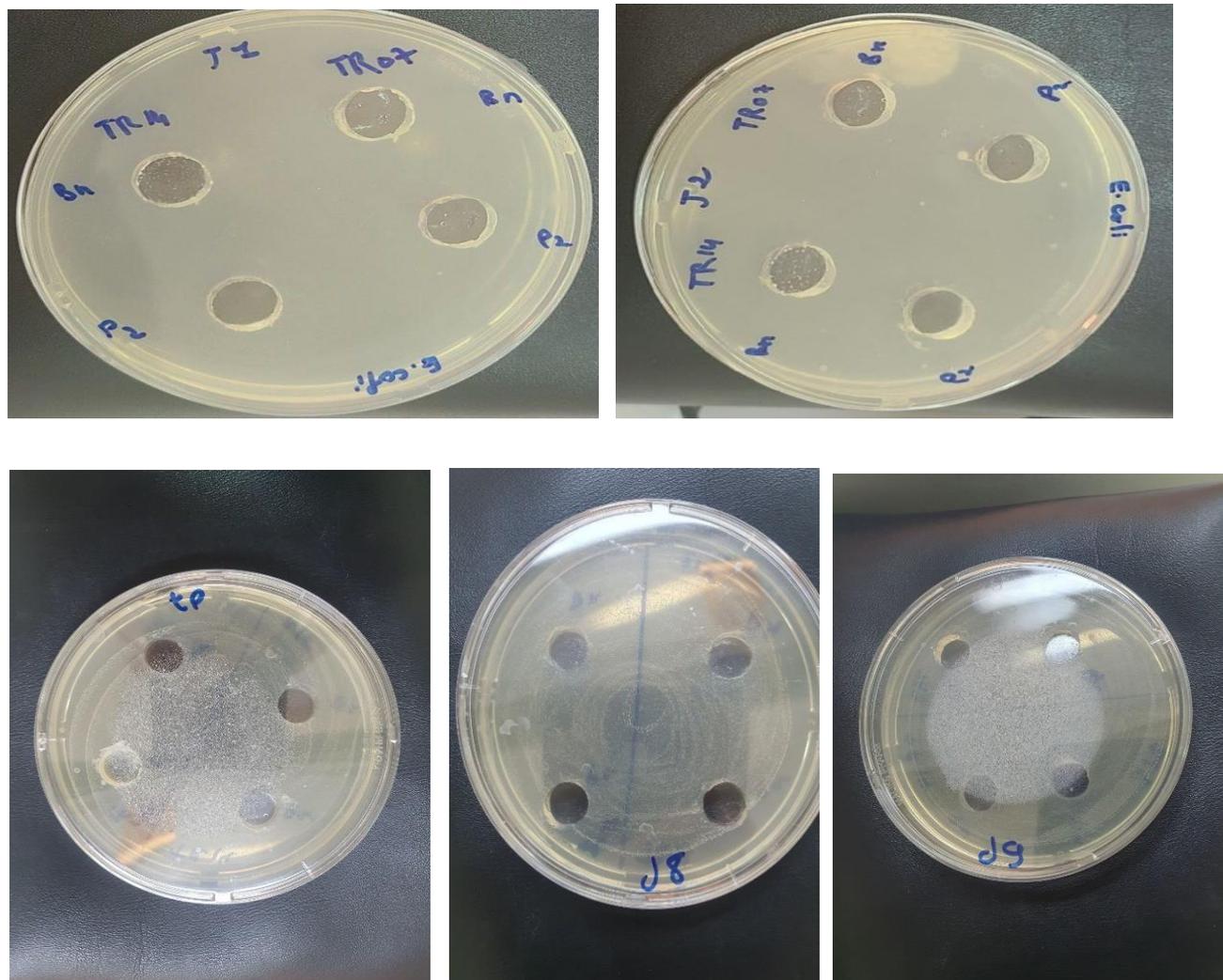


Figure 17 : Cinétique de production sur milieu liquide (méthode des puits)

1.6.- Cinétique de production de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

Vu les résultats négatifs obtenus à la cinétique de production sur milieu liquide, nous avons pensé à la production sur milieu solide. Pour cela, nous avons choisi la méthode des disques d'agar. Le suivi de la cinétique était pendant 5 jours. Les résultats obtenus ont montré une activité maximale produite pour les isolats TR7 et TR14 en deuxième jours d'incubation. Les diamètres d'inhibition sont 23 mm et 28 mm (avec disque de diamètre 10 mm) respectivement. Dans la suite des jours une diminution de production a été remarquée concernant les deux isolats. Il est à noter que la souche test utilisé est celle la plus sensible *E. coli*. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 18 et 19.

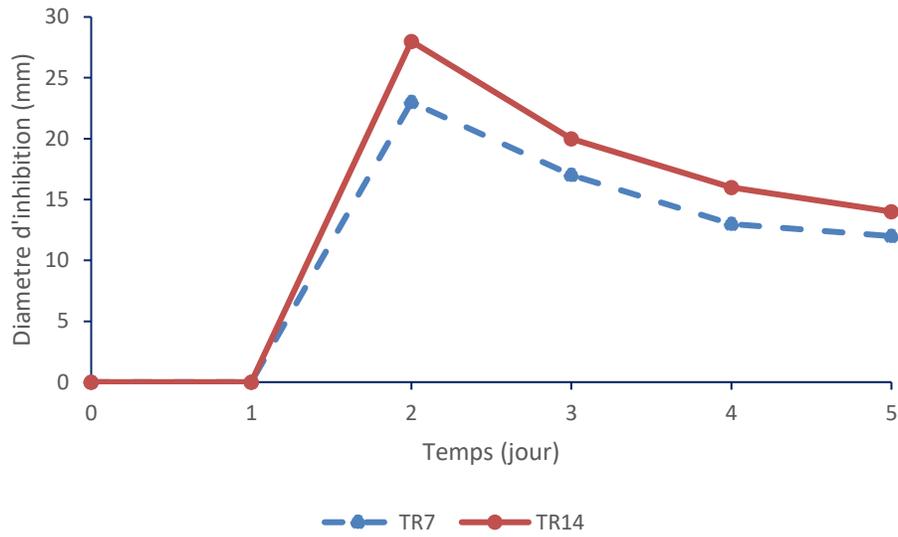


Figure 18 : cinétique de production des isolats TR7 et TR14 sur milieu solide

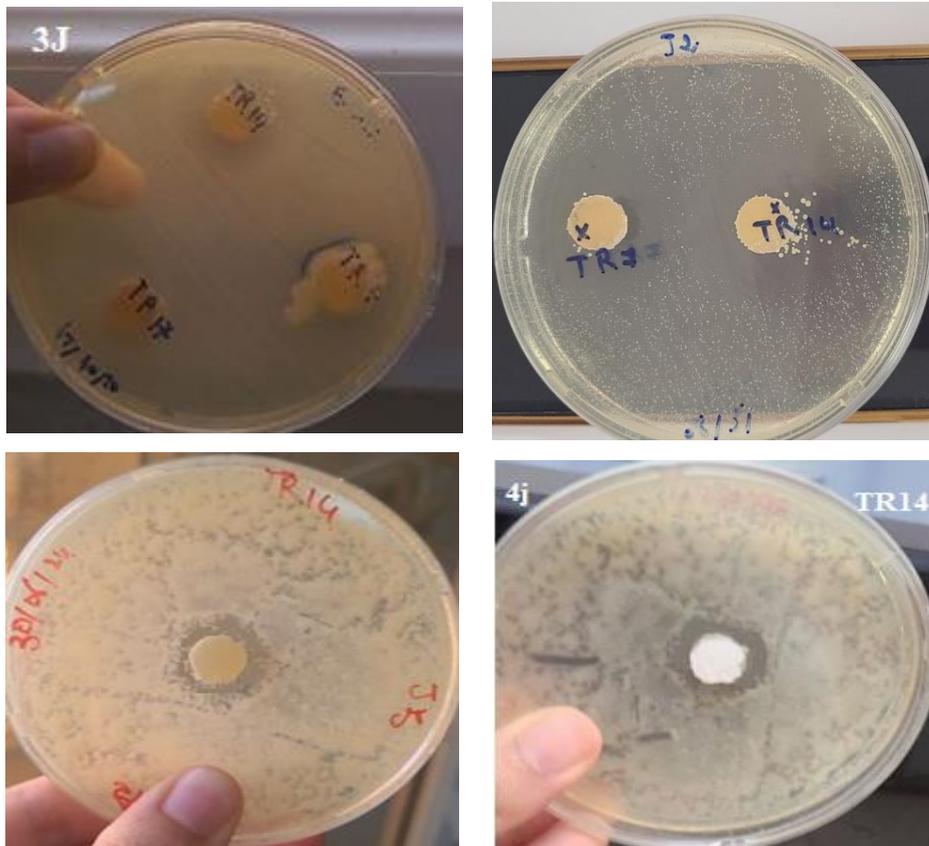


Figure 19 : Photos montrant l'activité des isolats TR7 et TR14 sur milieu solide

1.7.- Extraction des métabolites actifs sur milieu solide et test d'antibiogramme

Comme il a été décrit dans la partie matériel et méthodes, l'extraction a été effectuée à partir du milieu solide en utilisant le méthanol. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique du milieu solide de la souche TR14 était actif contre *E. coli*. Son test d'antibiogramme a révélé un diamètre d'inhibition de 8 mm. Ce diamètre est inférieur à celui obtenu avec la gentamycine qui est de 23mm (Fig. 20).



