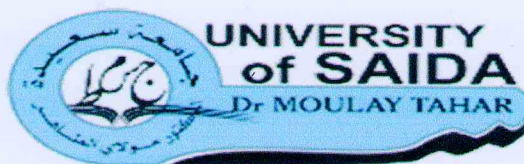


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université « Dr. Moulay Tahar » de Saïda
FACULTE DES SCIENCES

Laboratoire de Biotoxicologie Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes



Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Biologie
Option : microbiologie appliqué

Présenté par

M^{lle} : kaddour wafaa

et

M^{lle} : kesraoui salima

Recherche dans le sol de la région de Naama des
actinomycètes productrices de molécules
antibactériennes

Soutenu le 18/07/2019

Devant le jury:

Mr. Sitayeb T.

M.C.A. Université de Saïda

Président

Mr. Benreguieg M.

M.C.A. Université de Saïda

Promoteur

Mr. Adli D.H.

M.C.A. Université de Saïda

Examineur

Année universitaire 2018/2019



Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de microbiologie de l'université de Saida Dr. Moulay tahar.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur «Benreguiég .M» professeur à l'Université Dr. Moulay tahar Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur pour avoir dirigé ce travail, pour son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral lors de la Réalisation de ce travail.

Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

*Nos remerciements s'adressent, également, aux membres du jury Mr **Si Tayab**, et Mr. **Adli** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions*

Nos remerciements s'adressent également s à tous les enseignants du département de Microbiologie A leur aide pendant tout ces année .

Je tiens à remercier aussi les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, ainsi que toutes les personnes qui ont participé à l'avancée de mon travail et à la réalisation des études expérimentales.

Enfin nous remercions nos familles : nos parents pour leurs soutiens sans faille, parfois inquiets mais toujours compréhensifs, tout au long de ces années.

Pour tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire d'une manière directe ou indirecte.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père décédé, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études

J'aurais tant aimé que vous soyez présents

Que dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

A ma mère et mes grands parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez porté depuis mon enfance et j'espère

Que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux Tant formules, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie inch'lah

A ma tante qui m'a soutenue et encouragé durant ces années d'études qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon adorable frère walid et ma chère et unique sœur kenza.

Tous mes chers amis qui ont été toujours avec moi avec leurs aides et soutiens

A ma Binôme «wafaa» qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II microbiologie 2018/2019

salima.



Dédicace

Avant tout, je remercie 'Dieu' de m'avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail ; que je dédie :

À ceux que j'aime Ma mère et mon père sans eux je n'aurai pas abouti à ce stade d'étude, que Dieu m'aide à les honorer, les servir et les combler.

À ceux que j'aime et que j'adore : Mes sœurs Fatima et Aya d'où je m'inspire le courage Mon frère Abd El moemin,

A Mes tantes et mes oncles ; À ma binôme Salima et toute sa famille.

À tous mes amis

À toute la promotion de microbiologie appliquée sans exception.

À tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, à tous ceux qui m'aiment.

Wafaa

Liste des figures

Figure 01 : une colonie du genre <i>streptomyces</i> sur milieu solide.	05
Figure 02 : classification phylogénique des Actinobacteria ,basée sur les séquences du gène codant d'ARNt.	09
Figure 03 : cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	11
Figure 04 : morphologie des différentes chaînes de spores chez les streptomycètes.	13
Figure 05 : Forme et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes.	14
Figure 06: Quelques mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries.	31
Figure 07 :les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries (conjugaison ,la transformation, la transduction)	33
Figure 08 : mise en évidence de l'activité d'antibiotique de l'isolat d'actinomycètes des cylindres d'agar.	40
Figure 09 : Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM.	46
Figure 10 : mode opératoire de la microplaque .	48
Figure 11: Aspect de différents échantillons du sol .	51
Figure 12 : Isolements de diverses souches d'actinomycètes.	53
Figure 13: purification de la souche A ₁ W	54
Figure 14: Résultat de la coloration de gram chez la souche A ₁ W.	56

Figure 15: resultat du test catalase chez la souche actinomycétale A ₁ W.	58
Figure 16 : la structure du complexe IV.	59
Figure 17 : L'ordre de transfert des électrons dans le complexe IV.	59
Figure 18 : Résultat du test oxydase chez la souche actinomycétale A ₁ W.	60
Figure 19: inhibition des souches test par nos isolats d'actinomycètes .	62
Figure 20 : l'activité antibactérienne par la méthode des disques chez les souches d'actinomycètes.	64
Figure 21 : inhibition des bactéries test par la souche A ₁ W.	65
Figure 22 : les résultats des zones d'inhibition obtenus a partir de la technique des puis.	66
Figure 23 : observation de l'émigration de molécule bioactive sous l'ultraviolet.	67
Figure 24 : résultats de la bioautographie contre les deux souches test.	68
Figure 25 : histogramme obtenus autour des zones d'inhibition formée autour des puis de la purification des fractions actives séparée.	69
Figure 26 : résultat de la purification des fraction active séparées par CCM.	70

Liste des tableaux

Tableau 01 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents.	06
Tableau 02 : répartition des actinomycètes dans la nature.	07
Tableau 03 : principaux antibiotiques élaborés par les espèces de streptomyces.	17
Tableau 04 : Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes.	21
Tableau 05 : Classification des Antibiotique d'après leur structure chimique.	24
Tableau 06 : les différentes familles d'antibiotique.	25
Tableau 07 : résumé des mécanismes d'action des Antibiotique .	27 - 28
Tableau 08 : caractéristique des souches testées.	39
Tableau 10 : mode opératoire des différents dilutions pour réaliser la technique des puis.	44
Tableau 11 : caractéristiques des échantillons des sols prélevés	51
Tableau 12 : les valeurs de PH des échantillons du sol.	52
Tableau 13 : observation d'aspect macroscopique de diverses souches d'actinomycètes.	54
Tableau 14 : Résultats de la coloration de Gram chez différents souches.	55
Tableau 15 : Résultats de différent caractère biochimique des souches actinomètres.	57
Tableau 16 : résultats de test de l'activité antimicrobien de diverses colonies actinomycètes.	61

Tableau 17 : les résultats des zones d'inhibition obtenus a partir de la technique des puis. 65

Tableau 18 : les résultats obtenus autour des zones d'inhibition formée autour des puis de la purification des fractions actives séparée . 68

plan de recherche

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les actinomycètes

Généralités.

Historique.

Physiologie et écologie.

La Similitudes.

- Similitude entre les Actinomycètes et les champignons.
- Similitude entre Actinomycètes et bactéries.

Milieux de culture des actinomycètes.

Distribution dans la nature.

Morphologie.

Cycle de développement.

Classification des actinomycètes.

Identification des actinomycètes.

- Identification morphologique.
- Identification chimio-taxonomiques des actinomycètes.
- Identification génomique des actinomycètes.

Propriétés métaboliques des Actinomycètes.

- Production de l'acide indole acétique (AIA).
- Production d'enzymes.
- Production de sidérophores.
- Production d'antibiotiques.
- Solubilisation du phosphore.
- Dégradation de la lignine.

Autres intérêts.

Importance des Actinomycètes.

- Importance en agronomie.
- Importance en biotechnologie.
- Importance en écologie.

Chapitre II : principaux actifs des actinomycètes

Substances bioactives produites par les actinomycètes.

Antibiotiques.

Historique.

Définition des antibiotiques.

Modes d'action des antibiotiques.

- Action sur la paroi bactérienne.
- action sur structure de la membrane.
- action sur la synthèse protéique/

Action sur la synthèse de l'ADN.

Les familles des ATB

- Pénicilline.
- Céphalosporine.
- Les carbapénèmes.
- Les cyclines.
- Les aminosides.
- Les macrolides.
- Les quinolones.

Production des antibiotiques.

Extraction des antibiotiques.

L'antibiorésistance.

Enzymes.

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

Objectif de travail.

Matériel.

Matériel analytique.

Matériel biologique.

- Microorganisme test.
- Germes cibles.

Isolement et purification des actinomycètes.

- Echantillonnage.
- Mesure de PH.
- Préparation de la suspension de sable.
- Préparation des dilutions décimales.
- Prélèvement des colonies d'actinomycètes.
- Isolement sélective des actinomycètes.

Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar.

L'étude macromorphologique.

Coloration de Gram.

L'étude biochimique.

- La recherche de catalase.
- La recherche de l'oxydase.

Conservation des souches d'actinomycètes.

Production et extraction de métabolites secondaires.

Mis en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puis.

Mis en évidence de la technique de séparation par CCM.

Bioautographie des molécules bioactives.

Méthode Purification des fractions actives séparées par CCM.

Mis en évidence de l'activité anti - biofilm de la souche A1W.

Chapitre IV : Résultat et discussion

Mesure du pH des échantillons.

Caractéristiques des échantillons du sable.

Prétraitement du sable.

Isolement des Actinomycètes.

Identification des souches d'actinomycètes.

- Etude morphologique.
- Observation microscopique.
- Etude biochimique.

Mise en évidence de l'activité antibactérienne.

Caractérisation de la souche A₁W.

Résultat de l'extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide.

Résultats obtenus a partir de la méthode des puis.

La chromatographie sur couche mince.

Résultats de Bioautographie.

Résultat de la purification des fractions actives séparées par CCM.

Activité anti –biofilms.

Conclusion et perspectives.

Annexes.

Références bibliographiques.

Introduction générale

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme a utilisé des micro-organismes pour préparer des boissons, des aliments, des médicaments, bien que l'existence de ceux-ci n'ait été reconnue et étudiée au XIXe siècle.

Au siècle dernier, les micro-organismes, à mesure de leur découverte, se sont révélés à l'homme surtout comme ses pires ennemis, menaçant sa santé, son alimentation, ses biens. Ils le demeurent dès lors qu'existent des défaillances humaines d'hygiène, de prévention. Avec le progrès de connaissance, il paraît que les micro-organismes peuvent aider l'homme en agriculture, dans l'environnement, dans les industries.

Dans ce cadre en parle de réalisation telle que la biosynthèse de substances à visé thérapeutique (les antibiotiques,...) ou des vaccins antiviraux, révolutionnent certains traitements en médecine tout ça grâce au micro-organisme bénéfique qui sert à la production, des substances chimiques qui ont une action spécifique avec un pouvoir destructeur sur les micro-organismes ciblés (pathogène).

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde, mais leur efficacité est confrontée à des préoccupations cliniques graves, surtout en raison de l'émergence de bactéries résistantes (Maestro et Sanz, 2007), et suite à ce problème les chercheurs se sont orientés vers l'exploitation de nouvelles niches écologiques notamment les milieux salins et hyper salins dans le but de trouver de nouvelles souches productrices de ces substances (Blunt et al., 2006). Ont rapporté que les diverses bactéries halotolérantes et halophiles sont une source précieuse pour la découverte de composés bioactifs ayant des structures uniques telle que les actinomycètes.

Introduction générale

Ces derniers sont un groupe de bactéries filamenteuses, septées et ramifiées en mycélium de structure analogue à celle des champignons auxquels elles étaient autre fois assimilées. Mais malgré leur aspect morphologique de type fongique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryote et confirment leur classification parmi les bactéries. **(BOUSSEBOUA H, 2002)**

Elles ont une distribution très large dans la nature : air, aliment, sol. Ils jouent un rôle important dans les cycles biologiques et ont la particularité, pour un grand nombre d'entre eux, de produire des antibiotiques et des enzymes protéolytiques utiles de nombreux domaines **(LECTERCH et al. 1983)**

Les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production des antibiotiques d'origine bactérienne, notamment les Streptomyces qui sont à l'origine de la production de 70% des antibiotiques commercialisés et durant ces dernières années, plusieurs auteurs affirment qu'il faut s'orienter même vers l'exploitation des actinomycètes rares afin de s'alimenter en substances nouvelles. **(Berdy, 2005)**

Dans cette Expérience, on est intéressé à la recherche de nouvelles molécules bioactives isolés à partir des actinomycètes comme alternative à l'antibiothérapie. Cette étude a pour objectif essentiel de tester l'activité antimicrobienne (antibactérien) des substances produites par les actinomycètes des souches isolées à partir du sable saharien dans la région de Naàma.

L'objectif de notre travail c'est de :

- Isolement des actinomycètes à partir des échantillons du sable prélevés de différents endroits
- Purification et identification des souches isolées.
- la détection du pouvoir antimicrobien des souches isolées.

Introduction générale

- Extraction et purification des antibiotiques.

Généralités

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « Aktis » qui veut dire rayon et « mykes » qui veut dire champignon, Ils ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoïdes : filaments ramifiés, organes de sporulation...etc. Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques, permettent de les classer parmi les procaryotes. Ceci est illustré dans leur nom, Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons, aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les procaryotes. Cependant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons. **(Perry et al., 2004)**

Les actinomycètes, souvent décrit comme un groupe distinct par les microbiologistes, ce sont en fait des eubactéries, à coloration de Gram positive, à structure végétative de type mycélienne, septée, ramifiée et de haut coefficient de Chargaff (% CG), généralement compris entre 60 et 75 %.

Elles sont principalement, aérobies mais certains genres peuvent être des anaérobies facultatifs, voire même des anaérobies strictes (Actinomyces), hétérotrophes, saprophytes et généralement immobiles, ce groupe de bactéries inclut aussi des agents pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes comme *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose humaine), *Mycobacterium bovis* (tuberculose bovine), *Corynebacterium diphtherie* (diphthérie) et *Streptomyces scabies* qui provoque la maladie de la gale chez la pomme de terre et la betterave.

Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent, sans ambiguïté, parmi les procaryotes.

Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité aux actinophages et aux antibactériens, qui confirment le bien-fondé de la classification des actinomycètes parmi les bactéries. Leur analyse génomique a par la suite confirmé cette classification.

Les actinomycètes sont généralement mésophiles (température optimale de croissance est entre 25 à 30 °C), d'autres sont thermophiles qui peuvent croître à des températures de 55°C à 65°C.

Concernant le pH, la plupart des actinomycètes sont neutrophiles mais ils existent également d'autres qui sont acidophiles comme le genre *Streptacidiphilus*. Chez la plupart des actinomycètes, la germination des spores peut être observée à des valeurs d'activité d'eau supérieures ou égales à 0.67 et l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égale à 0.98. (**Zvyagintsev et al., 2005**).

Parmi les actinomycètes, il y a également des espèces halophiles et halotolérantes, l'étude menée par Djaballah (2010) a montré l'existence de ce type de microorganismes dans les milieux extrêmes tels que la sebkha, avec des isolats qui poussent en saturation de NaCl. (**MESBAH, Amina et al 2015**)

Historique

D'après **Waksman (1959)**, **Cohn** fut le premier à découvrir les actinomycètes en 1875 (**Lechevalier**), qu'il nomma **Streptothrix foerestri** ; par la suite **Hraz** en 1877, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*. (**BELFERKH .Asma et al 2016**)

On peut diviser l'histoire des actinomycètes en quatre grandes périodes :

La première va de 1874 aux années 1900, elle pourrait être nommée la période « médicale » par ce que l'intérêt porté à ces organismes était du presque exclusivement aux propriétés pathogènes.

La deuxième période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de **Krainsky (1914)**, **Cohn, Curtis et Orla Yensen (1909)**, qui créa la famille des Actinomycetaceae qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite **Buchanan(1917)** créa l'ordre des Actinomycetales. (**BELFERKH .Asma et al 2016**)

La troisième période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des genres a été acquise grâce aux recherches de **Waksman (1919)**, de **Lieske (1921)**, de **Krassilnikov (1938)**, et **Orskov (1925)** ; ce dernier ajouta le genre *Micromonospora* qui comprend les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. **Jensen (1932)** regroupe dans le genre *Paraactinomyces* (actuellement *Nocardia*) les actinomycètes dont le mycélium de substrat se fragmente. (**Baldacci, 1962**)

Quatrième période commence en 1940, et correspond à l'époque des antibiotiques produits par les actinomycètes, avec la création du genre *Streptomyces* (en combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) par **Waksman et Henrici en 1943** ; qui regroupe les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores. En **1958Pridham**, proposa un système de

classification des Streptomyces basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien, 1958 introduit un critère important dans la différenciation des espèces la production des pigments mélanoides. (**Messoudi, 2013**)

Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par **Hopwood** puis de génomique a révolutionné la classification des espèces puis les méthodes de découvertes de métabolites secondaires et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

Physiologie et écologie

Écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre Actinomyces. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**). En second lieu, les formes oxydatives, aérobie, tels que les Streptomyces ou le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air. Dans ce dernier, les spores sont considérées comme des contaminants.

Certains genres d'actinomycètes sont des chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. (**BENAISSA, Souad 2016**)

Physiologiquement La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier: l'oxygène, le pH, la température...etc.

