

**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

BOUTOUTTA Malika

**Isolement des Actinomycètes productrices des
substances antimicrobiennes à partir des sols des zones
arides de la région d'El Naama**

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

A l'échéance de ce mémoire de fin d'études, je dois en premier

Lieu l'énorme remerciement à notre Dieu miséricordieux qui a permis d'acquérir un tel niveau de savoir.

A mes très chers parents et tous les membres de la famille qui ont témoigné d'une grande patience et un grand sacrifice pour l'aboutissement de mes études.

J'ai également l'honneur de présenter mes remerciements les plus chaleureux et notre gratitude les plus profondes à mon encadreur **Mr Benregueig Mokhtar**, pour avoir dirigé ce travail avec compétence et professionnalisme, pour tous les conseils précieux qu'il nous prodigués

Nos remerciements s'adressent l'ensemble des membres de jury :

Mr Sitayeb Tayeb et **Mr Adli Djallal Eddine**, d'avoir bien voulu accepter et trouvé le temps pour lire le manuscrit de notre mémoire.

Enfin à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, trouvent ici le témoignage de toute notre gratitude.



Dédicace

Tous d'abord je tiens à dédier ce modeste travail a mes parents qui ont été toujours présent par leurs amour permanent, leurs soutient moral et financier et je vous souhaite une long vie.

Mon très cher père, qui m'a soutenu, protéger, et encourager tout long de ma vie. Merci.

Ma très chère mère, qui m'a donné beaucoup d'affection et d'amour tout au long de ma vie. Merci.

Je le dédie aussi ma très chère sœur unique Zineb et sa fils jawad mohamed qui je l'aime beaucoup je leur souhaite une vie plein de réussite et de sucées.

*Mon petit fils Nizar abdellah qui je l'aime beaucoup et je leur souhaite une vie pleine de joie et de réussite
Mes frères Mohamed Amine, Abdelkarim*

Je dédie une personne très chère kafi chiekh qui je l'aime et je leur souhaite une long vie plein de bonheur et de réussite

Mes oncles, tantes, cousins, cousines surtout Nesrine, Manel, Nadjoua, et toute la famille de Boutouta, Kaddache .

Ma copine qui j'ai passe avec elle des bonnes moments inoubliable soumia et sa famille

A tout personne, qui ma suivi mon travail de lion et de prés

*Mes chères amies Ftimadriskhodja, salima, wafa, mounia, sara
Toute ma promotion Master 2 Microbiologie Appliquée 2018-2019*

Malika

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes Extrêmes comme les sols arides de l'Algérie sont rares, Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la recherche des actinomycètes productrice des substances bioactives, à cet effet 15 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons différentes de sols arides de la wilaya d'Al Naama sur un milieu sélective GYM. L'activité antibactérienne a été effectuée vis-à-vis de 2 bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 10870), et 1 bactérie Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC25922). Elles ont été réalisées par la technique des cylindres d'agar. Parmi les 15 isolats, 2 isolats sont actives. Les deux isolats ont présentés une activité contre au moins 2 bactéries indicatrices.

Ces souches ont été cultivées par fermentation solide dans le milieu AF afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. L'extraction a été effectuée avec le méthanol. L'activité antifongique des extraits a été mise en évidence par la méthode de contacte directe vis-vis de 3 souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Endosporium*). Les deux extraits ont présenté une activité inhibitrice contre les 3 souches fongiques indicatrices.

Mots clés : Actinomycètes ; molécule bioactive ; sol aride ; activité antibactérienne ; activité antifongique.

Abstract

The actinomycetes are bacteria responsible for producing most of bioactive molecules. The work of isolating these microorganisms from extreme ecosystems such as arid soils of Algeria are rare. In this work we are interested in the search for actinomycetes producing bioactive substances, for this 15 strain of actinomycetes were isolated from different samples of arid soils and the wilayat'AlNaama on a selective medium GYM. The antibacterial activity was tested against of 2 Gram + bacteria (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 10870) and one gram- negative bacteria (*Escherichia coli*ATCC25922).they were made by the technique of agar cylinders. Among the 15 isolates, 2 isolates are active. Both isolates showed activity against at least 2 indicator bacteria. All the 2strains were cultured on a solid medium by fermentation medium (AF) to produce secondarymetabolites. The extraction was made by maceration by methanol. The antifungal activity of the extracts was highlighted by the method of direct contact with 3 fungal strains (*Aspergillus niger*, *Phytophthorainfestans*, *Endosporium*). Both extracts exhibitory activity against the 3 fungal indicator strains.

Key words: Actinomycets,Bioactive molecules, Soil arid, antibacterial activity, antifungal activity.

ملخص

الاكتينومييسات هي بكتيريا مسؤولة عن انتاج معظم الجزيئات البيولوجية النشطة حاليا الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه الجزيئات البيولوجية النشطة التي تفرزها الاكتينومييسات

في عملنا هذا تم عزل 15 سلالة من الاكتينومييسات انطلاقا من عينات مختلفة من التربة لمنطقة الجافة التي اخدت من ولاية النعامة و المزروعة في وسط زرع ملائم GYM من بين 15 سلالة 2 من السلالة فقط كانت نشطة ضد على الاقل اثنين من البكتيريا الممرضة و المعزولة

نشاط الاكتينومييسات المضاد للبكتيريا كان ضد اثنين من بكتيريا ايجابية الغرام
25923 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 10870,

Escherichia coli ATCC 25922 و بكتيريا سلبية الغرام

و قد نمت هذه السلالتين عن طريق التخمر في وسط انتقائي صلب AF وذلك من اجل استخلاص المركبات الثانوية بواسطة الميثانول و قد أظهرت هذه المركبات نشاط و فعالية و ضد ثلاثة فطريات (*Aspergillus niger*, *Endosporium*, *Phytophthora infestans*)

الكلمات المفتاحية: الاكتينومييسات , الجزيئات البيولوجية النشطة , تربة جافة , نشاط مضاد للبكتيريا نشاط مضاد للفطريات.

La liste d'abréviation

Gram+: Gram positive.
Gram - : Gram négative.
pH: Potentiel d'Hydrogène.
Nacl: Chlorure de sodium.
ADN: Acide désoxyribonucléique.
ARN : Acide ribonucléique
ATCC: American Type Culture Collection.
TSE : Tryptone, Sel, Eau
PDA : Potato Dextrose Agar
CMI : concentration minimale inhibitrice
°C : Degré Celsius.
% : Pourcentage.
S/cl : Sous classe.
S/O : Sous ordre.
ml: Millilitre.
µl: Microlitre.
g: Gramme.
h: heure.
S: Seconde.
nm: Nanomètre.
GN : Gélose Nutritif.
BN : Bouillon Nutritif
UFC : unité formant colonie.
V : Volume.
V/V: Volume sur volume
P/V: Poids sur volume
G: Grossissement.
µg: Microgramme.
G: Grossissement.
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
O₂: Oxygène.
G/C : Guanine et cytosine.
Min : minute.
GLM : Glucose-Extrait de levure-Malt.
ATP: Adenine three phosphates
BSC : Bouillon Sabouraud Champignon
AF: Actinomycète fermentation
MA: Mycélium aérien,
MS : Mycélium de substrat
S/C : sous-classe
S/O : sous-ordre
CCM : Chromatographie sur couche mince
Rf : Rapport frontal
I% : pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium

| Liste des figures | |
|---|-----------|
| Figure 01 : Croissance d'une colonie d'Actinomycètes sur milieu solide (Dvorak, 1999) | 5 |
| Figure 02 : Cycle de vie des <i>Streptomyce</i> | 10 |
| Figure 03 : Exemples de formes de chaînes de spores des actinomycètes Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997 (Joachin, 2002). | 11 |
| Figure 04 : Griséfuline® Laboratoire Sanofi Winthrop | 18 |
| Figure 05 : Mycostatine ® Laboratoire Bristol Myers Squibb | 19 |
| Figure 06 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb | 20 |
| Figure 07 : Sporiline® Laboratoire Schering-Plough | 21 |
| Figure 08 : Ancotil ® Laboratoire Roche | 22 |
| Figure 09 : (a) Daktarin® , (b) Triflucan® Laboratoire Pfizer, (c) Sporanox® Laboratoire Janssen Cilag | 23 |
| Figure 10 : Econazole(Pevaryl®) laboratoire Janssen-Cilag | 24 |
| Figure 11 : Clotrimazole(Trimysten®), laboratoire Roger Bellon | 24 |
| Figure 12 : Voriconazole(Vfend ®), | 24 |
| Figure 13 : Naftifine | 25 |
| Figure 14 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma | 25 |
| Figure 15 : Locéryl® Laboratoire Roche | 26 |
| Figure 16 : <i>Escherichia coli</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007). | 32 |
| Figure 17 : <i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007). | 32 |
| Figure 18 : <i>Bacillus subtilis</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007). | 33 |
| Figure 19 : Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM. | 40 |
| Figure 20 : aspect macroscopiques des isola | 43 |
| Figure 21 : diagramme présente la zone inhibitrice des souches actinomycètes contre les souches pathogènes tests | 44 |
| Figure 22 : inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les isolats des actinomycètes | 45 |
| Figure 23 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes contre <i>S. aureus</i> | 45 |
| Figure 24 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre <i>E. Coli</i> | 46 |
| Figure 25 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis <i>E. Coli</i> | 46 |
| Figure 26 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre <i>B. sibtillis</i> | 47 |
| Figure 27 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis <i>B. sibtillis</i> | 48 |
| Figure 28 : Aspect morphologique et caractères cultureux des souches W1 et K1 | 49 |
| Figure 29 Observation des souches d'actinomycètes (Gx 40) | 49 |
| Figure 30 : observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram | 50 |
| Figure 31 : aspect macroscopique de certaines souches fongiques cibles | 51 |
| Figure 32 : aspect microscopique des souches fongiques cible | 52 |
| Figure 33 : résultat de la technique de cylindre d'agar | 54 |
| Figure 34 : étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide | 54 |
| Figure 35 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche K1 | 55 |
| Figure 36 : diamètres de développement mycélien sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait de la souche W1 | 57 |
| Figure 37 : développement mycélienne de la souche fongique <i>A.niger</i> vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait W1 | 58 |

| | |
|---|-----------|
| Figure 38 : développement mycélienne de la souche fongique <i>A.niger</i> vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait K1 | 58 |
| Figure 39 développement mycélienne des deux souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait k1 | 59 |
| Figure 40 : développement mycélienne des deux souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait W1 | 59 |
| Figure 41 : présentent les résultats des CMI des extraits K1 et W1 vis-à-vis de trois souches fongiques | 61 |
| Figure 42 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits brute méthanolique sous UV à 254(A) et 365(B) nm. | 62 |
| Figure 43 : Illustration du résultat de la bioautographie contre la souche fongique (<i>Aspergillus niger</i>) | 62 |

| Liste des tableaux | |
|--|-----------|
| Tableau 01 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983). | 7 |
| Tableau 02 : La classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity et al., 2004) | 13 |
| Tableau 03 : Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (d'après Williams et al., 1989) | 15 |
| Tableau 04 : Caractéristiques des souches testées | 32 |
| Tableau 05 : les souches fongiques cibles | 34 |
| Tableau 06 : Représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince | 40 |
| Tableau 07 : Description des échantillons. | 42 |
| Tableau N 08 : résultats de l'isolement souche d'actinomycètes | 42 |
| Tableau N 09 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les micro-organismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar. | 43 |
| Tableau 10 : Résultats de l'étude macromorphologique et caractères culturels des souches actives. | 48 |
| Tableau 11 : pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar. | 53 |
| Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche K1 | 56 |
| Tableau 13 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche W1. | 57 |
| Tableau 14 : Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices CMI obtenues sur microplaque | 60 |
| Le tableau 15 : regroupe les rapports frontaux des composés séparés en utilisant différents systèmes de solvants. Résultat de la CCM des 2 extraits méthanoliques des souches d'actinomycètes | 61 |

| Sommaire | |
|--|-----------|
| ❖ Remerciement | |
| ❖ Dédicace | |
| ❖ Résumé | |
| ❖ Abstract | |
| ❖ ملخص | |
| ❖ Liste des abréviations | |
| ❖ Liste des figures | |
| ❖ Liste des tableaux | |
| ❖ Introduction | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| Les Actinomycètes | |
| I. Les Actinomycètes | 3 |
| I. 1 Historique | 3 |
| I. 2 Généralités | 3 |
| I. 3 Caractères morphologiques des Actinomycètes | 4 |
| I. 4 Physiologie des actinomycètes | 5 |
| I.4.1 Conditions de croissance des actinomycètes | 5 |
| I.4.2 Milieux de culture des actinomycètes | 6 |
| I.5 Ecologie et distribution dans la nature | 7 |
| I.6 Cycle de développement | 7 |
| I.6.1 Mycélium du substrat et Mycélium aérien | 8 |
| I.6.2 Formation des spores : | 8 |
| I.6.3 La germination des spores | 9 |
| I.6.4 Structures particulières | 10 |
| I.7 Classification des espèces : Exemple du genre Streptomyces | 11 |
| I.8 Identification des actinomycètes | 14 |
| I.8.1 Identification morphologique des actinomycètes | 14 |
| I.8.2 Identification chimio-taxonomiques des actinomycètes | 14 |
| I.9 Génétique et structure de l'ADN | 15 |
| I.10 Les applications des actinomycètes | 16 |
| I.10.1 Les applications biotechnologiques des actinomycètes | 16 |
| Les Antifongique | |
| II-Les Antifongique | 17 |
| II.1 Historique | 17 |
| II.2 Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine | 18 |
| II.2.1 Griséofulvine | 18 |
| II.2.2 Nystatin | 19 |
| II.2.3 Amphotéricine B | 20 |
| II.2.4 Autres agents polyènes antifongiques : | 20 |
| II.3 Antifongiques de synthèse | 21 |
| II.3.1 Le chlormidazole | 21 |
| II.3.2 Le tolnaftate | 21 |
| II.3.3 La flucytosine | 22 |
| II.3.4 Les imidazoles | 22 |
| II.3.5 Les antifongiques allylamines | 25 |
| II.3.6 Les antifongique non classés | 26 |

| | |
|--|----|
| II.4 Nouveaux antifongiques d'origine naturelle | 26 |
| II.4.1 Echinochandines | 26 |
| II.4.2 Nikkomycines | 27 |
| II.4.3 Pradimicines | 27 |
| Partie expérimentale Matériels et méthodes | |
| III.1 Objectif | 28 |
| III.2 Isolement des actinomycètes | 29 |
| III.2.1 Prélèvement des échantillons | 29 |
| III.2.2 Mesure du pH des échantillons | 29 |
| III.2.3 Traitement | 29 |
| III.2.4 Dilutions | 29 |
| III.3 Isolement des actinomycètes | 29 |
| III.4 vérification de la pureté des souches | 30 |
| III.4.1 Macromorphologie et caractères cultureux | 30 |
| III.4.2 Micromorphologie | 30 |
| III.5 Conservation des souches d'actinomycètes | 31 |
| III.6 Recherche de l'activité antibactérienne | 31 |
| III.6.1 Revivification des bactéries testent | 33 |
| III.6.2 Préparation des inocula des bactéries-tests | 33 |
| III.6.3 Méthodes des cylindres d'agar | 33 |
| III.7 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes | 34 |
| III.7.1 Purification et confirmation de l'identité des souches cibles | 34 |
| III.7.1.1 Microorganismes cibles | 34 |
| III.7.1.2 Purification des souches cibles | 34 |
| III.8 Confirmation de l'identité des souches fongiques | 34 |
| III.8.1 Préparation des suspensions fongiques | 35 |
| III.8.2 Technique des cylindres d'agar | 35 |
| III.9 Production et extraction de métabolites secondaires | 35 |
| III.9.1 Fermentation sur milieu solide | 35 |
| III.9.2 Extraction des métabolites | 35 |
| III.9.2.1 Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide | 35 |
| III.10 Tests de l'activité antifongique des extraits | 36 |
| III.10.1 Préparation des souches fongiques cibles | 36 |
| III.10.2 Identification macroscopique et microscopique des souches cible | 36 |
| III.10.3 La technique du contact direct | 36 |
| III.11 Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque | 37 |
| III.11.1 Préparation de l'inoculum fongique | 37 |
| III.11.2 Préparation de la microplaque | 37 |
| III.11.3 Inoculation de la microplaque | 38 |
| III.12 Caractérisation de la molécule bioactive | 39 |
| III.12.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) | 39 |
| III.12.2 Bioautographie des molécules bioactives | 41 |
| Résultat et interprétation | |
| IV Isolement des souches d'actinomycètes | 42 |
| IV.1 Caractéristiques des échantillons | 42 |
| IV.2. Isolement des Actinomycètes | 42 |
| IV.3 caractéristiques macroscopiques des isolats | 42 |

| | |
|---|----|
| IV. 4 Résultat de l'activité antibactérienne | 43 |
| IV.4.1 inhibition de Staphylococcus aureus par les isolats actinomycétals | 44 |
| IV.4.2 inhibition d'E.coli par les isolats actinomycétals | 46 |
| IV.4.3 inhibition de Bacillus subtilis par les isolats actinomycétals | 47 |
| IV.5 Identification des souches d'actinomycètes actives | 48 |
| IV.5.1 Caractérisation morphologique | 48 |
| IV.5.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux | 48 |
| IV.5.1.2 Micromorphologie | 49 |
| IV.5.2 Coloration de gram | 50 |
| IV.6 Purification et Confirmation de l'identité des souches fongiques cibles | 50 |
| IV.7 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète | 52 |
| IV.8 production et Extraction des métabolites secondaire | 54 |
| IV.8.1 Fermentation sur milieu solide | 54 |
| IV.9 Tests de l'activité antifongique des extraits | 55 |
| IV.9.1 Technique de contact directe ou de dilution | 55 |
| IV.10 Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque | 60 |
| IV.11 Caractérisation de la molécule bioactive | 61 |
| IV.11.1 Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM) | 61 |
| IV.11.2 Bioautographie des molécules bioactives | 62 |
| Discussion | 63 |
| ❖ Conclusion et perspective | 70 |
| ❖ Référence bibliographique | 72 |
| ❖ Annexe | 82 |

introduction

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme utilisé des micro-organismes pour préparer des boissons, des aliments, des vêtements, 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 lorsqu'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. Des réalisations telles que la biosynthèse de substances à visé thérapeutique (les antibiotiques,...) ou des vaccins antiviraux, révolutionnent certains traitements en médecine.

Les sols du Sahara algérien bien que soumis à un climat aride à semi-aride ont montré une biodiversité surprenante des Actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif (**Sabaou, 1988**) (**Sabaou et al., 1998**). Elles sont à majorité filamenteuses, représentent la principale source naturelle de métabolites anti cellulaires (**Higashide ., 1984**). Environ 75% des antibiotiques découverts entre 1971 et 1980 appartiennent aux actinomycètes (**Iwai &Takahashi , 1992**). L'isolement d'*Actinomycetales* actives à partir d'écosystèmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité.

Les antibiotiques sont des substances chimiques qui ont une action spécifique avec un pouvoir de structure sur les micro-organismes ciblés. Ces substances sont classées en diverses Familles selon leur structure chimique et leur mode d'action.

L'usage fréquent et abusif des antibiotiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique ou bactérienne est l'un des facteurs essentiels dans le développement et l'évolution de la résistance microbienne (**Leif et Larson 2000 ; Maccrain et al., 2005**), ce qui accentue l'urgence de découvrir de nouvelles molécules antimicrobiennes d'origines biologiques.

Celles-ci sont souvent recherchées à partir des microorganismes isolés d'échantillons prélevés de différents écosystèmes, dans le but découvrir des taxons originaux et par-là de nouvelles molécules biologiquement actives. Vu leur importance dans la production d'antibiotiques (**Tiraby et Etienne, 1983 ; Nolan et Cross, 1988**) et leur omniprésence dans presque tous les milieux même ceux où la vie est extrêmement hostile (**Goodfellow et**

William, 1983 ; Okami et Hotta, 1988), les actinomycètes sont les acteurs les plus prometteurs pour la production de nouveaux métabolites à activité antimicrobienne.

Cette étude a pour objectif d'isoler des Actinomycètes productrices de molécules antimicrobiennes à partir du sol de la zone Aride et de produire par fermentation ces substance en milieu solide.

*Synthèse
Bibliographique*

Les actinomycètes

I. 1-Historique

Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des Actinomycètes. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol, avec les travaux de **Kraisky**, de **Cohn**, de **Waksman** et de **Curtis**. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de **Waksman**, de **Lieske**, de **Krassilniko** et d'autres. La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de **Selman Waksman** lui est indissolublement lié (**Le minor, 1989**).

I. 2-Généralités

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries filamenteuses septées, ramifiées, prenant généralement le Gram ; possédant un coefficient de charge (GC%) compris entre 60-70% (**Larpen, 1989**). La plupart d'entre eux sont toujours immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols, etc. Les Actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leur morphologie fongicoïde : filaments ramifiés, organes de sporulation, etc. Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques, etc. les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme de chitine ni de 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'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des actinophages et à des antibiotiques antibactériens, cela confirme le bien-fondé de la classification des Actinomycètes parmi les bactéries (**Larpen, 1989**). Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (**Le minor, 1989**).

I.3-Caractères morphologiques des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont caractérisés par une grande diversité morphologique qui varie du simple bacille (la plupart des mycobactéries) diphtéroïde à des formes mycéliennes complexes (comme le genre *Streptomyces*) (**Gottlieb, 1973**). Le mycélium peut se développer sur et dans le milieu (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Le développement de certains Actinomycètes engendre un mycélium non persistant qui se transforme rapidement en une masse bactéroïde irrégulière et d'autres peuvent présenter des mycélia très rudimentaires. Il peut y avoir aussi une production de spores par les filaments. Les spores produites sont soit isolées soit groupées ou même enfermées dans un sporange ou conidie qui libère des spores de formes variées, d'aspect lisse ou ridé, soit isolées ou groupées en chaîne (**Perry et al., 2004**). Une colonie d'Actinomycète est constituée par une accumulation d'hyphe ramifié contrairement aux bactéries filamenteuses qui sont formées par l'accumulation des cellules. L'analyse par image montre deux catégories d'hyphe : l'hyphe dispersé (se présente sous deux formes : « freely dispersed » ou hyphe indépendant dispersé et le « mycelial clumps » qui est une masse ou agrégat de mycélium) et l'hyphe pellets (**Perry et al., 2004**).

L'observation macroscopique des colonies formées par les Actinomycètes sur des milieux solides montre différents aspects qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- Des colonies pâteuses, rugueuses ou lisses, rarement couvertes de mycélium aérien, et qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

Ces colonies sont généralement de taille moyenne (1 à 4 mm de diamètre). Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, orange, vert, violet, rose, gris, noir, etc (**Leclerc1975**).

