

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Dr. TAHER MOULAY SAIDA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOTOXICOLOGIE, PHARMACOGNOSIE ET
VALORISATION BIOLOGIQUE DES PLANTES



MEMOIRE EN VUE DE
DIPLOME

L'OBTENTION DU

Master EN BIOLOGIE

OPTION : Microbiologie appliquée

Présenté Par : M^{elle} **Guetaf Ahlem**

Soutenu le : 28/06/ 2017 devant la commission d'examen :

- | | | |
|---------------------------|----------------------------|------------|
| ➤ M. Adli D. | M.C.B. Université de Saida | Président. |
| ➤ M. Benreguieg M. | M.C.B. Université de Saida | Encadreur. |
| ➤ M. Ziani K. | M.C.B. Université de Saida | Examineur. |

Année Universitaire : 2016-2017.

Remerciements

« Louange à Allah pour m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail »

Je remercie mon encadreur Monsieur Benreguiég M., Maître de conférences de l'université de Saïda, de m'avoir encadrée, formée, dirigée et surtout de m'avoir fait confiance. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

J'adresse mes remerciements aussi à :

Monsieur Adli D., Maître de conférences de l'université de Saïda, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Monsieur Ziani K., Maître assistant à l'université de Saïda, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes sincères remerciements vont aussi aux enseignants, qui m'ont aidé durant cette année de ma formation, en particulier M. Adli D. ainsi qu'aux membres du laboratoire de Saïda-Faculté des sciences.

Je ne saurais comment remercier mes amies ; Zahira, Jihad, Amel avec lesquels j'ai partagé beaucoup de moments forts tout au long de ce mémoire entre rires et pleurs, déprime et bonheurs.

Je remercie Chiekh, qui a su partagé son expérience et offrir son aide précieuse.

En fin, je remercie toute ma promotion de biologie master II (Microbiologie appliquée). Et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif considéré comme les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. Notre travail a pour but la mise en évidence de l'activité antimicrobienne ainsi que la purification et la caractérisation de la substance impliquée dans ce phénomène chez des actinomycètes isolés à partir du sol aride algérien. Neuf isolats ont fait l'objet de cette étude. Les tests d'antagonismes sont réalisés par la technique des cylindres d'agar envers des champignons et des bactéries connues par leur importance dans les pathologies infectieuses humaines. Tous les isolats testés ont montré un pouvoir inhibiteur contre 4 espèces fongiques parmi 5 utilisés dans le premier screening. Deux isolats parmi les 9 sont utilisés pour une fermentation sur milieu solide (ISP2) (pour une production de la substance bioactive. Après 14 jours d'incubation à 28°C, deux solvants organiques (Méthanol et Acétate d'éthyle) sont utilisés pour l'extraction des métabolites produit dans le milieu. Les différents types des extraits bruts testés par la technique de contact direct contre 3 espèces fongiques (*A.ochraceus*, *P.expansum* et *F.graminearum*) ont montré un remarquable indice fongique (75,3%, 73% et 70%) respectivement. Les CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB (concentration minimale bactéricide) de chaque extrait sont ensuite déterminées en utilisant la technique des micro-dilutions sur microplaque. À une concentration de 12,5µl/ml la bactérie test *Listeria monocytogenes* a été inhibée. Les extraits ont subi par la suite une purification des composés actifs par CCM (chromatographie sur couche mince) en utilisant le système solvant acétonitrile : eau (9 : 1). Les *R_f* (rapport frontale) des fractions actives sont déterminés, ils correspondent à des substances antimicrobiennes qui n'appartiennent ni aux macrolides, ni aux tétracyclines.

Mots clé : Actinomycète, molécules bioactives, activité antimicrobienne, activité antifongique, CCM.

Abstract

Actinomycetes are Gram-positive filamentous bacteria considered to be the best candidates for the production of bioactive secondary metabolites. Our work aims to demonstrate the antimicrobial activity, purify and characterize of the substance involved in this phenomenon in actinomycetes isolated from the arid Algerian soil. Nine isolates were studied. The antagonism tests are carried out by the technique of agar cylinders against fungi and bacteria known for their importance in human infectious pathologies. All isolates tested showed inhibitory potency against 4 fungal species of the 5 used in the first screening. Two isolates out of 9 were used for Agar fermentation (ISP2) (for production of the bioactive substance). After 14 days incubation at 28 ° C., two organic solvents (Methanol and Ethyl Acetate) were used. The different types of extracts tested by the direct contact technique against 3 fungal species (*A. ochraceus* *P. expansum* and *F. graminearum*) showed a remarkable fungal index (75.3% , 73% and 70% respectively), and the MICs (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of each extract are then determined using the micro-dilution technique on a microplate, at a concentration of 12.5 µl/ml *Listeria monocytogenes* was inhibited, and the extracts were subsequently purified of the active compounds by TLC (thin layer chromatography) using the solvent system acetonitol: water (9: 1) The *R_f* (frontal ratio) of the active fractions are determined, they correspond to antimicrobial substances which do not belong to macrolides or to tetracyclines.

Key words: Actinomycete, bioactive molecules, antimicrobial activity, antifungal activity, TLC.

تلخيص

الاكتينوميسات هي بكتيريا خيطية موجبة الجرام تعتبر من أفضل البكتيريا المنتجة للمركبات الثانوية الحيوية النشطة. ويهدف عملنا إلى تسليط الضوء على النشاط البكتيري وتنقية فصل و تصنيف المواد النشطة التي يصنعها هذا النوع من الاكتينوميسات معزولة عن التربة الجافة الجزائرية. تسعة العزلات كانت موضوع هذه الدراسة. تم اختبار نشاط الاكتينوميسات باعتماد تقنية اسطوانات أجار لمعرفة مدى نشاطها ضد الفطريات والبكتيريا المعروفة لأهميتها في الأمراض المعدية للإنسان. وكانت لجميع العزلات المختبرة آثار مثبطة على 4 انواع من الفطريات الخمسة المستخدمة في الفحص الأول. تم الاحتفاظ باثنين من العزلات من 9 للتخمير في وسط انتقائي صلب (ISP2) لإنتاج مادة النشطة الحيوية ، وبعد 14 يوما في حرارة 28 درجة مئوية، اثنين من المذيبات العضوية (Methanol and Ethyl Acetate) استخدمت لاستخراج المركبات الثانوية التي نتجت في الوسط. تم فحص نشاط المركبات المستخرجة بواسطة تقنية مباشرة ضد ثلاثة أنواع من الفطريات (*A.ochraceus* *P.expansum*، *F.graminearum*) أظهر مؤشر تثبيط ملحوظ (75.3٪ ، 73٪ و 70٪) على التوالي. و MIC (التركيز المثبط الأدنى) و MBC (الحد الأدنى تركيز مبيد للجراثيم) من كل عينة الذي تم تحديده باستخدام تقنية التخفيفات الدقيقة. بتركيز 12,5µl / ml تم تثبيط نشاط *Listeria monocytogenes*. وقد خضعت المركبات في وقت لاحق لتنقية CCM باستخدام acétonitrile الماء كنظام مذيب (9 : 1). حيث تم تحديد الاجزاء النشطة، التي تتوافق مع المواد المضادة للميكروبات التي لا تنتمي إلى الماكروليدات أو التتراسيكلين.

□□□□□ □□□□□ :الاكتينوميسات ، الجزيئات الحيوية النشطة، مضادات الميكروبات، مضاد للفطريات CCM.

La liste d'abréviation

- ADN**: Acide désoxyribonucléique.
- A.E** : Acétate d'éthyle
- API** : Appareillage et Procédé d'Identification
- ARN** : Acide ribonucléique
- ATB** : Antibiotique.
- ATCC** : American Type Culture Collection.
- BN** : Bouillon Nutritif.
- C** : Celsius.
- CCM** : Chromatographie sur couche mince.
- CMB** : Concentration minimale bactéricide
- CMF** : Concentration minimale fongicide
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- CPG** : Chromatographie phase gazeuse
- Gram+** : Gram positive.
- Gram -** : Gram négative.
- GN** : Gélose Nutritif.
- G** : Grossissement.
- G/C** : Guanine et cytosine.
- G** : Grossissement.
- h** : Heure.
- H₂S** : Sulfure d'hydrogène
- HPLC** : Chromatographie liquide a haut pression
- IR** : Infrarouge
- ISP** : International *Streptomyces* Project (milieu de culture)
- UV** : Ultra violet
- J** : Jour
- MA** : Mycélium aérien
- Mg** : Milligramme
- MH** : Mueller-Hinton
- MHB** : Mueller-Hinton bouillon
- Min** : minute.
- ml** : Millilitre.

mm : Millimètre.

MS : Mycélium du substrat

Nacl : Chlorure de sodium

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standard.

nm : Nanomètre.

PCR : polymérase chaîne réaction

PDA : Potato Dextrose Agar (milieu de culture).

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PS : pigment soluble

Rf : Rapport frontal

RMN : Résolution nucléaire magnétique

Rpm : rotation per minute

S: Seconde.

S/C : sous-classe

SM : Spectre de masse .

S/O : sous-ordre.

T : Température.

Tc : Témoin de croissance.

Ts : Témoin du substrat

UFC : unité formant colonie.

V : Volume.

V/V: Volume sur volume

% : Pourcentage.

S/cl : Sous classe.

S/O : Sous ordre.

µl : Microlitre.

µg : Microgramme.

O₂: Oxygène.

Tr : Temps de rétention

Rf : Rapport frontal

Liste des Tableaux

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| Tableau 01: | Types de paroi chez les actinomycètes. | 18 |
| Tableau 02: | Répartition des actinomycètes dans la nature. | 21 |
| Tableau 03: | Nombre de souches d'actinomycètes produisant des métabolites bioactifs. | 23 |
| Tableau 04 : | Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes. | 24 |
| Tableau 05 : | Les différentes classes d'antifongiques. | 27 |
| Tableau 06 : | Les souches fongiques cibles du test d'antagonisme. | 46 |
| Tableau 07 : | Les 10 dilutions des extraits bruts des CMI. | 55 |
| Tableau 08 : | Les systèmes solvants employé pour la séparation par CCM. | 57 |
| Tableau 09: | Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches revivifiées. | 59 |
| Tableau 10: | Confirmation des caractéristiques culturelles et microscopiques des souches fongiques cibles. | 61 |
| Tableau 11 : | Pouvoir antifongiques des actinomycètes obtenus par la méthode des cylindres d'agar. | 65 |
| Tableau 12 : | Caractères biochimiques de deux souches d'actinomycètes bioactives. | 66 |
| Tableau 13 : | Activité enzymatique des deux isolats d'actinomycètes bioactives. | 67 |
| Tableau 14 : | Les résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes cibles. | 69 |
| Tableau 15 : | Les zones d'inhibition provoquées par les extraits bruts des souches sélectionnées contre <i>E.coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhi</i> et <i>B.subtilis</i> . | 74 |
| Tableau 16 : | Résultats des indices antifongiques des extraits bruts. | 76 |
| Tableau 17 : | Résultats des CMI et CMB de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle de la souche A7 sur les bactéries-tests. | 80 |
| Tableau 18 : | Résultats des CMI et CMB de l'extrait brut méthanolique de la souche A7 sur les bactéries-tests. | 81 |
| Tableau 19 : | Résultats des CMI et CMB de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle la souche A18 sur les bactéries-tests. | 82 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Tableau 20 : | Résultat de la CCM des trois extraits des isolats actinomycétales. | 84 |
| Tableau 21 : | Résultat du test d'activité des extraits semi purifiés et les Rf des fractions actives. | 88 |

Listes des figures

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figure 01 : | Étapes de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes | 06 |
| Figure 02: | Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide. | 07 |
| Figure 03: | Organisation des conidies chez quelques genres d'actinomycètes. | 09 |
| Figure 04: | Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes. | 10 |
| Figure 05: | Morphologie des chaînes de spores des actinomycètes. | 15 |
| Figure 06: | Morphologie des spores des actinomycètes. | 16 |
| Figure 07 : | Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B). | 16 |
| Figure 08: | Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. | 27 |
| Figure 09: | Cibles d'action des différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryotes. | 30 |
| Figure 10: | Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs. | 31 |
| Figure 11: | Mécanisme de résistance aux polyènes chez <i>C.albicans</i> . | 33 |
| Figure 12: | Mécanisme de résistance aux 5-fluorocytosine. | 34 |
| Figure 13: | Mécanisme de résistance aux azolés chez <i>C.albicans</i> . | 35 |
| Figure 14: | Mécanismes de résistance aux échinocandines chez <i>C.albicans</i> . | 36 |
| Figure 15: | Mécanisme d'action des principaux antibiotiques. | 41 |
| Figure 16: | Aspect culturale sur milieu ISP2 pour les souches revivifiées | 60 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figure 17: | Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des champignons cible sur gélose PDA. | 64 |
| Figure 18 : | Aspect microscopique des souches actinomycètes. | 66 |
| Figure 19 : | Aspect macroscopique des bactéries pathogènes tests. | 68 |
| Figure 20 : | diagramme présentant la zone inhibition des isolats actinomycétales contre les bactéries tests. | 71 |
| Figure 21: | Activité antibactérienne des souches actinomycètes démontrée par la méthode des cylindres d'agar. | 72 |
| Figure 22 : | Illustration résumant les étapes de l'extraction des métabolites bioactives à partir du milieu solide ISP2. | 73 |
| Figure 23 : | Illustration des 3 extraits produits de la fermentation sur milieu solide. | 74 |
| Figure 24 : | Zones d'inhibition obtenues par les extraits bruts testée sur les bactéries cibles | 75 |
| Figure 25: | L'indice antifongique de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de l'isolat A7 . | 77 |
| Figure 26: | L'indice antifongique de l'extrait brut méthanolique de l'isolat A7 . | 77 |
| Figure 27: | L'indice antifongique de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle de l'isolat A18 | 78 |
| Figure 28: | Résultat du contact direct sur la souche <i>F. graminearum</i> | 80 |
| Figure 29: | Illustrations des CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A7 | 81 |
| Figure 30 : | Illustrations des CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A18 | 82 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figure 31 : | Illustration montrant le processus de séparation par CCM | 83 |
| Figure 32 : | Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm. | 85 |
| Figure 33 : | Illustration du résultat de la bioautographie contre les germes cibles | 86 |
| Figure 34 : | Illustration des différentes fractions obtenues par CCM après purification. | 87 |
| Figure 35 : | Illustrations des zones d'inhibitions des fractions actives purifiées | 88 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans les années soixante-dix, la lutte contre les maladies infectieuses était pratiquement à son apogée. Estimant que leur arsenal thérapeutique était suffisant et que les besoins du marché étaient comblés, de nombreuses firmes pharmaceutiques ont orienté leurs travaux vers la recherche de médicaments autres que les antimicrobiens, tel que les analgésiques, les vasodilatateurs, les anti-inflammatoires, etc. Dix années après, avec la résurgence des maladies infectieuses déjà connues (paludisme, tuberculose, fièvre jaune, choléra, méningite, etc.), l'apparition de nouvelles autres encore plus mortelles (sida, grippe aviaire, etc.) et le phénomène de multirésistance microbienne, l'industrie pharmaceutique s'est tournée de nouveau vers la recherche d'antibiotiques innovants. Cette nouveauté se traduit du point de vue structure chimique, mécanisme d'action ou activité biologique intrinsèque intéressante (Barrett, 2002).