Figure 20 : Test d'antibiogramme de l'extrait méthanolique du milieu solide de la souche TR14 (la gentamycine témoin)

2. Discussion

Nous avons voulu par notre étude, rechercher des actinobactéries ayant une activité antagoniste d'*Escherichia coli*. Afin de réaliser cet objectif, nous étions obligés de revenir vers les travaux de recherche précédemment faits dans ce contexte. Il a été rapporté dans la littérature scientifique que les actinobactéries des habitats extrêmes sont considérées non seulement comme ayant de grandes diversités taxonomiques, mais ont également un potentiel intéressant pour synthétiser d'importantes molécules naturelles dans les études physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires ainsi que pour le criblage d'activités antibactériennes et antifongiques (**Benssaid et al., 2022**). Ainsi, nous avons choisi le sol de la région de Timimoune pour effectuer l'isolement. Le milieu d'isolement chitine-agar a été choisi en se basant sur des travaux antérieurs effectués qui ont confirmé sa prédilection pour les actinobactéries des sols sahariens (**Boudjella, 1994**). C'est le milieu le plus préconisé pour l'isolement des actinobactéries (**Hayakawa et Nonomura, 1987**). A partir de deux échantillons de sol un grand nombre d'actinobactéries a été isolé. Ces résultats confirment ce qui a été signalé depuis longtemps par nombreux chercheurs. Les recherches menées par (**Sabaou et al., 1992 ; Sabaou et al., 1998 ; Boudjella, 1994 ; zitouni et al., 2004, 2005 ; Badji et al., 2006; Lamari, 2006**) attestent de la richesse des sols sahariens en actinobactéries, lesquelles peuvent parfois être plus denses que les autres groupes de microorganismes.

Les échantillons de sol ont été prétraités par la chaleur et le CaCO_3 . Ces pré-traitements du sol peuvent stimuler l'isolement des actinobactéries en favorisant soit leur croissance, soit en éliminant la plupart des autres bactéries indésirables (**Matsukawa et al., 2007 ; Hong et al., 2009**). D'après **Gurung et al., (2009)** l'ajout de CaCO_3 permet non seulement une augmentation du nombre des colonies d'actinobactéries par un facteur de 100 ou plus en comparaison avec les échantillons non traités par le bicarbonate de calcium, mais aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération court et qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinobactéries.

L'ajout des antibiotiques sélectifs est nécessaire pour augmenter l'effet sélectif du milieu. En effet, un milieu contenant des macromolécules comme la caséine, la chitine et l'acide humique, sont importants pour favoriser la croissance des actinobactéries rares et supprimer les contaminants bactériens et fongiques. Il a été confirmé que l'ajout d'antibiotiques antibactériens et antifongiques tels que l'anisomycine, la cycloheximide, la gentamicine, la kanamycine, l'acide nalidixique, la novobiocine, la

nystatine, la pénicilline, la primaricine, la polymyxine, la rifampicine, la streptomycine, la tunicamycine et la vancomycine au milieu d'isolement favorise la sélection des actinobactéries rares (**Hong et al., 2009**).

Le genre *Streptomyces* est favorisé par la présence du chloramphénicol, la rifampicine et la streptomycine. Tandis que, Les genres *Actinomadura*, *Nocardia*, et *Nocardiosis* sont favorisés par la pénicilline et la rifampicine (**Sabaou et al., 1998; Badji, 2006; Zitouni et al., 2005**).

Afin de purifier les isolats, le milieu ISP2 a été utilisé, Selon les recherches de **Badji (2006), Boudjella (2007), Aouiche (2013), Boubetra (2013), Toumatia (2015) et Driche (2016)**, l'ISP2 est un milieu choisi comme milieu de culture en raison de ses résultats exceptionnels par rapport à d'autres milieux, La présence d'éléments nutritifs dans le milieu ISP2 (milieu complexe) favorise la production d'antibiotiques par les souches d'actinobactéries en fournissant des facteurs de croissance et d'autres précurseurs.

Après un examen microscopique pour tous les isolats, nous avons remarqué la dominance habituelle pour le genre *Streptomyces* par rapport aux autres genres. Il faut rappeler que ce genre constitue 80 à 95% des *Actinomycetales* dans divers types de sols et autres substrats de par le monde (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Afin de déterminer le potentiel d'activité antimicrobienne des isolats, nous avons utilisé la méthode des stries croisées. Selon **Rothrock et Gottlieb (1981)**, cette méthode est utilisée en raison de son avantage permettant d'utiliser différents micro-organismes tests pour la même souche étudiée et sur la même boîte. Les résultats ont montré le taux d'activité obtenu contre *E. coli* est faible. En effet, Parmi les 74 isolats d'actinobactéries testés, il n'y a que 3 isolats ayant montré une activité antagoniste. Ces résultats sont en accord avec ceux de (**Guendouzi, 2020**) qui ont trouvé que parmi 17 isolats d'actinobactéries isolées à partir de différents écosystèmes naturels il y a qu'un isolats active contre *E.coli* avec un taux de 5%. Le nombre d'actinobactéries ayant montré une activité contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 est plus élevé (21 isolats) que celui d'*E.coli*. Effectivement, les bactéries de Gram négatif possèdent des sucres de natures lipopolysaccharidique (LPS) dans leurs membranes externes, ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, Cependant, les bactéries de Gram positif ont une paroi uniquement tapissée par le peptidoglycane, ce qui ne constitue pas une barrière efficace (**Naikpatil et Rathod, 2011**). Selon **Ullah et al. (2012)**, de nombreux chercheurs ont constaté une résistance remarquable des bactéries Gram négatives par rapport à leurs homologues à Gram positif.

D'après la cinétique de la production des métabolites actifs sur milieu liquide, Nous n'avons pas remarqué une activité produite ni dans le milieu ISP2 ou dans le milieu Bennett. Celui-ci peut être revenir selon **Reghioua et al. (2008)** à la technique des puits qui n'a pas permis de détecter l'activité antibactérienne du surnageant de culture en raison de la faible concentration des substances antibactériennes présentes dans ce dernier.

D'après **Bushell et ses collègues (1997)**, ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans un milieu liquide, en raison de l'agitation, les filaments se décomposent et les petits fragments ne peuvent pas produire des quantités significatives d'antibiotiques.

Par ailleurs, et contrairement à ce qui a précédé, la cinétique de production suivie sur milieu solide a révélé une activité intéressante contre *E. coli* pour les deux souches d'actinobactéries TR7 et TR14. D'après **Shomura et al. (1979)**, l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle en milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide et il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide. ont rapporté que cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des actinobactéries fragmentent ce qui diminue leur capacité à produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**), et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide (**Olson et Ratzkin, 1999**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion de ce travail, nous pouvons dire que les résultats obtenus sont intéressants, surtout au regard à la résistance développée par les souches d'*E. coli* dans ces dernières décennies.