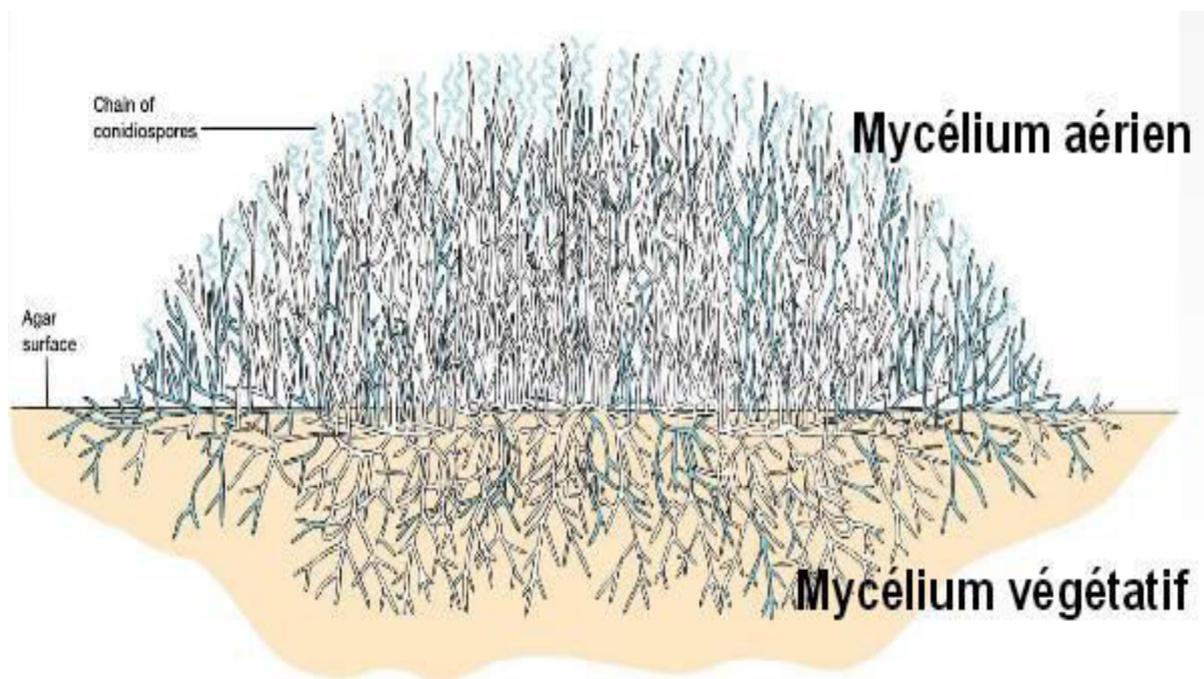


Figure 1 : Croissance d'une colonie d'Actinomycètes sur milieu solide (Dvorak, 1999).

I. 4-Physiologie des actinomycètes

I.4-1- Conditions de croissance des actinomycètes

Plusieurs facteurs environnementaux conditionnent la croissance des actinomycètes :

Le pH : Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin (Omura, 1992).

La température : Les actinomycètes sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C ou plus (Omura, 1992).

L'oxygène : Selon le type respiratoire, les actinomycètes peuvent être séparés en deux

Groupes : les formes oxydatifs aérobies, qui se trouvent essentiellement dans le sol, et les

Formes fermentatifs anaérobies strictes ou facultatives, qui vivent dans les cavités naturelles

De l'homme et des animaux. (Silini, 2012). En ce qui concerne les besoins nutritifs, les actinomycètes sont, en général, des chimoorganotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi d'être chimio-autotrophes, utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990).

Afin d'obtenir une croissance abondante, des matières suffisamment énergétiques doivent être fournis par des protéines, des hydrates de carbone, ou des acides organiques. Des sources appropriées d'azote, soit organique ou inorganique et certains minéraux notamment le potassium, le magnésium, le phosphore, le soufre et le fer, sont également nécessaires (Srinivasan *et al.*, 1991). Certains ont des exigences nutritionnelles en facteurs de croissance telles que les vitamines et certains acides aminés. D'autres aliments peuvent être aussi nécessaires pour soutenir des activités métaboliques dans l'utilisation des actinomycètes au niveau industriel, comme par exemple, le besoin en cobalt pour la synthèse de vitamine B12 (cobalamine), et le besoin en chlore pour la synthèse de chloramphénicol (Silini, 2012).

I.4-2 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 (Burman, 1973 ; Williams *et al.*, 1993 ; Hilal *et al.*, 2002).

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 : l'lanostatine, le cycloheximide (Actidione), la pimaricine, l'amphotéricine B pour l'inhibition des champignons. La polymyxine, la novobiocine, l'acide nalidixique, la colistine pour stopper les bactéries Gram négatives (Nonomura et Hayakawa, 1988 ; Larpent et Larpent, 1990, Takizawa *et al.*, 1993 ; Kurtbaoglu et Wildman, 1998). L'incubation se fait, généralement, à une température de 28°C ou 30°C qui favorise le développement des actinomycètes (Burman, 1973).

I.5- Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (Tab. 1). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après (Goodfellow et Williams, 1983) généralement les 10⁶ germes par gramme de

sol séché. D'après (Waksman, 1967), le rapport Microorganismetotaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon cemême auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à uneprofondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'a seulement 16%. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moinsabondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin,ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températuresavoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'a 60°C (Goodfellow et Williams 1983). La majoritédes actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (aw) est très basse (Davies et Williams,1970, Goodfellow et Williams, 1983). Les sols sahariens sont caractérisés par une teneurminime en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, destempératures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ontprouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une floremicrobienne très variée (Killian et Feher, 1939). Parmi les bactéries isolées, lesactinomycètes font partie essentielle de cettmicroflore, leurs présence est considérable dansce type d'écosystème extrême (Killian et Feher, 1939)

| Genre | Habitat |
|--------------------------|---|
| <i>Actinomadura</i> | Sol |
| <i>Actinoplane</i> | Sol, Eau, Litière |
| <i>Frankia</i> | Nodules des racines |
| <i>Microbiospora</i> | Sol |
| <i>Micromonospora</i> | Sol, Eau |
| <i>Rhodococcus</i> | Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition |
| <i>Saccharomonospora</i> | Sol, Eau, Litière |
| <i>Streptomyces</i> | Sol et Eau |
| <i>Steptosporangium</i> | matière en décomposition et en fermentation |

Tableau 1 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983).

I-6-Cycle de développement (Figures N°2)

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes.Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et L'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes.Ainsi, les

actinomycètes les plus différenciées développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distinctes : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche.

I-6-1 Mycélium du substrat et Mycélium aérien

Le mycélium du substrat, également, dénommé mycélium végétatif ou primaire se développe à partir du tube de germination issu de la spore. Chez quelques genres comme *Rhodococcus*, il n'y a pas de véritable mycélium mais seulement la croissance d'une propagule originelle formant un filament plus ou moins long se fragmentant ensuite en petites unités et donnant parfois naissance à des ramifications élémentaires. Cette fragmentation des hyphes est présente chez des genres généralement dépourvus de spores ou n'en produisant qu'un petit nombre. Les sporoactinomycètes produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié ou non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme *Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces*. La largeur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2 µm. Leur ramification est très souvent monopodiale mais parfois dichotomique ou verticillée. Le mycélium du substrat est ancré dans le support solide où il puise ses nutriments. Sa croissance, de type apicale, est analogue à celle observée en milieu liquide. Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe. Divers mutants de *Streptomyces* sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits (Chater et Merrick, 1979).

I-6-2- Formation des spores

Les spores d'actinomycètes ont une fonction de dispersion et de survie dans des conditions défavorables de croissance végétative. Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores. Les exospores sont le type le plus fréquent, elles sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus. Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles, elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant.

La viabilité des spores est fonction de leur type : des endospores de *Thermoactinomyces* ont survécu plusieurs centaines d'années dans des sédiments lacustres à 5 °C. Comparativement, des exospores sèches de *Streptomyces* survivent 20 à 30 ans comme les conidies de champignons. La thermorésistance des endospores est nettement supérieure à celle des exospores en milieu sec ou humide (Leveau et Buix, 1993).

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5. Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (Beppu, 1986, 1992 ; Grafeet al., 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitaliset al., 1986).

I-6-3- La germination des spores

À l'issue d'une dormance dont la durée est fonction du type et des conditions du milieu, les spores germent pour donner naissance à un mycélium. On distingue généralement quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube de germination et la croissance de celui-ci. Les exospores dont la dormance est de type exogène, sensible au milieu, germent après activation par un choc thermique qui peut être par exemple de 50 °C chez *S. viridochromogenes*, suivie d'une initiation en présence de L-alanine, d'adénosine, d'acide glutamique, d'acide para-aminobenzoïque, d'ions Ca²⁺, Mg²⁺ et de CO₂. L'oxydation des réserves de tréhalose fournit l'énergie nécessaire.

Les endospores de *Thermoactinomyces* ne germent dans des conditions de milieu favorable qu'avec une activation spécifique de nature physique. Un refroidissement à 20 °C de 2 à 48 h est nécessaire pour permettre aux spores de *Thermoactinomyces vulgaris* de répondre ensuite au choc thermique de 55 °C inducteur de la germination (Leveau et Buix, 1993).

I-6-4- Structures particulières

Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie. Ainsi les **sclérotés** trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnées dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés. Les **Synnemata**, appelés également **corémies** sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

Les **sporangés** sont des sacs contenant des spores. Les **conidies** sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

- ✓ une seule conidie tel que le genre *Micromonospora*;
- ✓ une paire de conidies chez le genre *Microbispora*;
- ✓ chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- ✓ longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
- ✓ conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

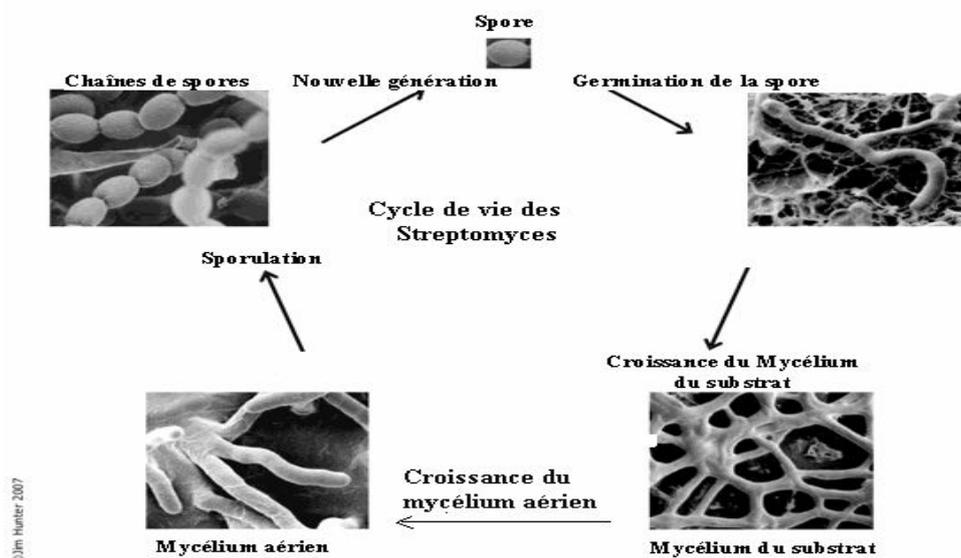
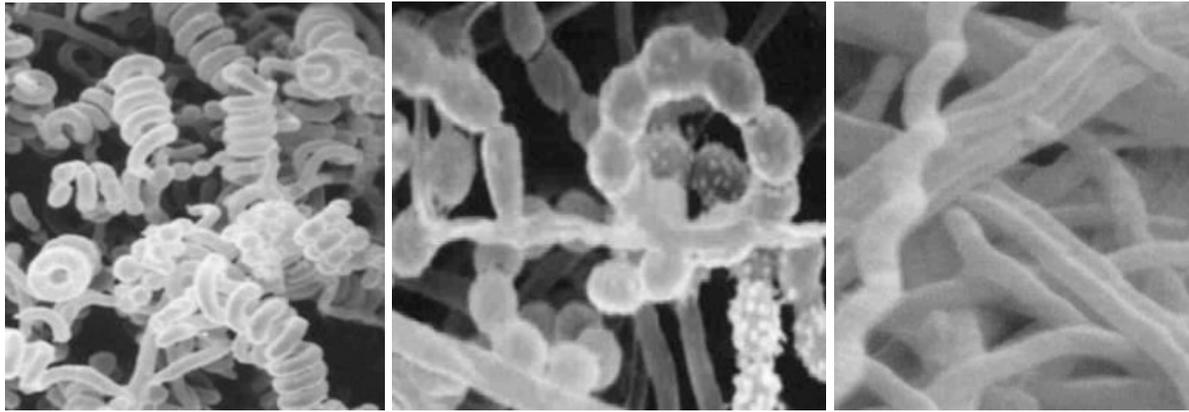


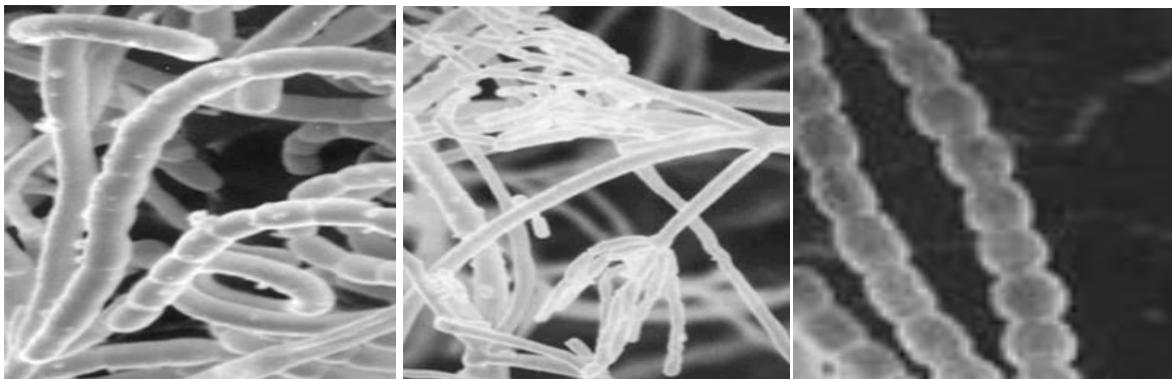
Figure N2 : Cycle de vie des *Streptomyce*



Spires compactes

Spires ouvertes

Flexibles



**Monoverticilles avec
Spires**

**Biverticille sans
spires**

Droites

Figure N° 03 : Exemples de formes de chaînes de spores des actinomycètes Photos dans l'Atlas des actinomycètes1997 (Joachin, 2002).

I-7-Classification des espèces : Exemple du genre *Streptomyces*

La clé de détermination des espèces de *Streptomyces* la plus employée est celle du *Bergey's Manual*; elle fait largement appel aux travaux de «International *Streptomyces* project ». Cette clé se fonde sur les caractères principaux suivants :

- La couleur du mycélium aérien sporulé avec 7 classes de couleur : blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet.
- La forme des chaînes de spores (**Figure N03**) :
 - Série Rectus Flexibilis lorsque les chaînes sont droites ou flexueuses
 - Série Spira lorsque les chaînes sont hélicoïdales
- La production de pigments mélanoides bruns à noirs
- L'ornementation de la paroi des spores : lisse, verruqueuse, échinulée ou chevelue ;

- La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer : D-glucose, Dxylose,

L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, raffinose, D-mannitol, inositol et saccharose. Toutefois, la description d'une souche peut nécessiter l'étude d'autres caractères. Une panoplie d'environ 120 caractères morphologiques et biochimiques supplémentaires est alors à la disposition des taxonomistes. 75 de ces caractères correspondent à la recherche de l'utilisation de nombreuses sources de carbone et d'azote (**Pridham et Gottlieb, 1948**).

La plupart des autres caractères traduisent le degré de développement et la morphologie des souches sur divers milieux complexes ou synthétiques (**Waksman, 1950**). Rappelons enfin que ces méthodes de classification évoluent rapidement et qu'au niveau subgénérique la taxonomie numérique devrait permettre une définition plus cohérente des espèces appartenant à divers genres d'actinomycètes dont en particulier le genre *Streptomyces* (**Locci, 1989**).

Phylum *Actinobacteria*

Classe *Actinobacteria*

| | | | | | |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| S/C | <i>Acidimicrobidae</i> | <i>Rubrobacteridae</i> | <i>Coriobacteridae</i> | <i>Sphaerobacteridae</i> | <i>Actinobacteridae</i> |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|

| | | |
|--------|--------------------------|------------------------|
| S/C | <i>Actinobacteridae</i> | |
| Ordres | <i>Bifidobacteriales</i> | <i>Actinomycetales</i> |

Ordre *Actinomycetales*

| S/O <i>Actinomycineae</i> | S/O <i>Micrococchineae</i> | S/O <i>Corynebacterineae</i> | S/O <i>Micrimonosporineae</i> | S/O <i>Propionibacteri- neae</i> |
|---|---|--|--|---|
| Famille <i>Actinomycetaceae</i> | Familles <i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i> | Familles <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsakamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i> | Famille <i>Micromonosporineae</i> | Familles <i>Propionionibacteriaceae</i> <i>Nocardiodaceae</i> |
| S/O <i>Pseudonocardineae</i> | S/O <i>Streptomycineae</i> | S/O <i>Streptosporangineae</i> | S/O <i>Frankineae</i> | S/O <i>Glicomycineae</i> |
| Familles <i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i> | Famille <i>Streptomycetaceae</i> | Familles <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i> | Familles <i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i> | Famille <i>Glycomycetaceae</i> |

S/C : sous-classe, S/O : sous-ordre.

Tableau N°2: La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004)

I-8-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 (**Lechevalieret al., 1977 ; Xu et Jiang, 1996**).

1-8-1- 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 dumycélium 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 Solomon1985**).

I-8-2- 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'acidehyppurique ; Synthèse de mélanine (*Streptomyces*) (**Lechevalier et Lechevalier 1985 ; Larpentet Sanglier 1989**).

I-9-Génétique et structure de l'ADN

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E.coli*, la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujet à des réarrangements. A la suite de Croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la Synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (**Larpenet *et al.*, 1989**). Les genres d'actinomycètes peuvent être définies par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % (**Tab 03**), qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, les espèces ne sont pas identifiées par cette technique. Historiquement, la classification des bactéries était basée sur la similarité des caractères phénotypiques. Bien que cette méthode ait donné toute satisfaction, elle est coûteuse, lente et pas assez précise pour permettre la distinction entre les organismes les plus proches. L'étude des acides nucléiques a apporté des renseignements plus précis (**Williams *et al.*, 1989**). Des auteurs insistent cependant, sur la nécessité de jumeler les études phénotypiques et moléculaires pour une identification encore plus précise (**Goodfellow, 2004**).

| Genre | G + C % (Moles) |
|----------------------------|-----------------|
| <i>Actinomadura</i> | 64 à 69 |
| <i>Nocardia</i> | 64 à 72 |
| <i>Streptomyces</i> | 69 à 78 |
| <i>Micromonospora</i> | 71 à 73 |
| <i>Actinoplanes</i> | 72 à 73 |
| <i>Actinopolyspora</i> | 64 |
| <i>Agromyces</i> | 71 à 77 |
| <i>Frankia</i> | 66 à 71 |
| <i>Glycomyces</i> | 71 à 73 |
| <i>Nocardiopsis</i> | 64 à 69 |
| <i>Rhodococcus</i> | 63 à 72 |
| <i>Streptosporangium</i> | 69 à 71 |
| <i>Streptoverticillium</i> | 69 à 73 |
| <i>Thermoactinomyces</i> | 53 à 55 |

Tableau 03 : Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes
(d'après **Williams *et al.*, 1989**)

I-10-Les applications des actinomycètes

I-10-1-Les applications biotechnologiques des actinomycètes

Les actinomycètes jouent un rôle important dans la production de divers agents antimicrobiens et d'autres substances industriellement importantes telles que des enzymes (Mukesh, 2014). Le potentiel d'actinomycètes dans la découverte de nouveaux composés ayant une activité contre les micro-organismes a été réalisé, et ouvre donc des pistes intéressantes dans le domaine de la biotechnologie et de la recherche biomédicale. (Mukesh, 2014). Le point de vue métabolique des actinomycètes fournit non seulement un domaine intéressant pour la recherche, mais offre également la possibilité de commercialisation des métabolites générés dans le processus. (Mukesh, 2014). Des enzymes telles que l'amylase, la lipase et les cellulases produites à partir des actinomycètes jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire, la fermentation, l'industrie du textile et du papier. Certaines enzymes utilisées comme agents thérapeutiques dans le cancer humain, principalement dans la leucémie. Les actinomycètes sont utiles dans le traitement du cancer, la bioremediation et il produit des antibiotiques précieux tels que la novobiocine, l'amphotéricine, la vancomycine, la néomycine, gentamicine, chloramphénicol, la tétracycline, l'érythromycine, la nystatine, etc. Les actinomycètes sont également utilisés comme agents favorisant la croissance des plantes (aide à produire l'hormone de croissance végétale indole-3-acétique), des outils de biocontrôle, les agents de biopesticides, des composés antifongiques, et biocorrosion et comme une source de composés agro-actifs. (Mukesh, 2014).

Les antifongiques

II-1-Historique :

Pendant des centaines d'années, les infections fongiques de la peau et des muqueuses sont été traitées par toutes sortes de médicaments populaires. Les infections du cuir chevelu ont été traitées en l'ans 23-79 après J.C. par des préparations telles que de la graisse d'ours mélangée à des extraits de plantes, des cendres de corne de cerf dans du vin, de la bile de chèvre dans de la craie et du vinaigre, de la bile de truie mélangée à de l'urine de taureau et du jus d'ail dans la graisse d'oie (**Ainsworth, 1986**). Parmi tous ces composés, seul l'ail est encore mentionné aujourd'hui en phytothérapie comme remède antifongique éventuel (**Odds., 1995**).

Au début du 20e siècle, les produits chimiques de synthèse et les colorants ont remplacé tous ces mélanges rudimentaires anciens. Ainsi, pour le traitement des infections à dermatophytes du cuir chevelu, le dermatologue **Raymond Sabouraud** en 1910 a décrit une pâte à base d'amidon, de résine et de farine contenant du carbonate de cuivre en tant qu'ingrédient actif. Pour l'infection de la peau glabre, il recommandait la teinture d'iode. Depuis, plusieurs préparations contenant du soufre, du permanganate de potassium ou des sels de métaux lourds comme l'argent et le mercure, ont été utilisées pour le traitement topique des infections à dermatophytes (**Ainsworth, 1986**). Nombreuses préparations anciennes ont été abandonnées, seules trois préparations antifongiques topiques du début du siècle sont encore prescrites aujourd'hui. La première est à base d'acide benzoïque et d'acide salicylique sous forme de pommade (**Whitfield, 1912**), la seconde est la teinture de triphénylméthane, le violet de gentiane (**Faber et Dickey, 1925**) et la troisième, rarement utilisée aujourd'hui, est «la Teinture de Castellani » formulée à base de carbol fuchsine (**Castellani, 1928**). Tous les mélanges cités précédemment sont toxiques, ils montrent en plus d'une activité antifongique, une action antibactérienne aussi efficace, ce ne sont donc pas de véritables antifongiques spécifiques. Parmi les premiers composés antifongiques, certains ont été initialement considérés comme des agents antibactériens mais, plus tard, ils ont révélé une activité contre certains champignons. Ces composés étaient entre autres le cycloheximide (qui inhibe *Cryptococcus neoformans*) et les sulfonamides (la sulfadiazine inhibe *Paracoccidiosis brasiliensis*). Les premiers antifongiques possédant exclusivement une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes humains n'ont été découverts qu'après la seconde guerre mondiale et leur utilisation courante en clinique date seulement de la fin des années 50. Les premières molécules antifongiques à usage médical sont les composés appartenant à la série des polyènes et la griséofulvine. Elles ont toutes été découvertes grâce aux techniques de

Screening d'actinomycètes et de champignons. Les deux antifongiques pionniers introduits pour un usage clinique, sont la nystatine et la griséofulvine. La nystatine a été commercialisée pour des applications cliniques à la fin des années 50, la griséofulvine au début des années 60 bien qu'elle a été découverte (Oxford *et al.*, 1939) avant la nystatine (Hanzen et Brown., 1950). La nystatine a été le point de départ du développement de nombreux autres antifongiques cliniques de nature polyénique.