L'oxygène

On peut diviser les actinomycètes selon leurs types respiratoires en deux groupes :

* Les formes fermentatives anaérobies, représentées par le genre type Actinomyces, qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs, Ils font partie de la flore de Veillons

* Les formes oxydatives aérobies, telles que les Streptomyces, sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol. **(Avril et al., 1992)**

Le pH

Pour le pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8. Mais on peut observer une croissance à des valeurs de pH inférieurs à 4 , telle est le cas pour les souches acidophiles comme le genre Streptacidiphilus . **(Wang et al., 2006)**

La température

La température optimale de croissance est entre 25 à 30°C, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures entre 55 et 65°C. **(Rangaswami et al., 2004)**

L'activité de l'eau (Aw)

La germination des spores de la plupart des actinomycètes peut être observée à des valeurs d'activité d'eaux supérieures ou égales à 0.67, l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égal à 0,98. **(Zvyagintsev et al., 2005)**

Tolérance en Na Cl

Selon leurs exigences en NaCl, les microorganismes sont divisés en deux groupes :

* Les halophiles : ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusqu'à 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.

* Les halotolérants : acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolèrent de 6 à 8 % de NaCl (P/V)) ; les modérément tolérants (tolèrent de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) et les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu'à saturation en NaCl). **(BELAIDI Ines 2015)**

La Similitudes

○ *Similitude entre les Actinomycètes et les champignons*

Un ensemble des caractères qui rapprochent les Actinomycètes à des champignons principalement la structure de leur mycélium présentant des ramifications, avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2µm) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium, parfois employé pour désigner cette structure. Ainsi la formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies, malgré ces analogies entre les Actinomycètes et les champignons mais il ya des différences fondamentales qui les séparent ; les Actinomycètes sont des procaryotes alors que les champignons sont des eucaryotes

○ *Similitude entre Actinomycètes et bactéries*

Parmi les caractères qui rapprochent les Actinomycètes à des bactéries sont : des procaryotes, caractérisé par une morphologie typiquement bactérienne chez les formes simples (Mycobacteriacées), ainsi la sensibilité aux attaques des actinophages à des antibiotiques

antibactériens et aux lysozymes, ceci confirme le bien-fondé de la classification des Actinomycètes parmi les bactéries

Milieux de culture des actinomycètes

La composition d'un milieu de culture doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. Les meilleurs milieux de culture pour l'isolement des actinomycètes sont ceux contenant de l'amidon, du glycérol ou de la chitine comme source de carbone, la caséine, l'asparagine ou l'arginine comme source d'azote organique.

Pour l'isolement des actinomycètes, les antibiotiques sont ajoutés dans les milieux sélectifs pour inhiber la croissance de certains germes indésirables. Les molécules les plus utilisées sont : la nystatine, le cycloheximide (Actidione), la pimaricine, l'amphotéricine B pour l'inhibition des champignons. La polymixine, la novobiocine, l'acide nalidixique, la colistine pour stopper les bactéries Gram négatives. L'incubation se fait.

Généralement, à une température de 28°C ou 30°C qui favorise le développement des actinomycètes. **(BELFERKH .Asma et al 2016)**

Distribution dans la nature

Les Actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires, on les rencontre sur tous les substrats naturels courants. Ils sont adaptés à divers milieux écologiques, ainsi, ils peuvent être dans les sols, les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, ils se trouvent abondamment dans le sol que les autres milieux, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique où ils constituent une part importante de la population microbienne. Le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans le sol, il couvre à lui seul 95% des souches d'Actinomycètes isolées

Genre	pourcentage
Streptomyces	95,34
Nocardia	1,98
Micromonospora	1,4
Thermomonospora	0,22
Actinoplanes	0,20
Microbispora	0,18
Mycobacterium	0,14
Streptosporangium	0,10
Actinomadura	0,10
Micropolyspora	0,10
Pseudonocardia	0,06
Microellobosporia	0,04

Tableau 01 : pourcentage des divers genres d'Actinomycètes dans le sol

L'essor des techniques moléculaires, principalement basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, a permis la mise en évidence d'une grande diversité phylogénétique dans l'écosystème.

Les Actinomycètes sont bien représentés dans les milieux aquatiques d'où l'on peut facilement isoler des souches de Microspora, d'Actinoplanes et de Streptosporangium. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa flaveur.

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries mésophiles avec croissance optimale située entre 25° et 30°C. Toutefois, il existe des souches thermophiles isolées à une température située entre 50° et 60°C. Pour ce qui est du pH, la plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles. Leur croissance est

meilleure à pH compris entre 6 et 9, avec un maximum autour de la neutralité. Cependant, certaines souches de Streptomycètes ont été isolées à partir des échantillons de sol acide (pH 3,5). **(BENAISSA. Souad 2016)**

Morphologie

Les Actinomycètes sont des Bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Morphologiquement on peut rencontrer et en plus des filaments ramifiés, des bacilles et aussi des coccobacilles comme Rhodococcus et Mycobactérium. **(Avril et al., 1992)**

Ces microorganismes, en effet, présentent des similitudes à la fois avec les Eubactéries et avec les champignons. Il existe d'ailleurs toute une série de formes de transition entre les formes mycéliennes typiques et les formes unicellulaires présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. **(Dommergues et Mangenot, 1970)**

Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires rassemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons.

Les actinomycètes sont des microorganismes Gram-positif caractérisés par une teneur élevée en guanine-cytosine dans leurs ADN. Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes. **(BENAISSA. Souad 2016)**

Cycle de développement

Les actinomycètes ont un cycle de développement complexe. Il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium de substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination. (BELAIDI INES 2015)

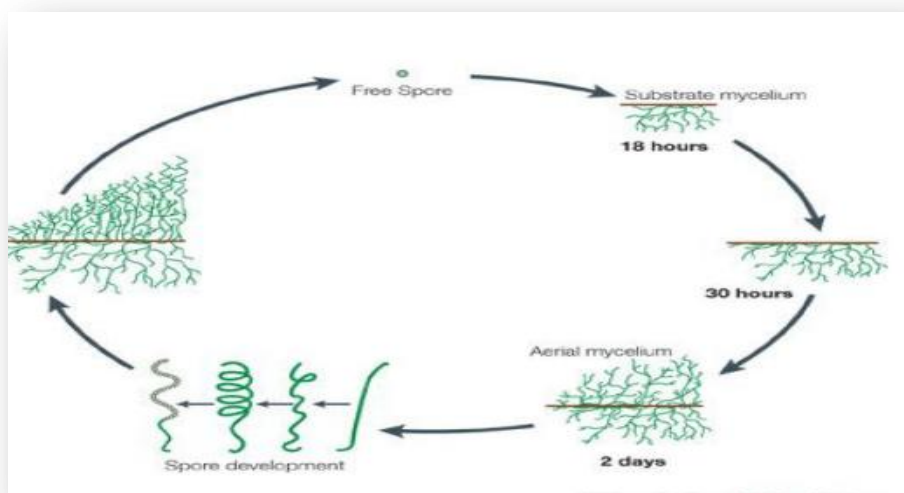


Figure 01 : Cycle de développement des actinomycètes

Classification des actinomycètes

Selon le système de classification de Murray qu'on retrouve dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986, 1989), Les Actinomycètes ont été classés dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), sont rattachées au phylum des Actinobacteria, à la classe des Actinobacteria, à la sous classe des Actinobacteridae et à l'ordre des Actinomycetales créé par Buchanan en 1917. Le classement en plusieurs familles reliées avec la biologie moléculaire et en particulier des séquences nucléotidiques de l'ARN ribosomal 16 S.

Le phylum Actinobacteria, déterminé par une seule classe : Actinobacteria, cette classe est subdivisée en 5 sous classes tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2007), 6 ordres, 13 sous ordres, 48 familles, 193 genres et près de 1711 espèces, tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, qui est supérieure à 55% chez certaines Corynebactéries, à plus de 70% chez les genres Streptomyces et Frankia, et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

La classification des actinomycètes a évolué en fonction du développement des connaissances, durant ces 30 dernières années elle fut marquée par quatre périodes dont chaque une à apporter des nouveaux critères de classification :

Premier période. C'est la période classique, où seuls les critères macro et micro morphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux.

Seconde période. C'est la période d'utilisation de la chimio-taxonomie, la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Selon les travaux de;, certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides. (**SabaouN, 1988**)

Des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinomycètes, ces constituent on les retrouve généralement soit dans la paroi ou dans la cellule entière.

Troisième période. Durant la troisième période naissait la taxonomie numérique, qui a débuté dans les années 70, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles (**Smaoui, 2010**). Sneath et Sokal ont défini la taxinomie numérique comme "le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères. (**BELFERKH .Asma et al 2016**)

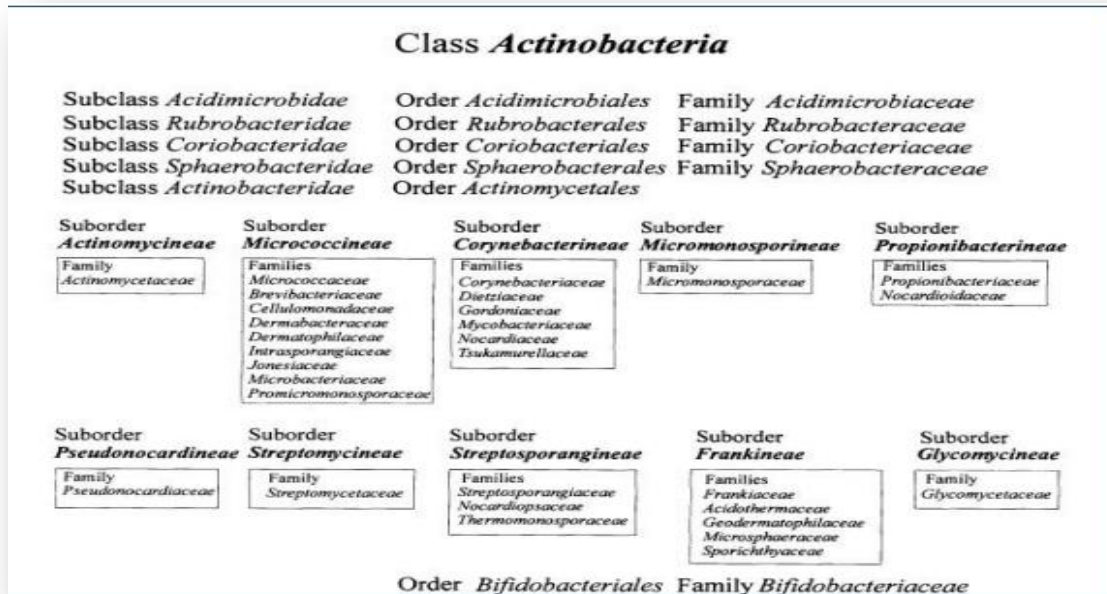


Figure 02 : Système de classification hiérarchique proposé de la classe Actinobactéries basé sur des analyses phylogénétiques des données de séquence ADNr 16S

Le procédé consiste à déterminer la présence ou l'absence des caractères sélectionnés dans le groupe d'organisme étudié. Pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins 50 et il est également préférable d'inclure de nombreux types de données différents : morphologique, biochimiques et physiologiques.

Chacun des caractères est codés 1 pour présence du caractère, ou 0 pour absence du caractère. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables.

Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », seconde édition 2004, le phylum Actinobacteria (bactéries à Gram positif et G+C

% élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « Actinobacteria ».

Cette classe est divisée en 5 sous-classes (figure N°02) : Acidimicrobidae, Rubrobacteridae, Coriobacteridae, Sphaerobacteridae, Actinobacteridae. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans La sous-classe des Actinobacteridae, l'ordre des Actinomycetales est subdivisé en 10 sous-ordres : Actinomycineae, Micrococcineae, Corynebacterineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae, Streptosporangineae, Frankineae et Glycomycineae.

Identification des actinomycètes

Les actinomycètes constituent un groupe bactérien très varié dont l'appartenance ou non à un genre donné est très délicate à établir. L'étude des caractères morphologiques, les caractères physiologiques et la composition chimique de la paroi cellulaire permettent de séparer ces microorganismes avec une grande précision en groupes et genres différents et d'identifier ces bactéries jusqu'au niveau de l'espèce.

Identification morphologique

Des actinomycètes Plusieurs critères morphologiques sont étudiés pour identifier les actinomycètes. Il s'agit principalement de :

- ✓ Hyphes : présence, abondance et disposition des hyphes du mycélium végétatif ou du mycélium aérien Spores : nombre, mobilité, forme, position sur les hyphes
- ✓ Présence de sporanges
- ✓ Présence de sclérotés ou de synnématas
- ✓ Résistance des spores à la chaleur
- ✓ Résistance aux traitements acides. (**Schofield et Schaal, 1981 ; Demain et Solomon 1985**)

Identification chimio-taxonomiques des actinomycètes

Les caractères chimiques étudiés sont :

- ✓ Composition du peptidoglycane.
- ✓ Composition en sucres cellulaires.
- ✓ Composition phospholipidique des membranes.
- ✓ Production d'antibiotiques.
- ✓ Tests biochimiques : Réduction du nitrate ; Hydrolyse de l'urée ; Hydrolyse de l'acide hyppurique ; Synthèse de mélanine (Streptomyces). (**Lechevalier et Lechevalier 1985 ; Larpent et Sanglier 1989**)

Identification génomique des actinomycètes

Pour les caractères génétiques, il s'agit d'analyser les points suivants :

- ✓ % GC de l'ADN.
- ✓ Digestions de l'ADN et analyse par électrophorèse en champ pulsé Séquence de l'ADNr 16S. (**BELFERKH .Asma et al 2016**)

Propriétés métaboliques des Actinomycètes

Les activités microbiennes au niveau du sol accroissent la vitesse de synthèse et de minéralisation de la matière organique permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes. Les actinomycètes occupent une place de choix en raison de leurs nombreuses activités.

En plus de leur rôle dans la décomposition de la matière organique. Les actinomycètes sont connus pour leur production de substances biologiquement actives telles les antibiotiques, les vitamines et les enzymes. Certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore D'autres sont également impliquées dans le contrôle phytopathologique et dans la production des composés antifongiques.

Production de l'acide indole acétique (AIA)

Les phytohormones sont des auxines, des gibbérellines ou de l'éthylène. Parmi les auxines, l'acide indole acétique (AIA) occupe une place de choix. Il est issu du métabolisme du L-tryptophane chez de nombreux microorganismes, champignons et algues. L'AIA est aussi produit par les jeunes feuilles et les graines de végétaux à partir de réactions de transamination et de décarboxylation du L-tryptophane. En général, le L-tryptophane constitue le précurseur principal pour l'AIA. Les microorganismes telluriques utilisent les sources naturelles de tryptophane et améliorent la croissance des plantes. Les bactéries productrices des phytohormones sont considérées comme de véritables régulateurs de la croissance végétale dans des conditions de stress salin. L'AIA influence plusieurs paramètres physiologiques chez la plante, à savoir l'élongation et la division cellulaire, la dormance apicale, la différenciation des tissus vasculaires, la production d'éthylène, l'initiation racinaire (**Keyeo et al. 2011**) et la prolifération racinaire aboutissant ainsi à une meilleure disponibilité en eau et en nutriments. Chez de nombreuses espèces de *Streptomyces*, l'AIA stimule la formation du mycélium et améliore également la production des antibiotiques. (**Perrig et al., 2007**)

Production d'enzymes

Les actinomycètes synthétisent des chitinases, des glucanases, des peroxydases et des glutaminases. Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases. D'autres sont capables de dégrader la lignine. *Streptosporangium* sp. Isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon. Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras. La production d'enzymes chinolytiques (chitinases et cellulases) par *Streptomyces albobovinaceus*, *S. caviscabies*, *S. griseus*, *S. setonii* et *S. virginiae* est considérée comme l'action antagoniste la plus efficace dans le contrôle de certaines maladies fongiques en raison de

leur action directe sur les chitinases. Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides. *Nocardiosis* sp. NCIM 5142 et *Streptomyces pactum* DSM 40530 sont parmi les actinomycètes les plus exploitées dans la production des peptides. (Perrig et al., 2007)

Production de sidérophores

Le fer est considéré comme le micro-élément le plus important utilisé par les bactéries, il joue également le rôle de cofacteur de nombreuses enzymes et protéines. Dans des conditions aérobies à pH neutre ou alcalin, cet élément est retrouvé dans la nature sous des formes insolubles dont elles ne peuvent pas être assimilées par les plantes et les bactéries. Ces dernières ont développé de nombreux systèmes de chélation de fer à partir de l'environnement qui utilisent le plus souvent les sidérophores ayant l'affinité la plus élevée pour le fer. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire secrétées par de nombreux champignons et bactéries en réponse à la carence en fer. Ils solubilisent et transportent le fer vers la cellule microbienne à travers des récepteurs spécifiques. Les streptomycètes du sol sont capables de produire les sidérophores. *Streptomyces fulvissimus* ATCC 27431 en accumule à un taux avoisinant à 94%. (Bendale et al., 2009)