L'origine de ces molécules, peut être naturelle, semi-synthétique ou synthétique. Ainsi, depuis le début des années quatre vingt dix, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de découvrir et de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques, aussi bien pour la médecine humaine et vétérinaire que pour l'agriculture (Donadio et al., 2002).

Les actinomycètes sont les microorganismes les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites primaires et secondaires essentiels pour la santé comme les antibiotiques (Okami et hotta, 1988 ; Barakat et al. 2002).

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes bien que son rendement soit réduit, il est pratiqué par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes (Larpent et al., 1989, Ouhdouch et al., 2001, Khettabi et al., 2002, Lemriss et al., 2003) et en mettant au point des méthodes de sélection favorisant des espèces rares (Hacène et al., 1994, Shearer et al., 1997, Hilali et al., 2002).

Les actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, présente malgré la lenteur de leur croissance et leur faible pouvoir compétitif, une aptitude formidable à produire de

nombreuses substances antibiotiques leur conférant un rôle essentiel dans les interrelations entre les microorganismes en intervenant sur la distribution de certains groupes, ainsi que dans les interactions plantes-sols. Ces propriétés font que les actinomycètes sont souvent préconisés dans le cadre de la lutte biologique contre les maladies des végétaux (Goodfellow et Williams, 1983).

Cependant, les actinomycètes sont surtout connus pour leur grande faculté à produire des antibiotiques, avec plus de 70 % des substances actives d'origine microbienne (Omura, 1992) et en particulier le genre *Streptomyces* qui produit à lui seul la majorité de ces antibiotiques.

En dépit de la longue liste des antibiotiques actuellement disponibles sur le marché et malgré l'élargissement de l'arsenal thérapeutique antifongique plus de 35 % pour les aspergilloses et les candidoses (Gellen-Dautremer et al., 2010), les antibiotiques antifongiques représentent un faible pourcentage (Vicente et al., 2003).

A ce titre, l'objectif principal de ce travail est la recherche d'un pouvoir antifongique chez des souches d'Actinomycètes isolées du sol de la zone aride. Mais au-delà de cet objectif primaire, cette étude est réalisée dans le but de caractériser les molécules bioactives, éventuellement, produites par ces souches.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. ACTINOMYCETES :

I.1. Définition et caractéristiques générales :

Les actinomycètes sont des bactéries qui donne après croissance sur milieu solide des colonies circulaire constituées d'hyphes c'est-à-dire de filaments qui irradient en croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Ceci explique leur dénomination Grec « actinomycetes ». aktino, mycetes « champignon à rayons » ou « champignon rayonnant ». « Ray Fungi » expression utilisée pour les désigner en anglais, allemand et russe (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**).

Les actinomycètes appartiennent à l'ordre des actinomycetales, c'est un groupe à coloration de Gram positive, la plupart sont abondamment distribuées dans la nature (**Mariat et Sebald, 1990**).

Longtemps, les actinomycètes ont été considérés comme champignons (Eucaryote), ceci se fondait sur l'allure mycosique des maladies provoquées par ces derniers ainsi que par leur morphologie fongöides : organe de sporulation, filament ramifiés, etc qui ne laissaient aucun doute sur leur appartenance au règne des eucaryotes. A présent ils sont définitivement classés comme bactérie (procaryote), car contrairement au eucaryote chez qui le matériel génétique est inclus dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire, ce groupe de microorganisme a un matériel génétique dépourvu de noyau, diffuse dans le cytoplasme (**Lefebvre, 2008 ; Reponen et al., 1998 ; Gazonko et al., 1998**).

Les points suivants résumant les principales différences entre les champignons et les actinomycètes :

- Paroi ne renfermant ni cellulose ni chitine, molécules présentent respectivement chez les champignons et les plantes (**shukla, 2010**).
- Le diamètre du mycélium représente approximativement le un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (généralement 0.7 à 0.8 µm).
- Leurs sensibilités aux antibiotiques antibactériens (**Rangaswami et al., 2004 ; Winn et Koneman, 2006**).

-
- Leurs sensibilités aux attaques des bactériophages et lysosomes (**Hawker et Linton, 1971**).

Les actinomycètes ont un coefficient de Chargaff (G+C%) supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**).

I.2. Historique et classification :

En 1959, Waksman divisa en quatre grandes périodes l'histoire des actinomycètes :

- **La première période (1874-1900)**, découverte du rôle des actinomycètes dans la pathologie : *streptothrix foeresteri* fut le premier actinomycète découvert par **Cohn en 1875 ; Harz en 1877** isola et nomma *Actinomyces bovis* l'agent pathogène responsables de l'actinomycose du bétail.
- **Seconde période (1900-1919)**, mise en évidence et étude des actinomycètes du sol : en **1909** la famille des *Actinomycetaceae* a été créée par **Orla Yensen**, suivie par l'isolation de nombreuses espèces telluriques, **Buchanan (1917)** créa l'ordre des Actinomycétales.
- **Troisième période (1919-1940)** : marquée par l'acquisition de meilleure connaissance sur ces germes, grâce aux travaux d'**Orskov (1923)** qui créa le genre *Micromonospora*. Ce genre regroupe les actinomycètes qui ne produisent pas de mycélium aérien. Le genre *Paraactinomyces* connue actuellement sous le nom de *Nocardia* regroupa quand à lui les actinomycètes dont le mycélium se fragmente, ce genre a été créé par **Jensen (1932)**.
- **Quatrième période** : débuta en 1940, et fut marquée par les antibiotiques produits par les actinomycètes, ainsi que par la création du genre *Streptomyces* par **Waksman et Henrici en 1943** qui regroupa sous son nom les actinomycètes dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores. En **1958 Pridham et al**, proposa un système de classification des *Streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien ;

Ettling et al., (1958) introduit un critère important dans la différenciation des espèces : la production des pigments mélanoides.

I.3. Classification :

Les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales (**Larpen, 2000**). La classe des Actinobacteria se présente comme suit :

Classe

Actinobacteria

| Sous-classe | Ordre | Famille |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| Acidimicrobidae | Acidimicrobiales | Acidimicrobiaceae |
| Rubrobacteridae | Rubrobactérales | Rubrobacteraceae |
| Coriobacteridae | Coriobactérales | Coriobacteriaceae |
| Sphaerobacteridae | Sphaerobactérales | Sphaerobacteraceae |
| Actinobacteridae | Actinobacteriales | |

I.4. Culture des actinomycètes :

La croissance des actinomycètes sur milieu de culture solide donne naissance à des colonies qui varient selon la composition de ce dernier, en se basant sur les critères des colonies tel que : la taille, la forme, la texture et la couleur, la différenciation entre les genres devient plus facile. Les mycéliums, végétatif et aérien, peuvent avoir des pigments intracellulaires différents qui peuvent être observés sur le dos de la colonie (mycélium végétatif) et à la surface de la colonie (mycélium aérien). Les couleurs des pigments diffusés dans le milieu de culture varient selon les espèces (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les colonies des actinomycètes sont des entités multicellulaires, elles forment des structures très variées morphologiquement et biochimiquement qui ont des fonctions spécifiques et des relations spatiales précises l'une par rapport à l'autre. Ces structures peuvent

être utilisées dans leur taxonomie. Les étapes de développement et les différentes structures formant une colonie d'actinomycètes sont élucidés par la (**Figure 01**).

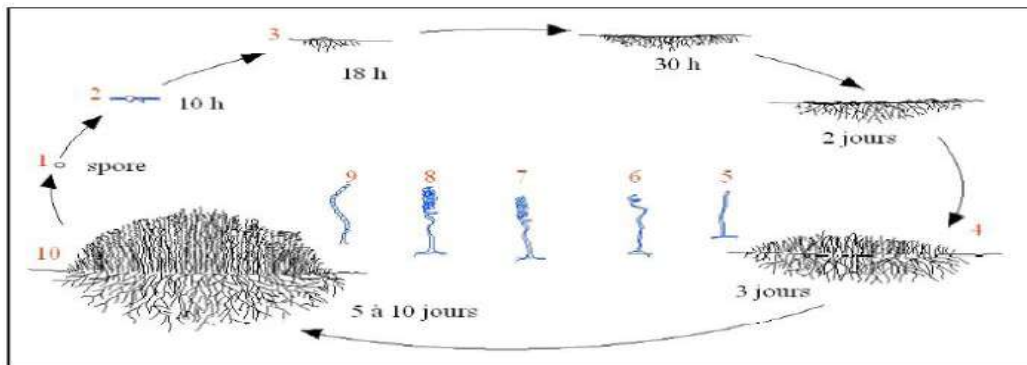


Figure 01 : Étapes de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes (genre *Streptomyces*) sur milieu solide (**Hopwood et al., 1985**), 1: spore, 2: tube germinal, 3: mycélium végétatif, 4: colonie jeune, 5: mycélium aérien, 6: sporophore, 7: sporulation, 8 et 9: maturation des spores, 10: colonie mature

En culture sur milieu solide des actinomycètes engendre des colonies variant entre :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- Des colonies pâteuses pouvant être de texture rugueuse ou lisse qui sont facilement détachable des milieux solides.
- Des colonies dépourvues de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

I.5. Caractères morphologiques des actinomycètes :

Morphologiquement, les groupes d'actinomycètes varient considérablement, d'un simple bacille diphotéroïde ou coccobacille tel que *Rhodococcus* et *Mycobacterium*, à des formes mycéliennes complexes (**Gottlieb, 1973 ; Avril et al., 1992**).

Dans certains cas le mycélium se développe sur et dans le milieu : mycélium végétatif ou mycélium de substrat, constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface, cette morphologie confère au microorganisme la possibilité de dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Locci, 1976**).

Tandis que dans des cas plus extrêmes il y a formation de mycélium aérien uniquement comme chez *Sporichthya* (Falkow, 2006).

Les filaments mycéliens peuvent produire des spores, soit uniques (*Micromonospora*), soit en chaînes (*Streptomyces*), soit groupées dans des sporanges (*Actinoplan*).

D'autres structures morphologiques sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir : des sclérotés sont formés dans le genre *Chainia*, des synnemas (ou corémies) par les *Actinosynnema* et des vésicules, différentes des sporanges, chez *Frankia* (Neyra, 1992).

Une analyse des hyphes d'actinomycètes par imagerie a révélée la présence de deux catégories de filaments : pellet et les hyphes dispersés (Figure 02).

Les hyphes dispersés sont divisés en deux formes « freely dispersed » qui signifie : librement dispersé et « mycelium clumps or aggregates » qui signifie : agrégat de mycélium (Cox et al., 1998).

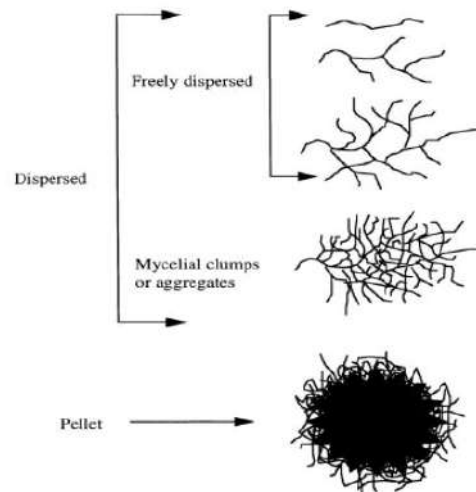


Figure 02 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

La première forme (pellet), est un agrégat de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres ; la seconde forme c'est des hyphes indépendants dispersés (Cox et al., 1998).

Au cours d'un processus de fermentation, la forme pellet pose problème, à cause de limitation de diffusion des nutriments et de l'oxygène à traverses les hyphes, ce qui conduit à une autolyse, mais heureusement au cours de la fermentation industrielle, c'est la forme des hyphes indépendant dispersés qui dominant (90% des cas) (Cox *et al.*, 1998).

I.1.1. Mycélium primaire :

Appelé aussi mycélium végétatif, mycélium de substrat ou mycélium intramatriciel, c'est un ensemble de filaments formés à partir du tube germinale (hyphe) issue d'une spore. Cet hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des jeunes colonies, formées par des filaments attachés en matrice complexe (Mighélez *et al.*, 2000).