Nous avons utilisé des échantillons de sol provenant d'une palmeraie et d'un reg de la wilaya de Timimoune. Ainsi, A partir d'un grand nombre d'actinobactéries qui a été isolé sur milieu chitine agar, nous avons sélectionné 100 isolats d'actinobactéries en se basant sur des critères morphologiques. A partir de ce nombre 26 isolats ont été perdus à cause de contamination et du changement de milieu purification. Tous les 74 isolats obtenus ont été l'objet d'un test par les stries croisées pour rechercher les isolats actifs contre *E. coli*. Les résultats ont montré que seulement 3 isolats ayant présenté un effet antagoniste contre le colibacille. Il s'agit des isolats TR7, TR14 et TP17. Leur étude macro et micromorphologique nous a permis de rattacher probablement les deux isolats TR7 et TR14 au genre *Streptomyces* tandis que, l'isolat TP7 au genre *Streptoverticillium*.

Le suivi de la cinétique de production sur milieu liquide a montré des résultats négatifs. Par contre, le suivi de cette cinétique sur milieu solide a montré que l'activité est maximale au deuxième jour d'incubation (un diamètre d'inhibition 28mm enregistré par l'isolat TR14 et 23mm enregistré par l'isolat TR7). Ensuite, l'activité diminue progressivement jusqu'au cinquième jour. Le test d'antibiogramme de l'extrait méthanolique du milieu solide au 2^e jour d'incubation a montré un taux d'inhibition de 8 mm contre *E. coli*.

Comme perspectives aux résultats obtenus, il est nécessaire de :

- Identifier les espèces des meilleurs isolats actifs en réalisant une étude moléculaire
- Suivre l'étude de production des métabolites sur les milieux liquides
- Semi purifier et purifier les fractions actives par (CCM, HPLC..)
- Déterminer les molécules pures par l'utilisation la spectrometrie de masse et RMN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agus, A., S. Massier, A. Darfeuille-Michaud, E. Billard and N. Barnich (2014). "Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies." *Biomed Res Int* **2014**: 567929.
- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- Athalye M., Lacey J. and Goodfellow M. (1981). Selective isolation and enumeration of actinobacterias using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51:289–297. In *bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardioopsis*.
- Aouiche, A. (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme (Doctoral dissertation, École Normale Supérieure de Kouba, Alger).
- Amin, D. H., Abolmaaty, A., Tolba, S., Abdallah, N. A., & Wellington, E. M. (2017). Phylogenetic characteristics of a unique antagonistic *Micromonospora* sp. Rc5 to *S. aureus* isolated from Sinai Desert of Egypt. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 5(6), 1295-1306.
- Avril, J. L., Denis, F., Dabernat, H., & Monteil, H. (2000). *Bactériologie clinique* (2e éd.). Marketing, Paris. pp. 148-280.
- Badji, B. (2006). Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinobactéries d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. [Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou]. 226 p.
- Badji, B., Riba, A., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabou, N. (2006). Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4), 373-382.
- Bessaid N., Verheeche-Vessen C. Bouras N., Mekelat A. (2019). Taxonomy and antifungal activity of thermophilic strain NT-T1 of *Streptomyces* sp. Isolated from Saharan soil of Algeria. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie Original Paper Tom. XXIX, Issue: 2, 2022*, pp. 125-132.
- Balière, C. (2016). Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).
- Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blažič, M., Horvat, M., ... Kosec, G. (2013). Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome Announcements*, 1(4), e00581-e00513.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., ... & Clément, C. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: an overview of main characteristics. *Escherichia coli-Old and New Insights*.
- Boucher H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Bradley, J., Guidos, R.J., Jones, R. N., E Murray, B., Bonomo, R. A., Gilbert, D. (2013). development of new drugs active against Gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Infectious Diseases Society of America*, 56(12), 1685-94