Production d'antibiotiques

L'émergence des microbes multi résistants aux antibiotiques a créé le besoin d'orienter la recherche vers de nouvelles molécules antibiotiques. Les actinomycètes constituent en effet une solution, elles produisent approximativement 2/3 de ces biomolécules. De nombreuses actinobactéries du sol synthétisent des substances antimicrobiennes, celles-ci montrent un rôle antagoniste élevé. 75% et 60% des antibiotiques produits par les actinomycètes sont utilisés respectivement en médecine et en agriculture, les streptomycètes sont à l'origine de 75% des antibiotiques produits. Le genre *Streptomyces* est considéré en

réalité l'une des sources majeures des produits naturels bioactifs, 60% des composés antifongiques et antibactériens et de phytohormones sont produits par *Streptomyces*. La néomycine et la streptomycine sont respectivement produites par *S. griseus* et *S. fradiae*. D'autre part, *S. viridochromogenes* et *S. hygroscopus* synthétisent le tri-peptide phosphinothricine qui possède des propriétés bactéricides, fongicides et herbicides. La staurosporine (*Streptomyces* sp. TP-A0274 et *Lechevalieria staurosporeus*) et la rébéccamycine (*L. aerocolonigenes* ATCC 39243) sont des antibiotiques anti-tumoraux. *S. fungicidicus* produit l'enduracidine ayant une activité bactéricide considérable contre les streptocoques multi-résistants et les bactéries à Gram positif. D'un autre côté, *S. rochei* sbsp. *volubilis*, T-2636 accumule la sédécamycine qui inhibe fortement la croissance de *Staphylococcus aureus*. La kalafungine de *S. tanashiensis* Kala UC-5063 possède une action antifongique et antibactérienne, comme elle agit sur les levures et les protozoaires. L'érythromycine, la sporaricine, la destomycine, la vanomycine et la saccharomycine sont synthétisés par le genre *Saccharopolyspora*. En outre, *Nocardioopsis* sp. VITSVK 5(FJ973467) a une activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger* par comparaison à l'amphotéricine-B. De plus, il est actif vis-à-vis *Candida cruzi*, *C. tropicalis* et *C. albicans* par comparaison à la streptomycine. Des actinomycètes rares: *Saccharopolyspora*, *Blastococcus* et *Actinocoralila* isolées à partir de nombreuses plantes médicinales sont douées de potentielle activité antimicrobienne. Deux nouveaux analogues de la novobiocine sont produits par *Streptomyces* à partir d'*Aucuba japonica* et des cédamycines par *Streptomyces* sp. à partir de *Cryptomeria japonica*. Le fistupyron synthétisé par *Streptomyces* sp. isolé à partir d'*Allium fistulosum* inhibe sensiblement l'infection par *Alternaria brassicicola*,

Solubilisation du phosphore

Le phosphore est considéré comme l'un des éléments essentiels limitant la production agricole, sa teneur dans le sol est estimée à 400-1200 mg/Kg. Il est présent sous forme de composés métalliques liés au fer, à l'aluminium, ou au silicium dans les sols acides ou avec le carbonate de calcium dans les sols alcalins. Afin de compenser cette pauvreté naturelle en phosphore, ce dernier est ajouté au sol sous formes de fertilisants phosphorés dont seulement 1% est utilisé par les plantes, le reste est rapidement converti en composés insolubles tels que les phosphates calcique et ferrique. Pour cette raison, les microorganismes solubilisant le phosphore ont un intérêt particulier les bactéries et les levures sont les plus performants. Parmi les bactéries possédant cette activité, les actinomycètes occupent une place de choix. Les mines marocaines, par exemple, sont riches en phosphore et constituent alors de bons sites pour l'isolement de ces bactéries. *Micromonospora aurantica* et *S. griseus* et *S. lividans* isolés à partir des mines marocaines solubilisent efficacement le phosphore et améliorent sensiblement le poids frais des tiges et des racines. Certaines actinomycètes possèdent une capacité importante de produire des phosphatases alcalines. *Micromonospora endolithica* par exemple, solubilise des quantités importantes de phosphore et produit des phosphatases alcalines et acides, à ceci s'ajoute sa capacité de coloniser *Phaseolus vulgaris* L.

Dégradation de la lignine

La lignine est un complexe biopolymérique résistant à la dégradation microbienne, cependant quelques espèces de champignons et bactéries dont les actinomycètes sont capables de la dégrader. Certains composés polymériques aromatiques ligneux sont catabolisés par *Streptomyces setonii* 75Vi2, *S. sioyaensis* P5 et *S. viridosporus* T7A. Une potentielle importance de ce groupe microbien intéresse de nombreux chercheurs pour son aptitude de dégrader la lignine en composés phénoliques très utiles.

Autres intérêts

Certaines espèces actinomycétales peuvent dégrader l'acide salicylique (AS) produit par les plantes et les bactéries. Ce dernier et son dérivé, l'acide acétyle salicylique (aspirine) sont largement utilisés comme des médicaments. De nombreuses espèces de *Streptomyces* dégradent la phénylalanine et la tyrosine. De même *Nocardia* convertit l'acide benzoïque en catéchol. Les actinomycètes présentent un intérêt crucial dans la biodégradation des produits plastiques. Les phénols considérés comme toxiques pour l'environnement marin sont dégradés par diverses souches actinomycétales. *Streptomyces hygroscopus* produit l'acide pétridique qui stimule le développement des racines des haricots et dont le rôle semble équivalent à celui de l'acide indole acétique. L'acide hydroxycitrique (AHC) utilisé comme un additif alimentaire est le principal acide accumulé par de nombreuses plantes tropicales telles que, *Garcinia cambogia* et *Hibiscus subdariffa*. Du fait que son extraction est coûteuse, l'application des agents microbiens producteurs de cet acide a fait l'objet de nombreuses recherches, *Streptomyces* sp.U121 est capable de produire le AHC à des taux élevés. Un nouveau polysaccharide synthétisé par *Streptomyces virginia* H03 est doué de potentielles activités antibactériennes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Candida utilis* contaminant les aliments. Enfin, le mycostope est un produit commercial synthétisé par *Streptomyces griseovirdis* K61 et *Streptomyces lydicus* WYEC 108, il est utilisé dans le traitement des maladies causées par *Phytium* sp. *Fusarium* sp. *Rhizoctonia* sp. et *Phytophthora* sp. (AMEUR Hanane 2014)

Importance des Actinomycètes

Importance en agronomie

Les Actinomycètes sont des microorganismes qui ont un rôle écologique majeur grâce à leur capacité de produire une large gamme d'enzymes ; telles que, les hydrolases extracellulaires, qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol. Ils sont caractérisés par leur grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes, tels que les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, qui sont difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, en plus, les Actinomycètes sont déterminées parmi la microflore importante de la rhizosphère, elles sont capables aussi de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxinogènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en Agro-alimentaire. **(GUEBLA. Khaoula et al 2016)**

Importance en biotechnologie

Les Actinomycètes présentent de grandes hétérogénéités biochimiques et ont une capacité de produire des métabolites secondaires qui sont intéressantes en industrie pharmaceutique et alimentaire, c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs , certaines espèces d'Actinomycètes produisent jusqu'à 75-80% des antibiotiques : ainsi, de nombreux métabolites synthétisés, qui peuvent être des enzymes telles que les enzymes alcalins, des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs, des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires. **(GUEBLA. Khaoula et al 2016)**

Importance en écologiques

Les actinomycètes sont presque partout dans la nature. Ils sont présents dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans des sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement

contaminés avec des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés.

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foin en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs. Les *Actinoplanes* et les *Actinosynnema* se rencontrent dans les sols cultivés et sur les débris végétaux qu'on trouve aux bords des rivières et des lacs ; Les *Micromonospora* au fond des lacs et des réservoirs ; Les *Streptosporangium* à la surface des sols forestiers ; Les *Microbispora* et les *Actinomadura* dans les sols de prairies et les sols cultivés. Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout.

La fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Les actinomycètes, fort nombreux dans les sols, se joignent aux autres bactéries et aux champignons comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus. Ils prolifèrent surtout quand l'action des bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action.

De plus, les actinomycètes du genre *Frankia* vivent en association avec de nombreux arbres et arbrisseaux, tels que les aulnes, sur les racines desquels ils forment des nodules où l'azote gazeux est fixé. Le système *Frankia*-plantes ligneuses fixe, globalement, dans la biosphère presque autant d'azote que le système *Rhizobium*-légumineuses. Les *Frankia* fixent aussi l'azote *in vitro*, tandis que les *Rhizobium* ne le font qu'*in planta*. Les *Frankia* pénètrent les cellules des racines, qu'ils déforment, et y produisent des vésicules où l'azote est fixé grâce à une nitrogénase.

Tout le monde connaît l'odeur de la terre fraîchement labourée. Cette odeur est due surtout à une huile neutre de bas poids moléculaire, la Géosmine, produite par les actinomycètes présents dans le sol. Du sol, la Géosmine et autres métabolites odoriférants se répandent dans les eaux, les rendant indésirables comme boisson à cause de l'odeur, ce qui pose

un problème dans la purification des eaux potables.
(BELFERKH .Asma et al 2016)

Substances bioactives produites par les actinomycètes

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives et autres antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (*LOUCIF 2011*).

Antibiotiques

Historique

En 1889, **Paul Vuillemin** introduit le terme «antibiose» pour décrire le principe actif d'un organisme vivant qui décroît la vie des autres pour protéger sa propre vie.

En 1897, **Emest Duchesne** envisagea de faire une activité de moisissures à des fins thérapeutiques mais son idée ne se mettra en place qu'au XX^{ème} siècle à la suite de la découverte de **Sir Alexaner Fleming**. En 1929, il remarque qu'une de ses cultures de staphylocoques est en partie décimée les bactéries ont été contaminées par la moisissure *Penicillium notatum*. Il constate aussi qu'elles ne se développent plus là où la moisissure prolifère.

Il formule alors l'hypothèse que cette-dernière synthétise une substance, la pénicilline, qui bloque le développement de la bactérie. Il essaye alors d'extraire le principe actif des moisissures, mais toutes ses tentatives se soldent par des échecs. Dix ans plus tard, le biochimiste américain René Dubos isole le premier antibiotique la gramicine. Celle-ci, produite par des bactéries du sol, tue les pneumocoques. Pourtant, ce premier antibiotique reste extrêmement difficile à purifier et hautement toxique.

En 1940, deux hommes cultivent une souche de *Penicillium* et pavanent à isoler et à purifier un peu de péniciline G. après les premiers essais chez des souris infectées où le résultat a été concluant, on administre cette substance à un policier atteint d'une septicémie. L'état de malade s'améliore, mais le stock de pénicilline étant insuffisant, le traitement doit être suspendu. Le policier décède donc, faute de quantité suffisante d'antibiotique.

Pourtant, le premier antibiotique synthétisé a été créé par Gerhard Domagk, un biochimiste allemand. En 1932, il a découvert qu'un colorant, le sulfamidochrysoïdine avait un effet sur les streptocoques. Il l'a alors tout de suite breveté sous le nom de prontosil. Il a d'ailleurs reçu le prix Nobel pour sa découverte.

En 1939 .En découvrant l'hémisynthèse, il a ouvert la voie à l'antibiothérapie moderne.

Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des agent strictement antibactériens dont la toxicité sélective, résulte d'un mode d'action spécifique. Ils exercent un effet relativement lent (de l'ordre de l'heure) mais à faible concentration (de l'ordre de mg/L). leur forte efficacité permet une utilisation in vivo par voie générale **(Bosgiraud ,2003)**.Les antibiotiques ont une origine naturelle s'ils sont extraits d'organismes vivants. Ils peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle, chaque antibiotique possède un mode d'action spécifique et une cible bien déterminée. En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries.ils peuvent être bactéricides ou bactériostatiques.**(Robert.2000)**

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un «âge d'or».qui s'est étendu de 1936 à 1962. **(Chrdain H.et al.2006)**

Modes d'action des antibiotiques

On considère les antibiotiques come le groupe le plus important de médicament pour la médecine. A coté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire.

Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre. **(EMMANUEL,2003)**

○ Action sur la paroi bactérienne

Bacitracine, Penicilline, Céphalosporine agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (murène composant essentiel de la paroi bacterienne ,qui confère à la bacterie sa forme et sa rigidité se qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) .

Or, la pénicilline est un antibiotique empêche la synthèse de peptidoglycane: par conséquent, la paroi cellulaire est grandement affaiblie. Et la cellule finit par se lyse. Puisque la pénicilline agisse seulement sur les cellules en croissance active.

○ *action sur structure de la membrane*

Et désorganisant sa structure et son fonctionnement. Ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur.

○ *action sur la synthèse protéique*

Sur les ribosomes, ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormale. Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamycine, amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous-unité. Les macrolides et les kétolides (érythromycines, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique. La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.

○ *Action sur la synthèse de l'ADN*

Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (**Flandrois et al., 1997**), les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (**Chopra, 1998**).

○ *Autre*

en agissant entrant qu'anti métabolites bactériens (c'est-à-dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries). par exemple: agit sur le métabolisme de l'acide folique (**Gerard. Et al., 2003**). (**Gerard. Et al., 2003**)

Les familles des ATB

Ces grandes familles d'antibiotiques se différencient par:

- leur spectre d'activité, c'est-à-dire l'ensemble des germes sensibles à chaque famille d'antibiotiques.
- leurs indications, directement liées au spectre d'activité et diffusion de l'antibiotique dans les différents organes: par exemple, certains antibiotiques se concentrent dans les urines et sont particulièrement intéressants en cas d'infection urinaire.

- leur voie d'utilisation: les antibiotiques peuvent être pris par voie orale, à l'exception des aminosides qui sont détruits dans l'intestin. Il existe également des collyres, des solutions auriculaires ou nasales et des pommades contenant des antibiotiques. Ces formes locales sont parfois suffisantes pour combattre des certaines infections.
- leur mode d'emploi et leur fréquence d'utilisation il existe pour certaines infections des traitements monodoses par exemple.
- leurs contre-indications.
- leurs effets indésirables: réaction Allergique, diarrhée, photosensibilisation, tendite, toxicité rénale sont des effets indésirables qui caractérisent certaines familles d'antibiotiques, l'apparition d'un effet indésirable grave limite l'utilisation ultérieure des médicaments appartenant à la même famille.

Pénicilline

Ce sont les antibiotiques les plus anciens.les pénicillines se divisent en plusieurs catégories en fonction de leur spectre d'activité: les pénicilline de type G sont actives sur une moins grande variété de germes que les pénicilline de type A(amoxicilline, ampicilline) l'amoxicilline est parfois associé à l'acide clavulanique qui permet d'empêcher sa destruction par certaines bactéries.

Ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine générale, notamment pour traiter les infections des poumons, des bronches, du nez, de la gorge ou des oreilles, de l'appareil digestif ou urinaire, des voies génitales, des gencives et des dents. Ils peuvent être utilisés chez la femme enceinte ou qui allaite.

Leurs effets indésirables sont limités. Ils peuvent néanmoins être responsables de réactions allergiques parfois graves. Un antécédent de réaction allergique à une pénicilline contre-indique la réutilisation d'un médicament de la même famille.

Céphalosporine

Ce sont des antibiotiques proches des pénicillines (elle ont un mécanismes d'action semblable). Elles sont divisées en trois groupes dits de 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} génération. Elles sont utilisées par voie orale dans le traitement de nombreuses maladies infectieuses, notamment des poumons, des bronches, des sinus, de la gorge ou des oreilles, et de l'appareil urinaire. Les céphalosporines injectables sont surtout réservées à une utilisation hospitalière.

Leur utilisation est généralement possible pendant la grossesse ou l'allaitement. Les céphalosporines peuvent être responsables d'allergie. Notamment chez les personnes allergiques aux pénicillines.

Les carbapénèmes

Ces cyclines sont prescrits et, pour certains, réservés à l'hôpital. ils sont actifs sur certaines bactéries devenues résistantes aux autres pénicillines. Ils sont utilisés en injection IV.

Les cyclines

Les cyclines sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines des bactéries. Elles sont actives sur différents germes, notamment les chlamydie et les mycoplasmes, des bactéries particulières qui se multiplient qu'à l'intérieur des cellules.

Ces antibiotiques sont indiqués dans diverses maladies infectieuses .notamment respiratoires et génitales, et dans le traitement de l'acné (souvent pendant plusieurs mois) . la minocycline est une cycline qui peut être à l'origine de réactions allergiques graves. Son utilisation réservée au traitement des infections résistantes aux autres cyclines et pour lesquelles aucun autre antibiotique ne convient.

Les cyclines ne doivent pas être utilisées à partir du 4^e mois de la grossesse et chez l'enfant de moins de huit ans, en raison d'un risque de coloration des dents. Les cyclines ne doivent pas être associées aux traitements oraux de l'acné de la famille des rétinoïdes .Elles peuvent être responsables d'une photosensibilisation: il faut éviter de s'exposer au soleil pendant le traitement.

Les aminosides

Ces antibiotiques sont actifs sur les bactéries gram positif, notamment les staphylocoques, ils ne passent pratiquement pas à travers la paroi de l'intestin et sont donc administrés par voie injectable. Ils sont indiqués dans le traitement de diverses maladies infectieuses, notamment urinaires et rénales car ils sont éliminés sous forme active par les reins.

Les antibiotiques de cette famille peuvent être toxiques pour l'oreille interne ou pour les reins. Ces effets ont surtout été observés en cas de doses trop élevées ou d'insuffisance rénale préexistante.