I.1.2. Mycélium secondaire :

Appelé aussi mycélium aérien, il se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Contrairement à celui du substrat, le mycélium aérien est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur milieu pauvre en sources nutritionnelles, dans la plupart des cas, par la dégradation du mycélium de substrat dont les produits assurent un apport de nutriments pour sa croissance loin de la colonie (Miguélez *et al.*, 2000).

I.1.3. Spores :

Les changements de développement que subissent les hyphes aériens des actinomycètes donnent naissance aux spores. La paroi cellulaire des hyphes du mycélium aérien est typique à celle des bactéries à coloration de Gram positive. Le volume interne des hyphes est occupé par: les membranes du mésosome (vacuoles), le matériel nucléaire, qui est allongé en fibres tout le long de l'hyphe, et le cytoplasme, ce dernier se divise en petites portions qui se distribuent de telle façon que chaque portion occupera le compartiment d'une spore, au même moment, le matériel nucléaire apparaît d'être étranglé aux sites où les septations auront lieu, puis il se divise complètement lorsque les septations seront formées. Les septations se forment à des intervalles réguliers pour limiter chaque spore individuelle, leur développement est synchronisé tout le long de l'hyphe. Les parois s'épaississent autour de chaque spore et des ornements externes peuvent se former (Wildermuth *et Hopwood*,

1970; Williams *et al.*, 1972; Miguélez *et al.*, 2000). Les spores des actinomycètes se diversifient d'un genre à l'autre, nous observons :

- **Conidies** : représente les spores asexuées, qui sont des sporangiospores non intercalaires ou des chlamidiospores. Ils peuvent avoir plusieurs organisations : une seule, en paires, en chaînes courtes ou longues (**Figure 03**), ou bien rassemblées dans des synnémata (**Holt *et al.*, 1994**).
- **Sporange** : Les sporanges, nombreux ou limités, sont des sacs contenant des spores, ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien ou à l'intérieur du milieu solide (**figure 04**) (**Holt *et al.*, 1994**).

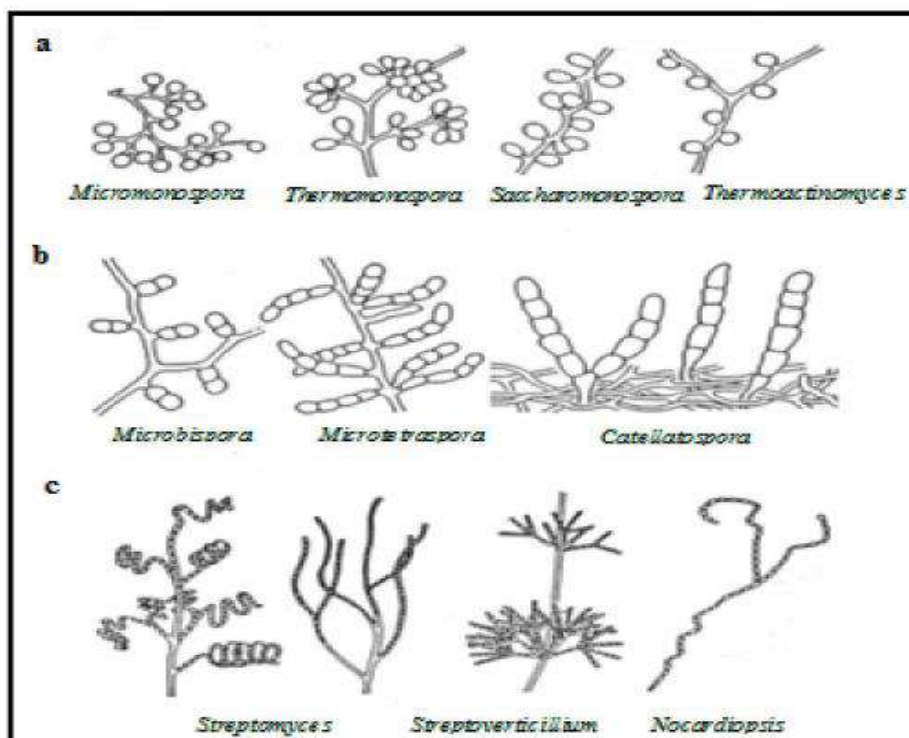


Figure 03: Organisation des conidies chez quelques genres d'actinomycètes (**Larpen et Sanglier, 1989**).

a: une seule, b: paires ou chaînes courtes, c: longues chaînes.

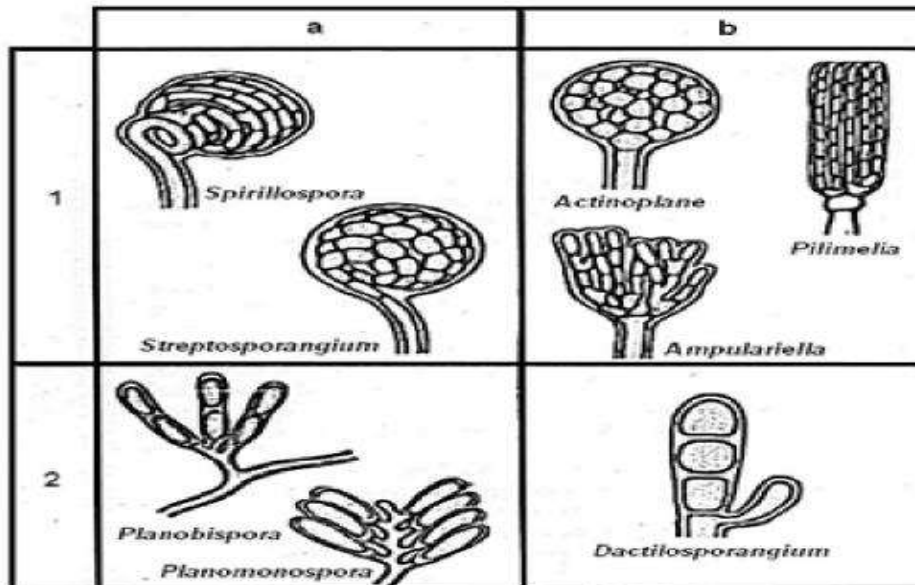


Figure 04 : Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes
(Larpent et Sanglier, 1989).

a: sur le mycélium secondaire, **b:** sur le mycélium primaire, **1:** spores nombreuses, **2:** spores en nombres limités.

Les critères morphologiques principalement utilisés pour délimiter les genres d'actinomycètes sont:

- La présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium de substrat et du mycélium aérien,
- La présence des spores, leur nombre, leurs formes, leur mobilité et leur position sur les hyphes,
- La formation de structures spéciales comme les sporanges, sclérotés ou synnémata. (Shirling et Gottlieb, 1966; Schofield et Schaal, 1981; Demain et Solomon, 1985).

I.1.3.1. Les endospores :

Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphes. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*.

I.1.3.2. Les exospores :

Elles naissent de la formation de parois transversales pour délimiter les spores. Les parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornements externes peuvent se former, le contenu en tréhalose, relativement abondant aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores. Par ailleurs, celles-ci ont fondamentalement la même structure qu'une cellule végétative et ne contient qu'un seul génome haploïde.

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 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, 1992 ; Grafe et al., 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitalis et al., 1986**)

I.6. Caractères physiologiques des actinomycètes :

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive, généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif. La majorité de ces microorganismes sont hétérotrophes, mais il existe certaines espèces capables aussi de croissance chimio-autotrophique (**Ensign et al., 1993 ; Locci, 1976 ; Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujilo, 1997**).

Certaines espèces d'actinomycètes nécessitent de facteurs de croissance comme les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tels que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (**Crawford, 1993**) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine et les résidus des plantes dans le sol (**Lacey, 1997**).

Les paramètres physiologiques tels que le pH, l'oxygène, la température... etc., peuvent avoir une influence importante sur la croissance des actinomycètes.

I.1.4. L'oxygène :

Selon le type respiratoire, les actinomycètes peuvent être divisés en deux groupes :

- Les formes fermentatives anaérobies, *Actinomyces* est le genre type, ce sont des commensales obligatoires des cavités naturelles des hommes et animaux supérieurs, ils font partie de la flore de Veillons (Avril et al., 1992).
- Les formes oxydatives aérobies, comme les *Streptomyces*, abondantes dans la nature en particulier dans le sol (Avril et al., 1992).

I.1.5. Le pH :

La majorité des actinomycètes sont considérés comme neutrophiles, et ont une croissance optimale dans un intervalle compris entre 7-8, néanmoins une croissance à des valeurs de pH inférieures à 4 a pu être observée le cas des souches acidophiles comme les espèces *Streptacidiphilus jiangxiensis* et *Streptacidiphilus oryzae* (McKinney, 2004 ; Wang et al., 2006). Des recherches ont aussi démontré l'existence d'une large variété d'actinomycètes acidophiles croissant au alentour d'un pH de 3,5 à 6,5 avec un optimum de croissance à une valeur comprise entre 4,5 et 5,5 (Hwang et al., 2001).

I.1.6. La température :

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

I.1.7. L'activité de l'eau (Aw) :

Chez les actinomycètes, la germination des spores peut être observée à des valeurs d'activité d'eau supérieures ou égales à 0,67, néanmoins la valeur optimale de l'activité d'eau pour leur croissance et développement est égale à 0,98 (Zvyagintsev et al., 2005)

I.1.8. La tolérance au NaCl :

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

- Les halophiles : ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.
- Les halotolérants acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V)) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) ; et les extrêmement tolérants (se développe de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (**Nanjani, 2011**).

I.7. Taxonomie des actinomycètes :

En se basant sur le système de classification de Murray (*Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology*, Murray *et al.*, 1989), les actinomycètes ont été classés dans le règne des procaryotes, division des Firmicutes (bactéries Gram-positives), classe des Thallobacteria (bactéries Gram-positives ramifiées), dans laquelle on trouve l'ordre des Actinomycétales (**Ouhdouch, 2003. Alauzet, 2009**). La taxonomie des actinomycètes a évolué en fonction du développement des connaissances, durant ces 30 dernières années elle fut marquée par quatre périodes dont chaque une à porter des nouveaux critères de classification :

I.1.9. Première période

C'est la période classique, où seuls les critères macro et micromorphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux. Les caractères morphologiques décrits dans la clé d'identification par **Nonomura (1974)** sont beaucoup utiles dans l'identification des streptomycètes (**Thenmozhi & Kannabiran 2010**). Ils sont comme suit :

- La couleur de mycélium aérien : Les *streptomyces* sont divisés en sept groupes selon la couleur du mycélium aérien « grise, rouge, jaune, blanc, bleu, vert, et violet ».
- Les pigments mélanoïdes.
- Fragmentation du mycélium de substrat
- La couleur de mycélium de substrat.

- Les pigments solubles : les actinomycètes sont divisés en deux groupes selon leurs pouvoirs de production des pigments outre que les pigments mélanoides : productrice et non productrices.
- La morphologie des chaînes de spores : les chaînes de spores peuvent être simples ; droit à flexueuses (type « rectus-flexibilis= RF), en crochet ou en boucles (type « rectinaculum-opertum » = RA), ou en spirales (type « spira » = S), comme elles peuvent être verticillées, Biverticillus (BIV), Biverticillus-Spira (BIV-S). Monoverticillus (MV), Monoverticillus - Spira (MV-S) (**Figure 05**).
- L'ornementation de la surface des spores : les spores peuvent avoir une surface lisse (type smooth), rugueuses (type warty), épineuse (type spiny) ou chevelue (type hairy) (**Figure 06 et 07**).

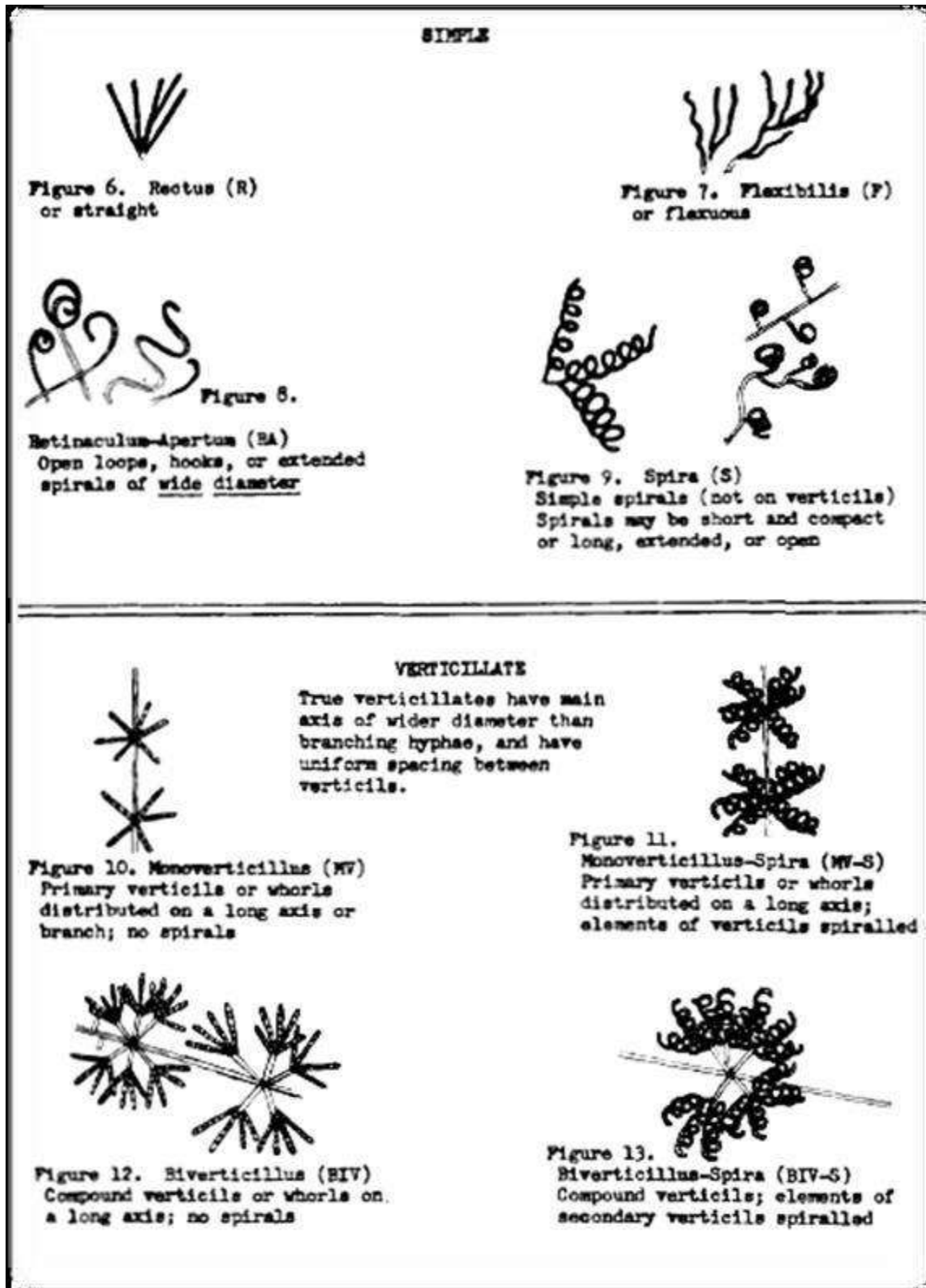


Figure 05 : Morphologie des chaines de spores des actinomycètes (Shirling & Gottlieb, 1966).