II-2- Principaux antifongiques naturels utilisés en médecine humaine

II-2-1-Griséofulvine

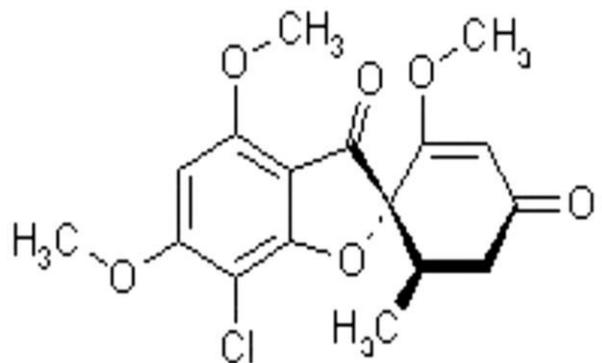


Figure 4 : Griséofulvine® Laboratoire SanofiWinthrop

L'emploi et la commercialisation de la griséofulvine (Fig.4) ont été d'abord comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement orale de la griséofulvine a été démontrée en premier, sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (Genties, 1958). Cette molécule antifongique est un métabolite produit par *Penicillium griseofulvum* d'où elle tire son nom. Parmi les champignons pathogènes pour l'homme, les genres inhibés sont : *Epidermophyton*, *Microsporumet* *Trichophyton*. Elle est utilisée également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps. Son action s'oriente sur l'inhibition de la mitose des champignons sensibles. La griséofulvine est considérée comme étant un antifongique bon marché pour les pays pauvres.

II-2-2- Nystatine

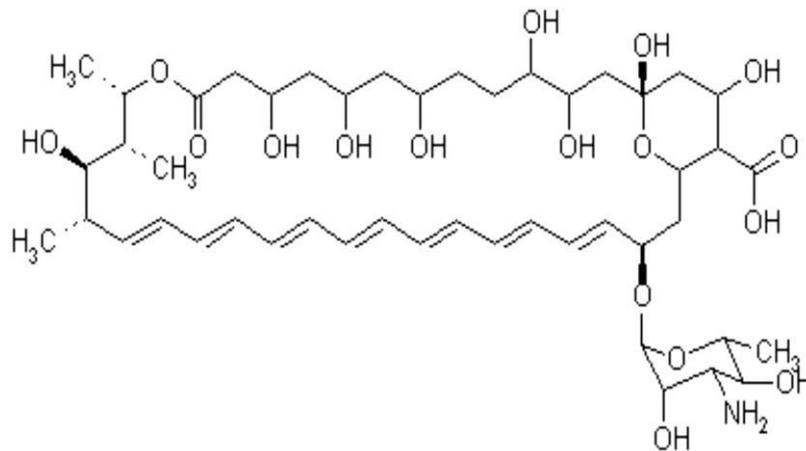


Figure 5 : Mycostatine © Laboratoire Bristol Myers Squibb

Découvert par Hazen et Brown en 1950, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York STATE" pour lesquels ils travaillaient. L'activité antifongique a été mise en évidence à partir d'une culture d'un actinomycète isolé de la terre de la ferme laitière de Nourse en Virginie, aux Etats-Unis, d'où son nom de *Streptomyces noursei*. Cette bactérie filamenteuse, produisait deux antibiotiques : La nystatine et le cycloheximide. La nystatine a été breveté et sa licence confiée à "E.R. Squibb et Sons" (connu maintenant sous le nom de Bristol Meyers-Squibb). La nystatine possède quatre doubles liaisons conjuguées dans sa structure (**Fig.5**). Le spectre antifongique de la nystatine in vitro est très étendu, il englobe plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp*, les pathogènes dimorphes qui sont infectieux sous une forme levure et *Cryptococcus neoformans* (**Hildick-Smith et al., 1964**). La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus spain* si que de nombreuses moisissures. La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée uniquement pour des usages topiques. Lnystatine agit comme tous les autres antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (**Kerridge et Whelan., 1984**). Cette toxicité sélective de la nystatine contre les membranes de champignons par rapport aux membranes des mammifères est due à une affinité de liaison avec l'ergostérol fongique supérieure à celle du cholestérol des mammifères (**Odds., 1995**).

II-2-3- Amphotéricine B

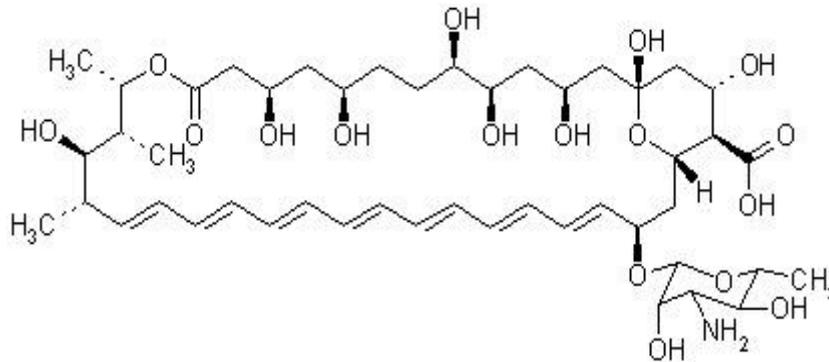


Figure 6 : Fungizone ® Laboratoire Bristol-Myers-Squibb

Molécule antifongique découverte par (**Gold et al.,1956**). Le germe producteur est un Actinomycète isolé du bassin d'Orinoco dénommé *Streptomyces nodosus*. C'est un polyène Heptène (**Fig.6**) qui inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures Et est sans action contre les bactéries. L'amphotéricine B, est un puissant antifongique qui Inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le Seule polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination Des mycoses profondes. Toutefois, des effets secondaires indésirables sont remarqués lors de ces traitements, mais ceux-ci peuvent être minimisés à l'aide de stratégies d'administration judicieuses.

II-2-4-Autres agents polyènes antifongiques

Outre l'amphotéricine B et la nystatine qui est les plus connus parmi la série des polyènes, plusieurs autres molécules naturelles de la même classe ont été découvertes dans les années 50. Il s'agit de la candidine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine) (**Medoff et Kobayashi., 1980**). La méparticine a été commercialisée au début des années 70 (**Simonetti et Strippoli., 1971**). Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines et certains ont été (et sont encore) commercialisés dans certains pays, toujours dans des formulations destinées à un usage topique. Dans l'espoir de trouver de nouvelles formulations lipidiques pour administration intraveineuse, comme pour l'amphotéricine B, l'intérêt pour ces molécules polyéniques commence à augmenter ces dernières années (**Odds., 1995**).

II-3-Antifongiques de synthèse

Jusqu'à la fin des années 50, les seules molécules à usage médicale étaient naturelles. Les premiers antifongiques de synthèse ont été utilisés en agriculture (**Odds., 1995**). Bien que, ces dernières années de nombreux nouveaux produits naturels à activité antifongique ont été décrits, on estime que depuis 1960 environ, les antifongiques de synthèse ont dominé et ont révolutionné la recherche dans ce domaine. Parmi les agents antifongiques de synthèse les plus utilisés, on cite les suivants :

II-3-1-Le chlormidazole

C'est le premier antifongique de synthèse qui a été utilisé en médecine humaine. C'est un dérivé du benzimidazole, et a été utilisé pour le traitement topique des dermatophytoses cutanées. Le composé n'a pas eu un grand succès commercial, mais a ouvert une voie de recherche dans le domaine des molécules antifongiques de synthèse.

II-3-2-Le tolnaftate

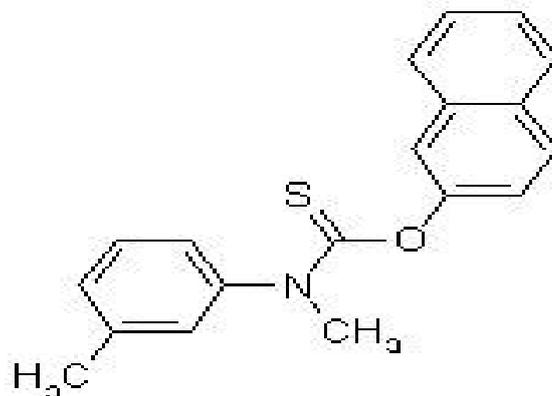


Figure 7 : Sporiline® Laboratoire Schering-Plough

Ce composé thiocarbamate (**Fig.7**) découvert en 1962 est un antifongique topique actif contre les dermatophytes et il est vendu également sous forme de poudre pour le traitement du tinea pedis. C'est un inhibiteur de l'enzyme squalène époxydase dans la voie de biosynthèse des stérols (**Ryderet al., 1986**). Le **tolciclate**, un thiocarbamate plus récent, possède des propriétés très similaires.

II-3-3-La flucytosine

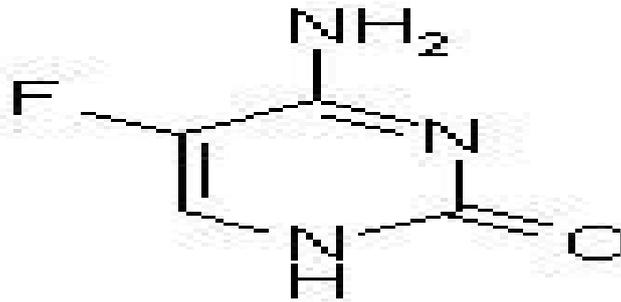


Figure 8 : Ancotil ® Laboratoire Roche

Le 5-fluorocytosine (**Fig.8**) est la première molécule qui offrait la possibilité réelle de Traiter par voie orale les infections fongiques profondes. C'est un inhibiteur de la synthèse de L'ARN de certains champignons. Après pénétration dans le cytoplasme fongique sous L'action d'une cytosine perméase, le 5-fluorocytosine se transforme en 5-fluorouracile qui se Substitue à l'uracile dans la synthèse des ARN. Cette situation conduit au blocage de la Synthèse protéique (**Scholer, 1980 ; Polak, 1990**). La spécificité d'action sur les cellules Fongiques, est due à la spécificité de la cytosine perméase qui n'existe pas chez les Mammifères. Son spectre d'action *in vitro*, se limite aux *Candida* sp ; *Cryptococcusneo formans*; certaines moisissures dématiées et certains isolats d'*Aspergillus* sp. A cause des multiples cas de résistance à cette molécule, la flucytosine est employée avec succès en association avec d'autres antifongiques polyéniques comme l'amphotéricine B ou azolés ou encore avec une échinocandine, dans le traitement combiné de nombreuses mycoses systémiques.

II-3-4-Les imidazoles

Le benzimidazole, le chlormidazole, les arylimidazoles et d'autres font partie des composés imidazoles présentant une activité antifongique importante *in vitro*. Les premiers antifongiques imidazoles appartenant à la série des azolés ont été décrits par Janssen Pharmaceutica en Belgique, il s'agit du miconazole (**Fig. 9a**) et l'éconazole (**Fig.10**) (**Godefroi et al., 1969**). Le clotrimazole (**Fig.11**) a été décrit par Bayer AG en Allemagne (**Marget et Adam., 1969**). Ces premières molécules ont été évaluées dans de nombreux essais cliniques et ont prouvés leur efficacité dans le traitement topique des infections superficielles à *Candida* et des dermatophytoses. Leur spectre antifongique s'étale contre plusieurs pathogènes fongiques systémiques et contre de nombreux autres agents des mycoses

superficielles. Le mode d'action de ces molécules a été élucidé par en **1978** par **Van denbossche *et al.*** Il a démontré que le miconazole inhibait la déméthylation du lanostérol en ergostérol conduisant ainsi à l'arrêt de la synthèse des stérols fongiques. Le succès des antifongiques azolés a été à l'origine d'une panoplie de découvertes de nouveaux composés du même type. Le fluconazole (**Fig. 9b**) et l'itraconazole (**Fig.9 c**) représentent les plus importants antifongiques triazolés. D'autres azolés comme, le voriconazole (**Fig12**), produit par Pfizer et le SCH 56592 de Schering-Plough seraient tous deux actifs vis-à-vis des *Candida* résistantes au fluconazole ; ces deux produits possèdent une activité nettement améliorée vis-à-vis d'autres affections fongiques telles que l'aspergillose et l'histoplasmosse.

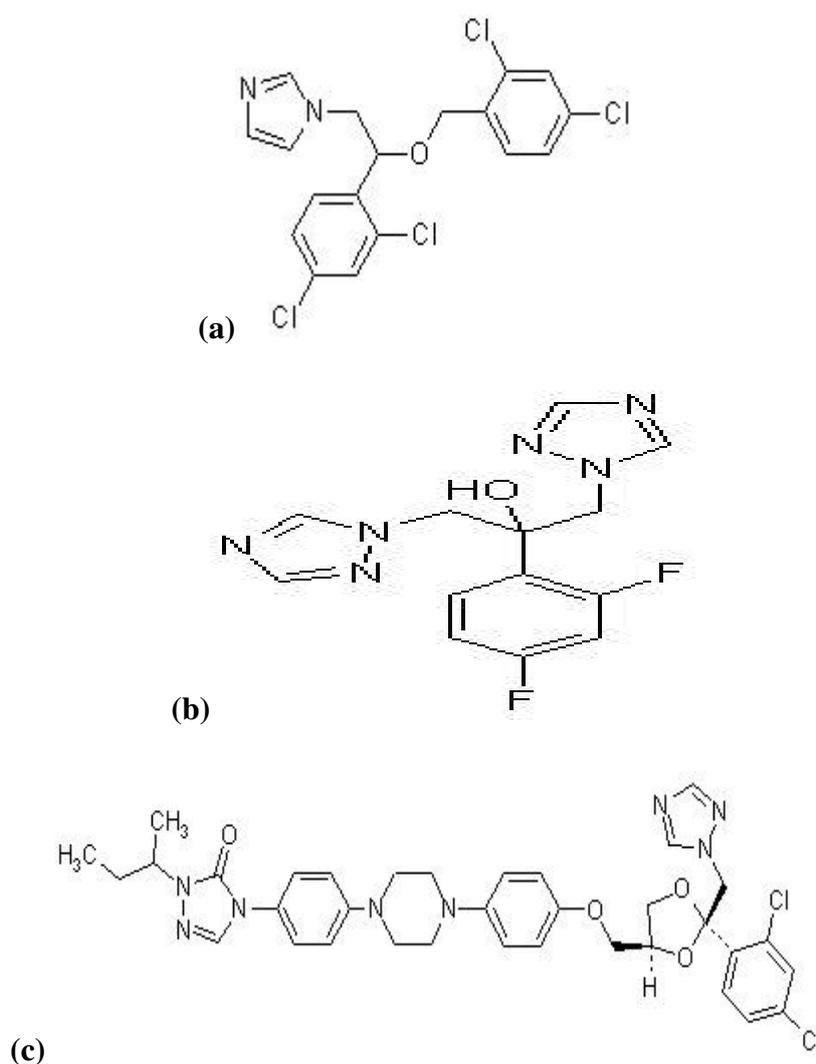


Figure 9: (a) **Daktarin®**, (b) **Triflucan®** Laboratoire Pfizer, (c) **Sporanox®** Laboratoire Janssen Cilag

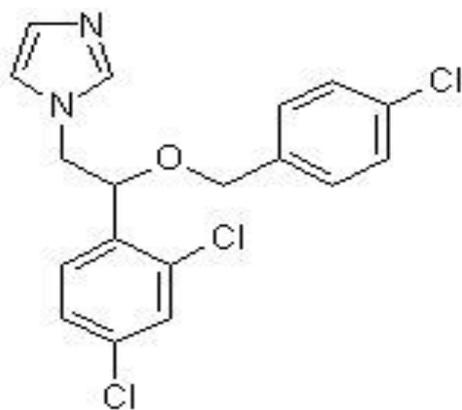


Figure 10 : Econazole(**Pevaryl®**) laboratoire Janssen-Cilag

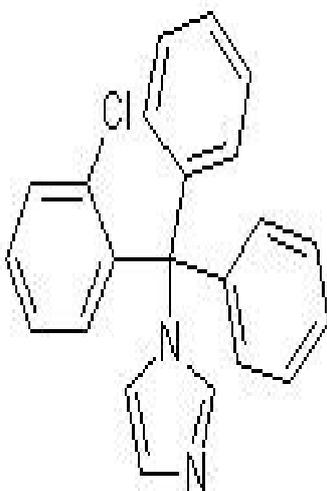


Figure 11 : Clotrimazole (**Trimysten®**), laboratoire Roger Bellon

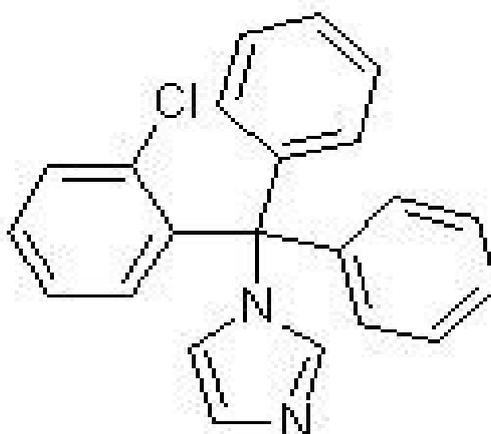


Figure 12: Voriconazole (**Vfend®**),

II-3-5-Les antifongiques allylamines

Ce nouveau groupe d'antifongiques, développés en 1977 au Sandoz Research Institute à Vienne, est caractérisé par sa structure chimique comportant une fonction allylamine tertiaire. Les composés de cette classe d'antifongiques inhibent l'enzyme squalèneépoxydase fongique qui intervient dans la voie de la biosynthèse des stérols. Parmi ces antifongiques on retrouve les suivants :

- **Naftifine** : Découvert en 1974, il est le premier composé allylamine (**Fig.13**) développé en clinique. La naftifine est utilisée contre les infections à dermatophytes.

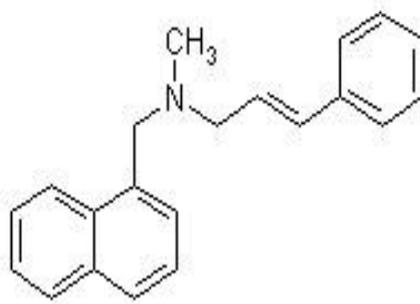


Figure 13: Naftifine

- **Terbinafine** : La terbinafine (**Fig. 14**), succède à la naftifine, elle est active par voie orale et topique très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes, l'onychomycose comprise. Le spectre antifongique de la terbinafine *in vitro* est très large : il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida sp* et de nombreuses moisissures (**Mieth, 1993**). Cependant *in vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*. Ce grand écart entre les activités *in vitro* et *in vivo* est un point, encore, non élucidé.

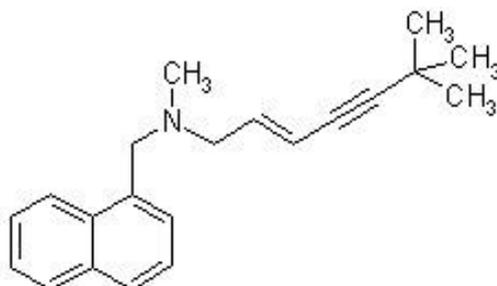


Figure 14 : Lamisil® Laboratoire Novartis Pharma

- **Amorolfine** : C'est le seul composé de la classe des phénylmorpholines utilisé en Médecine humaine, le reste des représentants de cette série sont employés en agriculture. L'amorolfine (**Fig. 15**) inhibe deux enzymes dans la voie de biosynthèse des stérols fongiques (**Hartman et polak., 1993**). Elle agit sur la plupart des champignons responsables des mycoses superficielles, y compris *Candida* sp et la dermatophytes et elle entre dans la composition de diverses préparations pour le traitement de l'onychomycose, des mycoses cutanées et des infections vaginales à *Candida*.

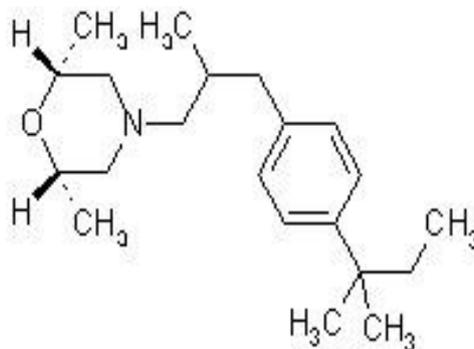


Figure 15 : Locéryl® Laboratoire Roche

II-3-6-Les antifongique non classés

D'autres antifongiques de synthèse, moins populaires que les molécules précédemment décrites, sont utilisés en clinique ; les plus rencontrés sont la chlordantoïne, l'haloprogrine, la ciclopiroxolamine et le nifuratel.

II-4-Nouveaux antifongiques d'origine naturelle

Une quantité infime d'antifongiques naturels ont été découverts et mis sur le marché clinique ces dernières années. Ces molécules sont produites par fermentation essentiellement par des actinomycètes et des champignons. Ils offrent au marché des antifongiques des composés nouveaux capables de faire face aux phénomènes de résistance constamment en progression.

II-4-1-Echinocandines

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats d'*Aspergillus* (**Benz et al., 1974**). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre champignon le *Zalerionarboricola* (**Schwartz et al., 1989**). Contrairement aux antifongiques sazoles, qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, les échinocandines

tuent les champignons en interrompant la synthèse des glycanes, qui est un important constituant de leur paroi cellulaire. Cet élément de la paroi cellulaire ne se trouve pas dans les cellules de mammifères, ce qui fait que le médicament est moins toxique que l'amphotéricine B. Dans le but d'élargir leur spectre d'action contre plusieurs moisissures pathogènes, ces deux molécules ont été optimisées par les laboratoires de recherche Merck au New Jersey en produisant le L-724,872 et les laboratoires Lilly en Inde qui ont mis au point le LY303366. L'amélioration de la solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité orale ont été également améliorées.

II-4-2-Nikkomycines

Ces composés sont les produits de la fermentation de *Streptomyces tendae* (Fiedler et al., 1993). Ces antifongiques sont actifs sur certaines espèces du genre *Candida* et sur les pathogènes dimorphiques (*Coccidioides immitis* et *Blastomyces dermatidis*).

II-4-3-Pradimicines

Les laboratoires Bristol-Myers disposent d'antifongiques nouveaux, les pradimicines. Ce sont des dérivés de l'antibiotique pradimicine A, produits par *Actinomadurahibisca* (Oki., 1992). Ces agents antifongiques sont actifs principalement contre les champignons qui contiennent une grande quantité de mannanes dans leur paroi cellulaire, comme chez les levures. Malheureusement, ces produits ne semblent pas être absorbés par voie orale.

Certaines augmentations des enzymes hépatiques peuvent-être liées au médicament administré par voie intraveineuse ont été observées chez l'homme.

Matériel
Et
Méthode

III.1. Objectif

L'objectif principal de notre travail consiste à l'isolement sélectif des souches d'actinomycètes productrices des substances bioactives à partir de plusieurs échantillons provenant des sols de la zone aride de la Wilaya d'Al Naama sur le milieu GYM (Annexe). La réalisation de cet objectif nécessite :

- isolement et confirmation de l'appartenance des souches au groupe des actinomycètes ;
- mise en évidence de l'activité antifongique chez les isolats obtenus ;
- sélection des isolats les plus performantes et production des métabolites bioactifs par fermentation sur milieu solide AF.
- Extraction et caractérisation préliminaire de la molécule bioactive.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques de l'université Dr. MOULAYTAHAR Saida, Faculté des sciences Département de biologie, pendant la période allant de février à mai 2019.

III.2 Isolement des actinomycètes**III.2.1 Prélèvement des échantillons**

Les échantillons de sols sont prélevés dans la zone aride dans les régions wadehlib et kesdir de Mecheria (la wilaya de Naama) selon la technique de **Pochon et Tardieux (1962)**. A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) 100 à 150 grammes de terre qui sont déposés sur un dispositif tubulaire stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 grammes sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire.

III.2.2. Mesure du pH des échantillons

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée des échantillons au laboratoire. La technique consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol en eau distillée (5g de sol pour 12,5 ml d'eau distillée) (**Pochon et Tradieux., 1962**).

III.2. 3.Traitement

Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO₃ et incubé à 28°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavala et Eberlin., 1994**).

III.2.4 Dilutions

5g de chaque sol séché et traité est dilué dans 45 ml de TSE (Tryptone, Sel, Eau). Cette suspension mère constitue la dilution 10⁻¹ subit une agitation pendant 10 minutes. Une série de dilutions décimales allant à 10⁻⁵ est effectuée pour chaque échantillon

III.3 Isolement des actinomycètes

L'isolement d'actinomycètes dans cette étude a été réalisé sur milieu GYM (Glucose-Extrait de levure-Malt) (voir composition en annexe). Cent microlitre des dilutions 10⁻³ et 10⁻⁴ sont ensemencés en surface sur le milieu d'isolement (2 boîtes pour chaque dilution).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Une atmosphère saturée en humidité est créée en utilisant un béccher rempli de l'eau dans l'étuve. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine.