Les macrolides

Les macrolides sont des antibiotiques généralement bactériostatiques, utilisés en seconde intention par voie orale. Leur spectre est grossièrement celui de la pénicilline G. leur tropisme intracellulaire très marqué leur accorde cependant des indications élargies, en particulier sur les germes dont la pathogénie s'est révélée chez l'immunodéprimé. La plupart d'entre eux inhibent les cytoplastes P450 et peuvent être ainsi à l'origine d'interactions médicamenteuses significatives. Ils sont utilisés dans le cas des infections pulmonaires atypiques (légionellose, infection à chlamydia). De certaines infections à streptocoques, staphylocoques méti-S, entérocoques. Cependant leur usage est délicat en raison de nombreux effets secondaires et interactions médicamenteuses.

Les quinolones

Ce sont des antibiotiques obtenus par une synthèse chimique. Ils agissent sur l'ADN bactérien et bloquent la synthèse de l'ADN bactérien, inhibent de manière sélective l'action de deux enzymes, l'ADN-gyrase et la topoisomérase.

sont généralement déconseillées pendant la grossesse et contre-indiquées pendant l'allaitement (en raison de leur passage dans le lait maternel). Ces antibiotiques ne sont généralement pas utilisés chez l'enfant (sauf en injections). Une exposition aux rayons ultraviolets (soleil ou lampe à UV) au cours d'un traitement par des quinolones expose à un risque de photosensibilisation.

Production des antibiotiques

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques.

On estime que les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinomycètes. Historiquement A. Waksman fut le premier à démontrer la richesse des actinomycètes dans ce domaine, il isola quatre des premiers antibiotiques utiles: l'actinomycine (1940) anti tumorale; la streptomycine (1944) - antibactérienne et antituberculeuse; la néomycine (1949) - antibactérienne; et la candidine (1953) - antifongique ayant aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes en tant que ligand des stéroïdes. Parmi les espèces actinomycétales, les Streptomyces sont les plus importants producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires, 75% des antibiotiques sont produits par les espèces de streptomycètes.

Les antibiotiques des actinomycètes sont utilisés aussi dans le traitement de certaines maladies des plantes. la blasticidine, par exemple, est active sur *Piricularia oryzae*, un pathogène du riz. (TOMITA et al., 1990)

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes, 50 à 70 % des souches isolées en sont productrices et sont l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde. (OKAMI , 1988)

Extraction des antibiotiques

La conduite d'un procédé d'extraction et de purification des molécules actives est ramenée à trois opérations de base :

1. Séparation des particules insolubles, telles que les composantes du milieu de culture, les cellules et le mycélium. Ceci se fait par filtration ou par centrifugation.
2. L'extraction du produit se fait par fractionnement avec les solvants organiques ou précipitation par la phase de partition.
3. La purification partielle des molécules est réalisée de façon très sélective grâce à l'application de la technique chromatographique (ZOUAGHI, 2007).

L'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques peut s'exprimer au travers de plusieurs mécanismes: production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique, modification de la cible de l'antibiotique ou encore, imperméabilisation de la membrane de la bactérie.

Certains bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques. On parle de résistance innée. Leur patrimoine génétique les rend insensibles à un certain nombre d'agents. C'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosae* face à l'ampiciline.

Plus préoccupant, le phénomène de résistance acquise entraîne l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie était auparavant sensible. Ces résistances peuvent survenir via une mutation génétique affectant le chromosome de la bactérie, permettant à cette dernière de contourner l'effet délétère de l'antibiotique. elles peuvent aussi être liées à l'acquisition de matériel génétique(plasmide) porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance, en provenance d'une autre bactérie. Les résistances chromosomiques

ne concernent en général qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques, voire plus répandu, soit 80% des résistances acquises.

Enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**THEILLEUX, 1993**). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (**TANAKA et OMURA, 1990 ; VONOTHINI et al., 2008**), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**PARK et al., 2002**). A titre d'exemple : la D-xylose isomérase, plus connue sous le nom de glucose isomérase, produite par l'espèce *Actinoplanes missouriensis* et plusieurs espèces de *Streptomyces*, est utilisée pour obtenir des sirops riches en D-fructose. Un complexe amyliase issu de *Streptomyces hydroscopicus* et *S. praecox* a été exploité pour préparer des sirops riches en maltose. Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (ex : pronase de *S. griseus*) (**THEILLEUX, 1993**). Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3-glucanase et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des pathogènes (**CONN, 2005**). D'après **PARK et al. 2002**, les chitinases produites et sécrétées par les actinomycètes agissent sur les cuticules des nématodes adultes et provoquent ainsi leur mort. Notamment l'espèce *Streptomyces coelicolor* qui sécrète de nombreuses hydrolases incluant : 60 protéases/peptidases, 13 chitinases/chitosanases, 8 cellulases/endoglucanases, 3 amylases et 2 pectates lyases (**BENTLEY et al. 2002**).

Objectif de travail

L'objectif principal de la présente étude, consiste à la production et l'extraction des principes actifs à partir des actinomycètes et même d'examiner les activités de ces molécules en travail expérimental permet de mettre en évidence :

- L'extraction et la purification des molécules bioactive.
- Le choix de meilleur solvant d'extraction.
- D'étudier de pouvoir antagoniste des extraits actifs vis-à-vis des souches cibles.

Matériel

1. *Matériel analytique* (voir annexe 3).

2. *Matériel biologique***2.1. *Microorganisme test*** (la souche d'actinomycète A₁W)

La souche d'actinomycète A₁W a été isolée au sein du laboratoire de microbiologie appliquée (L.M.A) à partir d'un échantillon de sable saharienne prélevés d'un site de l'ouest de la wilaya de naama (Ain safra).

2.2. *Germes cibles* :

- S1 :Staphylococcus aureus. (G+).
- S2 : pseudomonas aeruginosa. (G-).
- SA1 : bacillus cereus. (G+).
- SA2 : E .Colie. (G-).
- SA3 : Salmonella thyphimurium. (G-).
- SA4 : Listeria monocytogenes. (G+).

Méthodes

Isolement et purification des actinomycètes

Echantillonnage

Le prélèvement du sable a été réalisé à partir de sable dans la région de la wilaya de Naàma pendant le mois de décembre 2018 dans des conditions d'asepsie, Pour Les échantillons de sable utilisée dans cette étude ont été prélevés de 03 sites arides différents :

- ✓ E₁ : Ain safra
- ✓ E₂ : Ouad el halib
- ✓ E₃ : Kesdir

A savoir que cet sable était pas fréquenté par l'homme ou animal, Les échantillons de sable aride ontété prélevés selon la technique de Pochon et Tardieux à partir du sable de naamaaprès avoir écarté les (05) premiers CM de la couche superficielle de sable .

En pose une quantité suffisante (100g-140g) dans des flacons stériles a l'aide d'une spatule même stérile et transportés le plus rapidementpossible au laboratoire puis vers le séchage a l'air libre pendant 7 J a une T ambiante.



Figure (03) : Echantillonnage

Mesure de PH

En pose 5g de sable + 12,5 ml d'eau distillée Et pour l'outil de mesure en a utiliser les bandelettes de PH (PH mètre).

Méthode d'isolement***Préparation de la suspension de sable***

Pour chaque échantillon, 1g de sable saharien est diluée dans 9ml de TSE, puis agiter pendant 2mn, cette suspension constitue la dilution 10^{-1} .

Préparation des dilutions décimales

Une série de dilution décimales jusqu'à 10^{-3} ce travail est effectuée pour les 03 échantillons :

- ✓ E₁ : Ain safra
- ✓ E₂ : Ouad el hlib
- ✓ E₃ : Kesdir

Prélèvement des colonies d'actinomycètes

Toutes les colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes sont repiquées sur milieu GYM.

Le prélèvement est réalisé par les étapes suivantes :

- En fait le coulage de 09 boites pétris de milieu GYM qui est déjà préparé.
- l'ensemencement des dilutions sera sur la surface.
- Pour chaque boîte en pose une goutte (0,1 ml) à l'aide de pipette pasteur stérile et même sera étalier par la même pipette.
- Elles sont incubées à 28 c[°] pendant 07 jours.

après cette période en remarque la présence des divers colonies d'actinomycètes et pour la majorité des colonies apparaissent poudreuses ou granuleuses de différents couleurs de mycélium aérien (blanc, beige,

marron, noir), En général la taille moyenne des colonies est comprise entre 1 à 4 MM.

Isolement sélective des actinomycètes

Isolement des souches d'actinomycètes réalisé a partir des (03) échantillons de sable saharienne sur le milieu GYM a conduit a la purification des colonies bactériennes différents par leurs formes et aspets et se rapprochant toujours de ceux des actinomycètes par leur aspet filamenteuse.

Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar

L'activité antibactérienne

afin de déterminer le profil de sensibilité des six bactéries test ($S_1+S_2+SA_1+SA_2+SA_3+SA_4$) contre les actinomycètes, les isolat d'actinomycètes sont ensemencés en strie a la surface de milieu GYM et incubés 14 J a la température $28C^{\circ}$ (purification des actinomycètes) .

- avant de commencer ce travail en prépare une suspension bactérienne (18-24h) dans l'eau physiologie.
- l'étape suivante consiste à déposer des cylindres de milieu GYM de diamètre 6 mm qui ont prélevés a l'emporte – pièce et a savoir que chaque cylindre porte une colonie différente a l'autre actinomycète.
- déposé sur le milieu MH qui est déjà ensemencé par les bactéries test (par écouvillonnage).
- puis gardée à $4 c^{\circ}$ pendant (2-4h) à fin de permettre une diffusion des substances.
- puis vers l'incubation $37c^{\circ}$ pendant 18-24 h.

Les lectures sont effectuées par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des cylindres.

La figure ci-dessous résume les étapes suivies :

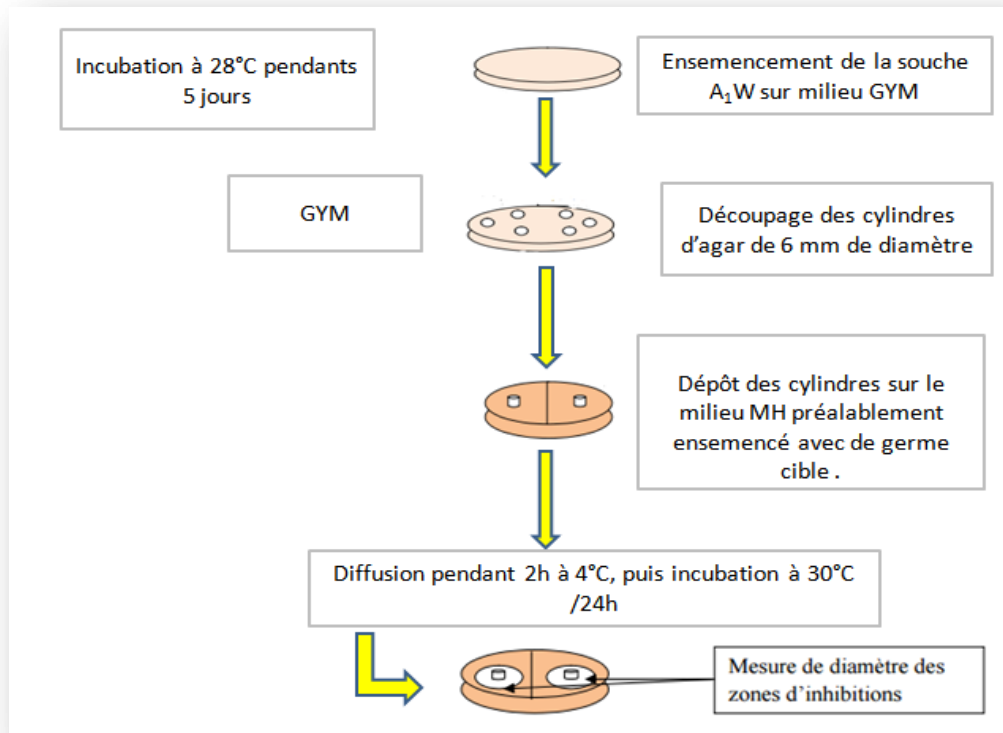


Figure (04) : Mise en évidence de l'activité d'antibiotique de l'isolat d'actinomycète A₁W sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar.

L'étude macromorphologique

Cette étude consiste à détecter le développement et la pigmentation du mycélium aérien et de substrat de chaque souche plus de déterminer la forme et la taille des colonies, les couleurs des mycéliums aériens (MA) et de substrat (MS), Ces caractères sont déterminés sur le milieu GYM, après l'ensemencement des colonies d'actinomycètes les plus actives qui sont :

- ✓ K₃10⁻³
- ✓ A₁W
- ✓ K₃N10⁻³
- ✓ A₁W

Elles sont apparues au bout de 7, 14 et 21 jours J d'incubation 28 c[°] nous souche sont apparues granuleuses et même chaque souche possède une

couleur spécifique de mycélium aérien (blanc, beige, jaune, gris, noir). En général la taille moyenne des colonies est comprise entre 1 à 4 mm

L'étude micro –morphologique

Coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, Pour chaque colonie répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes un frottis est réalisé selon la méthode classique, les frottis de colonies d'actinomycètes sont préparés et colorés comme suivant :

- Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen.
 - Coloration par violet de gentiane .Laissez agir de 1 min puis Rincez à l'eau distillée.
 - Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) pendant 1 min. puis rinçage à l'eau distillé.
 - Décoloration par l'alcool pendant 20 s, puis rincer à l'eau distillé.
 - Décoloration à la fuschine pendant 1 min, puis rinçage à l'eau distillé finalement le séchage.
- Puis observés sous microscope optique (grossissement fois 40 et même 100).

On l'examine à l'objectif (X 100) à l'aide d'huile d'immersion. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge à cause que le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram -, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui Décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à

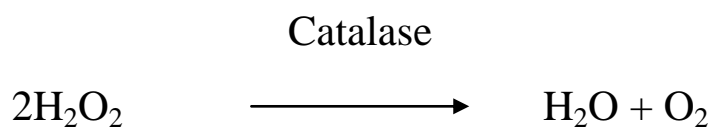
Gram +, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

L'étude biochimique

La recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂) selon la réaction suivante :

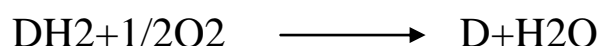


En réalise ce travaille comme suivant :

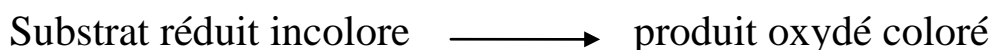
- Déposer une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) sur une lame propre.
- Prélever une colonie avec une pipette pasteur et déposer dans la goutte d'eau oxygénée.
- La présence de l'enzyme se traduit par le dégagement de bulles gazeuses en peut dire que les colonies sont dissociée dans une goutte de perroxyde d'hydrogène.

La recherche de l'oxydase

Oxydase est une enzyme de la chaine respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydations de type :



En présence d'oxygène ambiant, cette enzyme peut oxyder un substrat incolore en un produit facilement repérable car coloré :



La recherche de ce test c'est pour l'identification des bacilles à gram négatif

Pour réaliser ce test en travaille par ces étapes :

Un disque de papier buvard imbibé de substrat est posé sur une lame de verre propre puis fixée des fragments de colonies sur le papier a l'aide d'une pipette si les colonies sont en milieu solide si il y'a une suspension bactérienne en pose ce derniers directement sur le papier

- si le papier présente une tache violette : le substrat a été oxydé, la bactérie possède une oxydase
- si le papier reste incolore : il n'y pas eu de réaction, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

Conservation des souches d'actinomycètes

Seules les colonies les plus actives et à Gram positif présentant les aspects caractéristiques des actinomycètes, sont subissent a une purification sur milieu GYM, Les souches obtenues sont incubées a $28c^{\circ}$ pendant 14 J puis conservé Au milieu GYM à $4^{\circ}C$ parmi ces derniers il y'a :

- K_310^{-3}
- A_1W
- K_3N10^{-3}
- A_1W

Production et extraction de métabolites secondaires

Extraction à partir du milieu solide

D'après les résultats obtenu en est choisis la souche (A_1W) pour la continuation du reste de travail d'étude car elle a donnée des résultats positif et plus intéressante par apport les autres actinomycètes

- comme une étape suivante en est isolée la souche (A_1W) dans 40 boites pétris de milieu AF pendant 14J a une température de $28C$.

- après cette période en fragmente notre milieu a l'aide d'une spatule puis en ajoute 10ml de méthanol dans chaque boite de pétri.
- puis en pose cette quantité en (03) flacons et en commence par l'agitation pendant 2h (à l'aide des mains) puis filtration a l'aide de papier watmen afin d'éliminer les cellules vivantes.
- Après en passe à l'évaporation afin de diminuer la qualité d'extrait.
- puis la centrifugation de (4000 t par 12mn) après même centrifugation de (11000 t par 10mn)
- finalement on obtient notre cillot et même l'extrait (le surnagent) qu'on va l'utiliser à terminer le travail.

Mis en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puis

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puis, en utilisant le milieu Mueller Hinton.