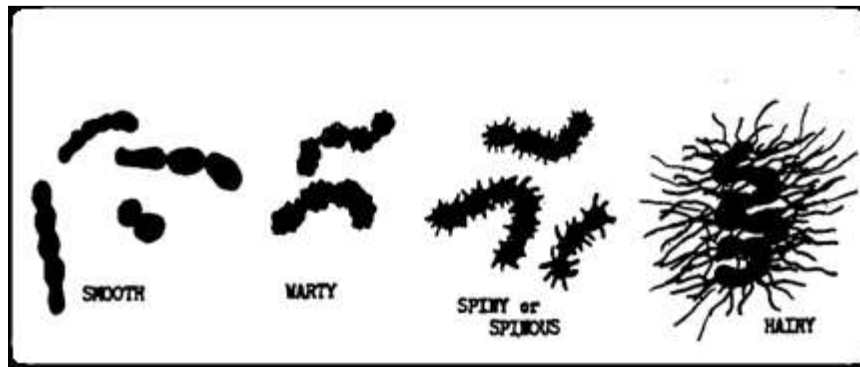


Figure 06 : Morphologie des spores des actinomycètes (Shirling & Gottlieb, 1966).

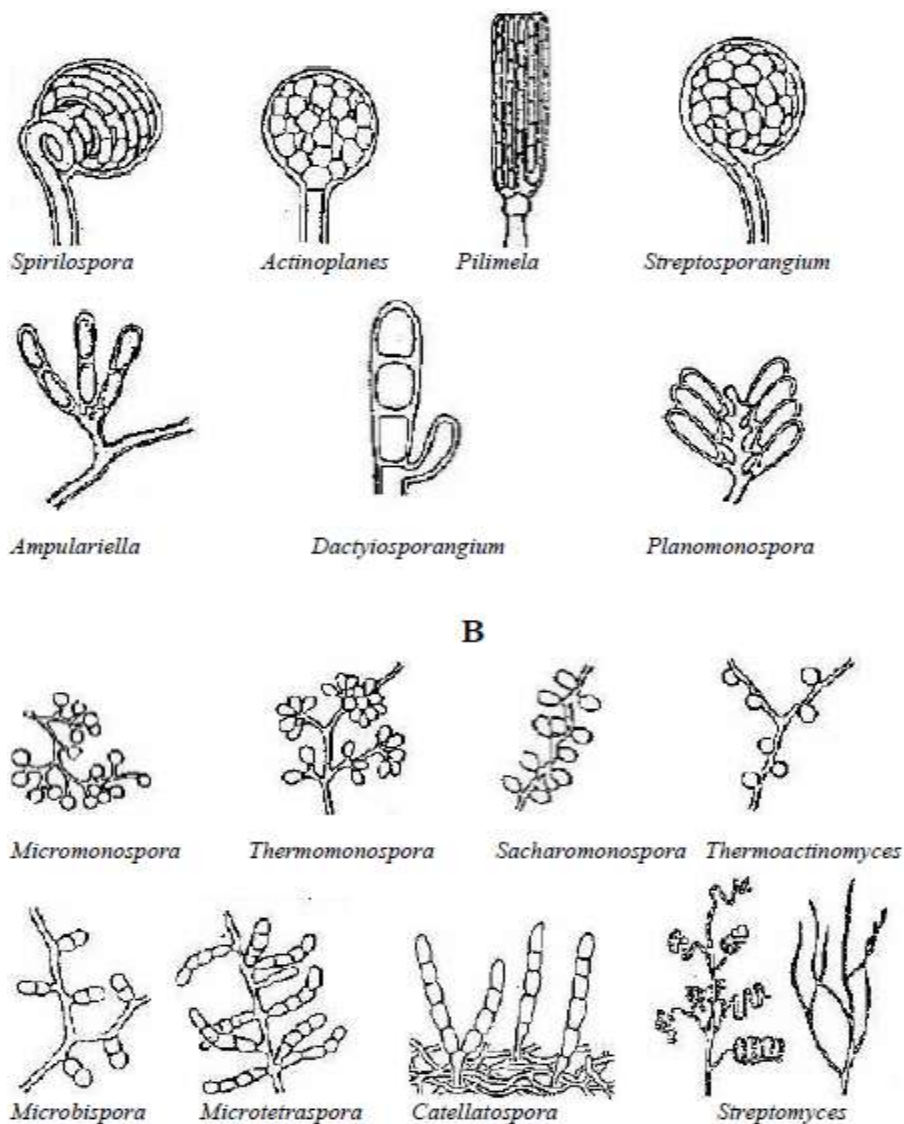


Figure 07 : Différentes chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton & al, 1989).

I.1.10. La seconde période

C'est la période d'utilisation de la chimio-taxonomie. Selon **Goodfellow & Minnikin, 1985**, la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Selon les travaux de **Becker & al. 1964** ; **Lechevalier et Lechevalier (1970)**, certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinomycètes, ces constituent on les retrouve généralement soit dans la paroi ou dans la cellule entière (**Sabaou, 1988**).

➤ **Les acides aminés et les sucres :**

Chez les bactéries à Gram négatif, la structure chimique des peptidoglycanes est uniforme, à quelque exception près, par contre, chez les bactéries à Gram positifs, la composition en acides aminés et en sucres se révèle un critère taxonomique de poids (Meyer, & al 2004). L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée soit d'une :

- Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**).
- Glycoprotéine contenant l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) ; Il est le plus souvent rencontré chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tel que les *Streptomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**), il est présent au niveau des parois de la plupart des actinomycètes sous deux formes isométriques ; la forme LL et la forme meso.

L'analyse des constituants cellulaires est devenue obligatoire pour la classification des actinomycètes qui était auparavant assez ambiguë. Plusieurs espèces de position systématique douteuse ont été reclassées dans d'autres genres et plusieurs genres ont été créés par la suite. Le tableau1 illustre les principaux types de parois rencontrés chez les actinomycètes aérobies.

Tableau 01: Types de paroi chez les actinomycètes (Prescott & al, 2010).

| Type de paroi | Acide diaminopimélique | | Acide aminés | | | Sucres | | |
|---------------|------------------------|-------------------|--------------|--------|-----------|-----------|--------|-----------------------|
| | Isomère LL | Isomère DL (méso) | Glycine | Lysine | Arabinose | Galactose | Xylose | Madurose ^a |
| I C | + | - | + | - | - | - | - | - |
| II D | - | + | + | - | + | - | + | - |
| III B | - | + | - | - | - | - | - | + |
| III C | - | + | - | - | - | - | - | - |
| IV A | - | + | - | - | + | + | - | - |
| VI | - | - | - | + | - | V | - | - |

a: 3-O-methyl-D-galactose.

+ Présent ;

- : absent ;

V: variable suivant la souche.

Les chiffres I ; II ; III ; IV ; VI : définis par **Becker & al. 1964; Lechevalier et Lechevalier (1970)** sur la base de la forme LL ou méso de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de la glycine et de la lysine.

- Les lettres A ; B ; C ; D : définis par **Lechevalier et Lechevalier (1970)** sur la base des constituants majeurs en sucres : galactose, xylose, arabinose et madurose.

➤ Les lipides

Les lipides sont aussi importants pour la classification des actinomycètes, tout comme le type de paroi cellulaire, qui fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. Trois sortes de lipides sont étudiées : les acides gras à longues chaînes, les ménaquinones et les phospholipides.

- **Les acides gras**

Les acides gras les plus trouvés chez les actinomycètes, peuvent être soit des courtes chaînes comportant 12-20 atomes de carbone, ou des longues chaînes qui caractérisent le groupe des acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone (**Minnikin et Goodfellow, 1981**).

- **Les quinones**

Ce sont des lipides terpéniques, les quinones respiratoires ou isopréniques. Ils ont un potentiel considérable comme marqueurs taxonomiques. Il existe 2 genres majeurs de quinones respiratoires chez les bactéries soient: les ménaquinones (mieux connus sous le nom de vitamine **K2**) et les ubiquinones (aussi appelées coenzyme 4) (**Minnikin et Goodfellow, 1981**).

- **Les lipides polaires** : les plus courants chez les actinomycètes sont les phospholipides (**Minnikin et Goodfellow, 1981**).

I.1.11. Troisième période

Durant la troisième période naissait la taxonomie numérique, qui a débuté dans les années 70, et qui combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles (**Smaoui, 2010**). **Sneath et Sokal** ont défini la taxinomie numérique comme " le groupement d'unité taxonomique, en taxons à l'aide de méthodes numériques sur la base des états de leurs caractères" (**Prescott et al., 2003**). Le procédé consiste à déterminer la présence ou l'absence des caractères sélectionnés dans le groupe d'organisme étudié. Pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins 50. Et il est également préférable d'inclure de nombreux types de données différents: morphologique, biochimiques et physiologiques. Chacun des caractères est codés 1 pour présence du caractère, ou 0 pour absence du caractère. Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables (**Kitouni, 2007 ; Prescott et al., 2003**).

I.1.12. La quatrième période

A débuter durant les années 80 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle. Elle consiste à l'application des données basées sur les acides nucléiques, aux problèmes de systématique. Le terme taxonomie moléculaire signifie l'utilisation de l'ADN et de l'ARN pour l'étude des relations entre les organismes (**Judd & al., 2001**). La structure générale des gènes codants pour l'ARNr 16s est hautement conservée chez tous les êtres vivants, et sa séquence présente des zones qui sont presque invariables appelées séquences signatures oligonucléotidiques.

Ces derniers serviront comme outil pour identifier spécifiquement les actinomycètes (Alauzet, 2009). Sur la base de l'analyse de l'ARNr16s l'ordre des actinomycetales est divisé en 14 sub-ordres : *Actinomycineae*, *Actinopolysporineae*, *Catenulisporineae*, *Corynebacterineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae*, *Jiangellineae*, *Kineosporineae*, *Micrococineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae* et *Streptosporangineae* (Adegboye et Babalola, 2012).

I.8. Ecologie

Les actinomycètes colonisent des habitats naturels largement varié (Tableau 02), cela est dû à leur capacité de se développer sur une large gamme de substrats. Présent dans des sols désertiques chauds tout comme dans les sols polaires gelés en permanence, les sols autrement contaminés par des métaux lourds, le pétrole brut, les lacs alcalins et les lacs salés, néanmoins ils semblent être absents des eaux minières très acides avec un pH inférieur à 1 et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Xu, 1996 ; Hwang et al., 2001).

I.1.13. Sol

Même à part les sols aux conditions extrêmes, les actinomycètes sont répartis dans tout les sols, surtout dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur. Les actinomycètes sont responsables de la production de deux substances ; la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols. (Omura, 1992 ; Zaitlin et al., 2003).

I.1.14. Milieux marins

Selon certaines opinions, les souches d'actinomycètes isolées des milieux marins ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existeraient une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; ainsi certaines souches *Nocardioforme* isolées à plus de 2000 m de profondeur se développent sous les pressions hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°C (Weyland, 1981).

I.1.15. Eaux douces

Les souches *Micromonospora*, *Actinoplanes* et *Streptosporangium* sont facilement isolable a partir de ce milieu, essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres ou ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donne a l'eau son odeur de terre et sa flaveur.

I.1.16. L'air

L'air peut être considéré comme un moyen de transport pour les actinomycètes et non pas comme un habitat, leur spores sont des contaminants importants dans notre environnement et peuvent être néfastes sur la santé (Gazenko *et al.*, 1998 ; Reponen *et al.*, 1998 ; Suutari *et al.*, 2002).

I.1.17. Les composts

Le compost est le produit finale d'un décomposition biologique thermophile, en présence d'oxygène et dans des conditions contrôlées, de déchets organiques, sous action de micro et macroorganismes, composé essentiellement de matières organique et composés minéraux (Mustin, 1987).