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brugère, H., Auvray, F., Mariani-Kurkdjian, P., King, L. A., Loukiadis, E., & de Maisons-Alfort, F. (2013). *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *Feuill Biol*, 54(311), 79-86
- Bastide, A., De Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M., & Duménil, G. (1986). Isolement et sélection de souches d'*Actinomyète* productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen Journal*, 2, 453-466.
- Belyagoubi, L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinobactéries et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens (Thèse de Doctorat). Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, p. 14-17.
- Bérdy, J. (2012, April 18). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Bhatnagar, A., & Bhatnagar, M. (2005). Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science*, 89(1), 91-100.
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). *Actinomyetes* benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, 111, 458–467. [CrossRef]
- Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix SA198* isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 103, 771-776.
- Boubetra–Biskri, D. (2013). Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix SP. SA198* (Doctoral dissertation).
- Boudellaa, Y., & Bougattoucha, W. (2010). *Examen cytobactériologique des urines* (Mémoire en ligne). École de formation paramédicale de Skikda, Algérie.
- Boudemagh, A. (2007). *Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries Actinomyétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives* (Thèse de doctorat en microbiologie appliquée). Université Mentouri Constantine.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua, S., Zerizer, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, D., & Boiron, P. (2005). Isolation and molecular identification of *Actinomyete* microflora of some Saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla): Study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 39-44.
- Boudjella, H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'*Actinomyètes* rares de quelques sols sahariens (Mémoire de magister, E.N.S. de Kouba).
- Boudjella, H. (2007). Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens (Doctoral dissertation, INA).
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., & Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'*Actinomyétales* productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Aïn Mlila. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 5-10.
- Bouznada, K., Bouras, N., Schumann, P., Sproer, C., Sabaou, N., & Klenk, H. P. (2016). *Actinophytocola algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 2760-2765.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Busarakam, K., Bull, A. T., Trujillo, M. E., Riesco, R., Sangal, V., van Wezel, G. P., et al. (2016). *Modestobacter caceresii* sp. nov., novel actinobacteria with an insight into their adaptive mechanisms for survival in extreme hyper-arid Atacama Desert soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(4), 243–251.
- Bushell, M. E., Dunstan, G. L., & Wilson, G. C. (1997). Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnology Letters*, 19, 49-52.
- Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003, November 25). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl_2), 14555–14561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>
- Claridge, G., & Campbell, I. (2004). The biology of arid cryosols. In: *Cryosols*. Springer, Berlin, pp 573–580.
- Clarke, S, C, Haigh, R, D., Freestone, P, P., et al. Virulence of enteropathogenic *E.Coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jul ; 16 (3):365-78.
- Corbaz, R., Gregory, P. H., & Lacey, M. E. (1963, September 1). Thermophilic and Mesophilic *Actinomycetes* in Mouldy Hay. *Journal of General Microbiology*, 32(3), 449–455. <https://doi.org/10.1099/00221287-32-3-449>
- Corke, C. T., & Chase, F. E. (1964, January). Comparative Studies of *Actinomycete* Populations in Acid Podzolic and Neutral Mull Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 28(1), 68–70. <https://doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800010034x>
- Cross, T. (1982). *Actinomycetes*: a continuing source of new metabolites. *Developments in Industrial Microbiology*, 23, 1-18.
- Das, A., & Khosla, C. (2009). Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Accounts of Chemical Research*, 42(5), 631–639.
- Davies, F., & Williams, S. (1970, November). Studies on the ecology of *Actinomycetes* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(4), 227–238. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(70\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(70)90029-5).
- Davies-Bolorunduro, O. F., Adeleye, I. A., Akinleye, M. O., & Wang, P. G. (2019). Anticancer potential of metabolic compounds from marine *Actinomycetes* isolated from Lagos Lagoon sediment. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(3), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.03.004>
- Devi, S., Menaka, & Rana, S. (2014). Antimicrobial Potential of *Actinomycetes* Isolated from Soil Samples of Punjab, India. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(2), 63-68.
- Dhananjeya, V., Selvan, N., & Dhanapal, K. (2010, August 1). Isolation, Characterization, Screening and Antibiotic Sensitivity of *Actinomycetes* from Locally (Near MCAS) Collected Soil Samples. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 514–519. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.514.519>.
- Djaballah, C. (2010). *Biodiversité des actinobactéries halophiles et halotolérantes isolées de la sebkha d'Ain Mlila* (Thèse de Magister). Université Mentouri-Constantine, p. 5-7.
- Donadio, V., Kallio, M., Karlsson, T., Nordin, M. & Wallin, B. G. (2002). Inhibition of human muscle sympathetic activity by sensory stimulation. *Journal of Physiology* 544, 285–292.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Driche, E. H. (2016). Isolement, taxonomie et caractérisation des molécules bioactives d'actinobactéries des sols sahariens antagonistes de *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation).
- Dulaney, E. L., Larsen, A. H., & Stapley, E. O. (1955, May). A Note on the Isolation of Microorganisms from Natural Sources. *Mycologia*, 47(3), 420. <https://doi.org/10.2307/3755463>
- Daniel R. (2004). - The soil metagenome, a rich resource for the discovery of novel natural products. *Cur. Opin. Biotech.*, 15, 199–204
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- Elbendary, A. A., Hessain, A. M., El-Hariri, M. D., Seida, A. A., Moussa, I. M., Mubarak, A. S., et al. (2018). Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 44–46.
- Elbing, K. L., & Brent, R. (2019). Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125(1), 83. <https://doi.org/10.1002/cpmb.83>.
- Euzéby, J. P. (1997, April 1). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 590–592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>
- Fatahi-Bafghi, M. (2019, June 27). Antibiotic resistance genes in the *Actinobacteria* phylum. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(9), 1599–1624. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03580-5>.
- Flaudrois, J. P. (2004). Bactério Génè /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie, 1-3-10.
- Goodfellow, M., & Donnel, A. (1989). Search and discovery of industrially significant *Actinomycetes*. In *Microbial products: New Approaches*, Society for General Microbiology Symposium No. 44, edited by Baumberg, S., Hunter, I. S., & Rhodes, P. M. (pp. 343-383). Cambridge: Cambridge University Press.
- Goodfellow, M., & Minnikin, D. E. (1985). *Chemical methods in bacterial systematics*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Goodfellow, M., & O'Donnell, A. G. (1989). Search and discovery of industrially-significant *Actinomycetes*. In S. Baumberg, I. S. Hunter, & P. M. Rhodes (Eds.), *Microbial products: new approach* (pp. 343–383). Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of *Actinomycetes*. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.
- Guendouzi. (2020). Actinomycètes, activité antibactérienne, métabolites bioactives, caractères physiologique et biochimique, *Streptomyces*. These de doctorat. Université Saida.
- Gurung. T. D. Sherpa. C. Agrawal. V. P. & Lekhak.. B. (2009). Isolation and Characterization of Antibacterial *Actinomycetes* from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*. Vol 10. Pp:173 -182.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil *Actinomycetes*. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), 501-509.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Harir, M., Miloud, B., Zohra, F., García-Arenzana, J. M., Veloso, A., & Rodríguez-Couto, S. (2017). Isolation and characterization of *Actinobacteria* from Algerian Sahara soils with antimicrobial activities. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 6, 109–120.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., & Tanida, S. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic *Actinomycetes*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 29(4), 319–322.
- Hayakawa, M. (1990). Studies on selective isolation methods and distribution of soil *Actinomycetes*. *Actinomycetol.*, 4, 103–112.
- Hayakawa, M. (1994). Selective isolation methods for rare *Actinomycetes* (in Japanese). In K. Hotta & S. Horinouchi (Eds.), *Bioscience and Actinomycetes* (pp. 219–229). Tokyo: Igakusyuppan Center.
- Hayakawa, M. (2003). Selective isolation of rare *Actinomycete* genera using pretreatment techniques. In I. Kurtböke (Ed.), *Selective Isolation of Rare Actinomycetes* (pp. 55–81). Queensland Complete Printing Service.
- Hayakawa, M. (2008). Studies on the isolation and distribution of rare *Actinomycetes* in soil. *Actinomycetologica*, 22(1), 12-19.
- Hazarika, S. N., & Thakur, D. (2020). *Actinobacteria*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 443–476). Academic Press.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1993). Selective isolation methods for soil *Actinomycetes* (in Japanese). In T. Beppu, A. Seino, & K. Hotta (Eds.), Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Hayakawa, M., Yoshida, Y., & Iimura, Y. (2004, May). Selective isolation of bioactive soil *Actinomycetes* belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 973–981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02230.x>
- Hong, K., Gao, A., Xie, Q., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H., Yu, H., Li, J., Yao, X., Goodfellow, M., & Ruan, J. (2009). *Actinomycetes* for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24-44.
- Jama-Kmiecik, A., Sarowska, J., Frej-Mądrzak, M., Choroszy-Król, I. (2020). Extraintestinal pathogenic *E. coli* infections: The spread of antibiotic resistance through the food products. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 74, 399-405
- Janardhan A, Arthala P *et al*: Production of Bioactive Compounds by *Actinomycetes* and Their Antioxidant Properties. *Biotechnology Research International*. Mar. 2014; 1–8.
- Janardhan, A., & Arthala, P. et al. (2014). Production of bioactive compounds by *Actinomycetes* and their antioxidant properties. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–8.
- Jeya, K., Kiruthika, K., & Veerapagu, M. (2013). Isolation of antibiotic producing *Streptomyces* sp. from soil of Perambalur district and a study on the antibacterial activity against clinical pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*, 5, 1207–1211.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo (2002). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : "The other bad *E coli* ""." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139(3): 155-162.
- Kalyani, B. S., Krishna, P., & Sreenivasulu, K. (2019, November). Screening and identification of novel isolate *Streptomyces* sp., NLKPB45 from Nellore costal region for its biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1655–1660. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.027>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140
- Kaur, P., Chakraborti, A., Asea, A. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 1-10
- Kawato, M., & Shinobu, R. (1959). A simple technique for the microscopical observation. *Memoirs of the Osaka University Liberal Arts and Education*, 8, 114.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- Kim, S. B., Lonsdale, J., Seong, C. N., & Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic *Actinomycetes* with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 107–116.
- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries *Actinomycétales* productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. [Thèse de Doctorat, Microbiologie Appliquée, Université Mentouri-Constantine, Algérie].
- Kumar, R. R., & Jadeja, V. J. (2016, May 10). Isolation of *Actinomycetes*: A Complete Approach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 606–618. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.062>
- Kurkdjian, P. M., Bingen E. (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli*
- Lamari, L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'*Actinomycètes*, *Saccharothrix algeriensis* (Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou).
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology* (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1965). Classification des *Actinomycètes* aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur*, 108, 662–673.
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Between pathogenicity and commensalism*, 3-32.
- Lee, J. Y., & Hwang, B. K. (2002). Diversity of antifungal *Actinomycetes* in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(5), 407–417.
- Li, H., & Gänzle, M. (2016). Some like it hot: heat resistance of *Escherichia coli* in food. *Frontiers in microbiology*, 7, 221985.
- Linagarppa, Y., & Lockwood, J. (1962). Chitin media for selective isolation and culture of *Actinomycetes*. *Phytopathology*, 52(4), 317-323.
- Lingappa, Y., AND J. L. Lockwood. 1961. A chitin medium for isolation, growth and maintenance of *Actinomycetes*. *Nature* 189:158-159.
- Logue, C. M., Wannemuehler, Y., Nicholson, B. A., Doetkott, C., Barbieri, N. L., & Nolan, L. K. (2017). Comparative analysis of phylogenetic assignment of human and avian ExPEC and faecal commensal *E. coli* using the Clermont phylogenetic typing methods and its impact on avian pathogenic *E. coli* classification. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2-9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021, October 12). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Martin, S. M., & Bushell, M. F. (1996). Effect of hyphal morphology on bioreactor performance in antibiotic producing *Saccharopolyspora erythraea* culture. *Microbiology*, 142, 8.
- Montet, M. (2009). Contamination des aliments par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (stec) en France, et importance de l'acide-résistance de la souche [Thèse, École Pratique des Hautes Études]. p. 72.)
- Mast, Y., & Stegmann, E. (2019, July 29). *Actinomycetes*: The Antibiotics Producers. *Antibiotics*, 8(3), 105. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030105>.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y., & Hayakawa, M. (2007). A new enrichment method for the selective isolation of *streptomycetes* from the root surfaces of herbaceous plants. *Actinomycetologica*, 21(2), 66-69.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., ... Coates, R. C. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 625–631. [CrossRef].
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14, 60. [CrossRef]
- Meklat, A., Sabaou, N., Bouras, N., Zitouni, A., Spröer, C., Klenk, H.-P., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2012). A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis*.
- Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D. E. (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of *Actinomycete* isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 438–445.
- Mobolaji, F. A., & Olubukola, O. B. (2012). Taxonomy and Ecology of Antibiotic Producing *Actinomycetes*. *African Journal of Agricultural Research*, 7(15), 2255-2261.
- Naikpatil, S. V., & Rathod, J. L. (2011). Selective isolation and antimicrobial activity of rare *Actinomycetes* from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(10), 48-53.
- Nonomura, H., & Hayakawa, M. (1988). New methods for the selective isolation of soil actinomycetes. In Y. Okami, T. Beppu, & H. Ogawara (Eds.), *Biology of Actinomycetes '88* (pp. 288–293). Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- O'Donnell, A. G. (1988). Recognition of novel *Actinomycetes*. In M. M. Goodfellow, S. T. Williams, & M. Mordarski (Eds.), *Actinomycetes in biotechnology* (pp. 69–88). London, United Kingdom: Academic Press.
- Olson, B. H., & Ratzkin, B. (1999). Morphological differentiation and antibiotic production in *Actinomycetes*: Solid vs. liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 682-689.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pasqua, M., Michelacci, V., Letizia Di Martino, M., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., Prosseda, G. (2017). The Intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12.
- Porter, J. N., Wilhelm, J. J., & Tresner, H. D. (1960, May). Method for the Preferential Isolation of *Actinomycetes* from Soils. *Applied Microbiology*, 8(3), 174–178. <https://doi.org/10.1128/am.8.3.174-178.1960>.
- Qinyuan, L., Xiu, C., Yi, J., & Chenglin, J. (2016). Morphological Identification of *Actinobacteria*. In D. Dharumadurai & J. Yi (Eds.), *Actinobacteria* (pp. 59–86). Rijeka, Croatia: IntechOpen.
- Raja, A., & Prabakaran, P. (2011, March 15). *Actinomycetes* and Drug-An Overview. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(2), 75–84. <https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.75.84>.
- Rapilly F. (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*. 19,numérohors série.
- Reghioia, S., Boughachiche, F., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., & Boulahfrouf, A. (2008). Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'*Actinomycètes* isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sciences & Technologie C*, (28), 59-64.
- Ricard. C. (1993). Identification des facteurs de mauvais pronostic des Infections par enterobacteries productrices de betalactamases a spectre etendu : etude retrospective dans un centre hospitalier regional. Thèse de doctorat. Marseille, France.
- Rothrock, C., & Gottlieb, D. (1981). Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *The Journal of Antibiotics*, 34(7), 830-835.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Rosai, J. (2011). *Rosai and Ackerman's surgical pathology* (10th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., Lefebvre, G., & Germain, P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien : source d'actinobactéries rares productrices d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9, 147-153.
- Sabaou, N., Hacène, H., Bennadji, A., Bennadji, H., & Bounaga, N. (1992). Distribution quantitative et qualitative des *Actinomycètes* dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(10), 1066-1073.
- Stocks, P., & Thomas, G. (2001). Mycelial morphology and antibiotic production in submerged culture. *Biotechnology Advances*, 19(5), 391-396.
- Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S. (2020). Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing *Actinomycetes* from soil samples. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-7.
- Saravana Kumar, P., Duraipandiyar, V., & Ignacimuthu, S. (2014, July 8). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 30(9), 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.05.006>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Schmidt, R., Ulanova, D., Wick, L. Y., Bode, H. B., & Garbeva, P. (2019). Microbe-driven chemical ecology: past, present and future. *ISME Journal*, 13, 2656-2663. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0469-x>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966, July 1). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
- Shomura, T., Yoshida, T., Amano, S., & Nosoh, Y. (1979). Antibiotic production by microorganisms grown on solid medium. *Journal of Fermentation Technology*, 57(5), 445-453.
- Stanek, R. J., Maher, M. B., Norton, N. B., & Mufson, M. A. (2011). Emergence of a unique penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 35 strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 400-404.
- Tang, Y., & Persing, D. (1999). Molecular detection and identification of microorganisms. In: *Manual of clinical microbiology*, 7th edn. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 215-244.
- Tayeb-Cherif, Y. M., Ghoribi, L., & Menacer, I. (2016). L'activité antibactérienne des huiles essentielles du Rosmarinus officinalis et de Origanum vulgare sur la bactérie *E. coli*.
- Tenebro, C.P., Trono, D.J.V.L., Vicera, C.V.B., Sabido, E.M., Ysulat Jr, J.A., Macaspac, A.J.M., et al. (2021). Multiple strain analysis of *Streptomyces* species from Philippine marine sediments reveals intraspecies heterogeneity in antibiotic activities. *Scientific Reports*, 11(1), 17544. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96886-4>
- Theilleux, J. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. In J. Y. Leveau & M. O. Bouix (Eds.), *Microbiologie industrielle* (Ch. 6, pp. 425-481). TEC & DOC-Lavoisier.
- Tian, X., Cao, L., Tan, H., Han, W., Chen, M., Liu, Y., & Zhou, S. (2007). Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microbial Ecology*, 53(4), 700-707.
- Tortorano, A. M., Cabrini, E., & Viviani, M. A. (1979). Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques: Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale*, 8, 69-74.
- Toumatia, O. (2015). Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé (Doctoral dissertation, École Normale Supérieure de Kouba, Alger).
- Tsao, P. H., Leben, C., & Keitt, G. W. (1960). An enrichment method for isolating *Actinomycetes* that produce diffusible antifungal antibiotics. *Phytopathology*, 50(1), 88-89.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Ullah, I., Arshad, M. M., Chuadhry, I. J. M., Noureen, U., Jadoon, W. A., & Jadoon, M. A. (2012). *Actinomycetes* screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Records of the Zoological Survey of Pakistan*, 21, 10-13.
- Valan, A. M., & Galal, A. S. (2016). Hypersaline *Actinomycetes* and Their Biological Applications. Dans *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(9), 546–558.
- 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, 392–416.
- Van Dijk, W. C., Verbrugh, H. A., Tol, M. E., Peters, R., & Verhoef, J. (1979). Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infection and Immunity*, 25(2), 603-609.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., et al. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 463–464. [CrossRef]
- Whelan, S., Lucey, B., Finn, K. (2023). ropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*, 11(2169), 1-32.
- Williams, S. T., & Vickers, J. C. (1988). Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. In Y. Okami, T. Beppu, & H. Ogawara (Eds.), *Biology of Actinomycetes* (pp. 165–270). Japan Scientific Societies Press.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., & Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (1st ed., Vol. 4, pp. 2452–2492). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Zimmerman, W. (1980). Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13, 199–130.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabou, N. (2005). *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, 156(9), 984-993.