Afin de réduire le travail en est choisi deux bactéries test pour terminer notre travail

- SA₁ : bacillus cereus (G⁺)
- SA₂ : E. coli (G⁻)

Comme une solution mère en prend l'extrait pure 100^o et pour les dilutions sont classé dans ce tableau :

Dilution	Extrait	Méthanol
Extrait pure	100 _u L	/
D ⁻¹ (75 ^o / _o)	750 _u L	250 _u L
D ⁻² (50 ^o / _o)	500 _u L	500 _u L
D ⁻³ (25 ^o / _o)	250 _u L	75 _u L
D ⁻⁴ (12,5 ^o / _o)	125 _u L	875 _u L

Tableau(02) : mode opératoire des différents dilutions pour réaliser la technique des puis.

Pour réaliser ce travail en passe par les étapes suivantes :

- En fait le coulage de (04) boites pétries de MH (chaqu'une répéter deux fois)

- En ensemence les deux bactéries test chaque'une dans deux boite pétrie.
- Puis en fait six puis en chaque boite à l'aide d'emporte – pièce et en les remplir comme suivants :

Puit1 : Témoin

Puis 2 : Extrait pure 100 %

Puis 3 : D^{-1} (75 %)

Puis 4 : D^{-2} (50 %)

Puis 5 : D^{-3} (25 %)

Puis 6 : D^{-4} (12,5 %)

Finalement vers l'incubation pendant 24 h a une T de $28C^{\circ}$, les lectures sont effectuées par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des cylindres.

Mis en évidence de la technique de séparation par CCM

Principe

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'absorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille en plastique ou en aluminium. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Chaque tache détectée ou révélée est caractérisée par sa référence frontale donnée par la relation suivante.

Rf : x / y

Rf : Référence frontale

X : Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

Préparation de l'éluant

CCM est une méthode utilisée pour l'identification des espèces chimiques et pour réaliser une chromatographie en va utiliser une plaque de silice.

Comme une première étape en prépare notre éluant (On a 03 propositions) :

- 1) 9ml de méthanol + 1ml d'acide acétique.
- 2) 8ml de méthanol + 2ml d'acide acétique.
- 3) 6ml de méthanol + 4ml d'acide acétique.

En pose chacun de ces derniers dans sa cuve à élution, puis en les couvre

Préparation de la plaque

En passe ou CCM comme une 1^{er} étape en trace une ligne par crayon sur le papier c'est la ligne de dépôt de (1-1,5 cm) de bas puis en déposer notre substance à analyser (l'extrait d'actinomycètes sur toute la ligne de dépôt) Après on pose ces derniers dans la cuve à élution et il faut que la hauteur de l'éluant doit être inférieure à la hauteur de la ligne de dépôt donc en bouche bien la cuve à élution et en laisse l'éluant monter par capillarité sur la plaque ou bien l'émigration de molécule biochimique puis en trace le front de l'éluant quand l'éluant arrivé à 1cm de bord , finalement en les sèche à l'aide d'un séchoir ,Puis l'observation faite sous la plaque ultraviolet .

Révélation La plaque

Est d'abord observée sous lumière UV aux longueurs d'onde. Les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres.

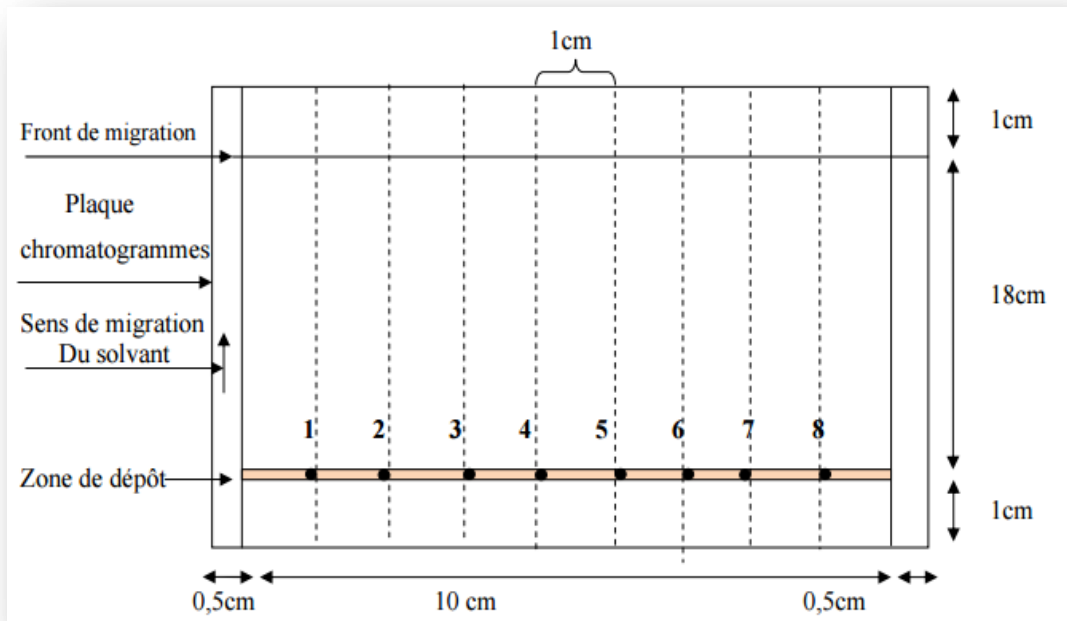


Figure (05) : Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM.

Bioautographie des molécules bioactives

L'activité de chaque spot obtenu après migration est appréciée par un test antibactérien des portions de plaque de CCM. Le mode opératoire est le même que celui de la technique de diffusion sur gélose mais au lieu d'employer des disques de 6mm imprégnés de l'extrait, on utilise directement les portions de plaque de CCM.

La suite de ce travail ce commence par le coulage de deux boites pétries de milieu MH puis en les ensemence par des bactéries test (SA_1 / SA_2) par écouvillonnage, finalement en pose notre bandelettes de CCM sur le milieu MH.

Finalement, incubation $28c^{\circ}$ pendant 24h, après d'avoir le résultat en Mesure le diamètre de zones d'inhibition, Puis en compte le Rf (rapport frontale)

Rf = la distance parcourt par le substrat / la distance parcourt par le solvant

Méthode Purification des fractions actives séparées par CCM

Et pour la réalisation de suite de ce travail, en répètent la mémé méthode de migration de molécule chimique utiliser en début sauf que en ce cas en utilise la place CCM complète et pour la suite de travail sera différente les besoins de cette expérience sont :

- Composition A : en sépare la partie blanche de la plaque de silice et en la pose Sur une quantité suffisante de méthanol (9 ml) et comme ça nous avons obtenir la composition A.
- Cillot : qui est déjà obtenu de la séparation de centrifugation (les grandes cellules). .
- Méthanol : utiliser comme témoin.

La suite de ce travail et comme ce ci :

- En fait le coulage de deux boites pétris
 - Les en ensemence par les souches pathogènes (SA1+SA₂)
 - En fait trois puis a l'aide de l'emporte - pièce a chaque boite pétrie puis en les remplir comme ce ci :
- ✓ Puis 1 : composition A
 - ✓ Puis2 : Cillot
 - ✓ Puis 3 : méthanol

Puis gardée a 4 c[°] pendant (2h) afin de permettre une diffusion des substances et vers l'incubation 37c[°] pendant 18-24 h les zones d'inhibition formée autour des puis sont alors mesurée.

Mis en évidence de l'activité anti-biofilm de la souche AIW

Ensemencement de la microplaque

La détection de CMI

La CMI est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il n'y a pas de croissance de germe visible, En est choisis trois bactéries test pour finir ce travail (S1 +S₂ +SA₂).

- Tout d'abord en ensemble les bactéries test sur milieu GN pendant 24h l'incubation $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ et le lendemain une prépare les 3 suspensions bactériennes :

En pose 5ml de milieu MH + des colonnés bactériennes prélevée à partir de boîte pétrie. .

- Puis en fait Une série de 9 dilutions dans le MH liquide dans des tupes
- Pour la réalisation de cette dernière en pose 2 ml d'extrait dans un tupe puis la dilution commence par prendre $1\text{ }\mu\text{l}$ de l'extrait + $1\text{ }\mu\text{l}$ de milieu MH pure et vers l'agitation pendant 2 mn puis les en couvrir de coton.

Finalement en remplir notre microplaque comme suivant et la lecture se faite par Éliisa :

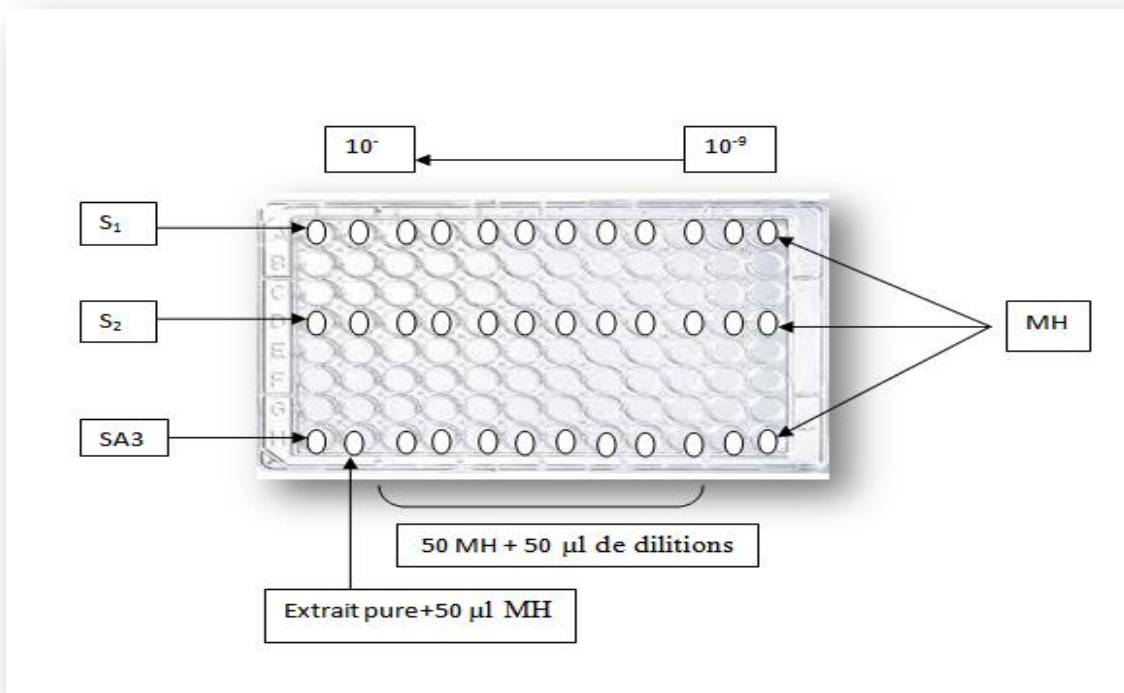


Figure (06) : mode opératoire de la microplaque

Résultat Et Interprétation

Dans cette partie on a présentés les résultats et les discussions de la caractérisation d'une souche d'actinomycètes prélevée à partir du sable saharienne (A₁W), Parmi les **11** souches isolées à partir de 3 échantillons de sable, et après plusieurs tests on est sélectionne cette souche A₁W car elle est la plus active. Cette souche d'actinomycète est soumise à une étude de différents caractères morphologique, culturels, et biochimiques dans le but de leur identification, suivi d'une mise en évidence de l'activité antibactérienne de cette souche par la méthode des disques d'agar et des puits, ainsi que son activité antibiotique, nous allons également présenter les résultats d'aptitude à former des antibiofilms et le pouvoir antioxydant de métabolites produit par cette souche.

Mesure du pH des échantillons

Le PH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires par différents mycètes et de faibles variations de PH peut donner des effets particuliers sur la productivité d'une souche.

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée au laboratoire. La technique consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sable en eau distillée (5g de sable pour 12,5 ml d'eau distillée)

Le PH de nos échantillons prélevés est résumé dans le tableau (02)

Echantillon	Ph
Ain safra	6
Ouad el halib	6
Kesdir	7

Tableau (03) : la détection de PH de chaque échantillon

Caractéristiques des échantillons du sable

On constate les caractéristiques des (03) échantillons de sable prélevés comme suivant :

Résultat Et Interprétation

Ech. Sable	Couleur
Ain safra	Jaunâtre
Ouad el halib	marron
Kesdir	Jaunâtre

Tableau (04) : les diverses Caractéristiques des échantillons du sable.

Prétraitement du sable

Plusieurs techniques de prétraitement des échantillons du sable, ont été appliquées dans les différents programmes de screening des actinomycètes dans le sable, ils ont tous comme objectifs à faciliter l'isolement sélectif des actinomycètes, qui ont une croissance lente, par rapport aux bactéries et aux champignons, qui gênent par leurs croissances rapides

Afin d'augmenter le rapport actinomycètes/microorganismes, trois stratégies sont suivies:

- Prétraitement chimique ou physique : les agents sporosides , le chauffage des échantillons du sable ou la centrifugation, séchage...etc.
- Utilisation dans le milieu de culture de certaines sources de carbone ou d'azote qui rende le milieu plus sélectif pour l'isolement des actinomycètes
- Utilisation des antibiotiques qui empêchent la croissance des bactéries et les champignons

Dans notre travail on a utilisé un prétraitement physique c'est le séchage.

Le séchage des échantillons du sable à l'air libre pendant sept jours, a pour but la réduction de la flore bactérienne contaminant. En effet les conidiospores des actinomycètes résistent bien à la dessiccation par rapport aux autres bactéries Gram positif et négatif qui vont crever. Les travaux de, indiquent qu'un séchage des échantillons du sable pendant 7 à 21 jours réduise considérablement le nombre des

Résultat Et Interprétation

champignons ainsi que les bactéries. De plus on a utilisé des milieux sélectifs on ajoutant les antibiotiques.

Isolement des Actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc.....

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu GYM et incubées à 28 °C pendant 7 jours.

Les résultats montrent clairement, que le milieu GYM est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes notre résultats montre que ont été isolées 11 souches d'actinomycètes.

Notre échantillon de sable présent un nombre réduit de colonies des actinomycètes, avec 11 souches, cela peut être expliqué par sa faible teneur en matière organique. Ceci est corroboré avec plusieurs travaux qui affirment que le nombre des actinomycètes est en corrélation positive avec le pourcentage de la matière organique.

L'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long.

Résultat Et Interprétation

Dans notre étude on a isolé 11 colonies d'actinomycètes sur le milieu GYM, Ces résultats font ressortir le milieu GYM comme un meilleur milieu de production d'antibactériens pour l'ensemble des actinomycètes du point de vue quantitative.



Figure(07) : isolements de diverses souches d'actinomycètes.

Identification des souches d'actinomycètes

L'identification morphologique, physiologique et biochimique a été effectuée pour les souches d'actinomycètes les plus actives sur les microorganismes pathogènes testés et même pour les souches test.

Etude morphologique

La caractérisation des souches est basée sur les critères morphologiques décrits dans le tableau (08)

Echantillons	Aspect macroscopique
K_310^{-3}	Colonie blanche avec le centre noir
A_1W	Colonie blanchâtre avec le centre gris
K_3N10^{-3}	Colonie grisâtre
A_1W	Colonie blanchâtre avec le centre gris

Tableau (05) : observation d'aspect macroscopique de diverses souches d'actinomycètes.

Résultat Et Interprétation

Après ensemencement sur le milieu GYM, les colonies des actinomycètes actives apparaissent au bout de 07 jours d'incubation à 28°C à degré de croissance faible, la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes couleurs de mycélium aérien (blanc, beige, jaune, marron, gris....) et difficiles à mettre en suspension.

En général, la taille moyenne des colonies est comprise entre 1 à 4 mm la croissance des souches étudiées, Elles sont tous incrustées dans la gélose.

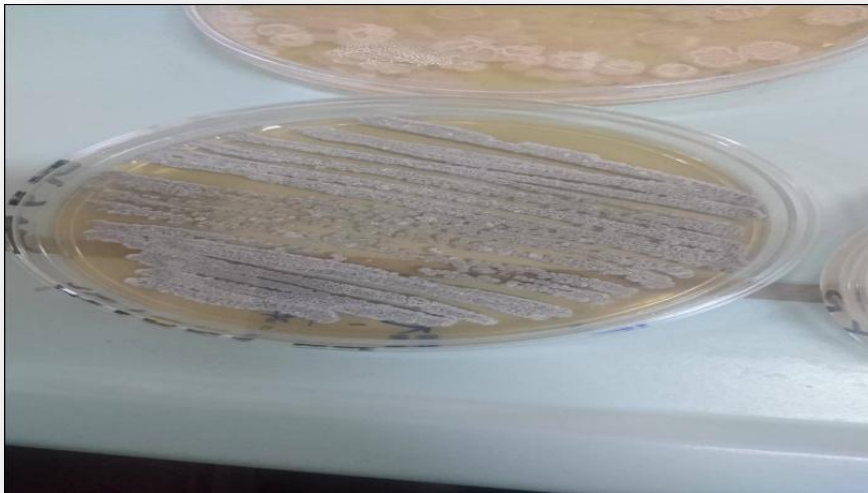


Figure (08) : purification de la souche A₁W

Observation microscopique

Toutes les souches actinomycétales sont Gram positif mais pour les souches test sont varies.