Les actinomycètes isolés de ce milieu sont pour la plupart des genre thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora*, ainsi que d'autres *thermotolérantes* tel que *Microbispora*, *Pseudonocardia*, *Micropolyspora* (ensign *et al.*, 1993 ;Lacey, 1997 ; Song *et al.*, 2001). Ils sont généralement présents dans les derniers stages du compostage attaquant les structure les plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Tableau 02 : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow, 1983).

| Genre | Habitat |
|--------------------------|--|
| <i>Actinomadura</i> | Sol |
| <i>Actinoplanes</i> | Sol, eau, litière. |
| <i>Frankia</i> | Nodule des racines |
| <i>Microbispora</i> | Sol |
| <i>Micromonospora</i> | Sol, eau |
| <i>Nocardia</i> | Sol, eau |
| <i>Rhodococcus</i> | Sol, eau, fumier, litière. |
| <i>Sacharomonospora</i> | Matière en décomposition |
| <i>Streptomyces</i> | Sol, eau, litière. |
| <i>Streptosporangium</i> | Sol |
| <i>Thermoospora</i> | Matière en décomposition et fermentation |

I.9. Métabolismes des actinomycètes :

Les actinomycètes représentent un groupe de microorganisme possédant deux propriétés significatives qui se manifeste dans leur aptitude à se développer sur les substrats les plus divers et leur capacité à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (45% des molécules bioactives connus dont 34% dérivent du genre *Streptomyces* et 11% des actinomycètes plus rares) , ils sont a l'origine de la plus importante production d'antibiotique par des microorganismes. Le (**Tableau 03**) donne le nombre des différentes souches d'actinomycètes produisant les métabolites bioactifs. Ces propriétés traduisent La remarquable richesse métabolique de ce groupe microbien (**Theilleux, 1993**).

I.1.18. Production d'antibiotique

Le premier antibiotique isolé à partir des actinomycètes fut la streptomycine, produit par une espèce du genre *Streptomyces* a qui on donna beaucoup d'intérêt durant les années 1950 et 1960 (70% des antibiotiques ont été isolés à partir de ce genre) ainsi les décennies qui suivirent les recherches furent tourné vers les souches d'actinomycètes rares, de ce fait ces derniers sont a l'origine de 25 à 30% des antibiotiques (**Tableau 04**).

Cependant, les *Streptomyces sp.* Reste toujours les producteurs majeurs des antibiotiques thérapeutiques. Les actinomycètes rares produisent les composés les plus singuliers et les plus divers et le plus souvent non toxiques, possédant un excellent potentiel antibactérien.

Parmi les métabolites produits par ces actinomycètes rares, il y a beaucoup de molécules qui sont très importantes en pratique clinique comme les gentamicines, les erythromycines, la vancomycine et la rifamycine. Ainsi d'autres molécules comme le ziracine, le dalbavacine et le spynosine sont utilisées en agriculture. Aussi, nous notons que la vancomycinristocetine est un type complexe de glycopeptide produit, presque en exclusivité, par plusieurs espèces d'actinomycètes rares (**Bérdy, 2005**).

I.1.19. Production d'enzymes :

Les actinomycètes sont des saprophytes dans leur biotope naturel, participant a la dégradation, par la production d'enzymes extra-cellulaires, de la matière organique , donc au recyclage des biopolymères complexes tels que la cellulose, la lignine, la lignocellulose, la

kératine, la chitine, la pectine et le xylane. E ce fait ces enzymes ont été exploités industriellement, tel que les amylases, les protéases, les ligninases, les cellulases et les lipase (Demain et solomon, 1985 ; Sanglier et trujillo, 1997 ; Chitte et al., 1999 ; Pitinate et al., 1999 ; Mason et al., 2001 ; Rivas et al., 2003).

Tableau 03 : Nombre de souches d'actinomycètes produisant des métabolites bioactifs (Berdy, 2005).

| Famille/Genre | Nombre | Famille/Genre | Nombre |
|-------------------------------------|---------|---------------------------------------|--------|
| <i>Streptomycetaceae:</i> | | <i>hermomonosporaceae:</i> | |
| <i>Streptomyces</i> | 8000 | <i>Actinomadura</i> | 345 |
| <i>Streptoverticillium</i> | 258 | <i>Saccharothrix</i> | 68 |
| <i>Kitasatospora</i> | 37 | <i>Microbispora</i> | 54 |
| <i>Chainia</i> | 30 | <i>Actinosynnema</i> | 51 |
| <i>Microellobospora</i> | 11 | <i>Nocardiopsis</i> | 41 |
| <i>Nocardioides</i> | 9 | <i>Microtetraspora/Nonomuria</i> | 26/21 |
| | | <i>Thermomonospora</i> | 19 |
| | | <i>Micropolyspora/Faenia</i> | 13/3 |
| | | <i>Thermoactinomyces</i> | 14 |
| | | <i>Thermopolyspora</i> | 1 |
| | | <i>Thermoactinopolyspora</i> | 1 |
| <i>Micromonosporaceae:</i> | | <i>Mycobacteriaceae:</i> | |
| (Actinoplanetes) | | (Actinobacteria) | |
| <i>Micromonospora</i> | 740 | <i>Nocardia</i> | 357 |
| <i>Actinoplanes</i> | 248 | <i>Mycobacterium</i> | 57 |
| <i>Dactylosporangium</i> | 58 | <i>Arthrobacter</i> | 25 |
| <i>Ampullariella</i> | 9 | <i>Brevibacterium</i> | 17 |
| <i>Glycomyces</i> | 2 | <i>Proactinomyces</i> | 14 |
| <i>Catenuloplanes</i> | 3 | <i>Rhodococcus</i> | 13 |
| <i>Catellatospora</i> | 1 | Autres espèces (non classées): | |
| <i>Pseudonocardiaceae:</i> | | <i>Actinosporangium</i> | 30 |
| <i>Saccharopolyspora</i> | 131 | <i>Microellobospora</i> | 11 |
| <i>Amycalotopsis/Nocardia</i> | 120/357 | <i>Frankia</i> | 7 |
| <i>Kibdellosporangium</i> | 34 | <i>Westerdykella</i> | 6 |
| <i>Pseudonocardia</i> | 27 | <i>Kitasatoa</i> | 5 |
| <i>Amycolata</i> | 12 | <i>Synnenomyces</i> | 4 |
| <i>Saccharomonospora</i> | 2 | <i>Sebekia</i> | 3 |
| <i>Actinopolyspora</i> | 1 | <i>Elaktomyces</i> | 3 |
| | | <i>Excelsospora</i> | 3 |
| | | <i>Waksmania</i> | 3 |
| | | <i>Alkalomyces</i> | 1 |
| | | <i>Catellatospora</i> | 1 |
| | | <i>Erythrosporangium</i> | 1 |
| | | <i>Streptoplanospora</i> | 1 |
| | | <i>Microechinospora</i> | 1 |
| | | <i>Salinospora</i> | 1 |
| <i>Streptosporangiaceae:</i> | | | |
| (Maduromycetes) | | | |
| <i>Streptosporangium</i> | 79 | | |
| <i>Streptoalloteichus</i> | 48 | | |
| <i>Spirillospora</i> | 11 | | |
| <i>Planobispora</i> | 10 | | |
| <i>Kutzneria</i> | 4 | | |
| <i>Planomonospora</i> | 2 | | |

Tableau 04 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

| Actinomycètes producteurs | Antibiotiques | Références |
|---|-----------------|------------------------------------|
| 1/Les agents antibactériens | | |
| <i>Micromonospora sp.</i> | Clostomycine | Takahashi et al., 2003 |
| <i>Streptomyces griseus</i> | Candicine | Jinenez et al., 2009 |
| <i>Streptomyces lydicus</i> | Streptolydigne | Liu et al., 2007 |
| <i>Streptomyces lindensis</i> | Rétamycine | Inoue et al., 2007 |
| <i>Marinispora sp.</i> | Marinomycine | Sturdiková et Sturdik, 2009 |
| <i>Verrucosipora sp.</i> | Abyssomycine | Sturdiková et Sturdik, 2009 |
| 2/ Les agents antifongiques | | |
| <i>Streptomyces griseochromogenes</i> | Blasticidine | Fukunaga et al., 2008 |
| <i>Streptomyces humidus</i> | Phénylacétate | Hwang et al., 2001 |
| <i>Nocardia transvalensis</i> | Transvalencine | Mukai et al., 2006 |
| <i>Streptomyces nodosus</i> | Amphotéricine B | Carle et al., 2003 |
| 3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes | | |

| | | |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|
| Spinosad. Insecticide neurotoxique | <i>Saccharopolyspora spinosa</i> | Williamson et al., 2006 |
| Herbicides. Exemple 1. 2,4-Dihydro-4-(β-Dribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one | <i>Actinomadura sp</i> | Schmitzer et al., 2000 |
| Exemple Herbimycine | 2. <i>Streptomyces hygrosopicus</i> | Omura et al., 2006 |

II. Les substances antimicrobiennes

II.1. Les antifongiques

II.1.1. Définition

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux.

Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse. Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (**Bastide et al., 1986**).

II.1.2. Historique

La découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, qui est un polymère à activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (**Drouhet et al., 1978**). Depuis, plus de 200 molécules antibiotiques polyéniques furent découvertes. Mais des problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité n'ont permis l'utilisation que d'un nombre restreint de ces composés en thérapeutique. (**Belkherroubi, 2009**).

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la figure ci-après (**Figure 08**).

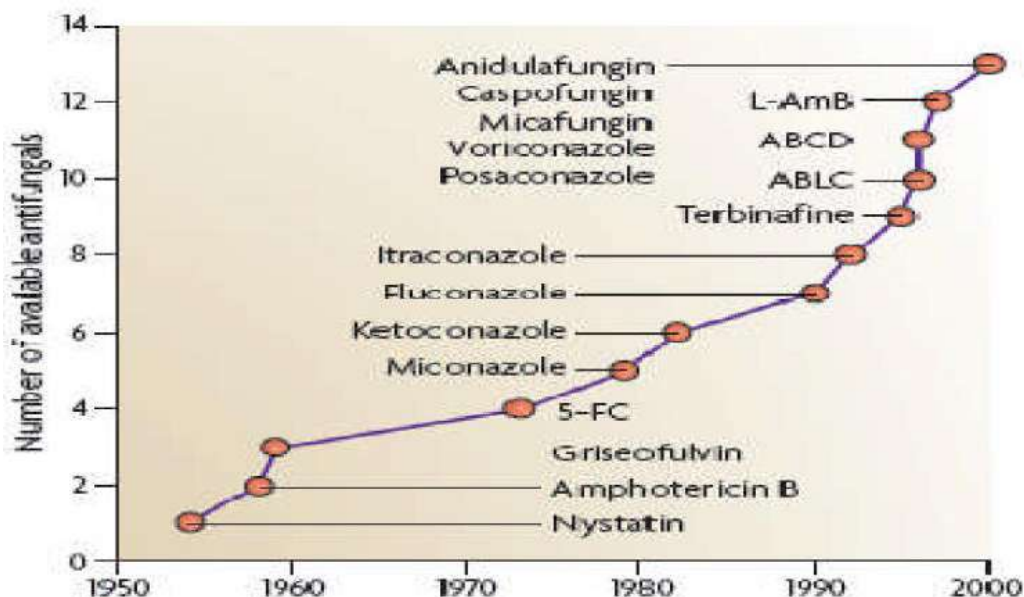
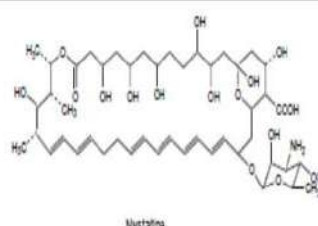


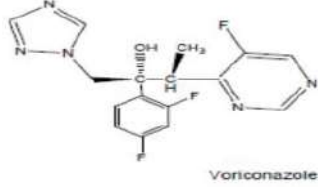
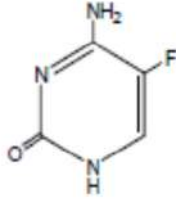
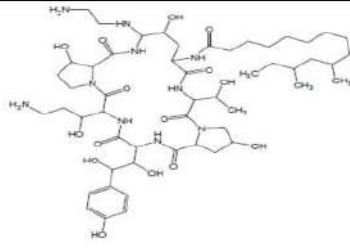
Figure 08 : Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. (Ostrosky-zeichner *et al.*, 2010).

II.1.3. Classification des antifongiques selon l'origine et la structure

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008), et sont résumées dans le (Tableau 05).

Tableau 05 : les différentes classes d'antifongiques (Million, 2006 ; Tulkens, 2008).

| Classes d'antifongique | Cible | Mécanisme d'action | Structure chimique |
|---|-------------------|--|--|
| Polyènes : -Nystatine (fongicide) | Membrane fongique | Augmentation de la perméabilité membranaire par formation de complexes avec l'ergostérol |  <p>Nystatine</p> |

| | | | |
|---|-------------------|--|---|
| Azolés : -voriconazole (fongistatique) | Membrane fongique | Inhibition de la synthèse de l'ergostérol |  <p style="text-align: center;">Voriconazole</p> |
| Fluoropyrimidines -Flucytosine (Fongistatique) | Acides nucléiques | Perturbation de la synthèse protéique (substitution de la 5FU à l'uracyl dans l'ARN) Altération de la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase |  |
| Candines -Caspofungine (Fongicides pour Candida) Fongistatique pour Aspergillus) | Paroi fongique | Inhibition de la B (1-3) D glucane synthétase |  |

Cependant les antifongiques les plus utilisés dans le traitement des mycoses sont les molécules macrolides polyéniques.

II.1.3.1. Les antifongiques de synthèse chimique

A. Les azolés

Les dérivés azolés sont les antifongiques les plus utilisés en clinique. Pour cette raison, ils sont les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action, que des stratégies de défense adoptées par les micro-organismes.