Webographie

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/entero.html>. (consulté le 2 /06 / 2024)

<https://fac.umc.edu.dz> (consulté le 2 / 06 / 2024)

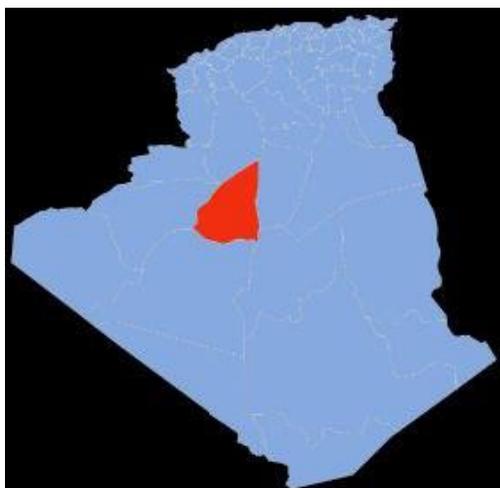
<https://urlz.fr/jMjK> (consulté le 2 / 06 / 2024)

<https://urlz.fr/qVCQ> (consulté le 2 / 06 / 2024)

ANNEXES

Annexe 01 :

Le site de prélèvement de l'échantillon de sol



Wilaya de timimoun

Milieus de culture utilisés :

Milieu chitine :

Chitine:2g; K_2HPO_4 : 0.35g ; KH_2PO_4 :0.15g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.2g ;NaCl:0.3g;
 $CaCO_3$:0.02g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$:10mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$:1mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$:1mg; agar: 18g ;eau
 distille:q.s.p.1000ml.PH=7.2.

Milieu ISP2:

Extrait de levure:4g ;extrait de malt:10g; glucose:4g ;eau distille q.s.p:1000ml; agar:20g
 .PH=7.2.