III .4 vérification de la pureté des souches

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect **macroscopique** caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect **microscopique** (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique ($G \times 10$).

III .4.1 Macromorphologie et caractères cultureux

Ces caractères sont déterminés sur le milieu GYM. Le milieu est stérilisé et réparti en boîtes de Pétri qui sont incubées à $28^{\circ} C$ avant leur utilisation. Après 7 jours d'incubation, l'importance de la croissance de chaque souche, le développement et la pigmentation du mycélium aérien et de substrat (dos de la colonie) sont déterminés. S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brun-noir caractéristique des pigments mélanoides, la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb.,1966**).

III .4.2 Micromorphologie**a). Observation au faible grossissement**

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'Agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique ($G \times 40$) (**Suzuki., 2001**).

b). Observation au fort grossissement

Est une observation au microscope optique ($G \times 100$), après coloration de Gram. La coloration de Gram est une double coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

La procédure de cette coloration

- Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen
- Coloration par violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 min.
- Rincez à l'eau distillée ;
- Mordançage au lugol (solution d'iode iodé-ioduré) pendant 1 min. puis rinçage à l'eau distillé.

- Décoloration par l'alcool pendant 30 s, rincé à l'eau ;
- Recoloration à la fuschine pendant 1 min, rinçage à l'eau puis séchage ;
- Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (G×100)

Le mécanisme de cette coloration est connu. 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 (**Camille., 2007**).

III .5 Conservation des souches d'actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes sur le milieu GYM, pures, numérotées, sont conservées selon différentes méthodes :

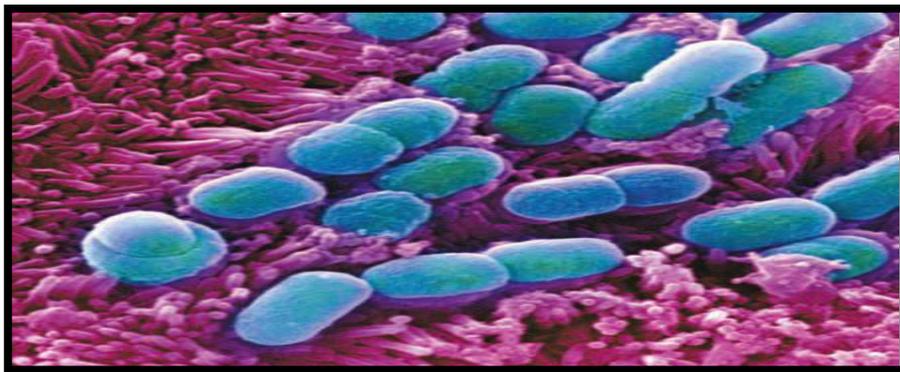
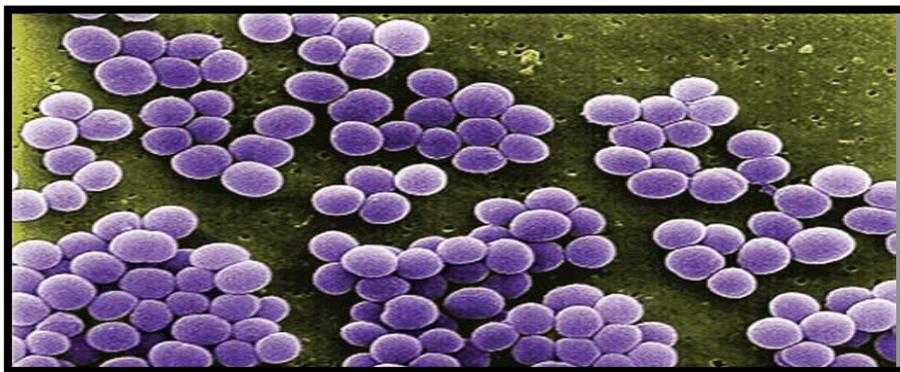
- Conservation en gélose inclinée à 4 °C après incubation de 21 jours à 28°C un repiquage est effectué tous les deux mois (**Hilali et al .,2002**).
- A la congélation à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.
- Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu GYM sont remplis de l'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation (**Boudemagh., 2007**).

III .6. Recherche de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes isolés est recherchée contre des bactéries testées qui ont été ramenées gracieusement par Mr Hala .N de (laboratoire antibiotique antifongique : physico-chimie synthèse et activité biologique département de biologie faculté des sciences de la terre et de la vie des sciences de la terre et de l'université de Tlemcen). Elles sont constituées de bactérie à Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC10876). Et aussi des bactéries à Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC 25922). (**Tableau N° 04**).

(Tableau 04) : Caractéristiques des souches testées

| Souches | Caractéristiques des souches | Maladies causées |
|--|---|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC 25923) Figure 17 | Cocci, Gram +, groupe en amas (forme grappe de raisin), aéro-anaérobie facultatifs, sporulé, non capsule , immobile, catalase +, oxydase - (Camille , 2007) . | Dues à l'ingestion d'entérotoxine préformées dans l'aliment : Abscesses, vomissements, diarrhées, hypotension, déshydratation et absence de fièvre (Camille , 2007) . |
| <i>Escherichia coli</i> (ATTC 25922) Figure 16 | Bacille, Gram -, mobile, aéro-anaérobie facultatifs, parfois capsulé, capable de fermenter le lactose et produire de l'indole (Jacques, 2001). | - Gastro-entérite, diarrhée, - Infections urinaires, - Méningites , septicémie (Jacques, 2001). |
| <i>Bacillus subtilis</i> Figure 18 | Cocci ou bâtonnet , Gram +, sporulé , catalase +, mobile, aérobie stricte ubiquitaire, produisant des acides à partir des glucides avec nitrates (Camille , 2007) . | - Méningites, otite, , - Infection urinaires, bactériémie, - Pneumonie, endocardite, panophtalmie (Camille , 2007) . |

**Figure 16 :** *Escherichia coli* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille., 2007).**Figure 17:** *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).

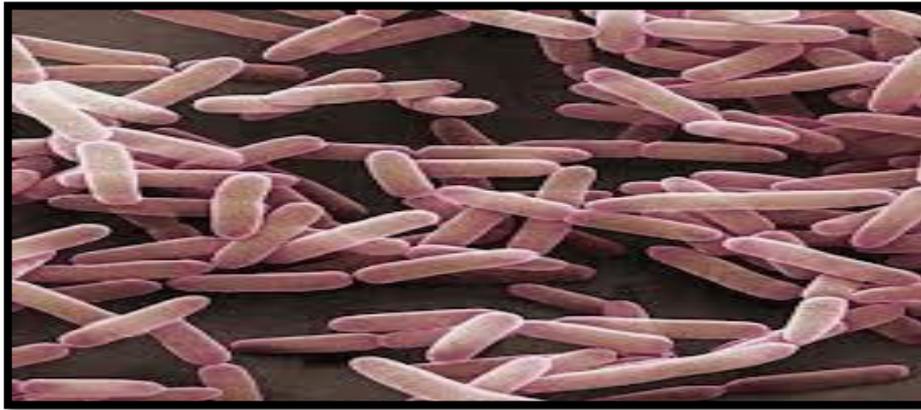


Figure 18: *Bacillus subtilis* vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille., 2007).

III.6.1 Revivification des bactéries testent

Chaque bactéries teste est revivifiée dans 9ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées. A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture estensemencée en stries sur une boîte de Pétri contenant dumilieu gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24heures afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées (Andriambololona., 2010).

III .6.2Préparation des inocula des bactéries-tests

A partir d'une culture de 18h sur gélose nutritif (GN) une suspension de chaque bactériestestes en eau physiologie (0.9 % NaCl) est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 650nm) de façon à obtenir une concentration finale de 106 UFC/ ml après incorporation dans le milieu MuellerHinton (Cavalla et Eberlin, 1994).

III .6.3 Méthodes des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes sontensemencées en stries serrées à la surface de milieu GYM. Après 07 jours incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont prélevés, déposés à la surface du milieu Mueller Hinton (Annexe) préalablementensemencé parécouvillonnage avec les bactéries tests. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant 4 heures pour permettre un pré diffusion des substances

bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres sont alors mesurés (Petrosyan *et al.*, 2003).

III.7 Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes

L'activité antifongique des souches est évaluée par la méthode des cylindres d'agar.

III.7.1 Purification et confirmation de l'identité des souches cibles

III.7.1.1 Microorganismes cibles

Dans le but d'effectuer un criblage préliminaire, les isolats conservés ont été repris et testés pour leurs activités antifongiques vis-à-vis des microorganismes cibles obtenus gracieusement du laboratoire de recherche de l'université de Tlemcen.

Tableau 05: les souches fongiques cibles.

| Nom de la souche | La famille |
|-------------------------------|------------------------|
| <i>Phytophthora infestans</i> | <i>Peronosporaceae</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Trichocomaceae</i> |
| <i>Endosporium spp</i> | <i>Coprinaceae</i> |

III.7.1.2 Purification des souches cibles

Afin de vérifier la pureté des souches fongiques cibles (*Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Endosporium*) sont repiquées sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (voir composition en annexe), stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, l'ensemencement est réalisé par dépôt d'un fragment de gélose contenant l'inoculum sur les boîtes qui sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 jours.

III.8 Confirmation de l'identité des souches fongiques

L'identification des microorganismes cibles fait appel aux caractères culturels (la vitesse de croissance, la texture, la couleur de thalle et la couleur du revers de la culture) et morphologiques (l'étude du mycélium et la nature des organes différenciés) Une observation microscopique est ensuite réalisée en utilisant la méthode de scotch (Botton *et al.*, 1990).

III.8.1 Préparation des suspensions fongiques

des suspensions fongiques des souches cibles (*Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Endosporium*) sont préparées en grattant la surface de la culture à l'aide d'une spatule stérile afin de récupérer les spores et les mélanger par vortex à 10 ml d'eau physiologique stérile.

III.8.2 Technique des cylindres d'agar

Cette méthode consiste à ensemencer les souches à tester sur milieu GYM en stries très serrées, puis à les incubé pendant 7 jours à 28°C. Au bout de l'incubation, des cylindres de gélose de 6mm de diamètre contenant des colonies d'actinomycètes sont découpées stérilement à partir de ce milieu à l'aide d'un emporte pièce, et déposés à la surface du milieu à l'extrait de PDA préalablement ensemencé par les suspensions fongiques des germes cibles à l'aide d'écouvillons stériles afin d'obtenir un tapis. Les boites ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2 à 4 heures avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 48h d'incubation à 25°C (**Bastide *et al.*, 1986**).

III.9 Production et extraction de métabolites secondaires**III.9.1 Fermentation sur milieu solide**

Les souches K1et W1, retenus parmi les 15 souches d'actinomycètes testées après avoir donné des activités antibactérienne et antifongiques importants avec la méthode de cylindre d'agar, sont ensemencées chacune sur 40 en stries serrées sur milieu AF stérile, à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 28°C pendant 14 à 21 jours.

III.9.2 Extraction des métabolites**III.9.2.1 Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide**

Les deux isolats retenus dans cette étude (K1et W1) sont ensemencés en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 14 jours, la gélose est fragmentée puis repartie dans des flacons stériles contenant 25 ml de méthanol à raison de chaque boîte. Les flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures avec agitation vigoureuse.

Les extraits sont filtrés en utilisant le papier Wattman N°1 afin d'éliminer les cellules vivantes. Les filtrats sont entraînés dans une centrifugation à 11000 g pendant 10 mn (**Boughachiche., 2012**).

III.10 Tests de l'activité antifongique des extraits

Cette méthode repose sur l'effet de l'incorporation de différentes doses de l'extrait dans le milieu de culture sur la croissance des souches fongiques cibles, dans le but de révéler l'existence de l'effet antifongique des extraits obtenus à partir des souches actinomycètes sélectionnées sur les moisissures étudiées avec des concentrations différentes.

III.10.1 Préparation des souches fongiques cibles

Les souches utilisées pour tester l'effet antifongique sont :

- *Aspergillus niger*
- *Phytophthora infestans*
- *Endosporium*

Afin de pouvoir déterminer la pureté des souches fongiques, celles-ci sont repiquées sur milieu PDA acidifié aseptiquement par 1ml de l'acide lactique dilué à 25% afin d'inhiber toute croissance bactérienne. Le repicage se fait par le transfert d'un fragment de gélose prélevé de la souche mère, et déposé au centre de la boîte.

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 jours.

III.10.2 Identification macroscopique et microscopique des souches cibles

Cette étape se fait par l'observation des caractères culturels, ainsi que par observation microscopique par la méthode de scotch (**Botton et al., 1990**) à différents grossissements (X10), (X40) et (X100) après l'incubation de 3 jours.

III.10.3 La technique du contact direct

Les extraits des souches actives sont testés pour leur activité antifongique par la technique de contact directe selon (**Laghchimi et al., 2014**)

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes K1 et W1 dans le milieu de culture sur

la croissance des souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Phytophthora infestans*, *Endosporium*) Une série des dilutions (de 0.5 à 8 mg/ml) est préparée en suspension avec le milieu de culture, à partir de la solution mère par addition des volumes variables de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes.

Dans des flacons contenant chacun 250ml de milieu de culture PDA stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 120 °C) et maintenus en surfusion à 45, on ajoute aseptiquement 1ml de l'Acide lactique diluer à 25% pour but d'inhiber les souches bactérienne.

Dans des tubes à essais on verse 20 ml du milieu PDA préparé préalablement, on ajoute l'extrait avec différent volume de tel façon à obtenir les dilutions (0,5, 1, 2, 4 et 8mg/ml).

Puis on les agite convenablement à l'aide du vortex avant de les répartir dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml de mélange par boîte. Après solidification, les boites préparées sontensemencées au centre de la surface du milieu gélosé avec un disque de mycélium (6 mm de diamètre) prélevé de manière stérile à l'aide d'une aiguille à partir du périphérique de cultures âgées de 7 jours. Les boites sont ensuite incubées à l'obscurité à une température de 28 °C pendant 5 jours. La croissance mycélienne est suivie en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le centre de chaque boîte. La fongitoxicité, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium (I%), est calculé selon la formule de **Pandey et al. (2000)**.

$$I(\%) = \frac{D_t - D_i}{D_t} \times 100$$

III.11 Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque

Des microplaques à fond en U (plaque à microtitration) sont utilisables pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Une plaque à 96 puits permet la détermination des CMI de 3 souches fongiques vis-à-vis les extraits obtenus.

III.11.1 Préparation de l'inoculum fongique

Afin de préparer la suspension fongique, cinq colonies sont prélevées à partir d'une culture pure de la souche cible dans 5 ml de bouillon sabouraud. La suspension doit être homogénéisée par Vortex avant l'ensemencement de la microplaque.

III.11.2 Préparation de la microplaque

Afin de déterminer la CMI, chaque microplaque va servir à tester un extrait donné sur les trois souches de champignon pathogènes citées plus haut, pour cela 100 µl de (BSC) sont distribués horizontalement dans chaque puits sur les rangées de la microplaque à partir de la colonne 2 jusqu'à la colonne 11.

La colonne 1 recevra 200 µl d'extrait dans chaque puits qui seront dilués horizontalement et successivement à demi, c'est-à-dire que, 100 µl seront prélevés des puits de la colonne 1, mis dans le puits de la colonne 2 qui vont se mélanger aux 100µl de BSC déjà existants dans le puits, du même puits 100µl du mélange (extrait + BSC) seront prélevés mis dans le puits suivants de la colonne 3 et ainsi de suite, jusqu'au dernier puits qui sera celui de la colonne 10, les 100 µl en surplus seront éliminés.

Les puits de la colonne 11 et 12 serviront respectivement de : témoin + (200µl de BSC + inoculum fongique) afin de mettre en évidence la croissance fongique et de témoin – (200µl BSC de seul) comme contrôle de contamination de la microplaque.

III.11.3 Inoculation de la microplaque

Une fois la microplaque prête, l'ensemencement par la souche cible ce fera horizontalement par le dépôt de 50 µl de la suspension fongique dans chaque puits à partir du puits de la colonne 1 jusqu'au puits de la colonne 11. Ce protocole se répètera pour les 3 souches fongique test.

Une fois l'inoculation effective et le couvercle scellé en asepsie la microplaque sera incubée dans une étuve à 25°C pendant 17 à 24 heures.

La lecture des résultats se fera après incubation par la détermination de la plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance, elle sera donc considérée comme la plus faible concentration inhibitrice (CMI)

III.12 Caractérisation de la molécule bioactive

III.12.1 Chromatographie sur couche mince (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 **(Randerath., 1971 ; Vernin., 1970). (Andriambololona., 2010).**

$$Rf = \frac{X}{Y} \quad \text{Rf: Référence frontale.}$$

X : Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

Mode opératoire

Dix microlitres de chaque extrait méthanolique des souches actinomycétales,

K1 et W1 sont déposés à l'aide d'une micro seringue sur des plaques de CCM en plastique (20 × 20 cm) préalablement étalées par une couche mince de gel de silice GF254 (Merck). Ces plaques sont ensuite maintenues verticaux dans des cuves de CCM contenant les systèmes de solvants suivants :

- Toluène-acétone (6 :4)
- Toluène- acide acétique (8 :2)
- N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1)
- Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4)
- Toluène- méthanol (5 :5) **(Boughachiche, 2012).**
- Déchlorométhane –méthanol (8,2) **(Andriambololona, 2010).**

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm) **(Boughachiche, 2012).**

Préparation de la plaque

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à environ 1cm du bord inférieur de la plaque. Puis les échantillons en solution sont déposés sous forme de trait sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Ils sont espacés de 1cm. Les dépôts sont séchés immédiatement puis vérifiés sous UV pour s'assurer que la quantité déposée est bien suffisante (**Figure N°19**).

Saturation de la cuve

Le système de solvants est versé dans la cuve 15 minutes avant l'élution. Ceci a pour effet de saturer l'atmosphère de la cuve.

Développement du chromatogramme

La plaque est placée en position presque verticale dans la cuve contenant le solvant de chromatographie, puis la cuve est fermée et le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque. Lorsque le front de solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et séchée à l'aide d'un séchoir.

Révélation

La plaque est d'abord observée sous lumière UV aux longueurs d'onde 254nm et 365nm. Les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres.

Tableau 06: Représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographiesur couche mince

| Révélateur chimique | Mode préparatoire | Molécules chimiques révélées | Conditions de révélation | Références |
|------------------------|---|--|--|---------------------------------|
| Vanilline | 3 % vanilline, 1,5 % acidesulfurique, éthanol à 95 % | Les éthers | 110 °C pendant 3-5 min | Geshvaet al.,2004 |
| Ninhydrine | Exemple : Préparation d'une solution de 0,3%de ninhydrine. 0,3% ninhydrine, 100 ml n-butanol. | Molécules portant des résidus amines (primaires et secondaire) | 80°C pendant 3-5min | Li et al ., 2006 |
| Cristaux d'iode | Une cuve en verre HermétiquePréalablement saturée parlesvapeurs des cristauxd'iodes | Les lipides | Juste à l'apparition des taches jaunesmarron | Parsons et pattons, 1967 |

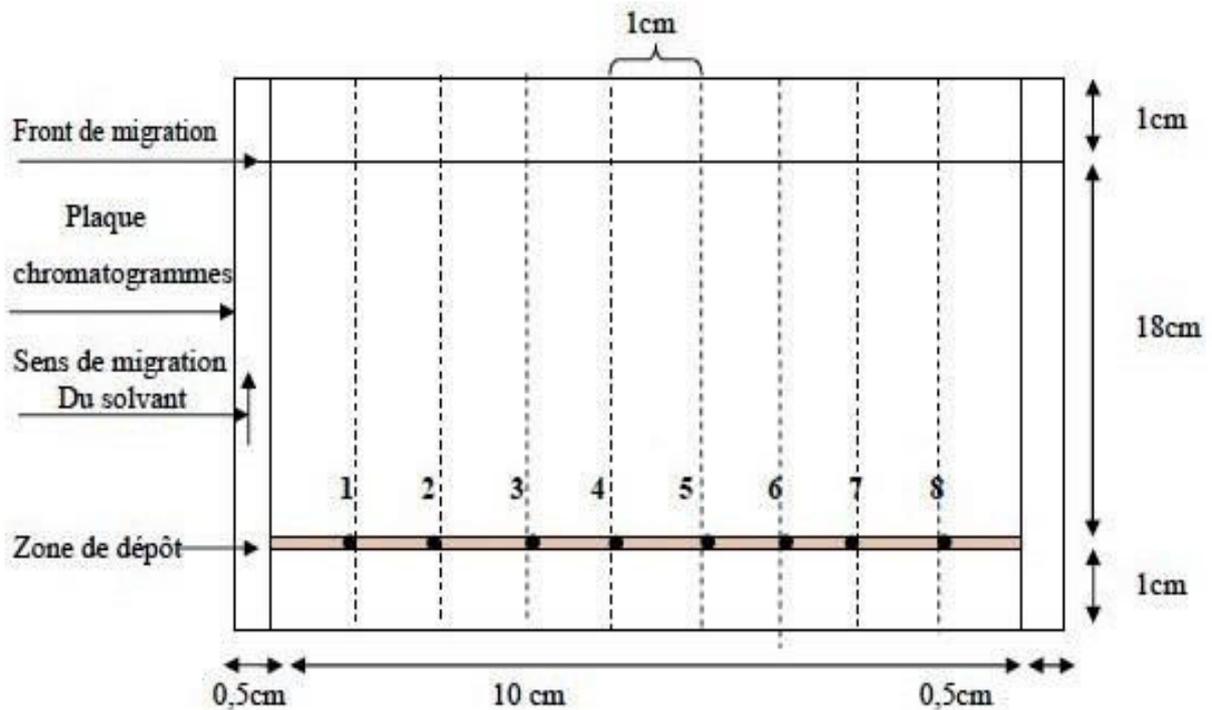


Figure 19: Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM.

III.12.2 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 (**Andriambololona., 2010**).

Les chromatogrammes sont alors déposés délicatement à la surface de la gélose Mueller Hinton préalablementensemencé avec les bactéries –testes. Après pré-diffusion 2 heures à 4°C, et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les zones d'inhibitions ont été notées après 24 heures d'incubation (**Kitouni., 2007**).

*Résultat
Et
Interprétation*

IV. Isolement des souches d'actinomycètes :

IV.1. Caractéristiques des échantillons :

Les caractéristiques et PH des échantillons des sols prélevés sont récapitulés dans le **tableau 07**. L'ensemble des échantillons examinés appartient aux zones arides. Ils se caractérisent par des pH presque neutre ou légèrement alcalin.

Tableau 07 : Description des échantillons.

| Echantillon | Site de prélèvement | Description | pH |
|-------------|---------------------|----------------------------|------|
| E1 | Wadehelib | Sol sableux, Marron Foncé | 8.20 |
| E2 | El kessdir | Sol sableux, Marron claire | 7.10 |

IV.2. Isolement des Actinomycètes

A partir de 2 échantillons de sol collectés sur les 2 différents sites dans la wilaya d'El Naama, 15 souches d'Actinomycètes sont isolées. Les nombres de souches isolées sur le milieu GYM sont regroupés dans le tableau 08.

Tableau N 08 : résultats de l'isolement souche d'actinomycètes

| Dilution | E1 | E2 | Total |
|--------------|----|----|-------|
| 10^{-3} | 8 | 5 | 13 |
| 10^{-4} | 2 | 0 | 2 |
| Total | 10 | 5 | 15 |

IV.3. caractéristiques macroscopiques des isolats

La figure 20 représente l'aspect macroscopique de quelques souches des actinomycètes isolées sur milieu de culture GYM. Les photos présent sur les boites montrent la forme caractéristique des colonies d'actinomycètes. Ces dernières ont un aspect différent aux autres bactéries (colonies poudreuses, contour irrégulier, attachées au milieu...). Les colonies présentes sur le milieu ont un aspect similaire aux champignons sauf que la différence majeure est la taille de colonies par rapport à la durée d'incubation qui est très longue chez les (Shirling et Gottlieb.,1966).