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Vandeputte, 2008).

B. Les fluoropyrimidines

Les fluoropyrimidines, dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et le 5-fluorouracile (5-FU). Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (**Vandeputte, 2008**).

II.1.3.2. Antifongiques naturels

A. Les polyènes

Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement D-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de "polyène") sur une face du cycle macrolactone, qui est donc hydrophobe, et de groupements hydroxyles sur l'autre face, qui est hydrophile (**Vandeputte, 2008**).

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine (**Figure 09**) (**Vandeputte, 2008**).

Les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être souvent antibactériens (**Berdy et al., 1987**).

Bien que les polyènes puissent être synthétisés chimiquement, ils sont encore produits aujourd'hui, pour des raisons économiques, à partir de cultures de *Streptomyces* spp. (**Vandeputte, 2008**).

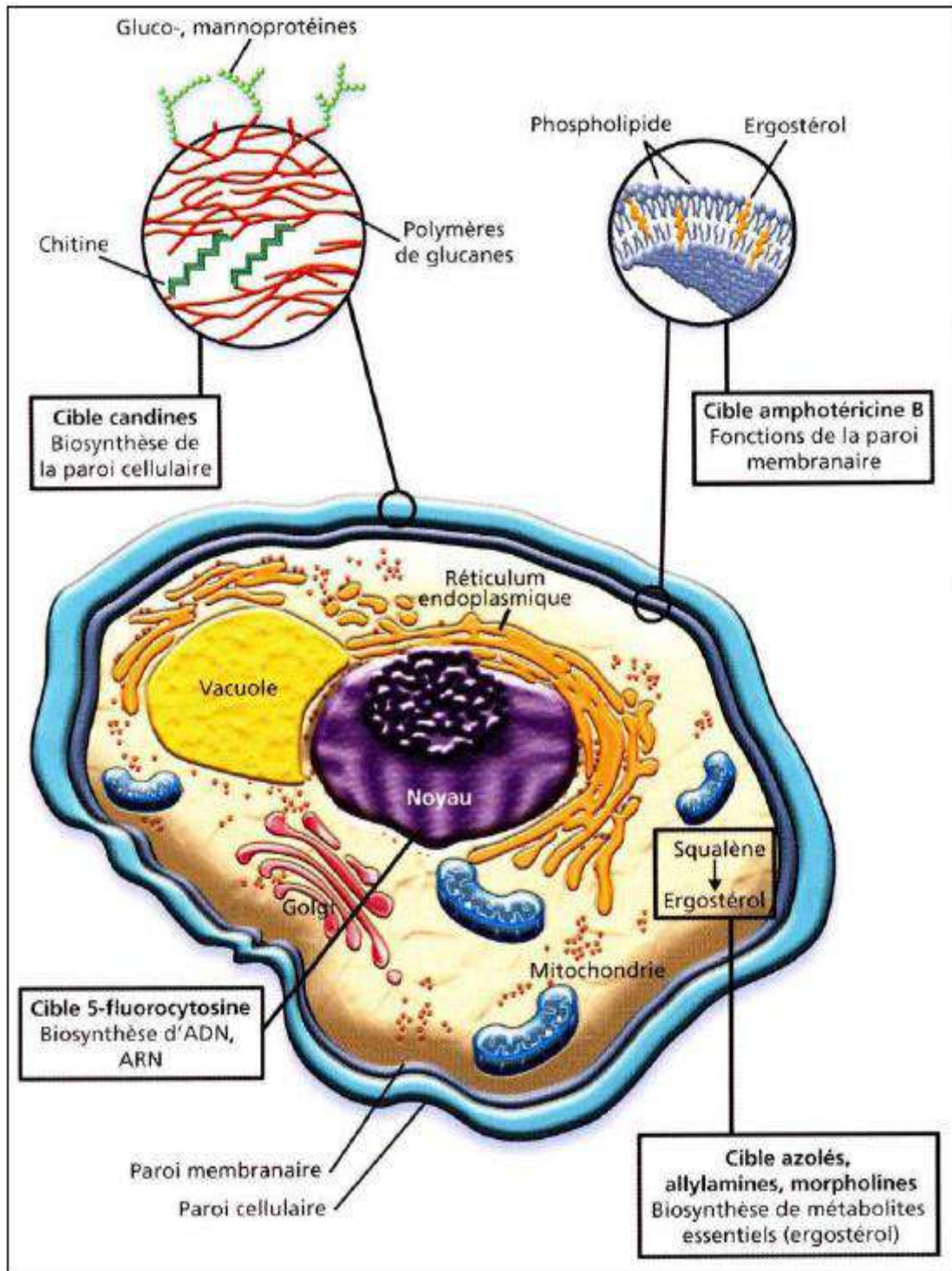


Figure 09 : cibles d'action de différentes classes d'antifongiques sur la cellule eucaryote (Hulin et al., 2005).

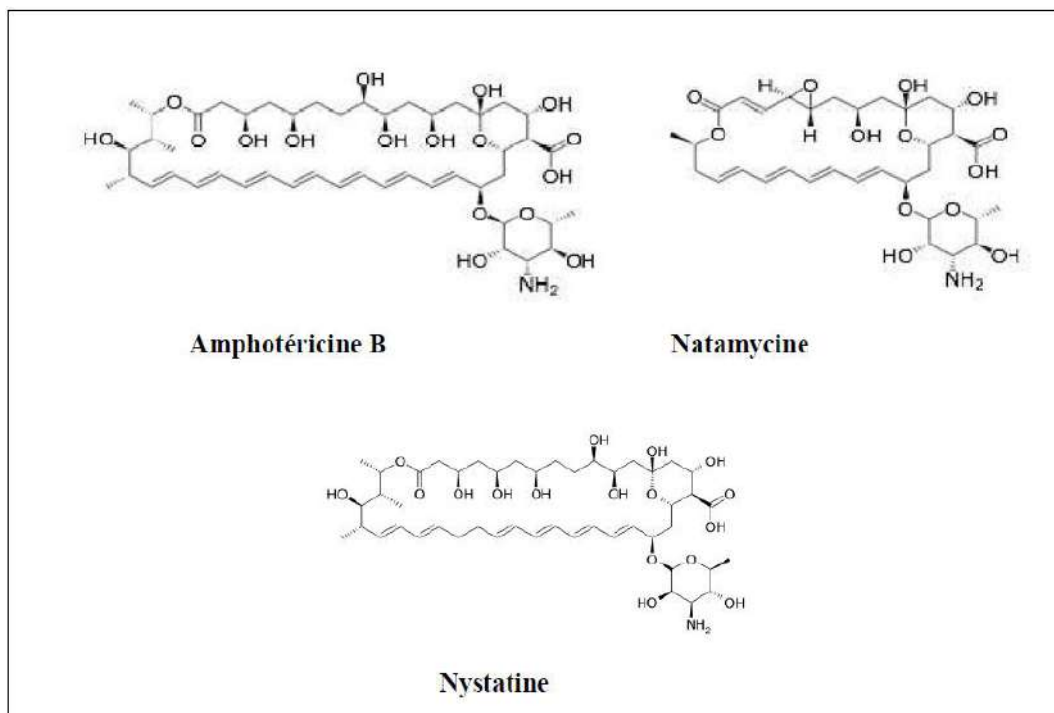


Figure 10 : structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs (Vandeputte, 2008).

B. Les échinocandines

Parmi les échinocandines, on peut citer la caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*. Cette molécule est le premier d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs de la synthèse du β _(1,3) D-glucan, composant essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes (Carle *et al.*; 2003).

Trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de développement : la caspofungine, anidulafungine et micafungine (Rautemaa *et al.*, 2008).

C. Les antifongiques non polyéniques

Les réactions secondaires et une certaine toxicité liée à la structure polyénique des antifongiques ont conduit à la recherche de nouveaux antibiotiques avec en priorité la production de dérivés de structure non polyénique (Benallaoua *et al.*, 1990).

Les antifongiques non polyéniques ont des structures assez variées. Ils sont moins importants en thérapie que les polyènes sauf pour quelques uns comme les aminoglycosides (kasugamycine), les quinones (anthracyclines), les hétérocycles azolés (blasticidine),

les aromatiques (griséofulvine), les composés alicycliques (cycloheximide). Leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans l'agriculture est parfois courante (**Zitouni, 1995**).

Leur spectre UV- visible est très variable mais en aucun cas ils ne présentent les trois pics caractéristiques des polyènes (**Martin, 1979 ; Badji, 2006**).

Les antifongiques de structure non-polyénique sont surtout représentés par la griséofulvine, active sur les dermatophytes. D'autres substances non-polyéniques, telles que le cycloheximide, l'azalomycine F ou la saramycétine n'ont que des applications limitées (**Bastide et al., 1986**).

II.1.4. Mode de résistance aux principaux antifongiques

Durant les années 1980 à 1990 une augmentation considérable du nombre de souches fongiques résistantes à été observée, accompagnée avec une large utilisation des antifongiques polyéniques mais surtout azolés qui a conduit à l'émergence d'espèces naturellement peu sensibles ou résistantes à ces molécules.

Comme dans toutes les conditions environnementales défavorables, l'exposition aux antifongiques actives des voies de réponse de stress qui confèrent une protection cellulaire immédiate et favorisent ainsi la survie de la levure. L'un des principaux régulateur de la signalisation cellulaire, elle régit la morphogénèse et influence la résistance aux antifongiques (**Sheikh et al., 2013**).

II.1.4.1. Les polyènes

Chez *Candida glabrata* ou encore *Aspergillus terreus*, la résistance aux polyènes est dépendent de la dose administrée, il semble également que d'autres aient un fort potentiel pour développer une résistance comme le cas *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, et *Candida krusei* (**Ellis, 2002**).

Un phénomène qui est qualifié de rare mais existant, il s'agit d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (**Figure 11**), les mécanismes de résistance aux polyènes sont décrits chez *Candida* et *Saccharomyces cerevisiae*, la délétion du gène ERG3 et ERG6 est responsable de ce type de résistance chez *C.albicans* (**Spamponato et Leonardi, 2013**).

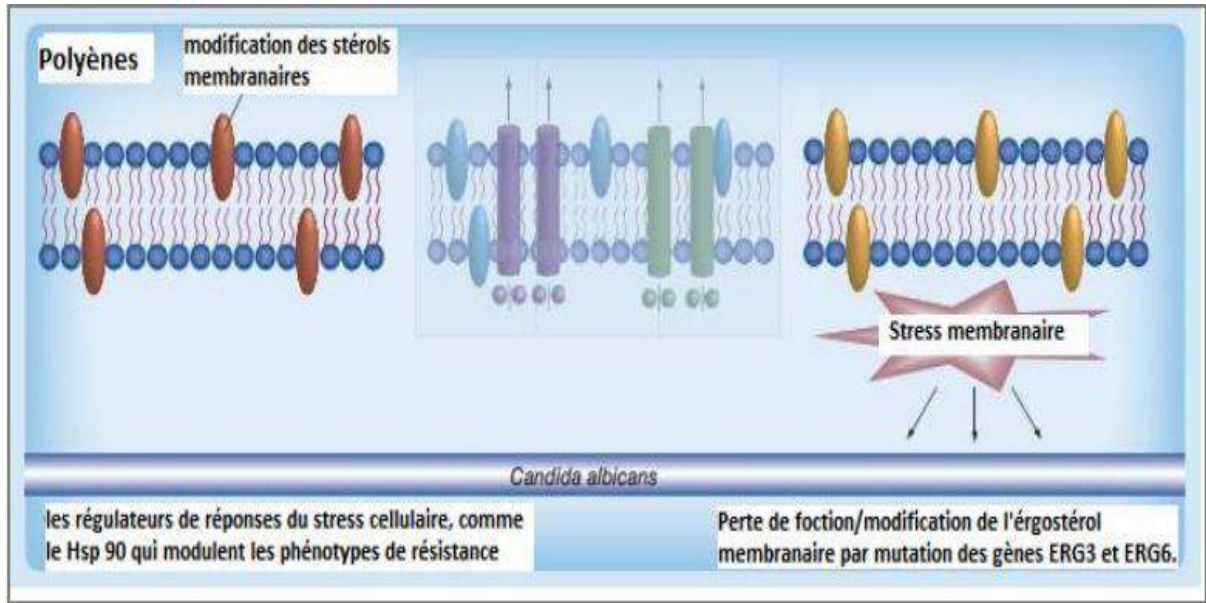


Figure 11 : mécanisme de résistance aux polyènes chez *C.albicans* (Lucy Xie et al., 2014).

II.1.4.2. Les fluoropyrimidines

La résistance peut être intrinsèque caractéristiques d'espèces comme chez *Candida tropicalis* ou acquise après exposition à l'antifongique, en raison de la complexité de son mode d'action, la résistance à la 5-fluorocytosine peut être regroupée en deux catégories :

La résistance peut survenir par mutation d'un gène codant pour l'enzyme impliquée dans le métabolisme de l'antifongique, ainsi le métabolisme le plus fréquent est une mutation sur le gène *FUR1* qui code pour l'uridine phosphoribosyl transférase (UPRT) (Spampinato et Leonardi, 2013).

Ou encore, à l'induction du métabolisme compétitif des pyrimidines, qui entraîne une compétition avec l'antifongique, ce mécanisme de résistance résulte d'une surexpression du gène *Cdc21* qui code pour la thymidylate synthétase (Vandeputte et al., 2010).

Le mécanisme de résistance au 5-fluorocytosine est résumé dans la (Figure 12).