Milieu Bennett:

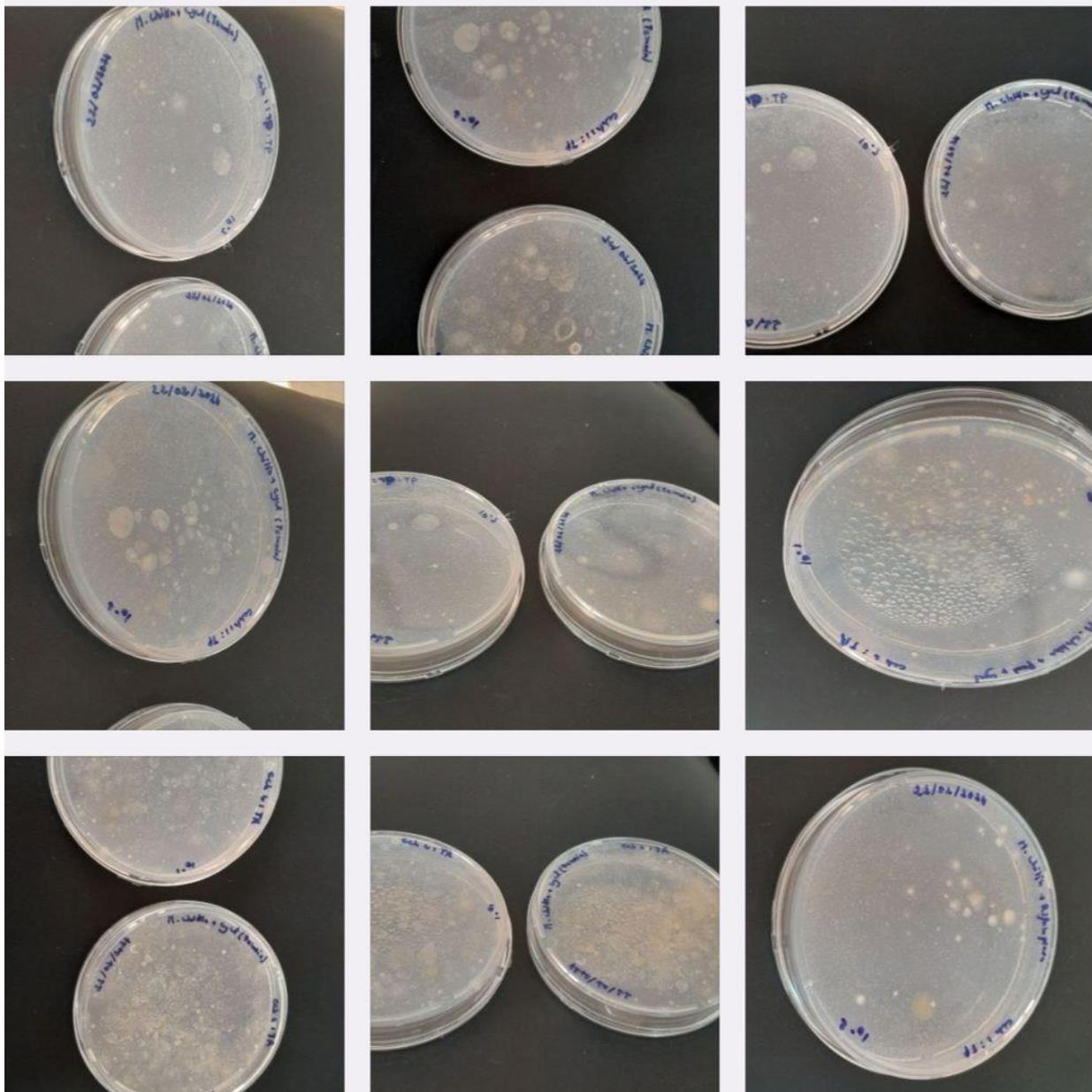
Glucose:10g ;peptone :2g ;extrait de levure :1g ;extrait de viande:1g ; agar:20g ; eau
 distille:q.s.p1000ml ; ph=7,2

Milieu muller hinton:

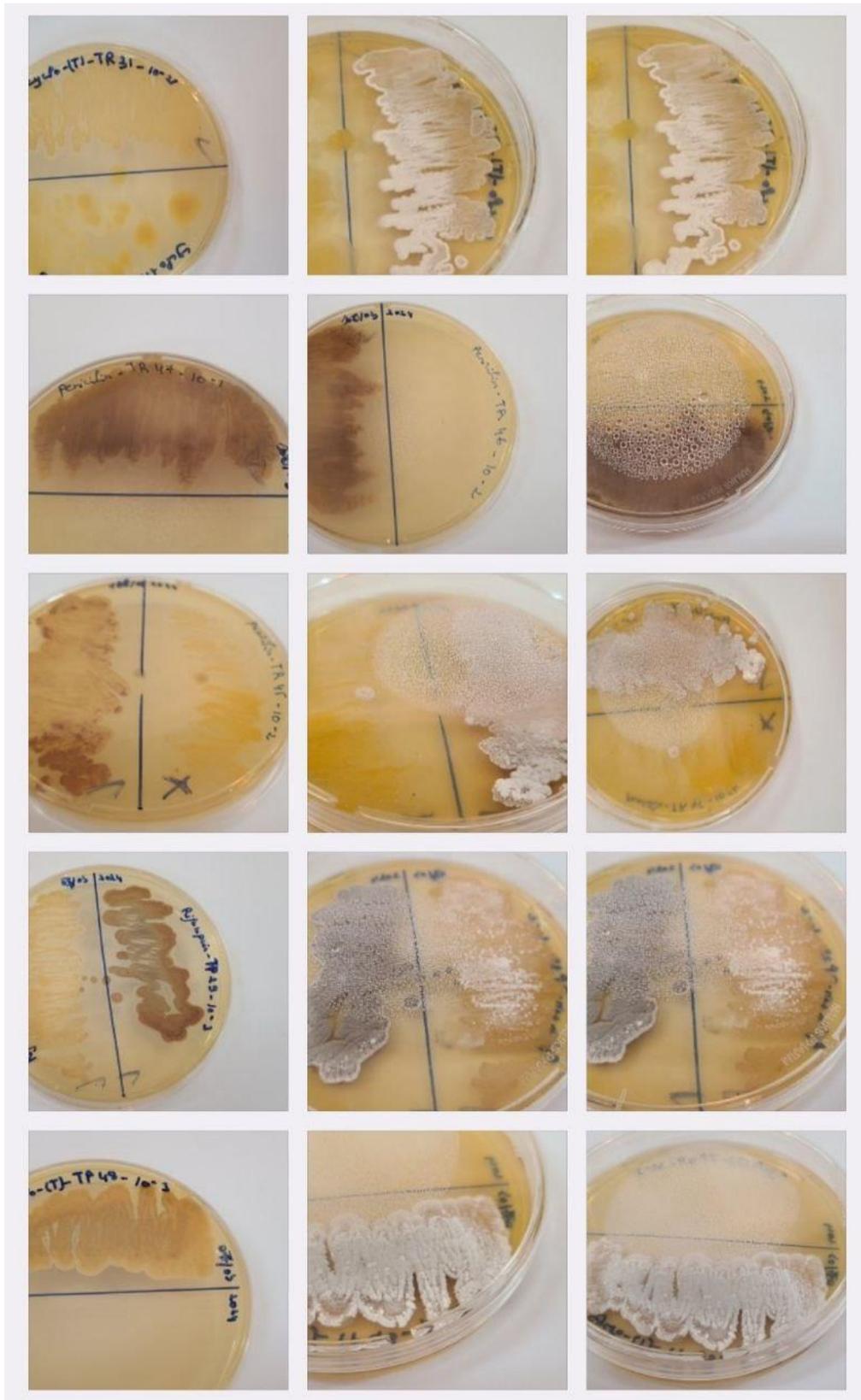
Peptone caseine:17.5g
 Amidon de maïs :1.5g
 Agar:17g
 Eau distille:1000ml