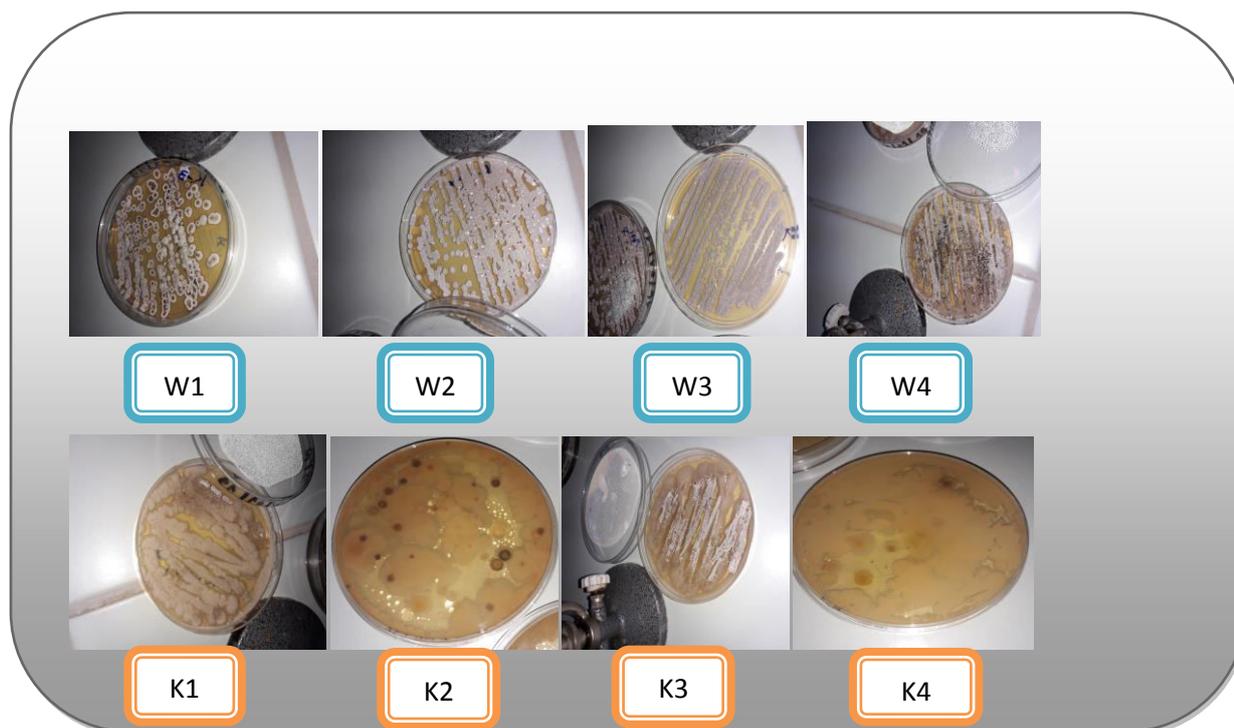


Figure 20 : aspect macroscopiques des isola

IV. 4. Résultat de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches *actinomycétales* isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 05. Les valeurs mentionnées dans le tableau représentent les diamètres des zones d'inhibition mesurées autour du cylindre d'agar posé sur le milieu contenant la souche indicatriceensemencée en surface. L'effet inhibiteur est obtenu par la diffusion de la substance bioactive en milieu gélosé.

Tableau N 09 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les micro-organismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar.

| Code | Activité antibactérienne (mm) | | |
|------|-------------------------------|------------------|-------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B.subtilis</i> |
| W1 | 13 | 0 | 10 |
| W2 | 9 | 0 | 14 |
| W3 | 23 | 0 | 0 |
| W4 | 9 | 11 | 0 |
| K1 | 13 | 7 | 10 |
| K2 | 9 | 0 | 0 |
| K3 | 12 | 0 | 11 |
| K4 | 7 | 10 | 0 |

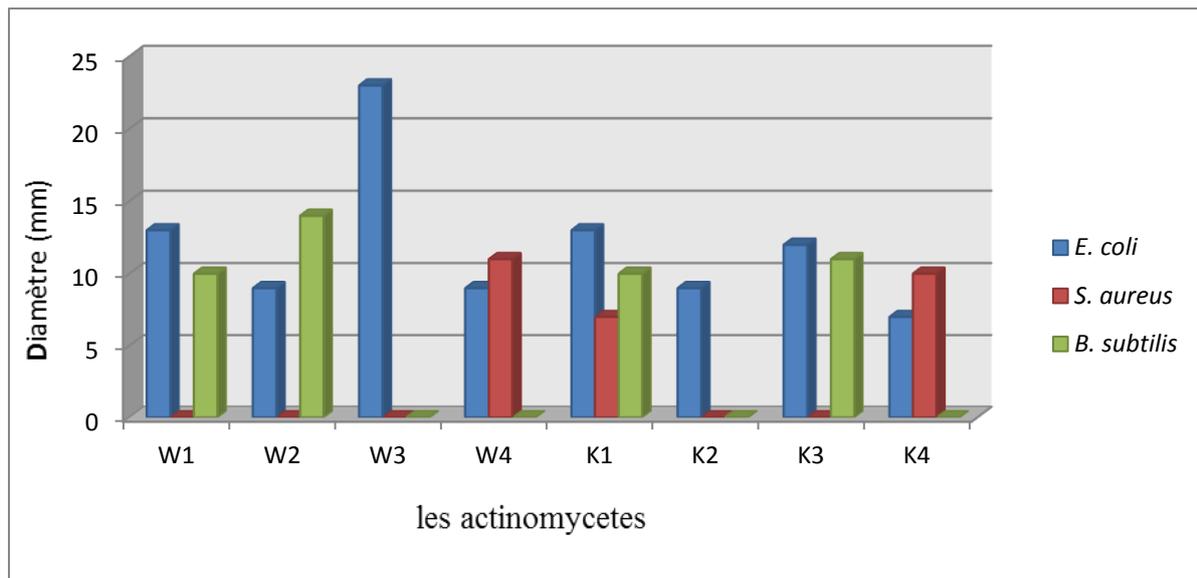


Figure 21 : diagramme présente la zone inhibitrice des souches actinomycètes contre les souches pathogènes tests

Sur un total de 20 isolats purifiées et testés contre 3 bactéries indicatrices, 8 seulement ont montrés une activité inhibitrice contre au moins une souche teste. Les 8 souches d'actinomycètes sont inhibées *E. coli*. La bactérie *Bacillus subtilisa* été inhibée par 4 souches W1, W2, K1, K 3. *Staphylococcus aureus* a été inhibées par 3 souches actinomycétales W4, K1, K4. La zone d'inhibition la plus grande (23mm) a été donnée par la souche W3 contre E.Coli.

IV.4.1. inhibition de *Staphylococcus aureus* par les isolats actinomycétals

Les résultats de l'activité antibactérienne de nos actinomycètes vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* sont représentés dans la figure.

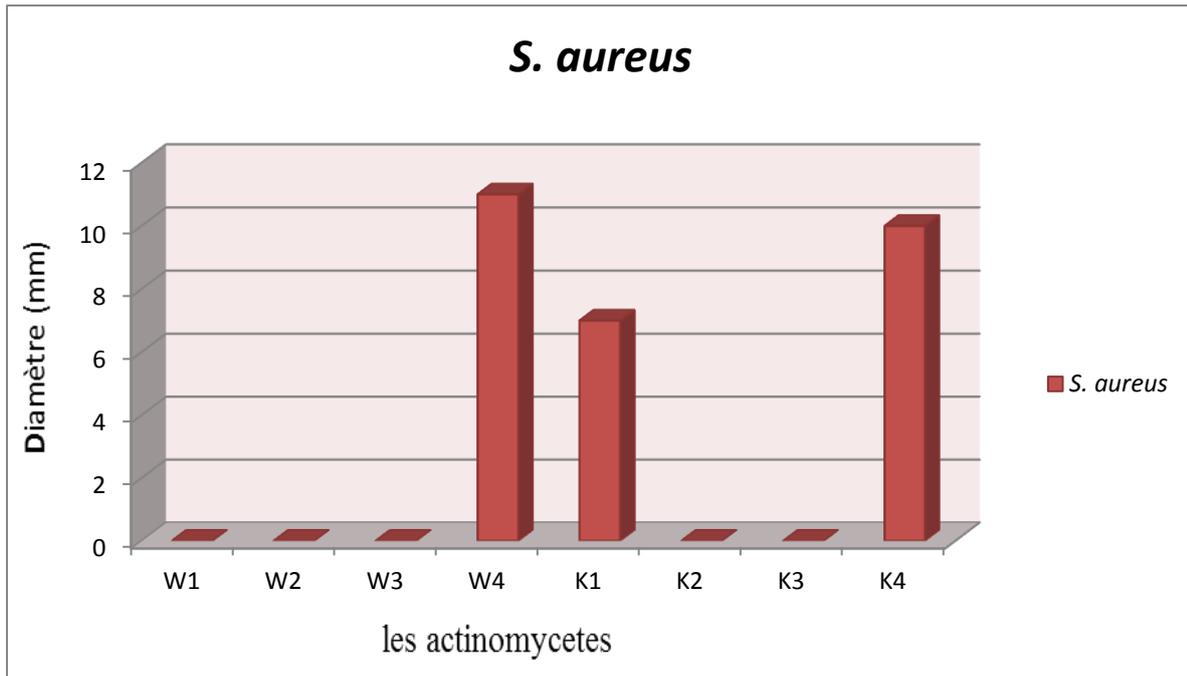


Figure 22 : inhibition de *Staphylococcus aureus* par les isolats des actinomycètes

La figure 22 montre que *S aureus* a été inhibée par 3 souches parmi les 8 actives. La souche W4 a donné la zone d’inhibition la plus importante avec un diamètre de 11mm. Les isolats K1et K4 ont exercées une activité moins importante. Les diamètres des zones d’inhibition appliquées par les souches K1 et K4 sont de l’ordre de 7et 10 mm respectivement.

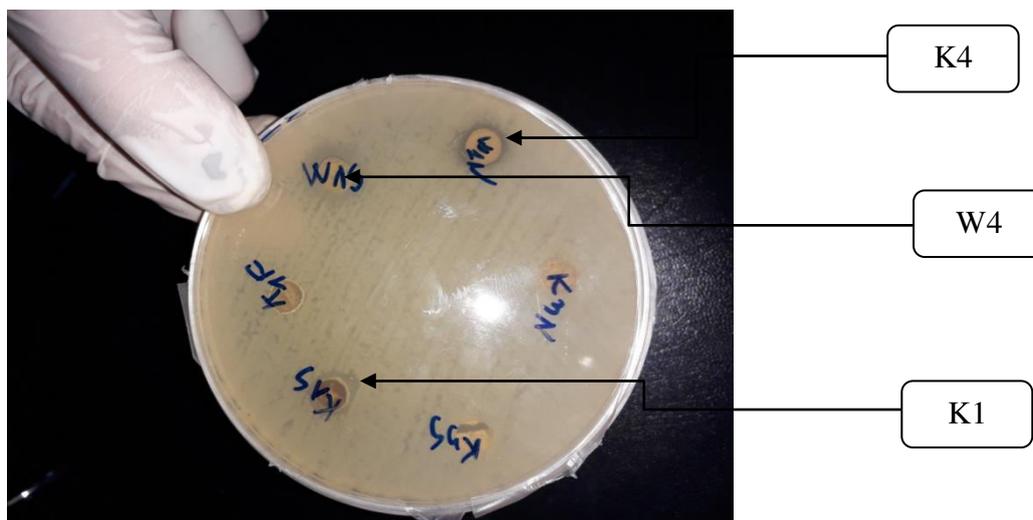


Figure 23 : l’activité antimicrobienne des actinomycètes contre *S. aureus*

IV.4.2. inhibition d'*E.coli* par les isolats actinomycétals

Les résultats de l'activité antibactérienne des actinomycètes isolés contre la souche *E.Coli* sont représentés dans la figure suivante (figure24).

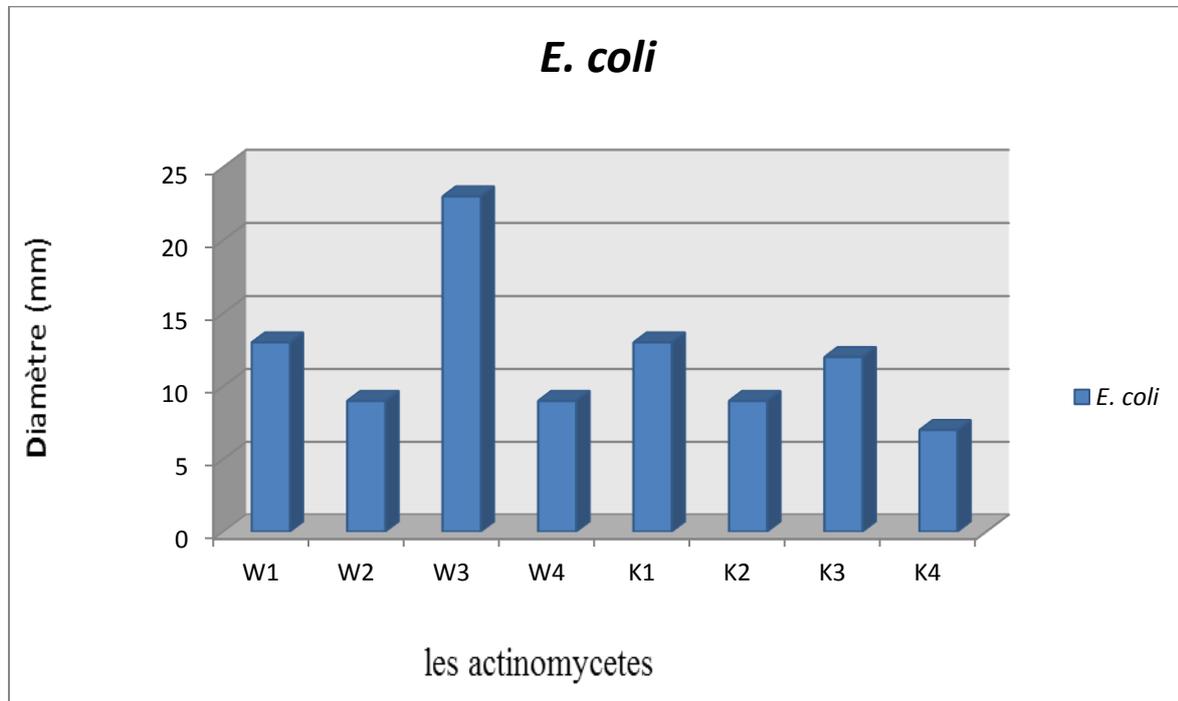


Figure 24 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre *E.Coli*



Figure 25 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis *E.Coli*

D'après l'histogramme on remarque que les 8 souches testées, ont présentées une activité inhibitrice contre *E.Coli*. Le pouvoir inhibiteur le plus important est noté chez la souche W3 avec un diamètre de 23mm. Les souches W1 et K1 sont données une zone d'inhibition de 13 mm de diamètre. L'activité la plus faible, qui se traduit par un diamètre de 7 mm, a été marquée par la souche K4. Les autres actinomycètes ont donnés des zones d'inhibition de diamètre compris entre 9 et 12.

IV.4.3. inhibition de *Bacillus subtilis* par les isolats actinomycétals

La figure 26 représente les résultats de l'activité inhibitrice de nos souches d'actinomycètes contre *Bacillus subtilis*

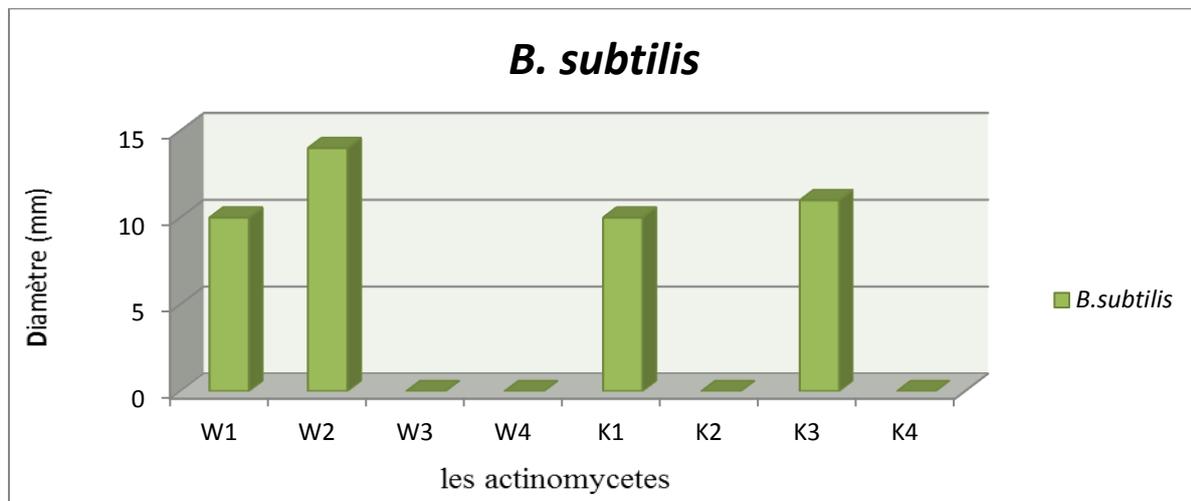


Figure 26 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre *B.subtilis*

On observe que les isolats W3, W4, k2 et k4 ne présentent aucune activité contre *B.subtilis* alors que les 4 autres souches ont toutes donnés un effet inhibiteur remarquable (figure 26) La zone d'inhibition la plus grande a été marquée par deux souches (W2 et K3). Les 2 autres souches ont donnés des zones de diamètres de 10mm.



Figure 27 : l'activité antimicrobienne des actinomycètes vis-à-vis *B.subtilis*

IV.5. Identification des souches d'actinomycètes actives

Après les tests d'activité antimicrobienne, nous avons sélectionnés deux souches d'actinomycètes les plus actives qui ont données les zones d'inhibition les plus grandes. Ces souches retenues ont subi une identification afin de déterminer au moins le genre.

IV.5.1 Caractérisation morphologique

IV.5.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des 2 souches actives sont illustrées sur le tableau 10

Tableau 10: Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives.

| Souches | W1 | K1 |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| Milieu de culture | GLM | GLM |
| Couleur du mycélium aérien | Blanc grise | Blanc Beige |
| Couleur du mycélium de substrat | Marron | Beige |
| Pigmentation | Grise | Beige |

Après ensemencement sur milieu GYM, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28 °C. A partir du 7^{ème} jour, la souche K1 a donné des colonies poudreuses et circulaires convexes, bossues, à bords ondulés et irréguliers, de taille moyenne de 4 à 8 mm, et adhèrent fermement au milieu de culture, elles sont

difficiles à mettre en suspension avec un mycélium de substrat beige et de mycélium aérien Beige.

La souche w1 présente des colonies à bords ondulés et irréguliers, opaques, adhérent au milieu de culture, mycélium de substrat marron, mycélium aérien blanc grise et une pigmentation grise

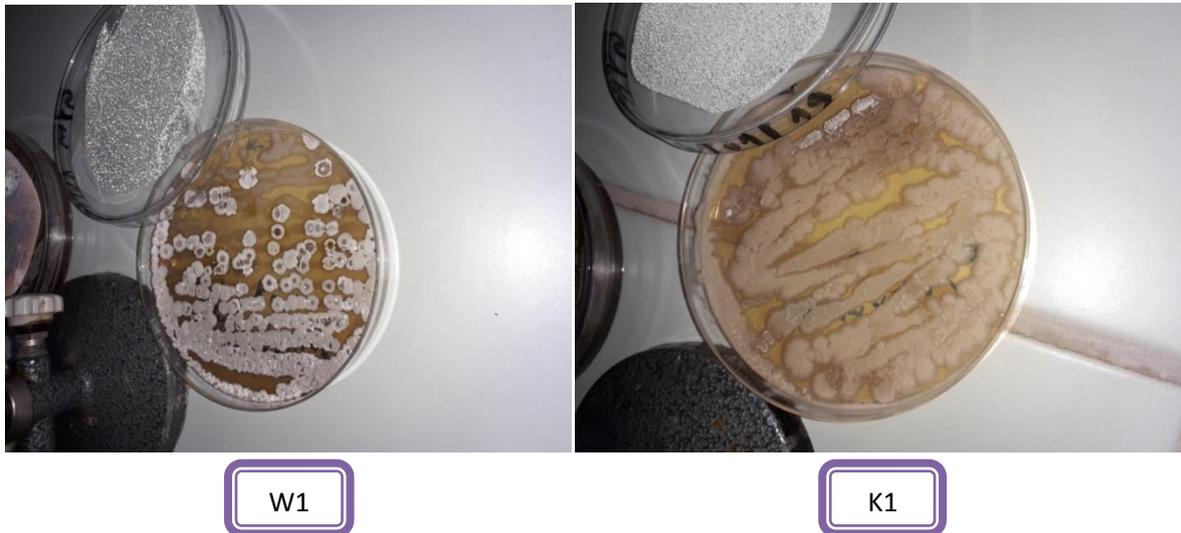


Figure28 : Aspect morphologique et caractères cultureux des souches W1 et K1

IV.5.1.2 Micromorphologie

Une colonie a été prélevée à partir de chacune des souches après une incubation de 7 jours à 28°C. Elle est déposée entre lame et lamelle puis observée au microscope optique à un grossissement de 40x.

Il apparaît que les deux souches développent un mycélium de substrat et mycélium aérien. Le mycélium des deux souches se présente sous forme de long filament ramifié.

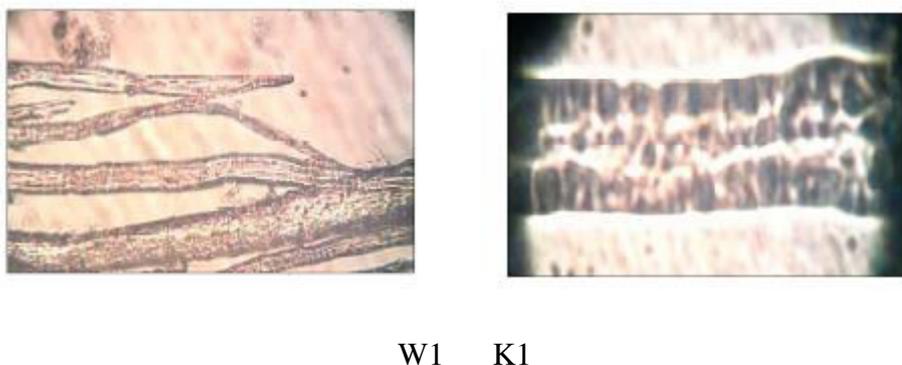


Figure 29 Observation des souches d'actinomycètes (Gx 40)

IV.5.2. Coloration de gram

Après une coloration de gram, les colonies ont montré une couleur violette (voire figure 26)

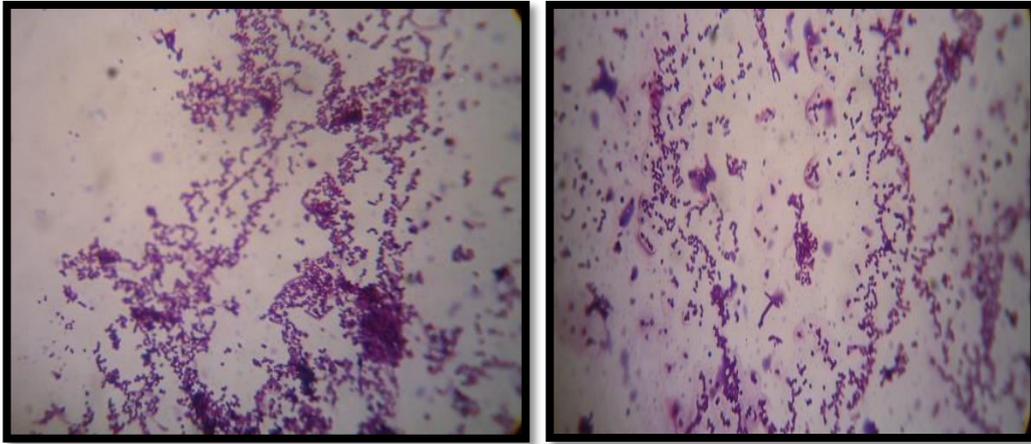


Figure 30: observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram

IV.6. Purification et Confirmation de l'identité des souches fongiques cibles

Les souches cible sont repique successivement sur PDA, les aspects morphologique de ces souches fongique a été étudié (voir figure 31).