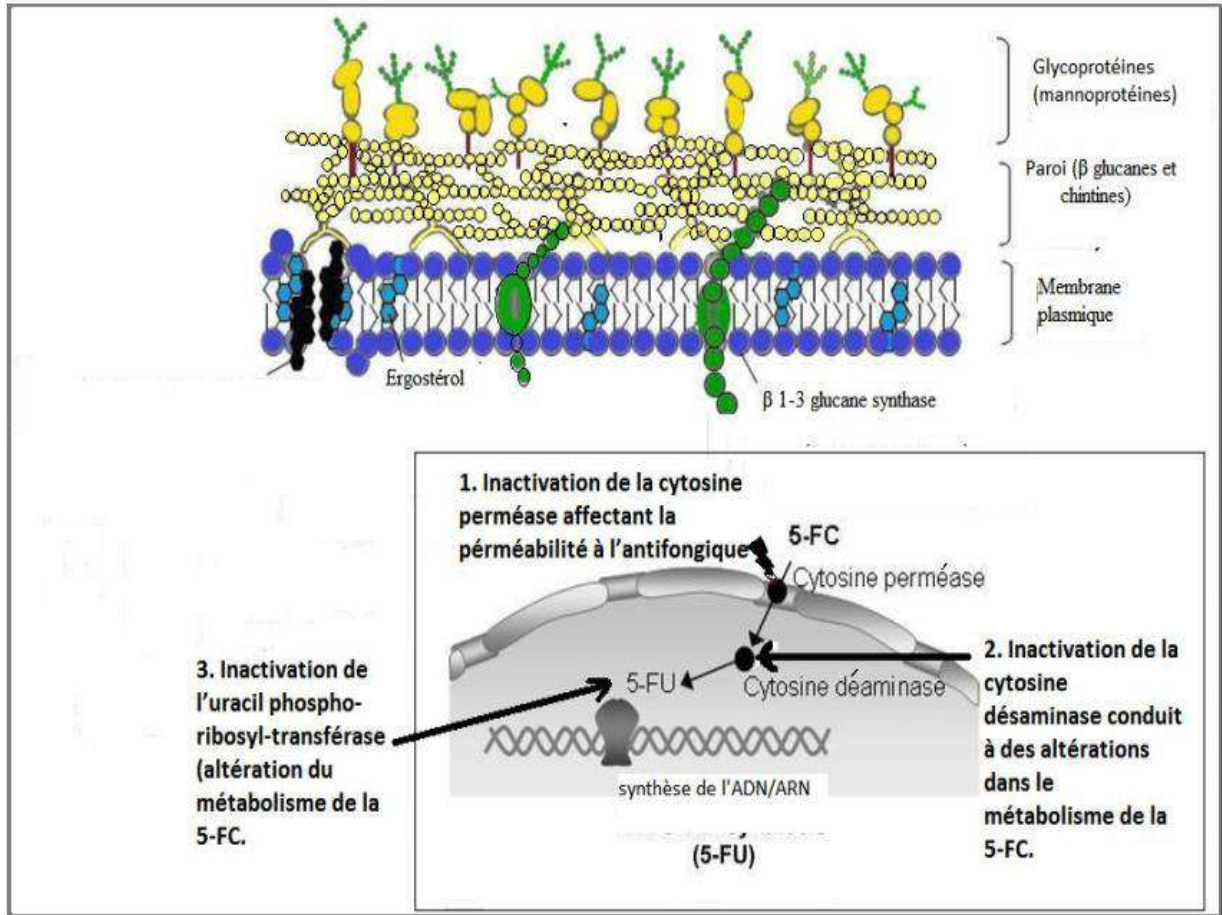


Figure 12 : Mécanisme de résistance aux 5-fluorocytosune (Ben-Ami et al., 2008).

II.1.4.3. Les azolés

Au début des années 1990 une augmentation considérable de la résistance observée, en raison de leur large prescription en thérapeutique, de nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'étudier les mécanismes de défense des champignons face à ces molécules (Figure 13) (Pham et al., 2014 ; Sanguinetti et al., 2005 ; Tobudic et al., 2012).

Les espèces du genre *Aspergillus* sont intrinséquement résistantes au fluconazole, mais sensibles à l'intraconazole, toutefois une résistance acquise peut survenir comme la conséquence de l'administration prolongée et ou de l'immunosuppression de l'hôte (Granier et al., 2003).

La résistance aux azolés par surexpression des pompes d'efflux représente le mécanisme le plus retrouvé chez les isolats cliniques des souches de *Candida* notamment *C.glabrata* et *C.albicans* les gènes responsables Crd1, Crd2 et Mdr1 codant pour des ABC protéines ont été identifiés (Kanafani et perfec, 2008).

Un mécanisme moins fréquent observé chez les mutants qui est le blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de la C5 stérol désaturase qui induit une résistance aux azolés, pour *C. albicans*, c'est la mutation du gène ERG3 qui aboutit à cette résistance (Tobudic et al., 2012).

Cette résistance peut également résulter de la multiplication du nombre de copies de la 14 α -déméthylase, de ce fait les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14 α -déméthylé, ainsi la surexpression du gène ERG11 par duplication chromosomique ou modification du promoteur, peut aboutir à la résistance aux azolés (Pfeller, 2012).

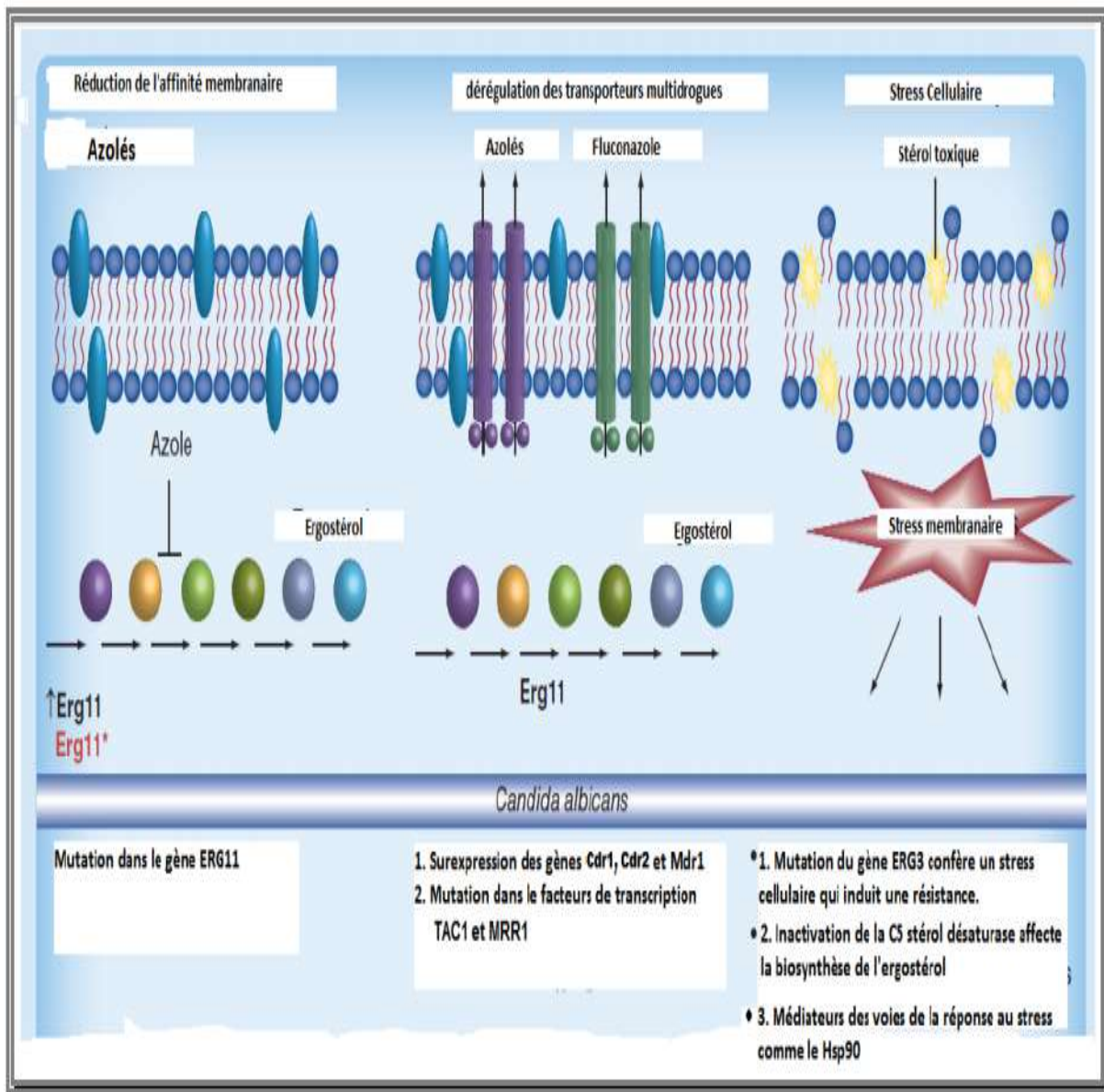


Figure 13 : mécanisme de résistance aux azolés chez *C.albicans* (Lucy Xie et al., 2014)

II.1.4.4. Les echinocandines

La résistance aux échinocandines reste un phénomène assez rare (**Espinel-Ingroff, 2008**), certains travaux ont pu mettre en évidence le mécanisme moléculaire de la résistance (Figure N° 14), il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS2 gène codant pour la β 1,3-glucane synthase chez *S.cerevisiae* et *C.albicans* (**Balashov et al., 2006 ; Park et al., 2005**), le mécanisme de résistance fut également observé chez *C. glabrata* (**Park et al., 2005**), et *C.krisei* (**Kahn et al., 2007**) .

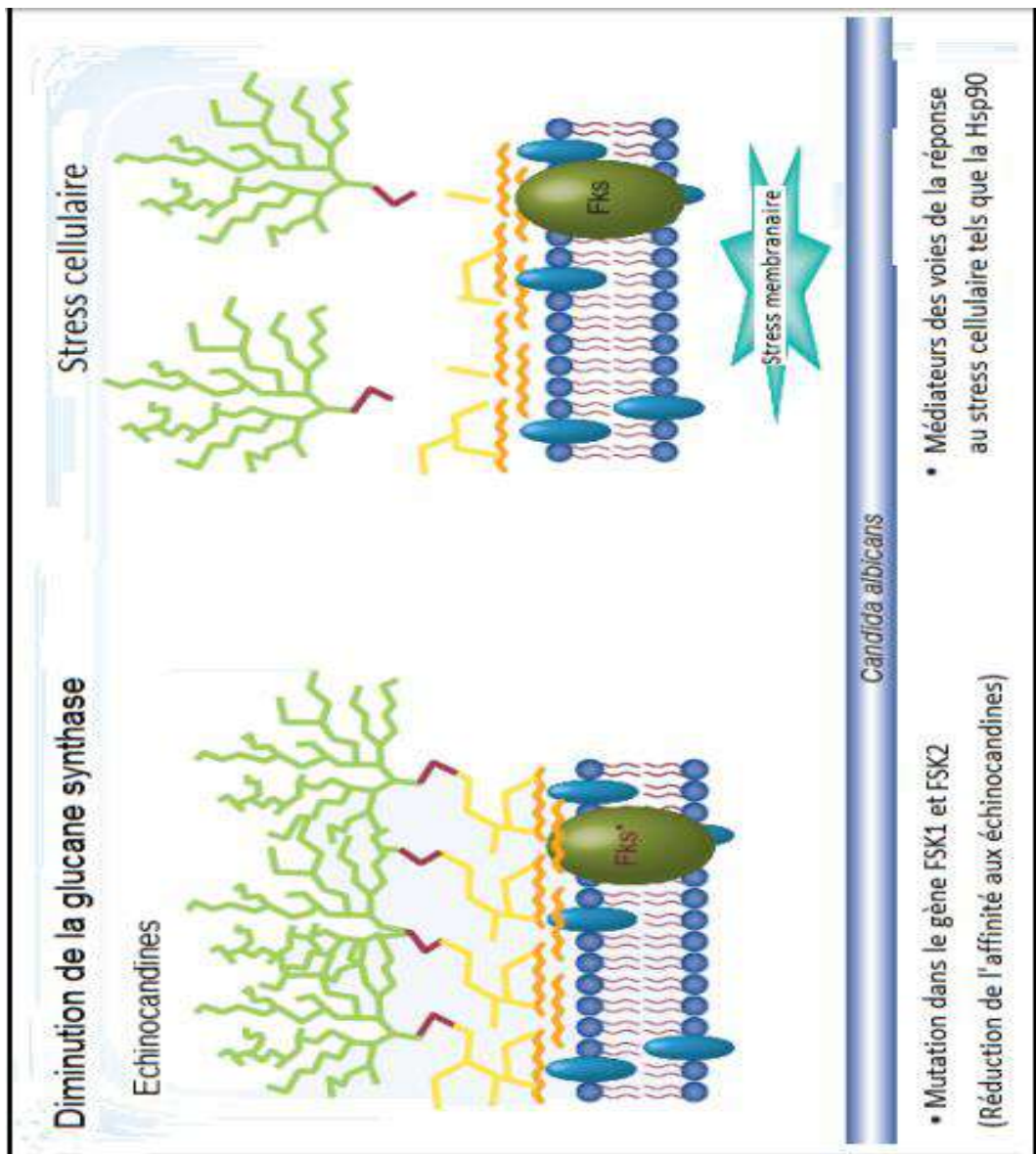


Figure 14 : Mécanismes de résistance aux échinocandines chez *C.albicans* (**Lucy Xie et al., 2014**)

II.1.5. Techniques d'étude et de caractérisation d'un antifongique

II.1.5.1. Extraction des antifongiques

A l'issue de la fermentation, la substance bioactive est présente à des concentrations relativement faibles dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules, des éléments du milieu et de nombreux métabolites. Le choix du solvant est primordial, celui-ci doit avoir non seulement une forte capacité d'extraction et une sécurité d'emploi, mais aussi assurer la stabilité des métabolites lors de l'extraction et de leur concentration par distillation (**Badji, 2006**).