Les résultats donnés au tableau suivant :

Résultat Et Interprétation

La souche	Coloration de gram
K ₃ 10 ⁻³	G ⁺
A ₁ W	G ⁺
K ₃ N10 ⁻³	G ⁺
A ₁ W	G ⁺
Staphylococeus aureus	G ⁺
pseudomonas aeruginosa.	G ⁻
bacillus cereus	G ⁺
E .Coli	G ⁻
Salmonella thyphimurium	G ⁻
Listeria monocytogenes	G ⁺

Tableau (06) : Résultats de la coloration de gram chez différents souches.

Pour les souches actinomycétales d'après la coloration de Gram, l'observation microscopique montre que la plupart des souches d'actinomycètes isolées et purifiées sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive.

Les actinomycètes se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certains ou pas pour d'autre en élément bacillaires ou ovoïdes.

Et pour le changement qui passe au cours des différentes colorations en peut l'interpréter comme suivant :

Avant la coloration cytoplasme possède une couleur transparente.

Coloration primaire avec le Violet de gentiane qui traverse la paroi et les membranes des bactéries

Puis colore le cytoplasme du couleur violette chez les grams positifs et négatifs.

Fixation par le lugol qui provoque une combinaison chimique entre le violet de gentiane et les

Résultat Et Interprétation

Composants cytoplasmiques des bactéries et fixe ainsi la coloration dans le cytoplasme. Tous les éléments sont colorés en violet noir les Grams positifs et négatifs.

Décoloration à l'alcool traverse uniquement la paroi des bactéries **gram -** et décolore le cytoplasme.

Coloration secondaire Fuschine traverse la paroi des bactéries **gram -** et **gram +** et colore le cytoplasme finalement cytoplasme chez **gram +** reste violette et **gram -** devient rose.

En conclus que la coloration de gram consiste a travailler sous l'impact de deux facteurs :

- La composition de la paroi bactérienne.
- La capacité de la perméabilité de l'alcool a travers le paroi.

Gram + : l'alcool ne travers pas la paroi Peptidoglycane à cause que il est épais, Donc les lipids ne dissociée pas .

Gram - : l'alcool Travers la paroi Peptidoglycane a cause que il est fin, Alors les lipids se dissociée.

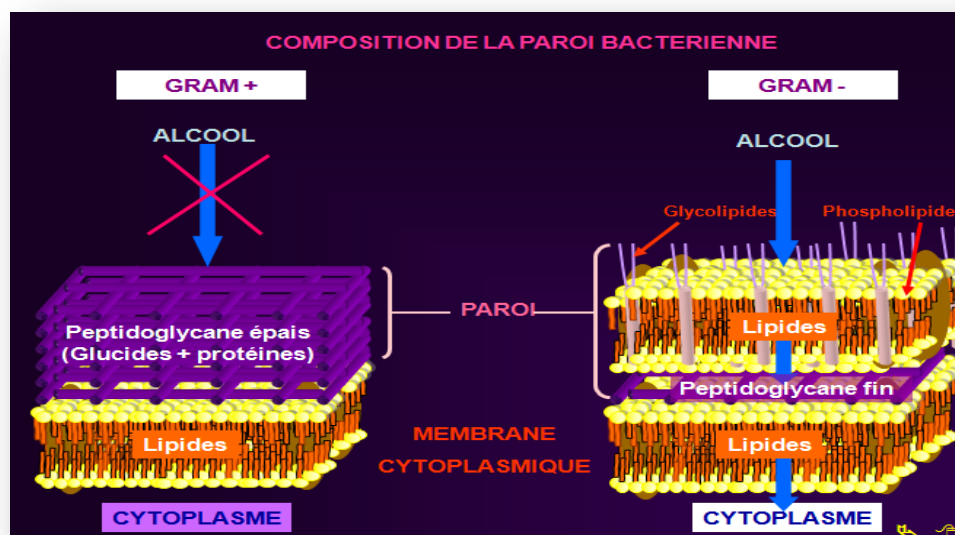


Figure (09): Composition de la paroi Bactérienne chez gram positif et négatif.

Résultat Et Interprétation

La souche A1W a donnée les résultants suivants:

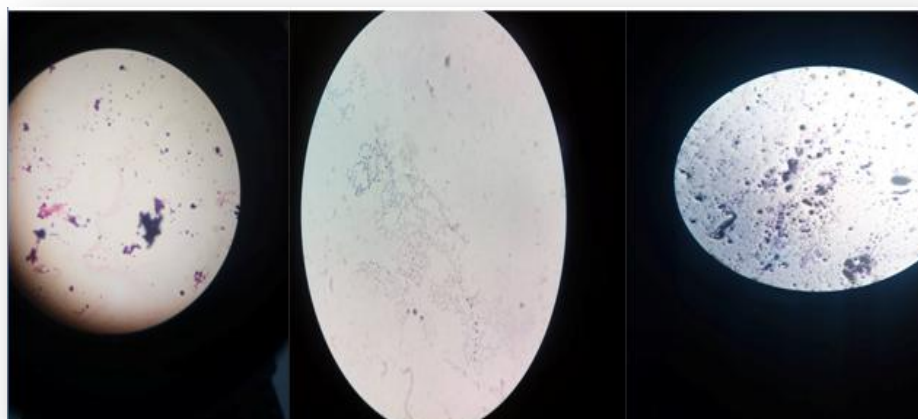


Figure (10): résultats du coloration de gram chez la souche A₁W.

Etude biochimique

Les résultats des différents caractères biochimiques des souches actinomycétales testées sont réunis dans le tableau (07). Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de nos souches.

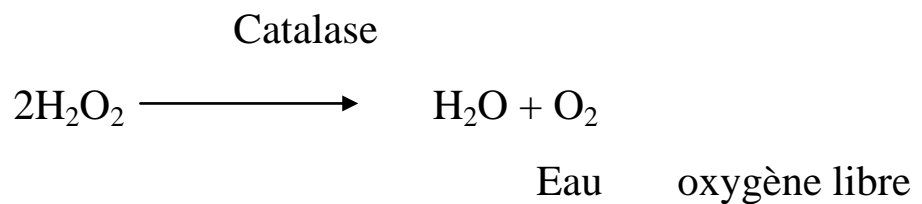
La souche	Test catalase	Test d'oxydase
A1W	+	-
Staphylococcus aureus	+	+
pseudomonas aeruginosa.	+	+
bacillus cereus	+	-
E .Coli	+	-
Salmonella thyphimurium	-	-
Listeria monocytogenes	+	-

Tableau (07) : Résultats de différent caractère biochimique des souches actinomycètes.

Résultat Et Interprétation

L'épreuve du catalase est utilisée pour distinguer si les bactéries sont capables de la production d'oxygène, elle est absente chez les bactéries anaérobies strictes.

Les micro-organismes capables de vivre dans les environnements oxygénés produisent des enzymes qui neutralisent des formes toxiques d'oxygène (les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène), l'une des enzymes est la catalase, qui casse le peroxyde de l'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire.



Les organismes qui produisent la catalase quand sont placés dans le peroxyde de l'hydrogène produisent des bulles d'air et l'absence de bulles indique que cette bactérie n'a pas le catalase.

Notre souche A1W a donné les résultats suivants:



Figure (11): Résultat du test catalase chez la souche actinomycétale A₁W.

Résultat Et Interprétation

Le terme d'**oxydase** désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. On dit qu'une bactérie est oxydase + si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone.

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le N diméthyl paraphénylène diamine**.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.

La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique IV (cytochrome-**oxydase**). Certains bactériologistes préfèrent parler de **cytochrome -oxydase** plutôt que d'oxydase.

Et pour L'épreuve du oxydase est utilisée pour distinguer si les bactéries sont capables a la production d'enzyme cytochrome oxidase.

Le complexe IV est constitué entre autre :

- du cytochrome a qui porte les groupes hème b_{560} et b_{566}
- du cytochrome a_3
- de 2 atomes de cuivre Cu_A et Cu_B

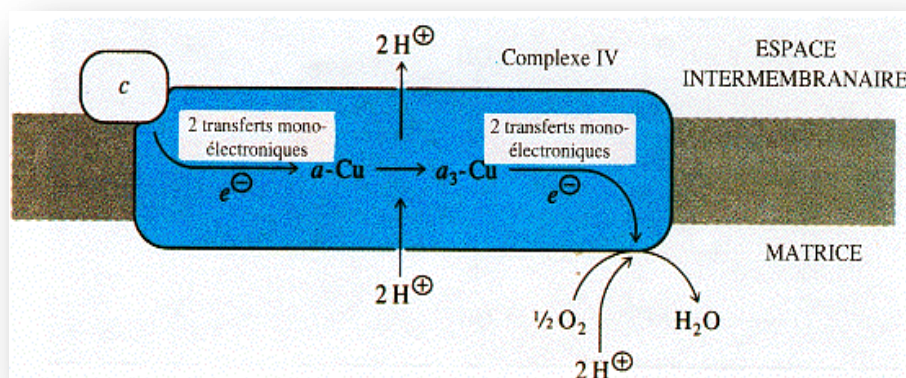
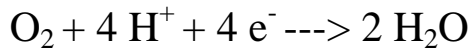


Figure (12) : La structure du complexe IV.

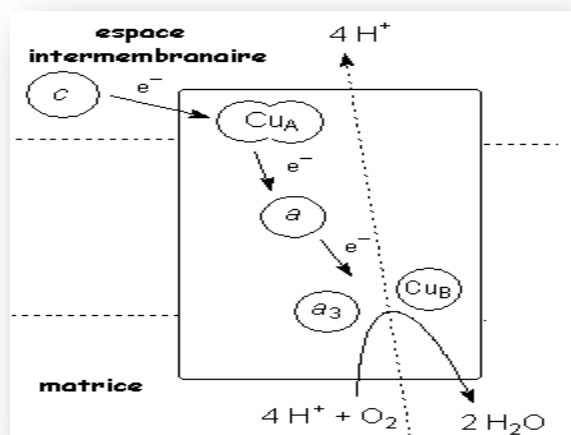
Résultat Et Interprétation

Le complexe IV est le dernier de la chaîne de transport d'électrons. Il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau :



Les 4 électrons sont transférés un à un du cytochrome c au complexe IV.

L'ordre de transfert des électrons est donc : cyt c \longrightarrow Cu_A \longrightarrow hème a \longrightarrow hème a₃/ Cu_B



Figure(13): L'ordre de transfert des électrons dans le complexe IV.

Quand les électrons traversent les cytochromes a et a₃, les atomes de cuivre des hèmes changent d'état d'oxydation.

Les hèmes des cytochromes du complexe IV et les 2 atomes de cuivre Cu_A et Cu_B sont ligandés à des atomes d'azote de résidus histidine.

Le complexe IV expulse 2 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Par ailleurs, il contribue d'autant plus à la formation du gradient de concentration de protons que, du fait de la formation de molécule d'eau, il soustrait des protons de la matrice.

Résultat Et Interprétation

Notre souche A₁W a donnée les résultant suivant:

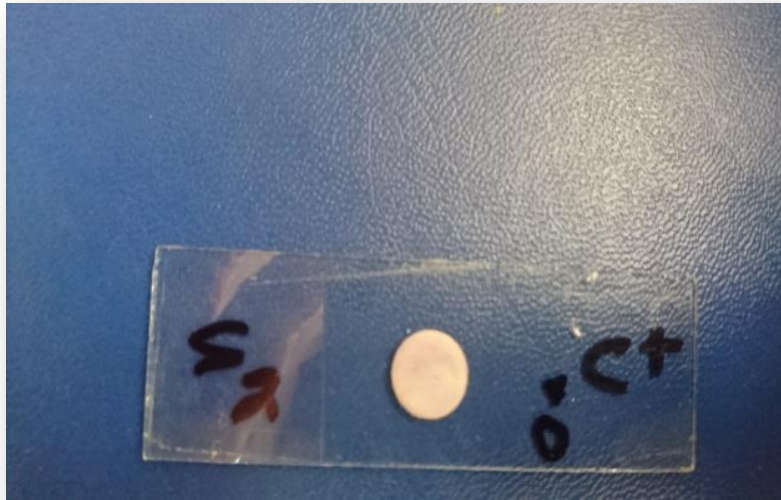


Figure (14): Résultat du test oxydase chez la souche actinomycétale A₁W.

Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de notre souche a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar, Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé qui permet de détecter l'effet inhibiteur de la souche A₁W envers les germes cibles testés (Gram positives et Gram négatives)

La croissance de la bactérie-test ensemencée sur la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion.

Ce test est réaliser sur milieu Muller – Hinton après 24h d'incubation a 30c[°], Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les actinomycètes. Pour cette raison, nous avons testés l'activité antibactérienne des 11 souches.

Résultat Et Interprétation

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (09), il montre d'une part que l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre et d'autre part que pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture.

Ces variations de résultat expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycetale peut produit plusieurs types de molécules antibactériennes

<i>Les bactéries</i>	Staphylococcus aureus	pseudomonas aeruginosa	bacillus cereus	E .Coli	Salmonella thyphimurium	Listeria monocytogenes
<i>A₁W</i>	-	2,7	2,8	2,6	-	1,9
<i>A₁W'</i>	-	-	-	2,7	-	-
<i>K₂W</i>	-	-	0,4	-	-	3
<i>K₁W</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K₃D10</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K₂D10⁻³</i>	-	-	-	-	-	-
<i>O₁W</i>	-	-	0,5	-	1,1	-
<i>K₃W</i>	-	-	0,6	-	-	-
<i>A₂W</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K₂D</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K₃</i>	-	-	-	-	-	-

Tableau (09) : résultats de test de l'activité antimicrobien de diverses colonies actinomycètes.

Résultat Et Interprétation

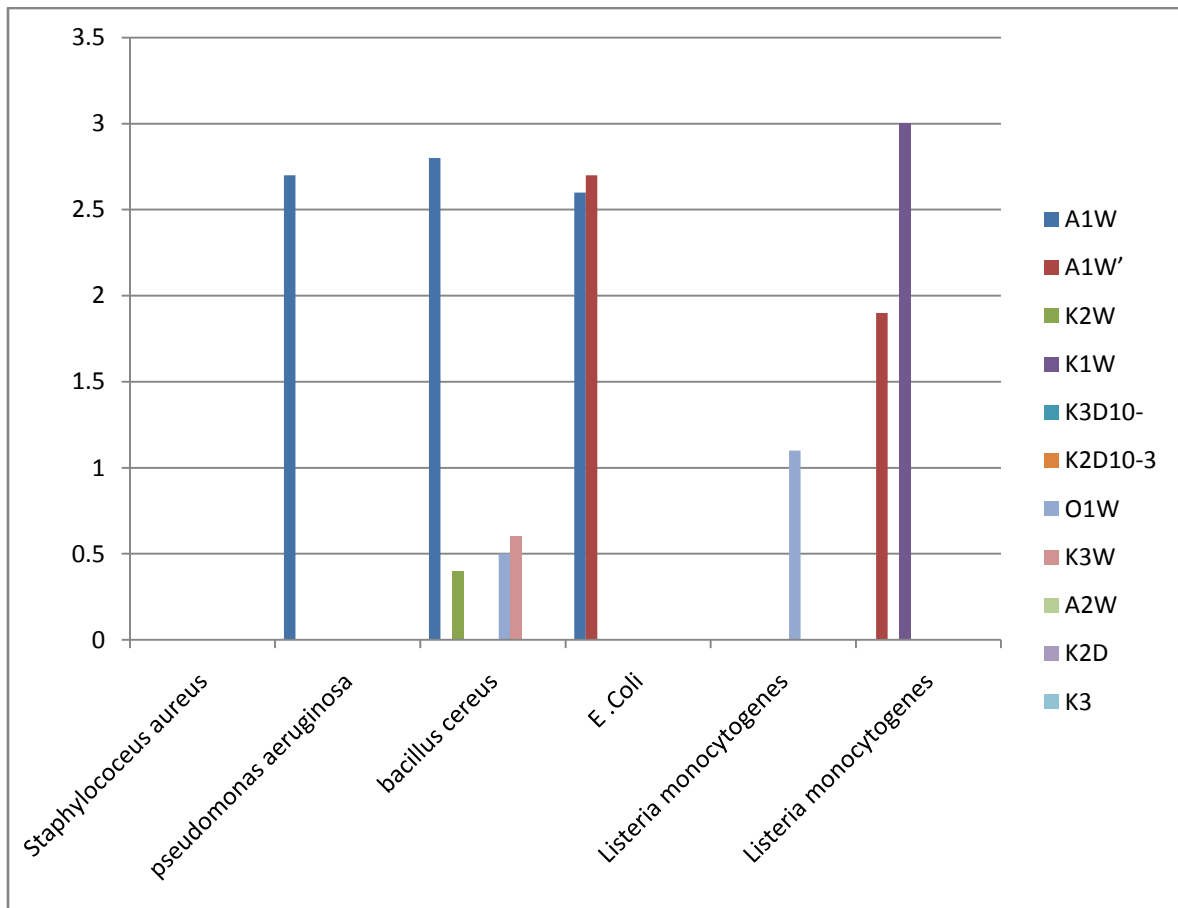


Figure (15): inhibition des souches test par nos isolats d'actinomycètes.