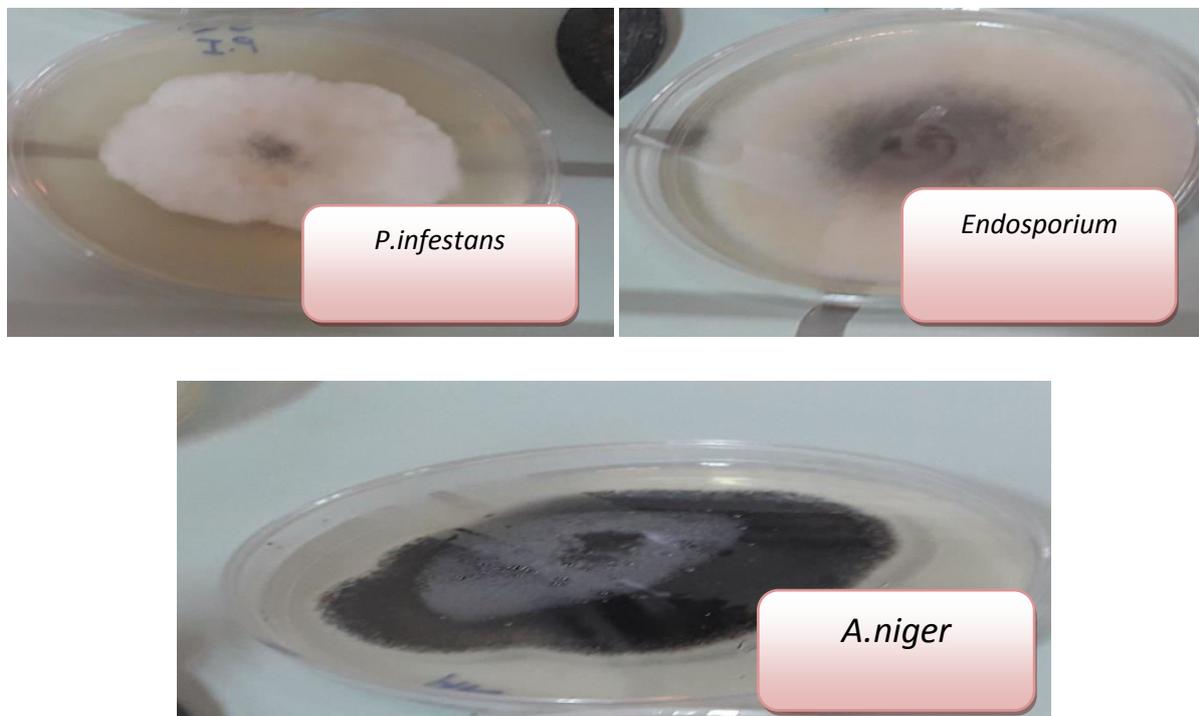


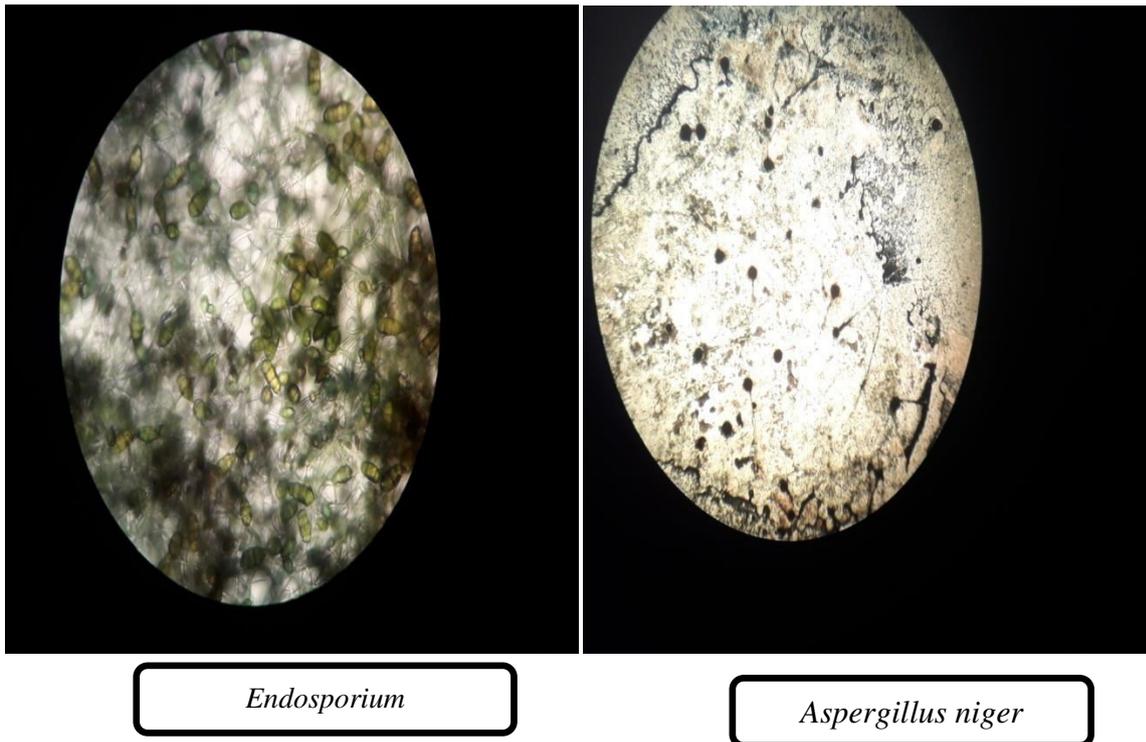
Figure31 : aspect macroscopique de certaines souches fongique cibles

Résultat et interprétation

Durant les 5 jours d'incubation à 25°C, *Aspergillus niger* montré des colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires. Sous microscope, en utilisant la méthode de scotch, nous avons constaté la présence des conidies globuleuses, brunes, échenillées, disposées en chaîne.

Phytophthora infestans montre des colonies poussent de façon radiale, compacte sans marge nette, elles sont duveteuse et présentent de courts hyphes aériens. L'aspect microscopique présent des conidies globuleuses à subglobuleuses, vertes pâles et échenillées

Endosporium montre des colonies apparait blanchâtre, mais vire au vert grisâtre, puis au jaune verdâtre foncé pour finir en vert jaunâtre très foncé. Le centre est légèrement plus élevé, de couleur plus claire, d'aspect laineux, alors que le reste de la colonie est d'un fin velouté ras. La marge de la colonie est blanc verdâtre, alors que sous microscope les hyphes sont septes, les conidies et les conidiospore sont bien interprété **Figure 32**





Phytophthora infestans

Figure 32 : aspect microscopique des souches fongiques cible

IV.7. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches d'actinomycète

Dans le but de sélectionner des souches d'actinomycètes ayant le pouvoir de produire des molécules qui sont capables d'inhiber certaines souches fongiques. Le test de cylindre d'agar est utilisé dont les résultats sont représentés dans le (**tableau 11**)

Tableau 11: pouvoir antifongique des actinomycètes obtenus par la technique de cylindre d'agar.

| Actinomycètes | Diamètre des zones d'inhibition (mm) | | |
|---------------|--------------------------------------|--------------------|----------------|
| | <i>P.infestans</i> | <i>Endosporium</i> | <i>A.niger</i> |
| W1 | 10 | 0 | 10 |
| W2 | 0 | 0 | 0 |
| W3 | 0 | 9 | 9 |
| K1 | 20 | 15 | 12 |
| K2 | 0 | 0 | 0 |
| K4 | 15 | 10 | 0 |

Les résultats du test antifongique obtenus montrent que les 4 souches d'actinomycète W1, W3, K1 et K4 présentent un effet inhibiteur contre au moins une souche fongique parmi les 3 utilisées dans cette étude. La souche K1 a montré un pouvoir inhibiteur important avec toutes les souches fongiques.

Les deux souches W2 et K2 ne sont inhibées aucune souche fongique, alors que la souche W1 inhibe les deux souches *P.infestans* et *A.niger*, avec une zone d'inhibition de 10

mm de diamètre. La souche w3 inhibé Les souches *Endosporium* et *A.niger* avec une zone d'inhibition de 9 mm de diamètre. La souche K4 ont montré un pouvoir inhibiteur important contre les souches fongiques *P.infestans* et *Endosporium* sont de l'ordre de 15 et 10 mm respectivement. (figure 33)

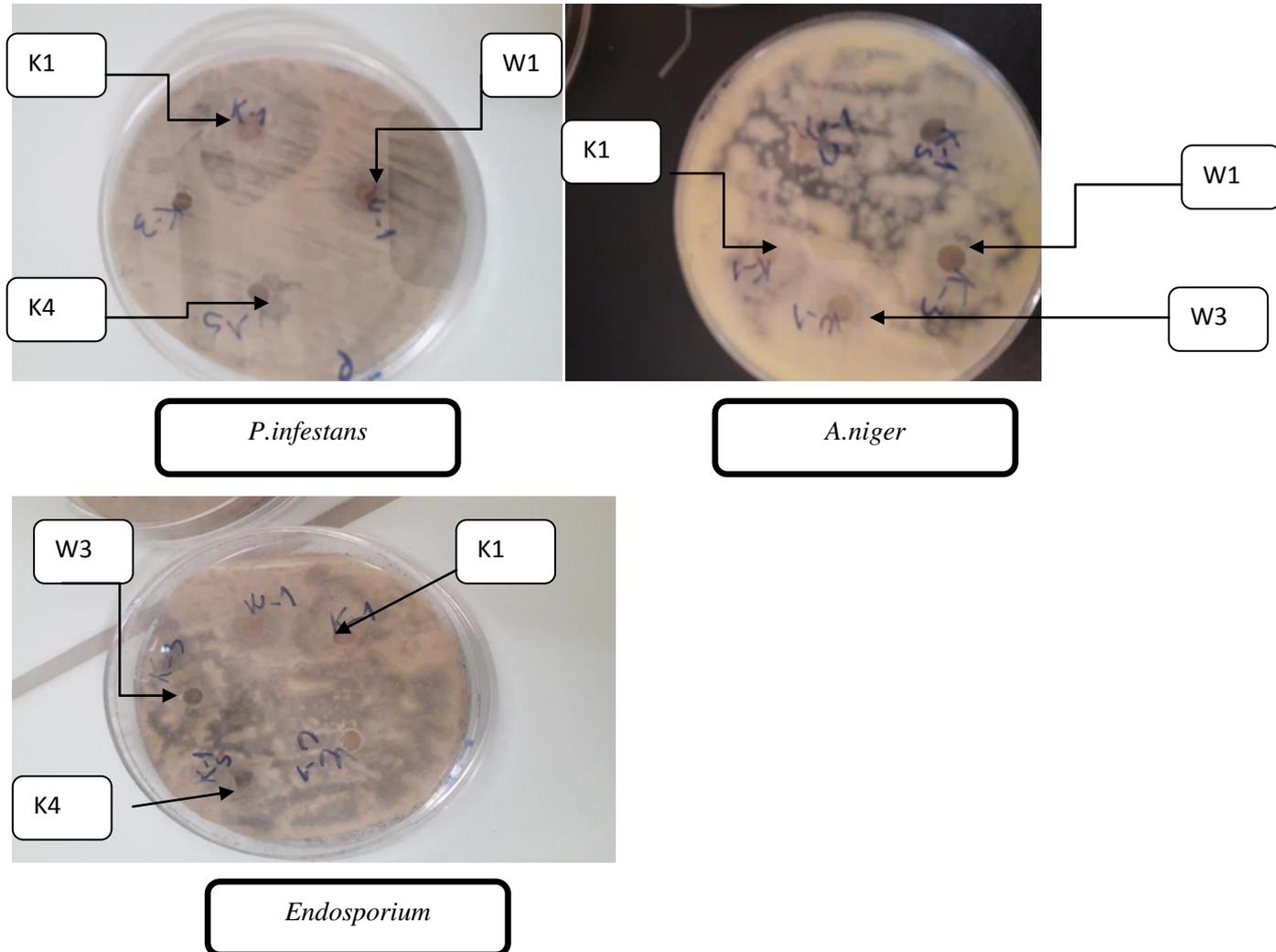


Figure 33 : résultat de la technique de cylindre d'agar

IV.8. production et Extraction des métabolites secondaire

Afin de pouvoir comparer le rendement et l'efficacité des métabolites secondaires obtenus, le type de fermentation utilisé sur milieu solide. Le milieu AF (Actinomycètes Fermentation) est utilisé dans l'état solide.

IV.8.1. Fermentation sur milieu solide

Les souches d'actinomycètes retenues, après avoir montré un pouvoir inhibiteur important lors du test de cylindre d'Agar, sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu AF (20 boîtes pour chaque souche), puis incubées à 28⁰ C pendant 14 jours.

Après l'incubation, le milieu produisant des métabolites sont fragmentés dans des flacons contenant du méthanol (20 lm pour chaque boîte). Ce dernier est utilisé comme un solvant d'extraction. Les flacons subissent une agitation rigoureuse pendant 2 heures. Le mélange

obtenu subi par la suite une filtration du contenant, puis une centrifugation à 11000 g pendant 10 min. (**Figure 34**)

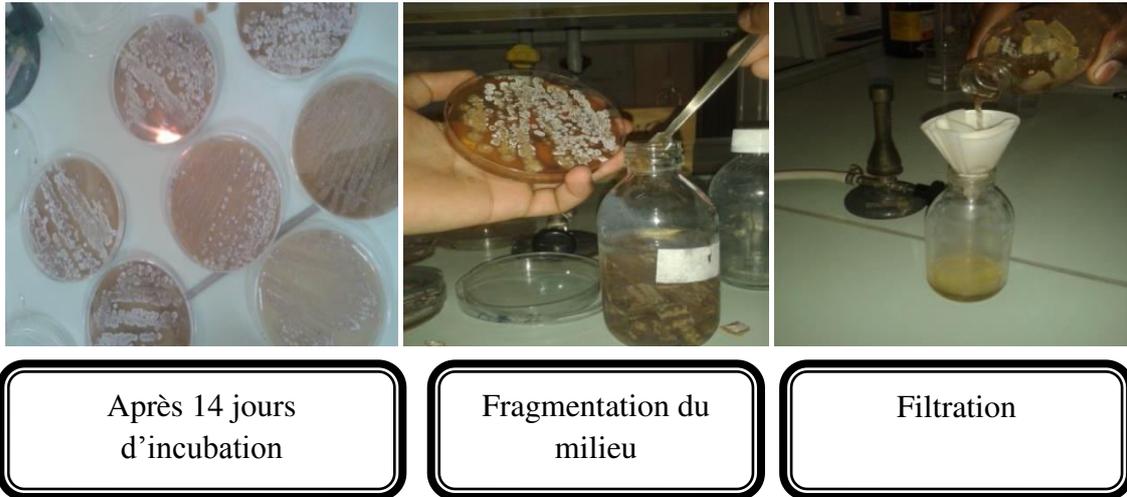


Figure 34 : étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide

IV.9 Tests de l'activité antifongique des extraits

IV.9.1 Technique de contact directe ou de dilution

Il s'agit de l'incorporation de l'extrait à différentes concentration avec le milieu de culture et le suivit de la croissance par rapport à un témoin.

Teste antifongique de l'extrait de la souche K1 :

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de la souche K1 sur la croissance mycélienne des trois champignons, après une période d'incubation de 5 jours sont regroupés dans la figure suivante.

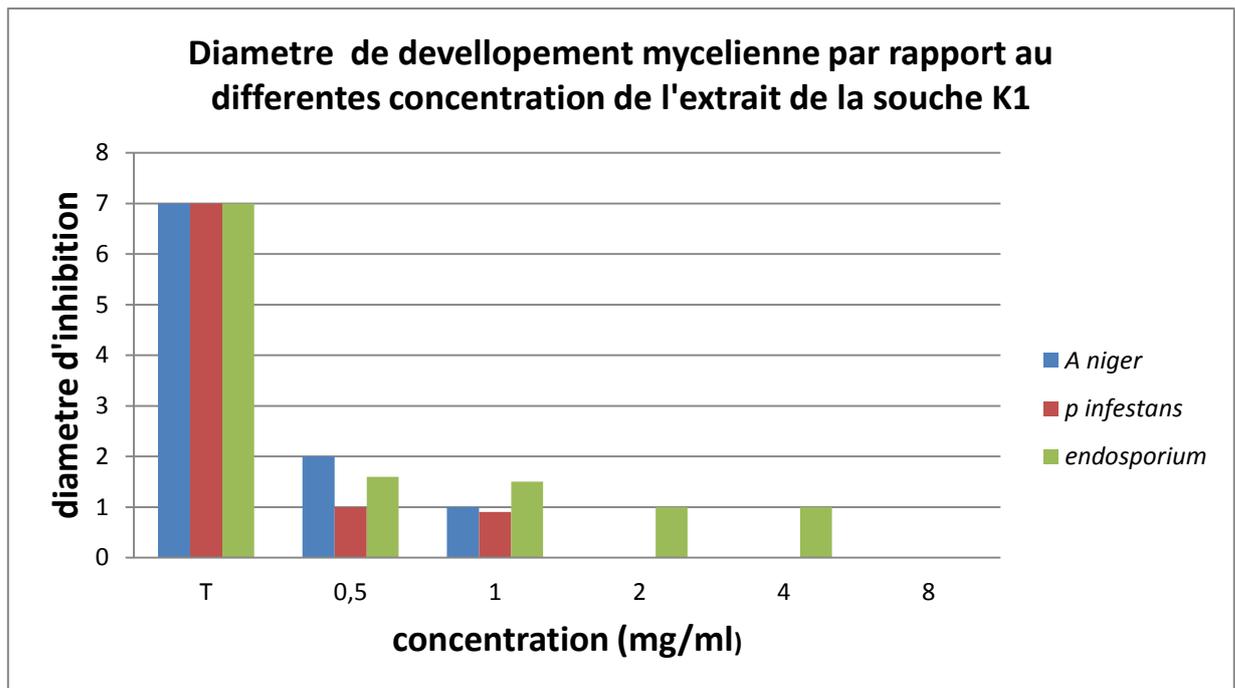


Figure 35 : Diamètres de développement mycélien en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut de la souche K1

Les résultats de ce tests ont montré qu'à une concentration de 8mg/ml aucune croissance n'est marquée chez les trois souches fongique cible (**tableau 12**). Cependant, à des concentrations de l'extrait de l'ordre de 4 mg/ml et 2mg/ml seule la souche *Endosporium* qui donne une croissance radiale de 1 cm. Les souches *P. infestans* et *Endosporium* ont montré une croissance de 0,9 cm et 1,5 cm de diamètre respectivement à la concentration de 1mg/ml de l'extrait dans le milieu de. A cette dernière concentration *A. niger* donné une croissance de 1,1cmde diamètre.

Dans les concentrations (0,5 mg/ml) les trois souches fongiques ont donné une croissance mycélienne qui augmenter chaque fois en diminuent la concentration

Résultats de la détermination de la CMF de la souche W1

Les Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche K1 sont présentés dans le (**tableau 12**)

Tableau12: Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche K1

Résultat et interprétation

| Concentration (mg/ml) | Espèces fongiques testées | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>A.niger</i> | <i>P.infestans</i> | <i>Endosporium</i> spp |
| 8 | 100% | 100% | 100% |
| 4 | 100% | 100% | 60% |
| 2 | 100% | 100% | 60% |
| 1 | 82,53% | 55% | 40% |
| 0.5 | 63,49% | 50% | 36% |

En ce basant sur les résultats obtenu il est clair que l'extrait issue de la souche K1 présent une activité antifongique importante. Cela est visiblement remarqué sur *A.niger* et *P.infestans* en inhibant ces croissances à partir d'une concentration minimale fongicide (CMF) de 2 mg/ml. Pour *Endosporium* la CMF est de 8mg/ml.

Teste antifongique de l'extrait de la souche W1

Les résultats de ce test ont montré que la souche fongique *Endosporium* n'a montré une croissance qu'à une concentration de 1 mg/ml (**tableau13**). Cependant, la souche fongique *A.niger* n'a montré aucune croissance à une concentration de l'extrait de l'ordre de 8 mg/ml. À des cinq concentrations utilisées nous avons marqué la présence de la croissance chez la souche *P.infestans*.

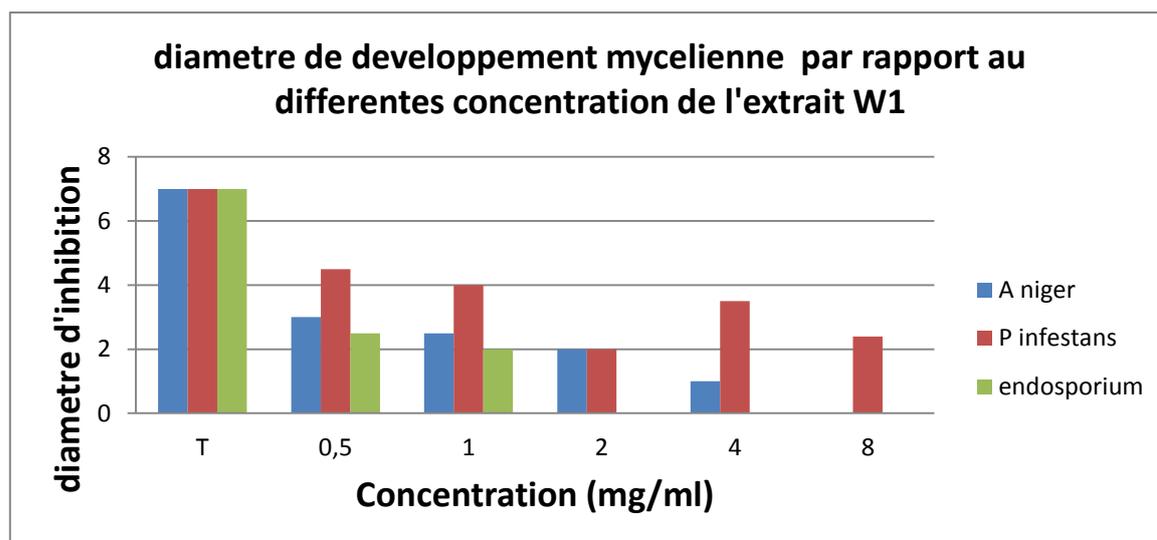


Figure 36 : diamètres de développement mycélien sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait de la souche W1

Résultats de la détermination de la CMF de la souche W1

Les Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche W1 sont présentés dans le (tableau 13)

Tableau 13 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche W1.

| Concentration (mg/ml) | Espèces fongiques testes | | |
|-----------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | A .niger | P.infestans | Endosporium |
| 8 | 100% | 40% | 100% |
| 4 | 68,25% | 40% | 100% |
| 2 | 72,22% | 50 | 100% |
| 1 | 57 ,14% | 30% | 40% |
| 0.5 | 63,49% | 10% | 10% |

Le calcul du pourcentage d'inhibition mycélienne a montré que *Endosporium* est totalement inhibés par une concentration de 2mg/ml. C'est la concentration minimale fongicide. Pour *A. niger* la concentration minimale fongicide est de 8mg/ml.