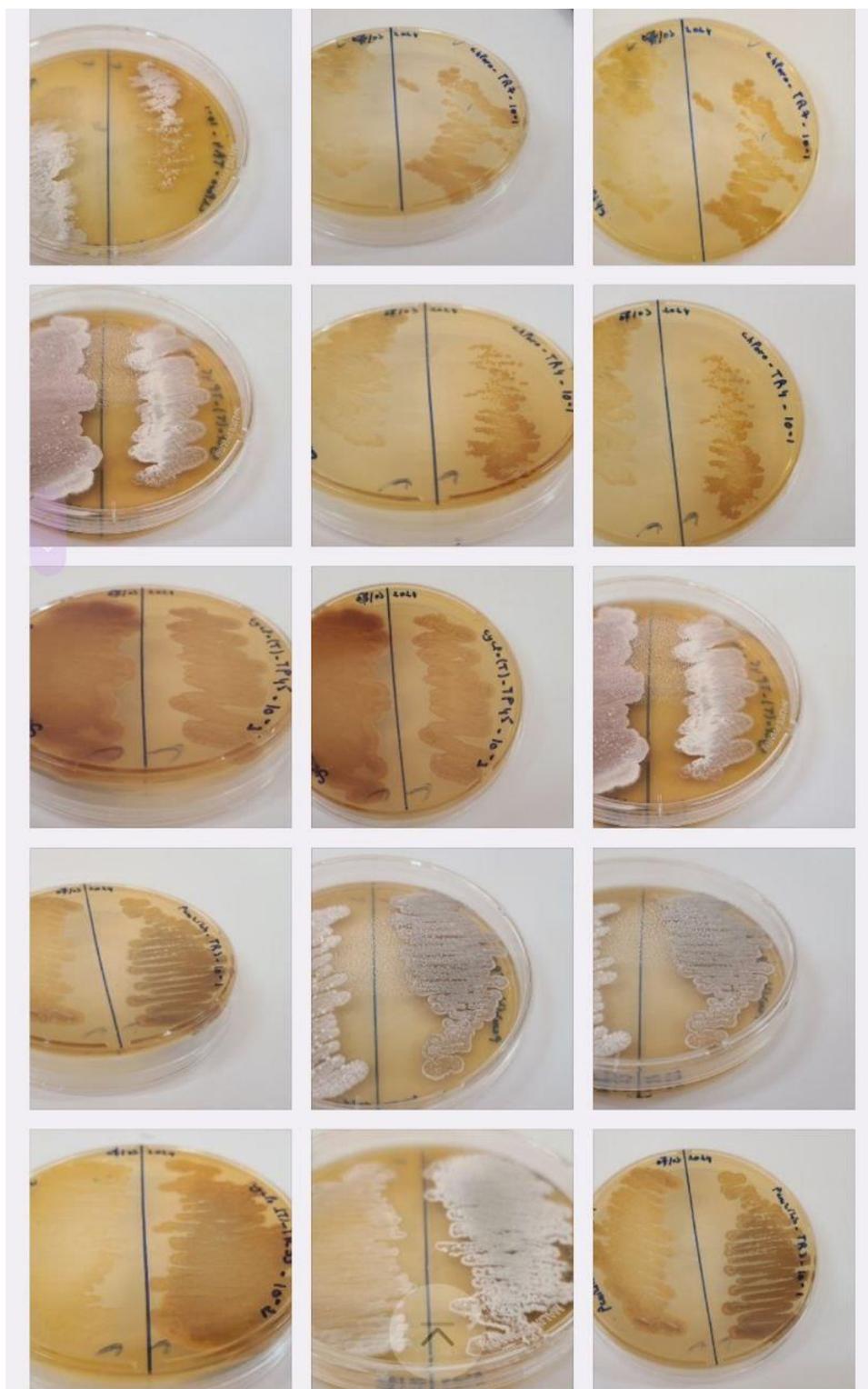
PH:7.2

Annexe 02 :