- La souche *Staphylococcus aureus* n'était pas inhibée par les 11 souches
- *pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par une souche A₁W La zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche A₁W avec un diamètre de 2,7 cm
- *bacillus cereus* a été inhibée par les 04 souches La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche A₁W avec un diamètre de 2,8 cm, les souches K₂W, O1W, K3O données des zones d'inhibition possède les diamètres 0,4 /0,5 /0,6 respectivement.
- E .Colie a été inhibée par les souches A₁W et A₁W' avec des zones d'inhibition qui possède presque le même diamètre.

Résultat Et Interprétation

- *Salmonella thyphimurium* a été inhibée par une souche O₁W La zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche O₁W avec un diamètre de 1,1 cm.
- *Listeria monocytogenes* a été inhibée par les souches A₁W et K₂W La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche K₂W (3cm) et A₁W avec un diamètre de 1,9 cm .

L'activité antibactérienne contre les bactéries-tests à coloration de Gram(+) apparait plus importante (100%) que celle contre les bactéries à coloration de Gram négative (88,88%) a cause de La différence en composition de la paroi entre les bactéries à coloration de Gram positive et négative peuvent être responsables de leurs différences de sensibilité.

En effet, les bactéries de coloration de Gram positive portent dans leurs membranes externes de Glucides et proteins ce qui donne Peptidoglycane épais ce qui rend leurs parois imperméables au passage, contrairement aux bactéries à coloration de Gram négative qui ont une paroi Peptidoglycane fin qui n'est pas une barrière efficace.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos souches actinomycetales a été réalisée contre six bactéries-tests, la majorité de ces bactéries sont résistantes aux antibiotiques et ont présenté une sensibilité vis-à-vis des substances secrétées par les souches actinomycétales étudiées, en totalité deux de ces bactéries tests (SA₁ et SA₂) sont plus sensibles que les autres presque Les résultats montrent que les 11 souches d'actinomycètes, sont actives contre au moins une bactérie-test. Aucune souche parmi les 11 n'a présenté une activité contre *Staphylococcus aureus*, La souche A₁W présente un pouvoir inhibiteur contre *pseudomonas aeruginosa*, *bacillus cereus*, *E. Colie*,

Résultat Et Interprétation

Listeria monocytogenes tandis que les souches K_2W , A_1W , O_1W , K_3O montrent une activité contre *Bacillus cereus*. Par contre la souche A_1W possède une activité seulement contre *E. coli*.

La souche K_2W possède une activité contre *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* avec des zones d'inhibition très importantes.

La souche O_1W possède une activité contre *Bacillus cereus* et *Salmonella typhimurium* avec des zones d'inhibition de 0,5 / 1,1 cm respectivement.

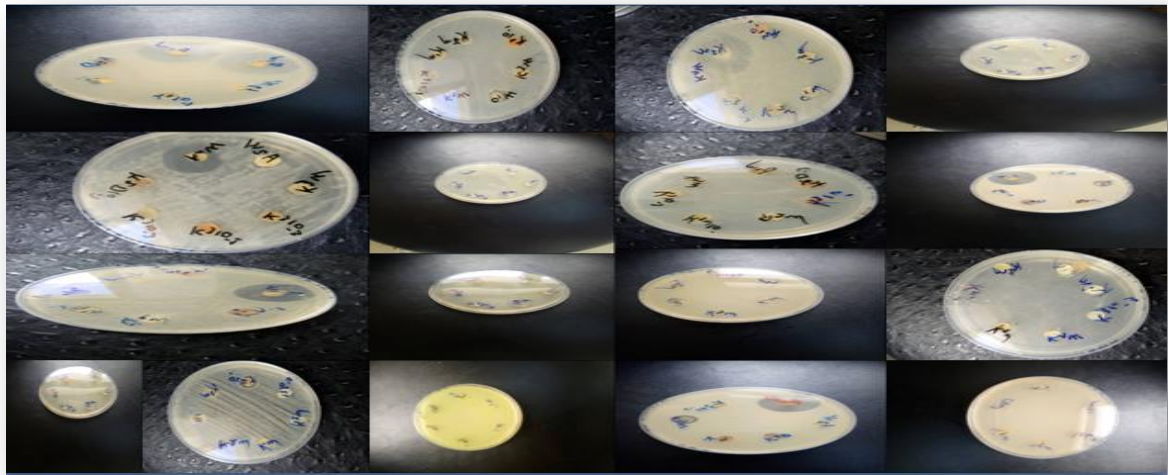


Figure (16) : l'activité antibactérienne par la méthode des disques chez les souches d'actinomycètes.

Caractérisation de la souche A_1W

Parmi les **11** souches isolées à partir de 3 échantillons de sable, et après le test d'activité antibactériennes on a sélectionné une souche qui est nommée A_1W qui est la plus active. Cette souche d'actinomycète est soumise à une étude de différents caractères morphologiques, culturels, et biochimiques dans le but de leur identification.

Résultat Et Interprétation

Résultat de l'extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide

La suite de ce travail consiste à choisir la souche la plus active A₁W car elle a donné des résultats positifs par rapport aux autres actinomycètes.

Après extraction nous avons obtenu un extrait brut à partir de la souche actinomycétale A₁W. C'est un Extrait brut méthanolique de la souche A₁W.

Les études récentes confirment que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du 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. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (Shomura et al. 1979).

Résultats obtenus à partir de la méthode des puits

L'activité antimicrobienne est aussi mise en évidence par la méthode des puits qui consiste à l'utilisation d'extrait et ses dilutions sur milieu Muller Hinton à l'égard des germes cibles testés après 24h d'incubation à 30°C[°], on observe des zones d'inhibition été notée autour des puits.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

/	T	100 %	75 %	50 %	25 %	12,5 %
bacillus cereus	0,6 cm	2,5 cm	1,5 cm	2,1 cm	2 cm	2cm
bacillus cereus'	0,5 cm	2,5 cm	1 cm	1,7 cm	2 cm	2 cm
E .Coli	/	2,1 cm	2 cm	2 cm	2cm	2 cm
E .Coli'	/	2cm	2,1 cm	2,1 cm	2,1 cm	2,5 cm

Résultat Et Interprétation

Tableau (10) : les résultats des zones d'inhibition obtenus a partir la technique des puis

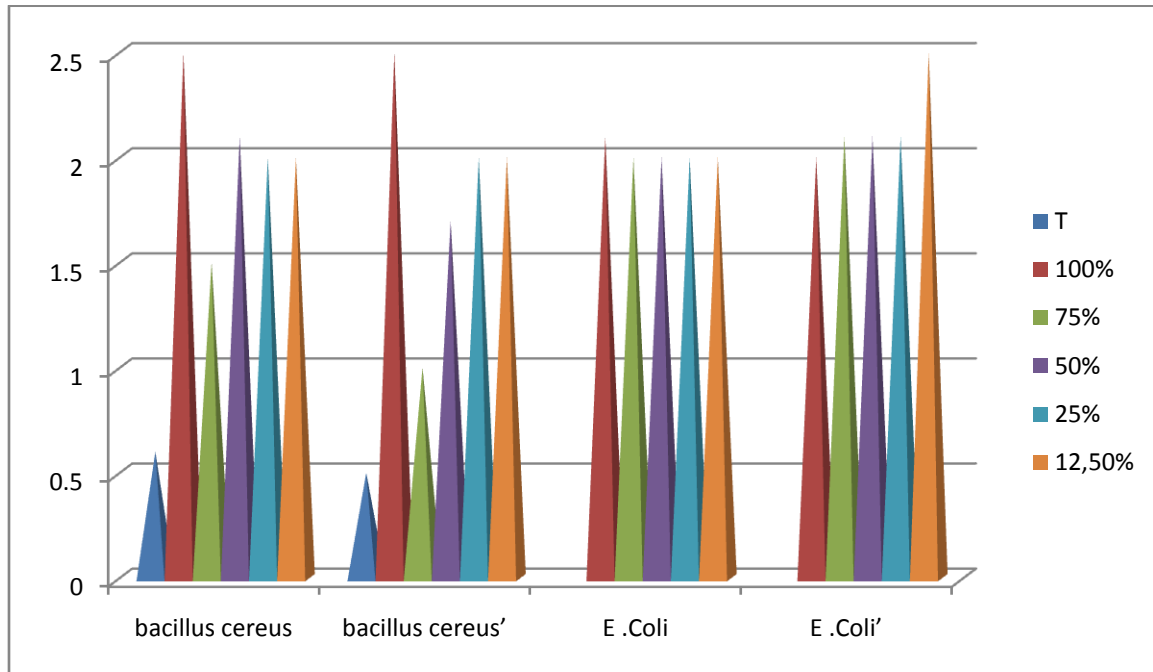


Figure (17) : inhibition des bactéries test par la souche A₁W



Figure (18) : les résultats des zones d'inhibition obtenus a partir de la technique des puis.

Les résultats montrent que les métabolites secondaires obtenus après l'extraction de la souche A1W a partir de milieu solide a donnée des résultats intéressent et trop importante contre les deux souche E. Coli et bacillus cereus

Résultat Et Interprétation

Le Témoin ou bien le méthanol a donnée des résultats contre bacillus cereus avec des zones d'inhibition (0,6 -0,5 cm)et en constate l'absence d'inhibition contre E. Coli.

Et pour le résultat de l'utilisation de l'extrait pure a donnée des résultats trop intéressent contre les deux souches avec des zones d'inhibition (2,5) contre bacillus cereus et (2-2,1) contre E.Coli.

Et pour la dilution 75° donnée des résultats importante contre les deux souches avec des zones d'inhibition (1-1,5) contre bacillus cereus et (2-2,1) contre E.Coli.

Et pour la dilution 50° donnée des résultats importante contre les deux souches avec des zones d'inhibition (2,1-1,7) contre bacillus cereus et (2-2,1) contre E.Coli.

Et pour la dilution 25° donnée des résultats importante contre les deux souches avec des zones d'inhibition (2-2) contre bacillus cereus et (2-2,1) contre E.Coli.

Et pour la dilution 12,5° donnée des résultats importante contre les deux souches avec des zones d'inhibition (2-2) contre bacillus cereus et (2-2,5) contre E.Coli.

La chromatographie sur couche mince

L'interprétation d'une CCM consiste à comparer les hauteurs relatives des différentes taches. Si les produits purs ont été déposés sur la même plaque, il est aide d'identifier les composés. Il est alors possible de connaître la composition de l'échantillon analysé

Alors dans notre cas en constate une seule tache sur la plaque ce qui veut dire quand a une seule espèce chimique qui entre dans la composition de notre produit pure (Extrait).

Pour chaque espèce chimique révélée, on peut quantifier l'élution en calculant le rapport frontal Rf défini par :

Résultat Et Interprétation

$$R_f = d/D$$

R_f = la distance parcouru par le substrat / = la distance parcouru par le solvant

$$R_f = 5,8/6,9 = 0,8406$$

Le rapport frontal est caractéristique du comportement d'une espèce chimique avec un éluant et une phase stationnaire donnés.

- d : est la distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache.
- D : la distance entre la ligne de dépôt et le front de l'éluant.

Pour le résultat de ce travail est ci-dessus :

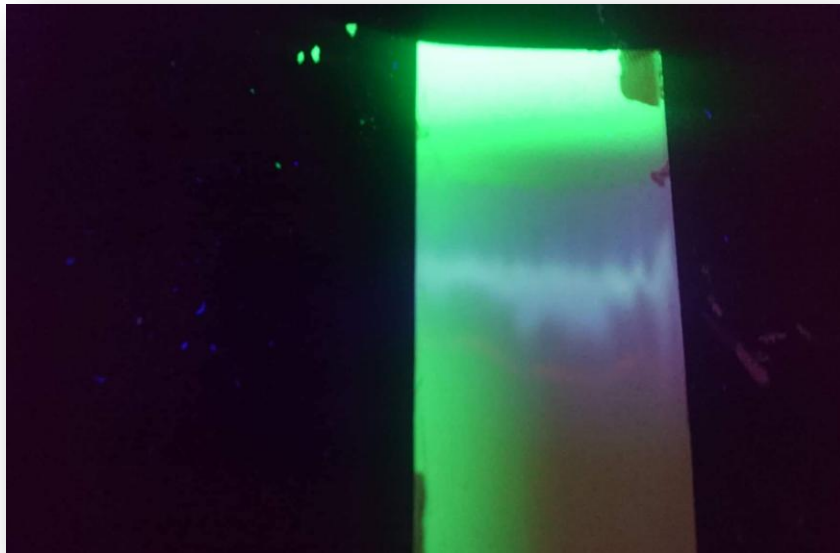


Figure (19) : observation de l'émigration de molécule bioactive sous l'ultraviolet.

Résultats de Bioautographie



Figure (20) : résultats de la bioautographie contre les deux souches testées.

Nous résultats montre l'efficacité de notre extrait vis-à-vis *E. coli* avec une zone d'inhibition de 1,9 cm et pour la souche *B. cereus* en observe l'absence de l'inhibition de germe pathogène. Ça peut être a cause de manque de diffusion de substance sur le milieu, cette cas est avéré négatif est car la faible concentration des substances antimicrobiennes au sein des feuilles CCM, En confirme cette hypothèse par les résultats positifs présentes contre la souche *B. cereus*.

Résultat Et Interprétation

Résultat de la purification des fractions actives séparées par CCM

/	Composition A	Cillot	Méthanol
bacillus cereus.	/	2cm	/
E .Coli.	1,6cm	1,1cm	0,5

Tableau (11) : les résultats obtenus autour des zones d'inhibition formée autour des puis de la purification des fractions actives séparées.

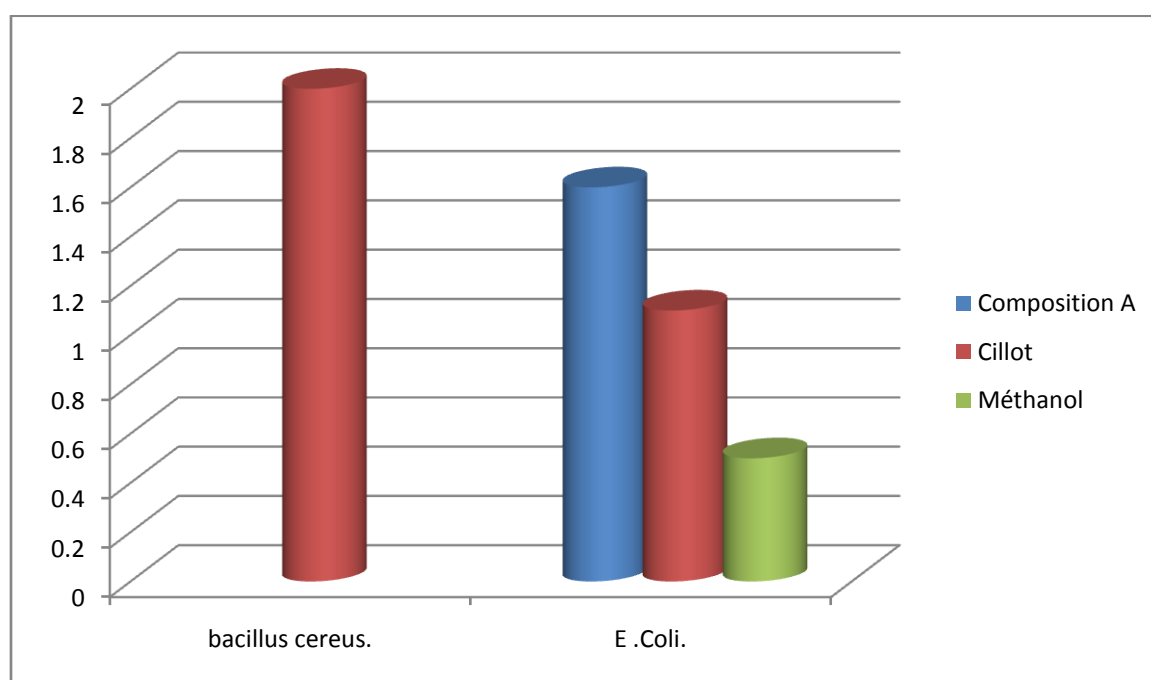


Figure (21) : histogramme obtenu autour des zones d'inhibition formée autour des puis de la purification des fractions actives séparées.

Interprétation

Après la Purification des fractions actives séparées par CCM nos résultats montrent que la composition A obtenue après Grattage du cilice contenant les fractions séparées et récupération de chaque fraction dans 2 ml de méthanol a donné des résultats importants contre E. COLI avec un diamètre d'inhibition de 1,6 cm et en constate l'absence contre bacillus cereus à cause de la diffusion de substance et peut être même à cause de la charge de l'extrait.

Résultat Et Interprétation

Et pour le Cillot Résultats positif peut être que la charge de l'extrait est forte dans ce cas parce que le cillot contient les cellules producteurs d'extrait ce cillot possèdent des zones d'inhibition de diamètre (2cm) contre bacillus cereus et (1,1cm) E.Coli avec des zones d'inhibition (0,5 cm) et en constate l'absence d'inhibition contre E. Coli.