Les figure (37, 38, 39,40) : développement mycélienne des trois souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait.

| Concentration (mg/ml) | témoin | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 |
|-----------------------|--------|---|---|---|---|-----|
| | | | | | | |

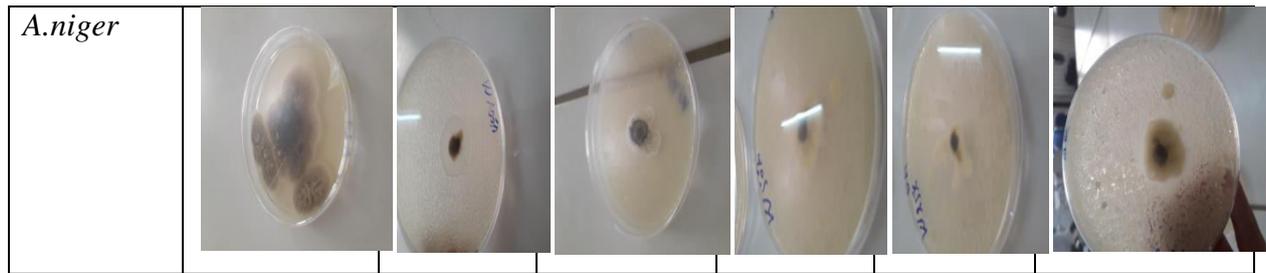
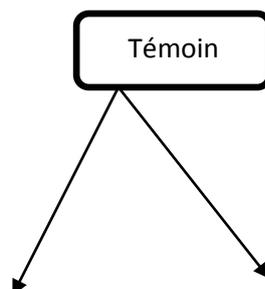


Tableau 37 : développement mycélienne de la souche fongique *A.niger* vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait W1

| Concentration (mg/ml) | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 |
|-----------------------|---|---|---|---|---|
| <i>A.niger</i> |  |  |  |  |  |

Tableau 38 : développement mycélienne de la souche fongique *A.niger* vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait K1



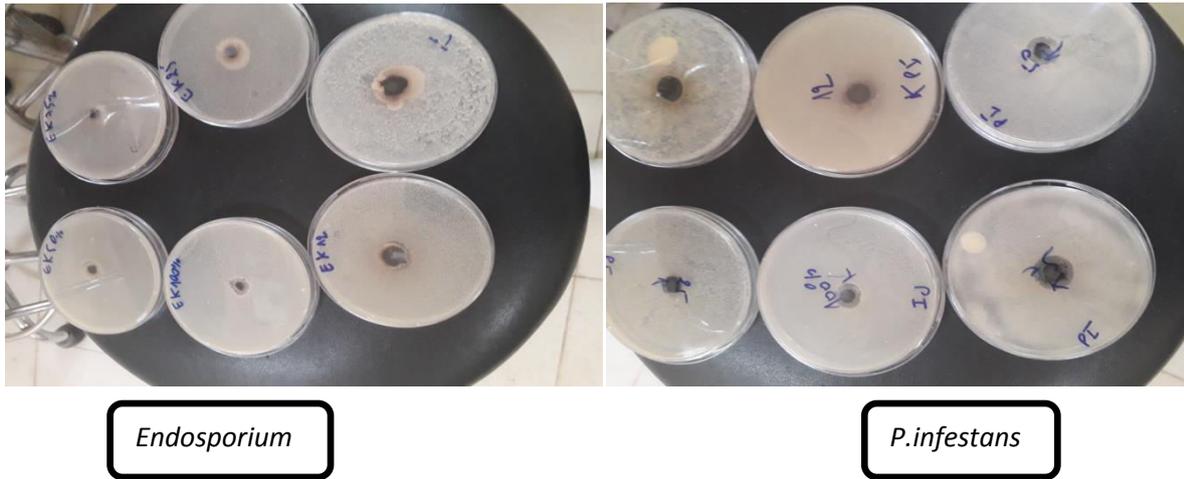


Figure 39 développement mycélienne des deux souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait k1

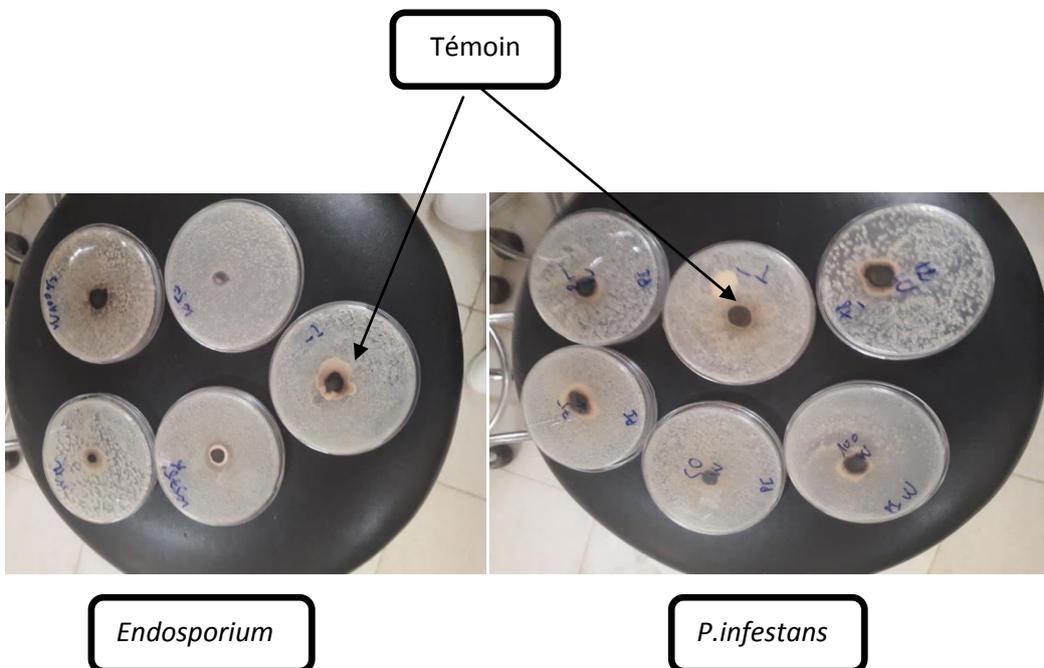


Figure 40 :développement mycélienne des deux souches fongique testes vis-à-vis les différentes concentrations de l'extrait W1

IV.10. Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque :

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des trois souches Fongique sont présentés dans le tableau (14).

Tableau 14: Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices CMI obtenues sur microplaque

| Les souches fongiques | Concentration minimale inhibitrice CMI mg /ml | |
|-----------------------|--|--------------|
| | Extrait K1 | Extrait W1 |
| <i>A.niger</i> | 0,25 | 1,562 |
| <i>P.infestans</i> | 2,25 | 3,125 |
| <i>Endosporium</i> | 6,25 | 4,125 |

Dans la méthode de microplaque la lecture se fait grâce aux troubles de croissance en observant les puits qui nous a permis de déterminer la CMI.

La **figure 41** : présentent les résultats des CMI des extraits K1 et W1 vis-à-vis de trois souches fongiques.

A. La concentration minimale inhibitrice de l'extrait K1 :

Les résultats de la méthode de microdilution montrent que l'extrait K1 a un effet inhibiteur à concentration de 0,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *A.niger* qui présentent la souche la plus sensible parmi nos souches testées. La CIM est de 2,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *P.infestans*. La concentration minimale inhibitrice la plus forte a été enregistrée vis-à-vis la souche *Endosporium* par une valeur de CMI qui est de 6,25 mg/ml

B. La concentration minimale inhibitrice de l'extrait W1 :

Les résultats concernant la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) montre que l'extrait W1 a un effet inhibiteur très prononcé avec une concentration de 1,562 mg/ml vis-à-vis *A.niger* et une concentration de 3,125 mg/ml vis-à-vis *P.infestans* et une CIM plus forte par rapport les autres souches fongique de 4,125 mg/ml vis-à-vis *Endosporium*

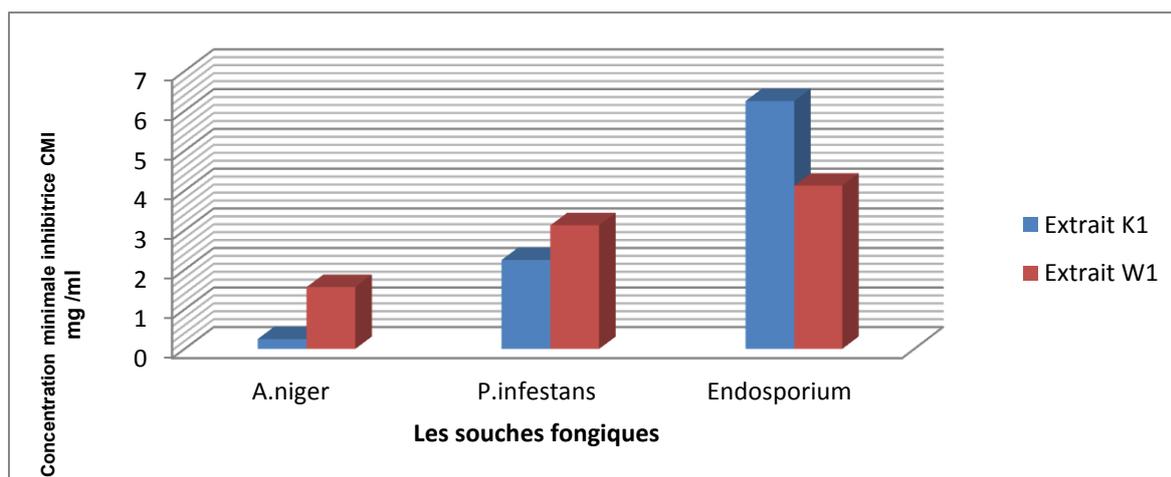


Figure 41 : présentent les résultats des CMI des extraits K1 et W1 vis-à-vis de trois souches fongiques.

IV. 11 Caractérisation de la molécule bioactive

IV.11.1 Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Le tableau 15 : regroupe les rapports frontaux des composés séparés en utilisant différents Systèmes de solvants.

Tableau 15:Résultat de la CCM des 2 extraits méthanoliques des souches d'actinomycètes.

| | Rapports frontaux (Rf) | |
|---|--|---|
| | K1 | W1 |
| Les systèmes solvant | | |
| Toluène-acétone (6 :4) | 0 | 0 |
| Toluène- acide acétique(8 :2) | 0 | 0 |
| N-butanol-acide acétiqueeau (3 : 1 : 1) | 0,5 ⁽²⁾ 0,62 ⁽²⁾ 0,87 ⁽¹⁾ | 0,25 ⁽¹⁾ 0,5 ⁽²⁾ |
| Acétate d'éthyle- méthanol(6 :4) | 0 | 0 |
| Toluène- méthanol (5 :5) | 0 | 0 |
| Déchlorométhane –méthanol (8,2) | 0 | 0 |

(1) tache révélée a 254nm

(2) tache révélée a 365nm

Aucune séparation n'est obtenue sur les 2 extraits en utilisant les systèmes solvants composés

De Toluène-acétone (6 :4), Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4), Toluène- méthanol (5 :5) et

Toluène- acide acétique (8 ; 2), Déchlorométhane –méthanol (8,2).

Le système solvant, N-butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1) a permis une migration rapide des molécules bioactives. Nous avons obtenu 5 taches bien distinguées sur la plaque CCM pour les extraits des isolats K1 et W1.

Pour l'extrait brut de l'isolat **K1**, 3 taches sont observées dont 2 taches avec les $R_f(0,5-0,62)$ apparaissent sous la lampe UV à 365 nm et une seule tache fluorescente détectée à 254 nm avec un R_f de 0,87.

Pour l'extrait brut de la souche **W1** nous avons marqué 2 taches avec le $R_f(0,25)$ détectés à 253 nm et une tache avec $R_f(0,5)$ à 365 nm.

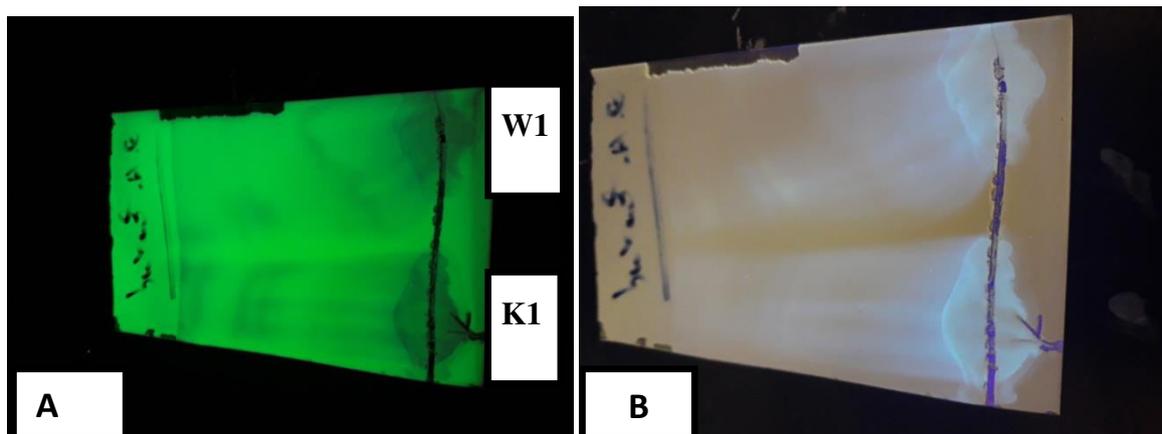


Figure 42 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts méthanoliques sous UV à 254(A) et 365(B) nm.

IV.11.2 Bioautographie des molécules bioactives

Les résultats de la bioautographie s'avèrent négatifs, ce soit à cause de la concentration faible des substances antifongiques au sein des feuilles CCM soit à cause de la présence d'un effet synergique entre 2 ou plusieurs composants.



Figure 43 : Illustration du résultat de la bioautographie contre la souche fongique (*Aspergillus niger*)

Discussion

Les sols de la zone aride utilisés dans ce travail, offrent le plus grand nombre d'actinomycètes. L'isolement des bactéries actinomycétales productrices des substances bioactive nécessite une méthode performante pour leur sélection.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le plus grand nombre d'actinomycète a été isolé à partir de la dilution 10^{-3} . Ceci est en accord avec ceux obtenu par **kitouni (2007)**. On constate également que le nombre d'actinomycètes récoltés des sols de la région d'Al Naama est de 15 isolats. Un résultat similaire est rapporté par **Miller et al., (1989)**, **Crawford et al., (1993)** et **Allaoueddine (2007)** qui montrent que les sols sont les plus abondants en actinomycètes.

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence des nouvelles souches d'actinomycètes dans les sols de la zone aride et sélectionner les souches à activité antibactérienne. L'écosystème étudié dans ce travail a été choisi pour ces caractéristiques physicochimiques extrêmes. La présence des actinomycètes dans divers échantillons de sol aride de la région d'Al Naama avec un nombre important nous a ouvert le chemin vers des études avancées dans le domaine pour sélectionner les souches à activité antibactérienne et antifongique.

Nos échantillons sont caractérisés par :

1. Sol dewadehelib : aride, sol sableux de couleur marron Foncé présent un pH de 8.20.
2. Sol d'el kessdir: aride, sol sableux de couleur marron claire a un pH de 7.10.

Les isolats d'actinomycètes utilisés dans cette étude (**W1 et K1**) sont choisis pour leur pouvoir antimicrobien remarquable par rapport aux autres. Les **2** isolats ont subi une culture par repiquage sur le milieu de culture GYM (annexe) à la suite d'une conservation à -20°C en présence de 20% du glycérol. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours d'incubation. Le milieu GYM utilisé dans notre travail contiennent des sources de carbone et d'azote nécessaires pour la croissance des actinomycètes et ils ont été utilisés dans de nombreux travaux. En effet **Kitouni (2007)** a utilisé GYM pour un isolement sélectif de 45 souches d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés. De même **Boudemagh(2007)** a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir des écosystèmes extrêmes, tandis que **Boussaber et al., (2012)** ont utilisé GYM pour l'isolement de 25 souches d'actinomycètes possédants une activité antifongique importante. Après ensemencement sur le milieu de culture gélosés (GYM) les colonies de nos souches apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 28°C . Pour le

milieu utilisé nous observons une différence importante de la taille des colonies de la flore actinomycétale repiquées. Cette différence peut être expliquée par l'affinité entre les bactéries et le milieu de culture utilisé. Les colonies sont rondes à contours irréguliers, opaques, d'aspect corné et de surface poudreuse. Les colonies adhérentes fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension. Après 48 heures d'incubation la plupart des souches développent des colonies, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide, en effet **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*. Après 07 jours d'incubation de ces souches, le mycélium aérien présente une gamme de couleur assez variée blanc, beige, marron, noir, jaune, gris. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Williams et Wallington, 1984**). Le mycélium est responsable de la formation des sporophores simples, qui produisent de spores, cela a pu être observé au microscope optique ou l'observation permet d'apprécier l'organisation de la chaîne de spores la majorité des souches actives développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. Le mécanisme de la morphogénèse a fait l'objet d'une étude réalisée par **Kim et al., (2005)** sur *Streptomyces coelicolor*, il s'est qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium du substrat, la libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes démontré par l'apparition d'un mycélium aérien. La souche W1 produit des pigments Grise et pour K1 et beige. Ces pigments peuvent être des substances bioactives selon **Margalith (1992)** qui a rapporté que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune, la production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinomycètes où elles sont considérées comme une clé pour la classification des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1972**). L'observation au microscope optique des hyphes du mycélium végétatif des souches W1 et K1 montre que les filaments sont taille moyenne, peu ramifiés et fragmentés. Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien. D'après **Williams et al., (1989)**, les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies à coloration de Gram positive, qui poussent en produisant un mycélium végétatif (mycélium de substrat) ramifié et un mycélium aérien portant des chaînes d'arthrospores. Les mycéliums de substrat et les spores peuvent être pigmentés, mais peuvent produire également des pigments diffusibles.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Selon la quelle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries tests utilisées. L'activité a été testée vis-à-vis des bactéries tests provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit des bactéries à Coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC10876), et de bactérie à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC2592). Les résultats (**Tableau 09**) obtenus montrent que les 8 isolats montrent un pouvoir inhibiteur contre au moins deux germes cibles testés. Selon **Lemriss et al., (2003)** l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes dépend de la méthode utilisée. La méthode des cylindres d'agar se prête mieux à la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes testées. Nos résultats montrent que *Escherichia coli* a été inhibée par les 8 souches d'actinomycètes testées. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus allant de 07 et 23 mm. **Oskay et al., (2004)** ont montrés que sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm. Trois souches d'actinomycètes parmi les 8 testées ont une activité contre *S. aureus* avec des zones d'inhibition comprises entre 07 et 11 mm de diamètre. *Bacillus subtilis* a été inhibée par 4 souches d'actinomycètes testées avec des zones d'inhibitions comprises entre 10 et 14 mm de diamètre.

La mise en évidence de l'activité antifongique a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu de PDA. Selon la quelle, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les souches fongiques tests utilisées. L'activité a été testée vis-à-vis des champignons suivants *A.niger*, *P.infestans*, *Endosporium*. Les champignons causent de graves pathologies qui touchent l'homme, parmi lesquelles on peut citer les mycotoxicoses (causés par *Aspergillus* et *Fusarium*), les mycoallergies (*Penicillium* et *Mucor*) et les mycoses superficielles ou profondes (dont les agents causals sont *Candida albicans*, *Microsporium* et *Trichophyton*) (**Drouhet 1978**). Les mycoses ont augmenté ces dernières années d'une manière drastique et se classent au quatrième rang dans les infections nosocomiales. (**Beck-Saguè et Jarvis, 1990**).

Les résultats (**Tableau 11**) obtenus montrent que les 6 isolats montrent un pouvoir inhibiteur contre au moins deux germes cibles testés. La gamme des antifongiques est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens (**Domenico, 1999**). Les travaux de **Hacèneet al., 1994**, démontrent que 11,18 % de l'ensemble des actinomycètes isolés du sahara Algérien ont une activité antifongique. Nos résultats montrent que *A.niger* a été inhibée par les 3 souches d'actinomycètes testées. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus allant de 9 et 12 mm. Trois souches d'actinomycètes parmi les 6 testées ont une activité contre *P.infestans* avec des zones d'inhibition comprises entre 10 et 20 mm de diamètre. *Endosporium* été inhibée par 3 souches d'actinomycètes testées avec des zones d'inhibitions comprises entre 9 et 15 mm de diamètre. Les travaux de **Hilaliet al., 2002** confirment également les mêmes résultats. Nous n'avons constaté que deux souches dénommées K1 et W1 isolées à partir de sol qui semblent être les plus actives contre la totalité des champignons tests.

Les 2 souches pures d'Actinomycètes sont mises en culture pour produire des métabolites Secondaires. La culture par fermentation sur milieu solide a été adoptée en utilisant le milieu AF solide. Les Actinomycètes en culture AF synthétisent alors des substances dites « métabolites secondaires » après 8 à 14 jours d'incubation à 28°C. Ces substances sont dispersées dans le milieu de culture et sont extraites avec le solvant organique. Puis la culture par fermentation a été macérée avec 25 ml de méthanol pendant 2 heures. La filtration et la centrifugation de l'extrait est indispensable pour débarrasser les cellules vivantes présents dans l'extrait. L'étude de l'activité des extraits des Actinomycètes a été portée sur des souches fongiques testées *A.niger*, *P.infestans*, *Endosporium* par la Technique de contact directe ou de dilution. Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes K1 et W1 dans le milieu de culture PDA sur la croissance des souches fongiques. Une série des dilutions (de 0.5 à 8 mg/ml) est préparée en suspension avec le milieu de culture, à partir de la solution mère par addition des volumes variables de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes. Dans des tubes à essais on verse 20 ml du milieu PDA préparé préalablement, on ajoute l'extrait avec différent volume de tel façon à obtenir les dilutions (0,5, 1, 2, 4 et 8mg/ml). La fongitoxicité, exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance de mycélium (I%), est calculé selon la formule de **Pandey et al. (2000)**.

Tous les extraits méthanoliques étudiés des 2 souches présentent des activités antifongiques (**Tableau 12 et 13**), pour l'extrait issue de la souche K1 présent une activité antifongique

importante. Cela est visiblement remarqué sur *A.niger* et *P.infesstans* en inhibant ces croissances à partir d'une concentration minimale fongicide (CMF) de 2 mg/ml. Pour *Endosporium* la CMF est de 8mg/ml. Et pour l'extrait issue de la souche W1 Le calcul du pourcentage d'inhibition mycélienne a montré que *Endosporium* est totalement inhibés par une concentration de 2mg/ml. C'est la concentration minimale fongicide. Pour *A. niger* la concentration minimale fongicide est de 8mg/ml.

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**). Cette différence est due à la physiologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* se fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas., 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin.,1999**). D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* (**Bussariet al.,2008**).

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant la 18-24 (**Andrews, 2001**). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories: "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire" (**Genné and Siegrist Hans., 2003**) Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de Concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure (**Rios et al., 1988**) Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (la microdilution ou la macrodilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries et les champignons (**Balouiri et al., 2016**). Nous avons choisies la méthode des microdilution sur milieu liquide est une technique quantitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis une substance antifongique. Cette méthode se base sur le pouvoir inhibiteur des extraits issus des souches K1 et W1 à l'intérieur d'un puits, dans un milieu nutritif (bouillon

sabouraud) ensemencée par l'inoculum des souche testée (*A.niger*, *P.infestans*, *Endosporium*). Les résultats de la méthode de microdilution montrent que l'extrait K1 a un effet inhibiteur à concentration de 0,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *A.niger* qui présentent la souche la plus sensible parmi nos souches testées. La CIM est de 2,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *P.infestans*. La concentration minimale inhibitrice la plus forte a été enregistrée vis-à-vis la souche *Endosporium* par une valeur de CMI qui est de 6,25 mg/ml. Les résultats concernant la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) montre que l'extrait W1 a un effet inhibiteur très prononcé avec une concentration de 1,562 mg/ml vis-à-vis *A.niger* et une concentration de 3,125 mg/ml vis-à-vis *P.infestans* et une CIM plus forte par rapport les autres souches fongique de 4,125 mg/ml vis-à-vis *Endosporium* la CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire. La constante de migration caractéristique de chaque tache dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelé le rapport frontal.