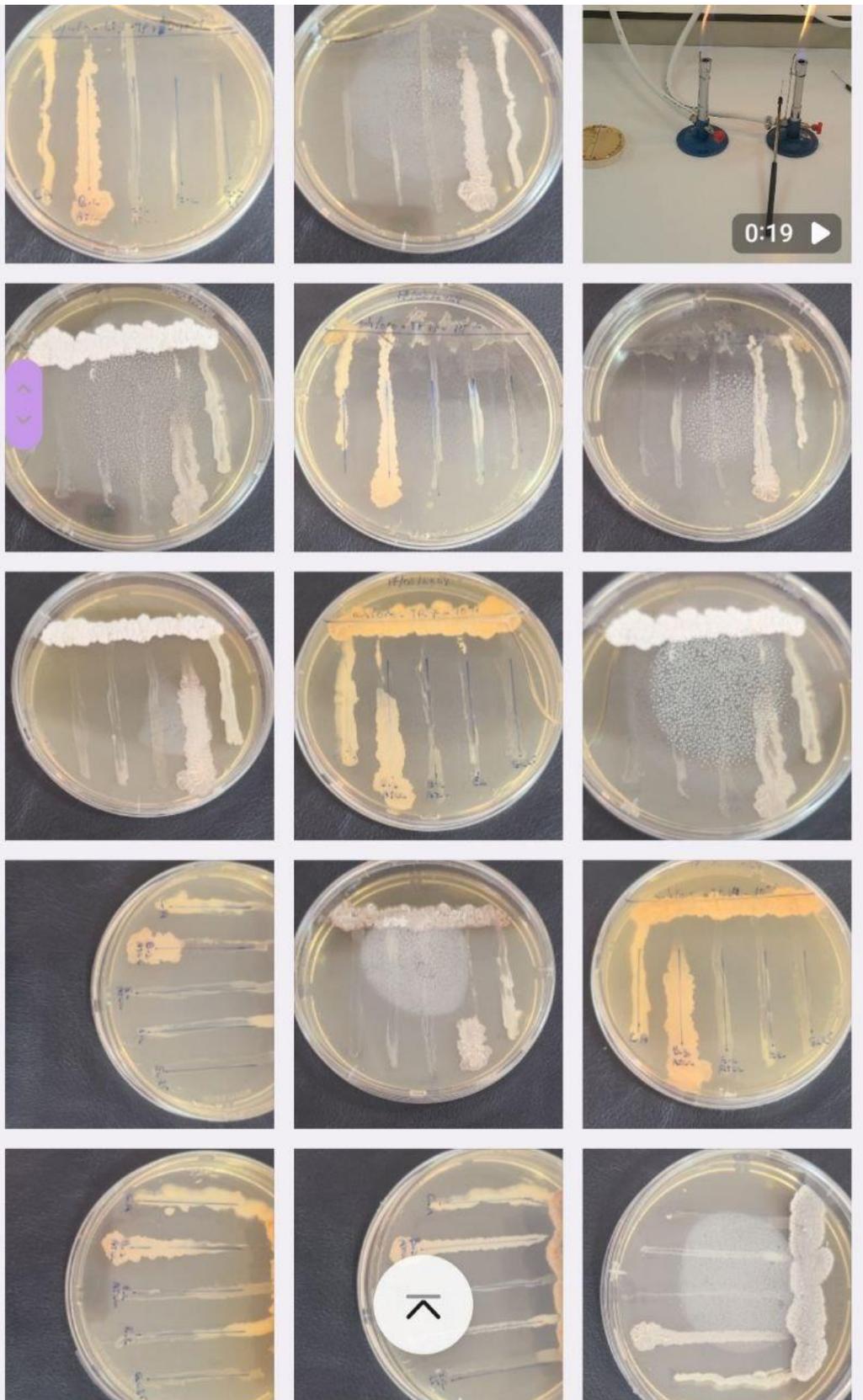


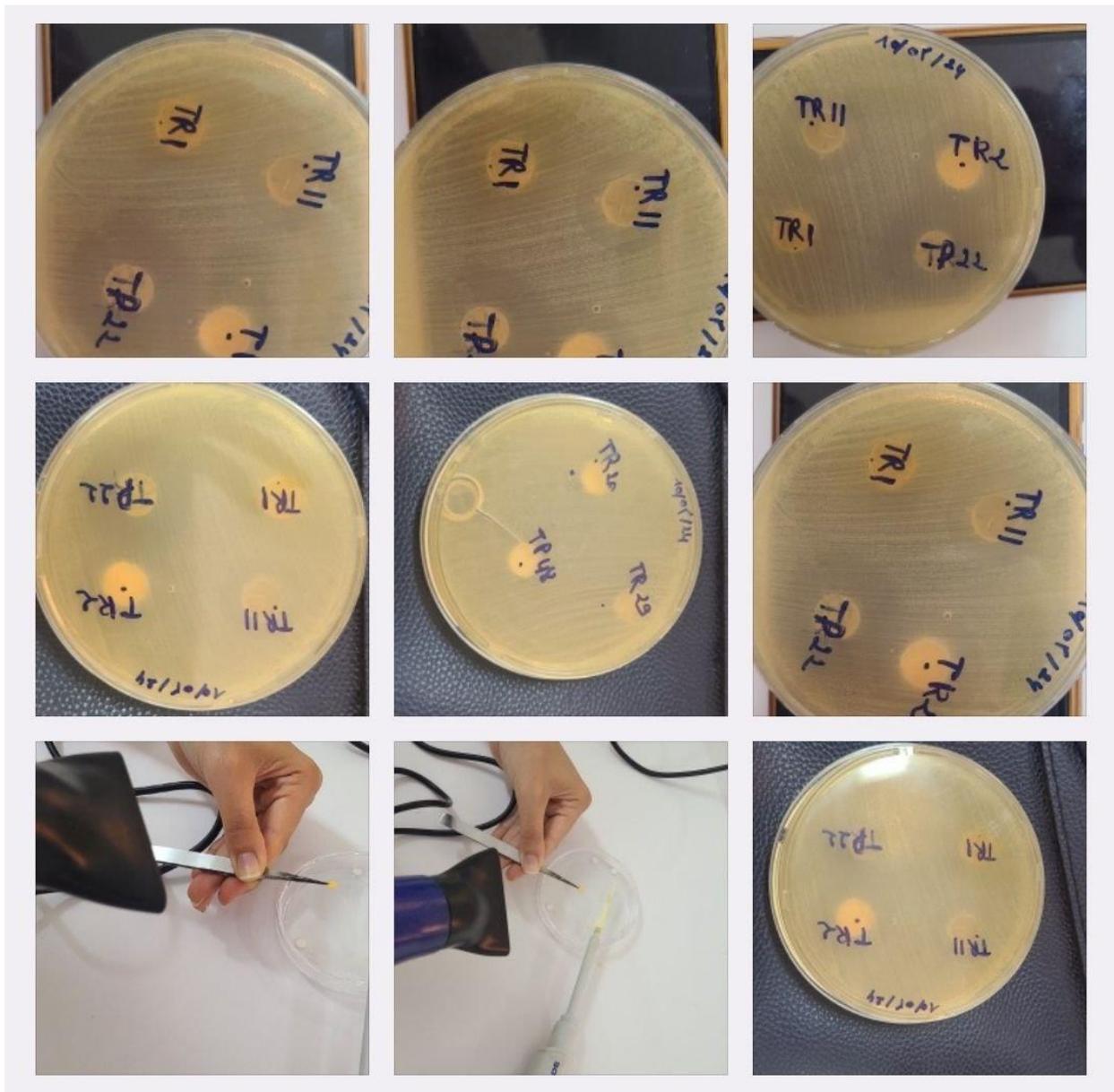
Quelques photos de l'isolement des colonies d'actinobactéries sur milieu chitine





photos de purification des colonies d'actinobactéries.





Activité de quelques souches d'actinobactéries (technique de cylindres d'agar).

بحث في أترية صحراوية عن بكتيريا هيفية نشطة ضد *Escherichia coli*

ملخص

يهدف العمل المنجز إلى عزل بكتيريا هيفية منتجة لمضادات حيوية ضد *Escherichia coli* من أترية صحراوية. ولهذا اخترنا عينتين من التربة مأخوذتين من واحة نخيل وإقليم "رق" بولاية تيمون. باستخدام وسط الكيتين مع أو بدون إضافة مضادات حيوية انتقائية، تمكنتنا من عزل عدد كبير من البكتيريا الهيفية. تم اختيار 100 عزلة على أساس معايير مورفولوجية، وبعد تنقيتها تحصلنا على 74 عزلة فقط. تم اختبار هذا العدد بطريقة الخطوط المتقاطعة ضد سلالات *E. coli* على الوسط ISP2 حيث أظهرت 3 عزلات نشاط ضد *E. coli* هذه العزلات هي: TR7 و TR14 و TP17 أظهرت دراستها المورفولوجية احتمال انتماء TR7 و TR14 إلى جنس *Streptomyces* بينما TP17 إلى جنس *Streptoverticillium*. تم تسجيل نتائج سلبية بخصوص حركة إنتاج المضادات الحيوية في الوسط السائل، بينما أظهرت نتائج هذه الحركة على الوسط الصلب أقصى نشاط في اليوم الثاني من التحضين بقطر تثبيط 28 ملم للعزلة TR14 و 23 ملم للعزلة TR7، كما أظهر اختبار التضاد الحيوي للمستخلص الميثانولي للوسط الصلب قطر تثبيط بلغ 8 ملم.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الهيفية، *Escherichia coli*، المضادات الحيوية، التربة الصحراوية، النشاط ضد البكتيري

Recherche dans les sols sahariens d'actinobactéries à activité contre *Escherichia coli*

Résumé

Le travail effectué a pour objectif l'isolement, à partir de sols sahariens, d'actinobactéries productrices d'antibiotiques contre *Escherichia coli*. Pour cela, nous avons choisi deux échantillons de sol prélevés à partir d'une palmeraie et d'un reg de la wilaya de Timimoune. En utilisant un milieu à base de chitine, additionné ou non d'antibiotiques sélectifs, nous avons pu récolter un grand nombre d'actinobactéries. Ensuite, 100 isolats ont été sélectionnés en se basant sur des critères morphologiques, et après leur purification, nous en avons obtenu que 74. Le test de ce nombre par la méthode des stries croisées contre des souches d'*E. coli* sur milieu ISP2 a révélé que 3 isolats ayant une activité contre *E. coli*. Ces isolats sont TR7, TR14 et TP17. Leur étude morphologique a montré l'appartenance probable de TR7 et TR14 au genre *Streptomyces* tandis que, TP17 au genre *Streptoverticillium*. Les résultats de la cinétique de production sur milieu liquide étaient négatifs alors que, ces résultats sur milieu solide ont montré une activité maximale au 2^e jour d'incubation avec un diamètre d'inhibition de 28mm pour l'isolat TR14 et 23mm pour l'isolat TR7. Le test d'antibiogramme de l'extrait méthanolique du milieu solide a révélé un diamètre d'inhibition de 8 mm.

Mots clés : Actinobactérie, *Escherichia coli*, Activité antimicrobienne, Sol saharien, Antibiotique.

Search in Saharan soils for actinobacteria active against *Escherichia coli*

Abstract

The work aims to isolate, from Saharan soils actinobacteria producing antibiotics against *Escherichia coli*. For this purpose, we chose two soil samples taken from a palm grove and from a reg in the wilaya of Timimoune. By using a chitin medium, with or without the addition of selective antibiotics, we were able to isolate a large number of actinobacteria. Then, 100 isolates were selected based on morphological criteria, and after their purification, we obtained only 74. The test of this number by the cross-streak method against strains of *E. coli* on ISP2 medium revealed only 3 isolates with activity against *E. coli*. These isolates are TR7, TR14 and TP17. Their morphological study showed the probable belonging of TR7 and TR14 to the genus *Streptomyces* while, TP17 to the genus *Streptoverticillium*. The results of the production kinetics on liquid medium were negative whereas, these results on solid medium showed maximum activity in the 2nd day of incubation with an inhibition diameter of 28mm for isolate TR14 and 23mm for isolate TR7. The antibiogram test of the methanolic extract of the solid medium revealed an inhibition diameter of 8mm.

Key words: Actinobacteria, *Escherichia coli*, Antimicrobial activity, Saharan soils, Antibiotics.

Faculté des sciences de la nature et
de la vie et sciences de la terre

جامعة غرداية

كلية علوم الطبيعة والحياة
وعلوم الأرض

Département de Biologie



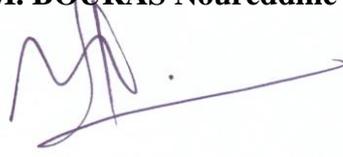
قسم البيولوجيا

Université de Ghardaïa

Ghardaïa le: 10/07/2024

Rapport : Correction du mémoire

Enseignants Chargés de la correction :

Nom et prénom l'examineur 1 et Signature	Nom et prénom de l'examineur 2 et Signature	Nom et prénom de président et Signature
M. IDER Soufian 	/	M. BOURAS Noureddine 

Thème : **Recherche dans des sols sahariens d'actinobactéries à
activité contre *Escherichia coli***

Après les corrections apportées au mémoire, les étudiantes :

ZAGUI Houda et BEN REMILI Fattoum safa

sont autorisées à déposer le manuscrit au niveau du département.

Signature du Président