En constate pour le Témoin une zone contre E. coli du diamètre (0,5cm) donc en conclus que le méthanol possède un impact sur la souche E. coli.



Figure (22) : Résultat de la purification des fractions actives séparées par CCM

Activité anti –biofilms :

Dans cette expérience, on a voulu tester l'activité anti-biofilm vis – a – vis des germes cibles a Gram positif et Gram négatif a partir de surnageant de culture de notre souche actinomycétales et afin de déterminer la CMI.

Après la lecture sur Élisa, en a obtenus Les Résultats illustrés dans la figure () montre que notre microplaque été contaminer ce qui conduit a l'absence d'activité anti-biofilm contre les germes testés

Résultat Et Interprétation

A partir de ces résultats on conclut, que il y'a une valeur de l'absorbance présente de l'extrait est ce qui confirme ça les étapes précédentes de travail mais la seule chose qui reste à lutter contre un résultat positif c'est la contamination.

Conclusion et Perspectives

Parmi les nombreux propriétés d'actinomycètes leur capacité a produire une variétés substances intéressantes.

Notre expérience sert à l'étude de l'isolement des acténomycétales et la production, extraction et purification de quelques composés actifs extraits à partir d'une souches d'actinomycètes isolée de la région de Naama.

L'étude consiste à suivre certaines espèces de micro-organismes produisent des métabolites secondaires qui ont appliqués en des applications thérapeutiques importantes. Cette production doit être soumise à la notion de performance, En effet, les micro-organismes comme tous les êtres vivants se nourrissent : ils utilisent des substances minérales et organiques puisées dans l'environnement pour se croître et produire des métabolites.

Telle que Les actinomycètes qui sont des bactéries à Gram positif à majorité filamenteuses, sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques, notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces* dont plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses, qui sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par leur métabolisme secondaire.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés par la détermination des conditions optimales de la production des métabolites secondaire produisent par les actinomycètes.

L'isolement et la revivification des souches actinomycétale ont été fait sur milieu GYM, nos résultat montre que cet milieu permettent une croissance importante de actinomycètes.

Nos résultats expérimentaux ont montré que la souche bactérienne A₁W qui a été isolée à partir du milieu aride qu'elle possède une

activité antibactérienne plus active que les autres souches actinomycétales contre des bactéries à coloration Gram positive et à coloration Gram négative. Cette activité est maximale en utilisant la technique de cylindres d'agar d'A1W sur milieu de culture MH probablement ensemencé par les souches tests pour détecter cette fonction, sous incubation de 28°C pendant 24H.

Les deux méthodes de cylindre d'agar et la méthode des puis s'avère la plus performante dans la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par nos souches d'actinomycètes.

nous nous sommes intéressés à la purification partielle de l'antibiotique produit par la souche bactérienne utilisée (A₁W) et pour le solvant organique qui fournit le meilleur rendement d'extraction et séparation en cette cas c'est le méthanol alors Cette souche était ensemencé par stries dans le milieu gélosé AF, puis incubée a 28°C pendant 21 j, après cette durée les métabolites était récupères sous l'action de méthanol.

Ce dernier semble être le solvant le plus approprié pour extrait les molécules bioactives des filtrat de la culture , l'étude est ensuite suivi d'un essai purification de ces fraction organiques

Notre extrait étudié présente une activité antibactérienne contre des divers germes telle que E. coli et B. cereus .

Dans une seconde partie, l'analyse chromatographique sur couche mince, pour obtenir une meilleure phase ou système d'élution cette étude était montrée que le système Acide acétique - méthanol (9:1) est le meilleur. Il a favorisé une migration rapide des molécules biactives et une bonne séparation des composés de cet extrait méthanolique. Cette étude parmi d'obtenir des informations sur la nature du principe actif par l'utilisation de différentes révélateurs chimique et

microbiologique, suivie par l'utilisation de microplaque afin de déterminer CMI de ce Extrait vis-à-vis les bactéries test.

Les résultats de la bioautographie ont montré que la tache obtenue possède une activité antibactérienne contre E. coli avec une zone d'inhibition allant de 1,9 cm et On constate l'absence dans d'autres (B. cereus) ce qui peut être expliqué par la diffusion des molécules bioactives dans le gel ce qui diminue leur concentration sur le chromatogramme après la migration et la séparation.

Toutefois, les résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être approfondis pour tirer des conclusions définitives et confirmées. Comme Perspective, nous préconisons de poursuivre les recherches autour des axes suivants :

- Confirmer l'identification des genres étudiés
- L'utilisation des souches active en domaine thérapeutique
- Recherche et étudier l'activité antibactérienne sur une gamme plus large des Bactéries-tests, et on appliquant différents méthodes tels que la technique des puits, la technique de cylindre d'agar
- L'extraction et la purification des molécules bioactive
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI)

ANNEXES***Annexe 1******Composition des milieux de culture******Mueller Hinton***

Infusion de viande de bœuf 2 g

Amidon 15 g

Hydrolysate de caséine 17,5g

Agar 17 g

Eau distillée 1000 ml

PH 7,3

Gélose nutritive

Peptone 10 g

Extrait de levure 5 g

Na Cl 5 g

Agar 15-20 g

Eau 1000 ml

PH 7,2

Bouillon nutritif

Peptone 10 g

Extrait de levure 5 g

Na Cl 5 g

Eau distillée 1000 ml

PH 7,2

GYM

Glucose 4g

Extrait de levure 4g

Extrait de malte 10g

CA CO₃ 2g

Agar_agar 14g

Eau distillée 1000ml

TSE

Nacl 8,5g

Tryptone 1g

Eau distillée 1L

AF

Extrait de levure 4g

Extrait de malt 10g

Glucose 2 g

NaCl 2,5 g

CACO₃ 1g

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

PH 7

Annexe2

Coloration de gram

Elle est réaliser selon la méthode classique, des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopique et microscopique des actinomycètes sont préparer et colorés comme suivant :

- Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen ;
- Coloration par violet de gentiane .Laissez agir de 1 min.
 - Rincez à l'eau distillée ;
- Mordançage au lugol (solution d'iode iode-iodurée) pendant 1 min. puis rinçage à l'eau distillé .
- Décoloration par l'alcool pendant 20 s, rincé à l'eau distillée
- Décoloration à la fuschine pendant 1 min, rinçage à l'eau distillé puis séchage

Puis , on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge.

Annexe 03

Matériels utilisés

I.1.Grands matériels

- Agitateur
- Balance
- Microscope
- Etuves réglables
- Plaque chauffante.
- Autoclave

- Bain marie
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex
- Table à niveaux
- Pied à coulisse
- Loupe binoculaire
- La Hotte

I.2. Petits matériels

- Anse de platine
- Bec bunsen
- Boîtes de Pétri (boîtes compartiment, des mini boîtes)
- Portoirs • Virerai: béchers gradués, éprouvettes gradués, tubes à essai stériles, et les flacons
- les lames
- Pipettes Pasteur
- Spatule
- Barreaux magnétique
- Picette
- film photographique
- papier whatman

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

AMEUR Hanane, Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de Streptomyces et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride, Sétif, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 06/11/2014,200p

Avril, J, L., & al. 1992. Bactériologie clinique.2 éd. Paris : ellipses. Pp. 511.

B

Baldacci, E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. Ann Soc Belge Méd Trop, 4 : 633–646

BELFERKH .Asma et al . solement des actinomycètes à partir d'un sol Saharien et d'une Sebkha de la région d'El-Oued et mise en évidence de leur capacité à dégrader quelques pesticides , Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes
30/06/2016,78P

BELAIDI Ines, Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes, Constantine, Université des Frères Mentouri, 30 /06/2015 ,68P

BENAISSA. Souad, Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema), TLEMCEN, UNIVERSITE de TLEMCEN, 16/06/2016 ,127p

Références Bibliographiques

BENJIRA LAMIA, ETUDE DE LA PRESCRIPTION D'ANTIBIOTIQUE CHEZ L'ENFANT, MAROC, UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH, 2016,166p.

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot (Tokyo) 58: 1-26.

Bosgiraud C. (2003). Microbiologie générale et santé. Association des enseignants de microbiologie des facultés de pharmacie française. Edition ESKA, Paris. 520p

Blunt.J.W, Copp. B .R, Munroa. M .H. G, Peter. T. N and Prinsep. M. R. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. (2006); 23: 26-78.

BOUSSEBOUA H., 2002-Element de microbiologie générale. Edition de Université Mentouri de Constantine : 17p.

C

Chardain H, Barsotti O et Martine. Microbiologie en odontostomatologie. Edition : Maloine. 2006. 329p

CONN. V.M. (2005). – Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297. dans : Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A. et Schlegel H.G. The prokaryote

G

GUEBLA. Khaoula et al. CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ MÉTABOLIQUE DE DIFFÉRENTS ISOLATS D'ACTINOMYCÈTES, Tébessa, Université de Larbi Tébessi, 30mai 2016,115p

Références Bibliographiques

K

Kerbab. Souhila, Les actinomycètes d'un sol salé: rôle des osmoprotecteurs naturels, Sétif, Université Ferhat Abbas, 133p

Keyeo, F., O. Noor Ai'shah, et H. G. Amir. 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormones production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotech.* 10: 1-7.

L

Lechevalier M.P., Lechevalier H., (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces*. *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. pp 315-360.

LECTERCH H., IZARD D., et WATTRE P., 1983- Microbiologie générale. Paris : 39p.

LOUCIF K., 2011-Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine : 21p.

Références Bibliographiques

M

Maestro. B, Sanz. J.M. Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. (2007); p : 2188-196.

MAMERI Nadia, Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés au niveau de l'EPSP de Boghni Tizi Ouzou, BEJAIA, Université Abderrahmane MIRA, 2012,46p

Mariat F. et Sebald M. (1990). Actinomycetes In :Bactériologie Médicale. Le Minor L. et véron M. 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.

MELOUAH .Ratiba Oum Hani, Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des actinomycètes, Ouargla, UNIVERSITE KASDI MERBAH, 10/06/2015,65p

MESBAH. Amina et al. Étude de l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne, Constantine, Université des Frères Mentouri, 2015,68p

Messoudi O., (2003). Contribution à la caractérisation des souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de Kenadsa (Bechar). Thèse de Magistère en Microbiologie Appliquée. Université Abou BakrBelkaid Tlemcen. 78p.

N

Références Bibliographiques

Naimi somia, Contribution à la caractérisation biochimique des substances antibactériennes sécrétées par des actinomycètes isolées à partir des sols des zones arides de la région d'El Bayadh, Saida, Université Dr. Moulay Tahar, 2015,155p

O

OKAMI Y., et HOTTA K. (1988). "Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». Academic Press, Orlando (Ed.), pp.33-67.

P

PERRY J.J., STALEY J.T., et LORY S., 2004.-Microbiologie. Edition Dunod.

R

Rangaswami. G. Bagyaraj. D. J. Bagyaraj D.G. 2004. Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi. Pp: 440.

Robert O. (2000). Résistance aux antibiotiques. Fondation pour la recherche médicale.

S

SabaouN.,(1988). Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et écologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.

Références Bibliographiques

Schofield G.M. and Schaal K.P. (1981). A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 121, 237–259.

Smaoui S.,(2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.

T

TANAKA. Y; and OMURA. S. (1990). – Metabolism and products of Actinomycetes– an introduction. *Actinomycetologica*, 4 (1), 13–14.

THEILLEUX J., 1993 – les actinomycètes in *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425

TOMITA, K., M. NISHITO, K. SITO, H. YAMAMOTO, Y. HASHINO, H. OKHUMA, M. KONISHI, T. MIYAKI et T. OKI. 1990. Pramycin A, B and C: new antifungal antibiotics. I. Taxonomy, production and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* 43: 755–762.

W

Wang L; Huang. Y; Liu. Z; Goodfellow. M & Rodriguez. C. 2006. *Sreptacidiphilus oryzae* sp. Nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. *J. Sys. Ev. Microbiol.* Vol 56. Pp: 1257–1261.

Références Bibliographiques

Z

Zmahoun, C. 2005. Evaluation de la sensibilité aux antibiotique des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M). Thèse de doctorat d'état , Université du Mali. 91.

ZOUAGHI A., 2007-Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage : 12p

Zvyagintsev. D. G; Zenova. G. M; Sudnizin. I. I; Doroshenko. E. A. 2005. The Ability of Soil

Actinomycetes to Develop at an Extreme Dommergues, Y. Mangenot, F. (1970) ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, paris, pp9-72(796). ly Low Humidity. Vol: 405. Pp 461-463.

Références Bibliographiques

Résumé :

Le développement continu de la résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient le besoin urgent de nouvelles molécules antimicrobiennes. Dans cette étude, nous avons testé l'activité d'agents antibactériens produits par une souche d'actinomycètes isolés provenant de sols désertiques.

Une seule souche d'actinomycètes, qui était plus efficace que d'autres souches, a été sélectionnée en raison du fait que ces bactéries sont responsables de la production de la plupart des molécules biologiques actuellement actives. Le but de cette étude est d'identifier ces molécules biologiques produites par ces dernières.

Cette souche a été isolée dans le milieu riche en GYM dans le but d'évaluer l'activité des bactéries antibactériennes par la technique des cylindres contre six types de bactéries et également de tester leur diversité morphologique, physiologique et métabolique.

Ces souches ont été cultivées à partir d'un milieu de fermentation en milieu AF afin d'extraire des composés secondaires à l'aide de méthanol, lesquelles ont démontré une activité et une efficacité contre deux bactéries pathogènes.

Les expériences ont montré que la souche A1W commence par la production maximale d'antibiotiques à partir du premier jour, ce qui permet d'éliminer complètement les souches cibles et a montré une forte activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes.

Grâce à la tache que nous avons obtenir du CCM a été particulièrement active contre E. Coli et cette activité a été réalisée par bioautographie.

les mots clés :

Actinomycètes, CCM, Milieu riche, Antibactériens, Antibiotiques, Production maximale, souches cibles, Bioautographie.

ملخص

التطور المستمر لمقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وظهور أمراض معدية جديدة يبرر الحاجة الملحة لجزيئات جديدة مضادة للميكروبات في هذه الدراسة اختبرنا نشاط المضادات البكتيرية المنتجة من طرف سلالة من الاكتينومييسات المعزولة من التربة الصحراوية .

وفي إطار انجاز هذا العمل تم اختيار سلالة واحدة من سلالة الاكتينومييسات والتي كانت لديها فعالية أكثر مقارنة بباقي السلالات لان هذه بكتريا مسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات البيولوجية النشطة حاليا الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه الجزيئات البيولوجية التي تفرزها هذه الأخيرة .

تم عزل هذه السلالة في وسط غني GYM وذلك لغرض تقييم نشاط المضادات البكتيرية بواسطة تقنية الاسطوانات ضد ست أنواع من البكتريا و أيضا لاختبار تنوعها المورفولوجي و الفيزيولوجي و الايضي .

وقد تم نمو هذه السلالات عن طريق التخمر في وسط انتقائي صلب AF وذلك من اجل استخلاص المركبات الثانوية بواسطة الميثانول وقد أظهرت هذه المركبات نشاط وفعالية ضد نوعين من بكتريا الممرضة .

أوضحت التجارب أن السلالة A_1W تبدأ بالإنتاج الأقصى للمضادات الحيوية ابتداء من اليوم الأول والذي يعمل بالقضاء التام على السلالات المستهدفة وأظهرت السلالة نشاط مثبط قوي ضد البكتريا الممرضة و ذلك بحساب أقطار مناطق التثبيط البكتريا الضارة.

من خلال اللطخة التي تحصلنا عليها عن طريق CCM, هذه اللطخة كانت نشطة خاصة ضد E.Coli وهذا النشاط تم تحقيقه بواسطة تقنية البيوتوغرافيا.

الكلمات المفتاحية :

الاكتنومييسات, CCM, وسط غني, المضادات البكتيرية, المضادات الحيوية, الانتاج الأقصى, السلالات المستهدفة, البيواتوغرافيا.

Summary :

Continued development of bacterial resistance to antibiotics and the emergence of new infectious diseases justify the urgent need for new antimicrobial molecules. In this study, we tested the activity of antibacterial agents produced by a strain of isolated actinomycetes from soils desert.

A single strain of actinomycetes, which was more effective than other breeds, was selected because these bacteria are responsible for the production of most of the currently active biological molecules. The purpose of this study is to identify these biological molecules produced by them.

This strain was isolated in the GYM-rich medium in order to evaluate the activity of antibacterial bacteria by the cylinder technique against six types of bacteria and also to test their morphological, physiological and metabolic diversity.

These strains were cultured from a fermentation medium in eclectic AF medium to extract secondary compounds with methanol, which demonstrated activity and efficacy against two pathogenic bacteria.

The experiments showed that the A1W strain begins with maximum antibiotic production from the first day, which completely eliminates target strains and has shown strong inhibitory activity against pathogenic bacteria.

Thanks to the coloring we had, CCM was particularly active against E. Coli and this activity was performed by bioautography.

keywords :

Actinomycete, CCM, Rich Medium, Antibacterials, Antibiotics, Maximum Production, Target Breeds ,. bioautography