Par définition, le rapport frontal est égal au rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt (**Louisif, 2011**) D'après nos résultats nous avons constaté qu'aucune migration n'est observée pour les extraits avec les systèmes solvants suivante : Toluène-acétone (6 :4), Acétate d'éthyle- méthanol et Toluène- méthanol (5 :5) Toluène- acide acétique (8 :2).

D'après les rapports frontaux pour chaque tâche des extraits K1 et W1, le système solvant N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1). Un résultat similaire est rapporté par **Boughachiche (2012)**. En plus les taches qui possèdent le même R_f est constituée soit d'un seul type de molécule ou bien un ensemble de molécule ayant le même poids moléculaire et donc la même vitesse de migration. Pour l'extrait brut de l'isolat **K1** 3 taches sont observées dont 2 taches avec les $R_f(0,5- 0,62)$ apparaît sous la lampe UV à 365 nm et une seule tache fluorescente détectée à 254 nm avec un R_f de 0.87. Pour l'extrait brut de la souche **W1** nous avons marqué 2 taches avec les $R_f(0,25)$ détectés à 253 nm et une tache avec $R_f(0.5)$ à 365nm. Ces résultats font appel à d'autres techniques de séparation convenables aux substances de nature protéiques notamment l'électrophorèse.

Les résultats de la bioautographie des molécules bioactives s'est avéré négatif est cela soit à cause de la concentration faible des substances antifongiques au sein des feuilles CCM soit à cause de la présence d'un effet synergique entre 2 ou plusieurs composants.

Conclusion
Et
Perspective

Conclusion et perspective

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multi-résistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes. Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antibiotiques.

Les actinomycètes, 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.

Cette étude a pour objectif d'identifier les molécules bioactives contenues dans les métabolites secondaires sécrétés par des actinomycètes isolées à partir du sol des zones arides.

Les caractérisations de ces substances se font après le choix des meilleurs solvants d'extraction et de séparation et en se basant sur des techniques spectrales et chromatographiques adéquates.

Les isolats d'actinomycètes utilisés dans cette étude (**W1 et K1**) sont choisis pour leur pouvoir antimicrobien remarquable par rapport aux autres. La méthode de cylindre d'agar s'avère la plus performante dans la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par nos souches d'actinomycètes.

Les métabolites synthétisés par les actinomycètes sont dispersés dans le milieu de fermentation AF. La récupération de ces métabolites secondaires a été réalisée en utilisant le méthanol. Tous les extraits étudiés présentent une activité antibactérienne et antifongique. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient de 14 mm contre *E. coli* à 23 mm, *B. subtilis* 14 mm, 11 mm contre *S. aureus*. L'activité antifongique, les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient de 12 mm contre *A. niger*, *P. infestans* 20 mm, 15 mm contre *Endosporium*.

La technique de contact direct ou de dilution. Tous les extraits méthanoliques étudiés des 2 souches présentent des activités antifongiques, pour l'extrait issu de la souche K1 présent

Conclusion et perspective

une activité antifongique importante. Cela est visiblement remarqué sur *A.niger* et *P.infestans* en inhibant ces croissances à partir d'une concentration minimale fongicide (CMF) de 2 mg/ml. Pour *Endosporium* la CMF est de 8mg/ml. Et pour l'extrait issue de la souche W1 Le calcul du pourcentage d'inhibition mycélienne a montré que *Endosporium* est totalement inhibés par une concentration de 2mg/ml. C'est la concentration minimale fongicide. Pour *A. niger* la concentration minimale fongicide est de 8mg/ml.

CIM concentration minimale inhibitrice, les résultats montre que l'extrait K1 a un effet inhibiteur à concentration de 0,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *A.niger* qui présentent la souche la plus sensible parmi nos souches testées. La CIM est de 2,25 mg/ml vis-à-vis la souche fongique *P.infestans*. La concentration minimale inhibitrice la plus forte a été enregistrée vis-à-vis la souche *Endosporium* par une valeur de CMI qui est de 6,25 mg/ml , l'extrait W1 a un effet inhibiteur très prononcé avec une concentration de 1,562 mg/ml vis-à-vis *A.niger* et une concentration de 3,125 mg/ml vis-à-vis *P.infestans* et une CIM plus forte par rapport les autres souches fongique de 4,125 mg/ml vis-à-vis *Endosporium* La chromatographie sur couche mince (CCM) nous a montré que parmi les 6 systèmes solvant utilisé, le système N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1) est le meilleur. Il a favorisé une migration rapide des molécules biactives et une bonne séparation des composés dans les Extraits méthanoliques. Pour l'extrait brut de l'isolat **K1**, 3 taches sont observées dont 2 taches avec les Rf (0,5- 0,62) apparaît sous la lampe UV à 365 nm et une seul tache fluorescente détectée à 254 nm avec un Rf de 0.87. Pour l'extrait brut de la souche **W1** nous avons marqué 2 taches avec le Rf (0,25) détectés à 253 nm et une tache avec Rf (0.5) à 365nm.

*Références
Bibliographiques*

- ❖ **AINSWORTH G.C., (1986).** Introduction to the history of medical and veterinary mycology. University Press. Cambridge.
- ❖ **Allaoueddine Boudemagh, 2007.** Isolement, à partir d es sols Sahariens, de bactéries actinomycète a les productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat d 'Etat En Microbiologie Appliquée de l'Université Mentouri Constantine
- ❖ **Andrews, J.M., 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of
- ❖ **Andriambololona T. (2010).** Etudes biologiques et chimiques des métabolismes secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe . Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies de biochimie en Biotechnologie et Microbiologie. Université d'Antananarivo.
- ❖ **Avril J. L. Dabernat H. Denis F. Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique 3ème Edition. p, 115-116,212.
- ❖ **Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6, 71-79.
- ❖ **Barry A.L., Garcia F. Et Thrupp L.D. (1970).** An improves single disk method for testing.
- ❖ **Bastide, A., M. de Méo., M., Andriantsoa, M., Laget et G. Duménial. (1986).** isolement et sélection de souche d'actinomycètes productrice de substance antifongiques de structure non-polyénique. laboratoire de microbiologie . faculté de pharmacie . MIRCEN journal , 1986, 2, p 453-466
- ❖ **Beck-sagué C, jarvis WR.** secular trends in the epidimiology of nosocomial fungal infections in the united states 1980-1990. J Infect Dis 1993; 167:1247-51.
- ❖ **BENZ F., KNUSEL F. NUESCH J., TREICHLER H., VOSER W., (1974).** Echinocandin B, ein nueartiges polipeptid- antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var. *Echinatus*. Isolierung und bausteine. Helv. Chim. Acta. **57**: 2459-2477.
- ❖ **Beppu T. (1986).** Regulatory substances and genes for differentiation and antibiotic synthesis in actinomycetes. In: *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of actinomycetes*. Eds: G. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 15-23.
- ❖ **Beppu T. (1992).** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Genes*. **115**, 159-165.

Références bibliographiques

- ❖ **Boudemagh A., (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université de Mentouri Constantine.
- ❖ **Boudemagh A., (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Microbiologie.Appliquée. Université de Mentouri Constantine
- ❖ **Boughachiche F, (2012).** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh. Thèse Présentée pour l'obtention le grade de Doctorat en Sciences Option : Biotechnologies Microbiennes. Université Mentouri Constantine.
- ❖ **Boussaber E., Issam M. K., Hilali L., Hilali A. (2012).** Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques. Volume 4N° 120801
- ❖ **Burman N.P., (1973).** The occurrence and significance of actinomycetes. In: *Actinomycetales.Characteristics and practical importance.* Academic Press (Ed).219-230
- ❖ **Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008).** Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.
- ❖ **Camille D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.
- ❖ **CASTELLANI A., (1928).** The treatment of epidermohytosis of the toes (mango toe) and certain forms of epidermophytosis by fuchsin paint. *Lancet.* 2: 595-596.
- ❖ **Cavala M. and Eberlin T. (1994).** Isolement des *Streptomyces* du sol L'operon, XIX, 4,13-17.
- ❖ **Chater K.F., Merrick M.J. (1979).** Streptomycètes, in: *Developmental Biology of prokaryotes.* Ed : J.H. PARISH. University of California press, Berkeley and Los Angeles. 93-114
- ❖ **Crawford D. I., Lynch J. M., Whipps.J.M., Dusley M. A. (1993).** Isolation and characterization of actinomycètes antagonists of a fungal root pathogen.Appl. Environ. Microbiol.59, 3899-3905
- ❖ **Di Domenico B.** Novel Antifungal drugs curr opin Microbial 1999;2:509-15.

- ❖ **Drouhet.E.** Antifungal agents. *Antibiot chemother* 1978; 25:253-88
- ❖ **Dvorak A., Johnston A. (1999).** Actinomycetes and Streptomycetes. New York. 23p
- ❖ **FABER K.K., DICKEY L.B., (1925).** The treatment of thrush with gentian violet. *Am. J. Dis. Child.* **34**: 408-417.
- ❖ **FIEDLER H.P., SCHUZ T., DECKER H., (1993).** An overview of nikkomycins; history, biochemistry, and applications. In “cutaneous antifungal agents” (Rippon J.W., Fromfling R.A., eds) Marcel Dekker, New York, pp 325-352.
- ❖ **Flandrois (2002).** Bactériologie médical sous la direction de Jean -pierre. p, 207, 228.
- ❖ **Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. In: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer-Verlag. New York.
- ❖ **Genné, D., Siegrist Hans, H., 2003.** De l’antibiogramme à la prescription d’un antibiotique. *Forum Med Suisse*, pp. 464-468.
- ❖ **GENTIES J.C., (1958).** Experimental ringworm in guinea pigs : oral treatment with griseofulvin. *Nature*, **182**: 476-477.
- ❖ **GODEFROI E.F., HEERES J. VAN- CUTSEM J., JANSSEN P.A.J., (1969).** The preparation and antimycotic properties of 1-phenethyl imidazole. *J. Med. Pharm. Chem.* **12**: 784-791.
- ❖ **GOLD W., STOUT H.A., PAGANO J.S., DONOVICK R., (1956).** Amphotericin A and B: antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **56**: 579-586.
- ❖ **GOODFELLOW M, JONES AL, MALDONADO LA, SALANITRO J. (2004).** *Rhodococcus aethrivorans* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether
- ❖ **Goodfellows M., Williams S.T., (1983).** Ecology of Actinomycètes. *Annual Review of Microbiology.* 37: 189-216.
- ❖ **Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. In : Sykes G., Skinner F. A. (éds). Actinomycetales characteristics and practical importance. London, New York : Academic Press.
- ❖ **Grafe U., Eritt I., Fleck W.F. (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. *Actinom.* **18**, 220-246.
- ❖ **Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G. (1994).** Screening for non-polenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbiol.* 79: 81

- ❖ **Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G. (1994).** Screening for non-polenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbiol.* 79: 81.
- ❖ **HARTMAN P.G., POLAK A., (1993).** The action of amorolfine: from molecule to cell. In "Cutaneous antifungal agents" (Rippon J.W., Fromling R.A., eds). Marcel Dekker, New York. 27-36.
- ❖ **HAZEN E.L., BROWN R., (1950).** Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol., (NY)*. 76 : 93-97.
- ❖ **Higashide E. ,(1984),** "The macrolides : properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci.*, 22,(1984), pp. 452-508
- ❖ **Hilali L., Khatabi A., Nassrallah N., Malki A. et finance C., (2002).** Isolement des nouvelles souches actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir d'un milieu naturel marocain. *Revue .Biol .Biotech.* 2, 49-53.
- ❖ **Hilali L., Khatabi A., Nassrallah N., Malki A. et finance C., (2002).** Isolement des nouvelles souches actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir d'un milieu naturel marocain. *Revue .Biol .Biotech.* 2, 49-53.
- ❖ **Hilali L., Khattabi A., Nssrlah N., Malki A., Finance C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.* 2 :49-53.
- ❖ **HILDIK-SMITH G., Blank H., SARKANY I., (1964).** Fungus diseases and their treatment. Little, Brown, Co., Boston U.S.A., 370-377.
- ❖ **Iwai Y., Takahashi Y. (1992).** "Selection of microbial sources of bioactive compounds" in «The search for bioactive compounds from microorganisms», Springer- Verlag, New York, (Ed.), pp. 281-302.
- ❖ **Jacques B. (2001).** Le technicien d'analyses biologiques. Guide théorique et pratique. Londres-paris-New York. p 665, 986, 1051-1052.
- ❖ **Joachim W. (2002).** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In : the pharmaceutical industry. *Electronic Manual*.
- ❖ **Joachim W. (2002).** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In: the pharmaceutical industry. *Electronic Manual*.
- ❖ **Joachim W. (2002).** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In : the pharmaceutical industry. *Electronic Manual*
- ❖ **Kalakoutskii L.V., Agre N.S. (1976).** Comparative aspects of development and differentiation. in : *Actinomycetes. Rev Bacteriol.*, 40 (2), 469-524.

- ❖ **KERRIDGE D., WHELAN W.L., (1984).** The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine: molecular actions and interactions. In “ Mode of action of antifungal agents” Cambridge University Press. Cambridge. 343-376.
- ❖ **Khokhlov A.S. (1986).** Actinomycete autoregulators. In : Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Eds : G. Szabo S. Biro M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest.791-798.
- ❖ **Kim D.W., Chater K., Lee K. J. Hesketh D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the bldA gene product, a developmentally significant ARNt, reveal a new target for the ropie regpleiotulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. J. Baacteriol. 187(9), 2957-2966
- ❖ **Kitouni M., (2007).** Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine P16.
- ❖ **Kurtbaeke D.I. and Wildman H.G. (1998).** Accessing Australian biodiversity, towards an improved detection of Actinomycetes. **9 (1-2)**, 10-13.
- ❖ **Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481.
- ❖ **LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p.
- ❖ **LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p
- ❖ **Larpent J.P., Larpent G.M., (1990).** Memento technique de Microbiologie. Editions *Tec. & Doc.*Lavoisier.
- ❖ **Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985).** "Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamen Cummings Publishing Company, INC. 315-360.
- ❖ **Lechevalier M.P., Bievre C.D. and Lechevalier H. (1977).** Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes : phospholipides composition. *.Bioch. Syst. Ecol.* **5**, 249-260.
- ❖ **Leclerc H. (1975).** Microbiologie générale. Paris: Doin (éd).279p

- ❖ **Leif C., Larson E., 2005.** Bounty from deep: an investigation of the antimicrobial properties of two species from phylum porifera: A thesis submitted in partial fulfilment of the Honours thesis, University of Wining
- ❖ **LEMINOR L., VERON M., (1989).** Bacteriologie médicale. 2 ème édition. pp 335-349.
- ❖ **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J. M., Saintpierre-Banaccio D.,**
- ❖ **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J. M., Saintpierre-Banaccio D., Rifai S., Fassouane A., Boiron P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49; 669-674.
- ❖ **Leveau J.Y. et Buix M. (1993).** Les Actinomycètes. In. : Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. 424-480
- ❖ **Leveau J.Y. et Buix M. (1993).** Les Actinomycètes. In. : Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. 424-480.
- ❖ **Locci R. (1989).** Streptomycetes and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. **4**, 2451-2508
- ❖ **Lousif 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 magistère en microbiologie. Option : Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne. Université Mentouri-Constantine
- ❖ **Margalith P.Z. (1992).** Pigment microbiology. Shapman and Hall. London. p 5,114.
- ❖ **MARGET W., ADAM D., (1969).** Erste Erfahrungen mit dem breibandantimykotikum bay b5097. *Med. Klim.* **64**: 1235-1239.
- ❖ **Mariat F., Sebald M., (1990).** Actinomycétales. In: Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. *Medecine-Sciences*. Flammarion. France. Deuxième partie : **933-999**
- ❖ **MEDOFF G., KOBAYASHI G.A., (1980).** The polyènes. In Antifungal Chemotherapy". (Speller D.C.E. ed). John Wiley & Sons. Ltd. Chichester. U.K. 3-33.

- ❖ **MIETH H., (1993).** In vitro and in vivo activities of terbinafine in cutaneous antifungal agnts. (rippon J.W., Fromtling R.A., eds), Marcel Dekker, New York. 137-149
- ❖ **Mukesh S., (2014).** Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences* (2014) 3(2): 801-832.
- ❖ **Nodwell J.R. and Losick R. (1998).** Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180 (5), 1334-1337.
- ❖ **Nonomura H., Hayakawa M., (1988).** New methods for selective isolation of soil actinomycetes, dans « *biology of Actinomycetes* ». Japon Scientific Societies Press. Tokoyo. (Ed). 88-100.
- ❖ **ODDS F. C., (1995).** Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **10 (4)**, 285-293.
- ❖ **Okami Y, Hotta K., 1988.** Search and discovery of new antibiotics, In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (Ed). *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, Inc., San Diego, 33-67.
- ❖ **OKI T., (1992).** Pradimicin, a novel antifungal agent. In “ New approaches for antifungal drugs” (Fernandes PV., ed.), Boston, pp. 64-87.
- ❖ **Olson E. et Rattzkin B. (1999).** Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 10: 525-527.
- ❖ **Omura S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed: Springer Verlag, New York. Inc. pp 281-303.
- ❖ **Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycètes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3(9), pp, 441-
- ❖ **Ottow J. C.G., Glathe H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and Actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol*, 16, 170-171.
- ❖ **OXFORD A.E., RAISTRICK H., SIMONART P., (1939).** Studies in the biochemistry of micro-organisms. 60. Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*

- ❖ **Pandey A., Shukla A. et Majumdar S.K. (2000).** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *Afr J Biotechnol.* 4 (9): 909-910.
- ❖ **Perry J-J., Staley J-T. et Lory S. (2004).** Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod (éd), Paris.
- ❖ **Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madriral A., Huitron C., Flores M. E. (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., axylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* p53, 269-273.(2003).
- ❖ **POLAK A., (1990).** Mode of action studies. In “ Chemotherapy of fungal diseases” (Ryley J.F., ed), Springer-Verlag. Berlin, pp,155-182.
- ❖ **Pridham T.G., Gottlieb D. (1948).** The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**, 107-114.
- ❖ **Randerath K. (1971).** Chromatographie sur couches minces. Paris : édition Gauthier-Villars. 399p.
- ❖ **Rifai S., Fassouane A., Boiron P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49; 669-674.
- ❖ **Rios, J., Recio, M., Villar, A., 1988.** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology* 23, 127-149.
- ❖ **RYDER N., FRANK I., DUPON M.C., (1986).** Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolnalfate and tolcliate. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **29** : 858-860.
- ❖ **SabaouN.,(1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes :systématique et écologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.
- ❖ **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.
- ❖ **SCHOLER H. (1980).** Flucytosine. In “Antifungal chemotherapy” (Speller D.C.E. Ed.). Chichester, U.K. 35-106.
- ❖ **SCHWARTZ R.E., GIACOBBE R.A., BLAND J.A., MONAGHAN R.L., (1989).** L- 671329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* **42** : 163-167.

- ❖ **Shirling E. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of strains of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst.* 22, 265-394.
- ❖ **Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 16(3), 313-340
- ❖ **Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 16(3), 313-340.
- ❖ **Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. et Nida T.(1979).** Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot.* 32: 427-435.
- ❖ **Silini S., (2012).** Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteurbatch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania. Thèse de Magister en écologie option : Gestion des déchets : évaluation et solution environnementales.Université des frères Mentouri Constantine. 101p.
- ❖ **SIMONETTI N., STRIPPOLI V., (1971).** Azione della metilpatricina sulfa Candida albicans. *Antibiotica.* 9: 5-19.
- ❖ **Srinivasan M.C., Laxman R.S. and Deshpande M.V. (1991).** Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 7,171-184.
- ❖ **Stoks S.M. et Thomas C.R. (2001).** Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythrae* in submerged fermentation. *Biotechnol and Bioeng.* 75 (6):702-709.
- ❖ **Suzuki S.I. (2001).** Establishment and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy.* 15(2), 55-60.
- ❖ **Takizawa M., Colwell R.R., Hill R.T., (1993).** Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology,* 997-1002
- ❖ **Tiraby G., Etienne G. 1983.** L'avenir des streptomyces. *Biofuture,* 15, 33-37.
- ❖ **VAN DER HORST C.M., SANG M.S., CLOUD G.A., et al., (1997).** Treatment of *Cryptococcal meningitis* associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 337: 15-21.

- ❖ **Vernin G. (1970).** Chromatographie sur couche mince : techniques et applications en chimie organique. Paris: Dunod. 178p.
- ❖ **Vitalis S., Vallu G., Bekesi I., Szeszak F. and Szabo G. (1986).** Effect of factor C on the differentiation of *streptomyces griseus*. In: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Eds : G.Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiad, Budapest. 799-806.
- ❖ **Waksman S.A. (1950).** The Actinomycetes : their nature, occurrence, activities, and importance. Chronic. Botan. Company, Waltham, MA, USA.
- ❖ **Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West M.(1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiology*. **144**, 653-656.
- ❖ **WILLIAMS S.T, GOODFELLOW M., ALDERSON G., (1989).** Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In "Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-2492.
- ❖ **Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of Actinomycetes. In: The Biology of the Actinomycetes. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski et S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481-528.
- ❖ **WITFIELD A., (1912).** Eczematoid ringworm of the extremities and groins. Proc. Roy. Soc. Med. **5**: 36-43.
- ❖ **Xiu-LI W., Yang K. and Wang YZ. (2003).** Properties of Starch blends with biodegradable Polymers. *J. Macro mol. Sci. Part C – Polymer Reviews*. **43 (3)**, 385–409.
- ❖ **Zouaghi A. (2007).** Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage : 12p

Annexe

Les milieux de culture

Glucose - Extrait de levure-Malt (GYM)

Extrait de levure 3g
Extrait de malt 3g
Peptone 5g
Glucose 10g
Agar 20g
Eau distillée 1000ml
PH 7.2

Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf 300,0ml
Peptone de caséine : 17,5g
Amidon de maïs : 1,5g
Agar : 17,0 g
PH 7,4

Bouillon nutritif

Peptone 10 g
Extrait de levure 5 g
Na Cl 5 g
Eau distillée 1000 ml
pH = 7,2

Gélose nutritive

Peptone :10 g
Extrait de levure : 5 g
NaCl :5 g
Agar 15-20g
Eau distillée 1000 ml
PH :7,2

Milieu AF

Extrait de levure 4g
Extrait de malt 10g
Glucose 2g
NaCl, 5 g
CaCO₃ 1g
Agar 15g
Eau distillée 1000ml
pH 7

PDA (Potato Dextrose Agar)

Dextrose 20g
Potato Extract 4g
Agar 15 g

Préparation de l'extrait de pomme de terre: 200g de pomme de terre non pelée et vieille, sont lavés et coupés en petits dés, ensuite mis dans un litre d'eau distillée et porté à ébullition pendant une heure. Ils sont en fin écrasés, filtrés. Compléter à un litre d'eau distillée.

Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine 10g

Glucose 20g

Eau distillée qsp1000ml

pH = 6,5

Eau physiologie

Na Cl 9g
Eau distillée 1000ml

TSE

Tryptone 1g

NaCl8,5g

Eau distillée qsp 1000ml

Les colorants

Lugol

Iode 1g
Iode de potassium 2g
Eau distillée 300m

Violet de gentiane

Violet de gentiane 1g
Ethanol à90 10g
Phénol 2g
Eau distillés 1000ml

Fuchsine

Fuchsine basique 02g
Acide phénique 10g
Alcool absolu 20ml