La localisation des antimicrobiens peut être différente selon leur nature et le microorganisme producteur. C'est pour cette raison que les activités antibiotiques sont à rechercher aussi bien dans le filtrat que dans les cellules et même sur les parois de ces dernières (**Augustine et al., 2004**).

II.1.5.2. Purification des antifongiques

- **Purification par chromatographie sur couches minces et sur colonne**

Après extraction avec le meilleur solvant choisi, il est souvent indispensable d'effectuer une semi purification par filtration sur gel ou par chromatographies préparatives

- ✚ La filtration sur gel (séphadex, polyacrylamide, agarose, etc.) est un procédé qui permet de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire.
- ✚ Les méthodes chromatographiques préparatives sont utilisées pour séparer des molécules qui ont des propriétés physicochimiques voisines. Elles sont réalisées sur colonnes ou sur plaques épaisses de gel de silice (**Cappuccino et Sherman, 1999**).

- **Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

L'HPLC est une méthode d'analyse très sélective. Elle est utilisée comme dernière étape de purification car elle permet de séparer de nombreux produits, y compris des isomères d'un mélange complexe. Souvent, le travail s'effectue en phase inverse : la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire (**Badji, 2006**). La colonne C18 est très souvent utilisée pour séparer les antibiotiques qui sont généralement de polarité moyenne (**Zitouni, 2005**).

La phase mobile la plus utilisée est un gradient méthanol-eau. Lorsque l'équilibre entre la silice greffée et le mélange est établi, les constituants les moins polaires de la phase

éluant (solvant organique) s'adsorbent préférentiellement à la surface des chaînes hydrocarbonées. La phase inverse est la plus utilisée pour purifier les antibiotiques notamment ceux extraits par des solvants organiques à polarité faible ou moyenne (**Lamari, 2006**).

II.1.5.3. Identifications des antifongiques

- **Identification des molécules par des méthodes spectrales**

La spectroscopie d'adsorption est très utilisée dans les laboratoires pour identifier des substances ou pour les doser. Les mesures sont réalisées dans l'UV (190 à 400nm) et / ou dans le visible (100 à 800 nm).

- ✓ **Spectroscopie (UV-visible)**

La spectrométrie en UV-visible peut permettre d'identifier la classe de l'antibiotique inconnu par comparaison avec les spectres d'absorption connus et répertoriés. Cette étude permet de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260nm) et les systèmes insaturés dont certains (substances colorées) absorbent même dans le visible. Les polyènes qui absorbent entre 291 et 405 nm (**Dynia et Sztaricskai, 1986**) sont aisément détectés par spectroscopie UV-visible.

- ✓ **Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)**

Les absorptions dans l'infrarouge permettent de déterminer la présence de groupements et fonctions au sein d'une substance inconnue (CH₃, CH₂, CH, OH, NH₂, CHO, COOH, etc.), d'aromatiques, etc. Et ce, à l'aide de tables de corrélations (**Williams et Fleming, 1989**).

Le domaine des infrarouges s'étend du spectre visible (environ 400 à 900 nm) jusqu'aux ondes hertziennes (environ 1010 à 1011nm), assurant ainsi la continuité du spectre des radiations électromagnétiques (**Pouilly, 2009**).

- ✓ **Spectrophotométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de caractériser des molécules purifiées ou présentes en très faible quantité, de l'ordre du femtomole (soit 10⁻¹⁵), au sein d'un mélange. Cette technologie nécessite que les biomolécules soient volatilisées et ionisées pour être analysées (**Auvin-Guette, 2002**). Il existe deux méthodes différentes pour

ioniser les biomolécules qui permettent d'avoir les masses molaires et parfois même la structure des substances analysées avec une grande certitude. Les plus utilisées pour l'étude des antibiotiques sont l'ionisation chimique (IC), l'ionisation par bombardement rapide des atomes (FAB), l'impact électronique et l'électrospray (**Deshayes *et al.*, 1989**).

✓ **Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique polyvalente utile aussi bien en analyse quantitative que structurale. Elle est généralement utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie classiques et de la spectrométrie de masse pour localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié. Le spectre RMN est constitué d'un diagramme représentant des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques de l'échantillon. Pour obtenir ces signaux, l'échantillon est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques dont l'un est intense et fixe, tandis que l'autre est environ 10.000 fois plus faible et variable (**Diop, 1998**).

II.2. Les substances antibiotiques

II.2.1. Les infections bactériennes et l'antibiothérapie

Les systèmes de santé, dans le monde en générale et en Algérie en particulier continuent d'être confrontés à de nouveaux défis et le plus important d'entre eux est celui des maladies infectieuses.

En effet, les maladies infectieuses, censées être vaincues par le progrès en matière d'hygiène, les succès réels dans le domaine de la prévention et des traitements antibiotiques, le développement des vaccins et l'amélioration des conditions de vie en général, demeurent la principale cause de mortalité dans le monde selon l'OMS avec 14,7 millions de morts en 2001 soit 26 % de la mortalité mondiale.

Elle comporte un risque de prolifération rapide, d'émergence ou de réémergence du fait principalement des changements environnementaux et sociaux associés à la rapidité, la facilité et à l'intensité accrue des transports internationaux qui favorisent la dissémination rapide des phénomènes épidémiques.

L'émergence des résistances aux médicaments anti-infectieux se développe en raison de leur pression de sélection mais aussi de leur mauvaise utilisation. Enfin, les

maladies infectieuses se caractérisent par des disparités, souvent importantes, entre les pays dans l'élaboration et la mise en œuvre des stratégies de lutte.

Il est donc essentiel de reconnaître leur importance, de prendre la mesure de leurs risques, et de mettre en œuvre des politiques adéquates de lutte et de prévention à l'échelon national, régionale et internationale (**Mesbah, 2009**).

II.2.2. Situation épidémiologique en Algérie

L'Algérie, aujourd'hui, poursuit sa phase de transition épidémiologique qui est marquée depuis deux décennies par la persistance de certaines maladies transmissibles avec des bouffées épidémiques (fièvre typhoïde, brucellose), par la résurgence sous forme d'une flambée épidémique de maladies infectieuses telles la diphtérie, la rougeole et même de maladies devenues rarissime comme le botulisme en 1998, et la peste en 2003. Cette situation illustre l'importance du défi auquel l'Algérie est confrontée (**Mesbah, 2009**).

II.2.3. Définition des antibiotiques

A l'origine, le mot antibiotique désigne tout produit microbien qui, même de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large pour inclure en outre toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (**Singleton, 1994**).

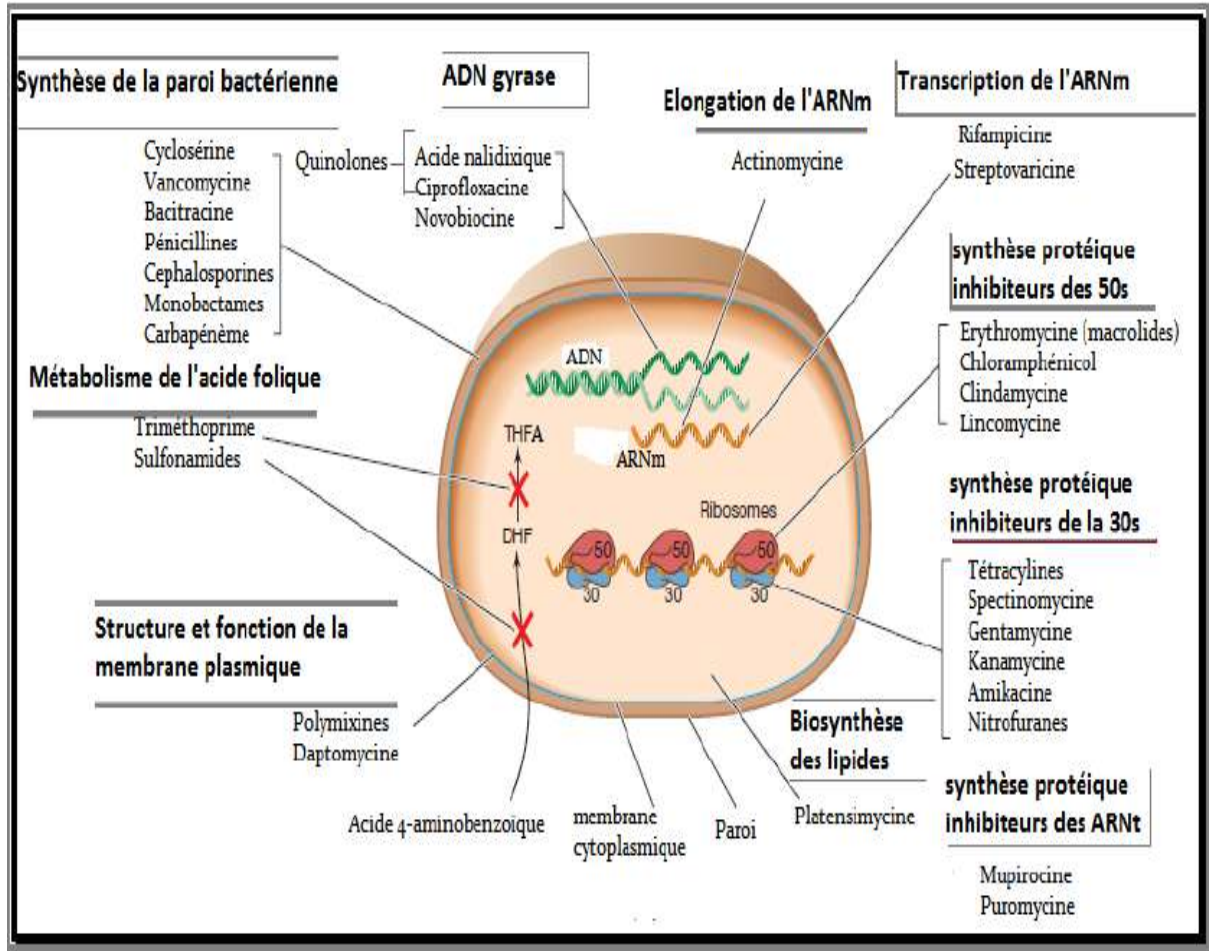
II.2.4. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (**Yala et al., 2001**). La sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques est très diverse, les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative peuvent avoir un comportement différent vis-à-vis un antibiotique spécifique, alors que certains antibiotiques à large spectre présentent la même efficacité sur ces deux groupes (**Madigan et al., 1997**).

Théoriquement, les agents antimicrobiens visent la destruction des agents agresseurs en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique, ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et leurs fonctions.

II.2.5. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les mécanismes d'action des principaux antibiotiques au niveau de la cellule bactérienne sont illustrés par la **Figure 15**.



DHF : acide dihydrofolique ; THFA : acide tétrahydrofolique (précurseur de l'acide folique).

Figure 15 : Mécanisme d'action des principaux antibiotiques (Madigan et al., 2012).

II.2.5.1. La résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance bactérienne aux antibiotiques est principalement rencontrée chez les microorganismes pathogènes, spécialement aux soins intensifs, elle se présente par plusieurs formes et fait intervenir une multitude de mécanismes.

II.2.5.2. Types de résistances

A. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est présent chez toutes les souches d'une espèce bactérienne donné, par exemple le cas d'une protéine innée empêchant l'antibiotique

d'accéder à sa cible, c'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aerogenosa* face à l'ampicilline (**Madigan et al., 2012**).

B. La résistance acquise

La résistance acquise est apparue avec l'emploi d'une antibiothérapie chez une espèce bactérienne initialement sensible, elle est donc évolutive, il en existe deux types.

- ❖ **Chromosomique** : conséquence d'une mutation qui apparaît dans le chromosome, elle peut inclure toute la famille d'un antibiotique, c'est un processus spontané qui se produit par exemple dans le gène qui code pour une protéine ciblée par l'antibiotique, rendant ce dernier inefficace contre ce mutant.

- ❖ **Plasmidique** : le plasmide qui contient le gène de résistance peut se transmettre en générale par conjugaison permettant ainsi la propagation rapide des résistances, souvent plusieurs gènes de résistance peuvent se regrouper chez un seul plasmide (**Madigan et al., 2012**).

II.2.6. Principaux mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques

II.2.6.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Dans l'espace extracellulaire (bactéries Gram positives) ou périplasmique (bactéries Gram négatives), les pénicillines peuvent rencontrer des β -lactamase de l'antibiotique (**Gaudy et buxeraud, 2005**)

II.2.6.2. Modification de la cible

Celle-ci peut se produire à la suite d'une seule mutation sur le site de fixation de l'antibiotique, la résistance est consécutive à la diminution de l'affinité du β -lactame vis-à-vis des PLP (protéine liant les pénicillines), une augmentation de la biosynthèse des PLP ou l'induction de nouvelles PLP de faible affinité pour l'antibiotique. Chez les Gram positifs, ces

divers mécanismes sont à la base de la résistance de *Staphylococcus aureus*, de *Streptococcus pneumoniae* et des entérocoques (**Gaudy et Buxeraud, 2005**).

II.2.6.3. Mécanisme d'efflux

Par rejet l'antibiotique une fois qu'il parvient à entrer dans la cellule, par le biais de «pompes effluentes» présentes dans la membrane plasmidique, des transloquases qui permettent d'expulser l'antibiotique, ce mécanisme se trouve notamment chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* et *Staphylococcus aureus* (**Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott et al., 2003**).

II.2.6.4. Diminution de la perméabilité membranaire (absence de pénétration)

Ce phénomène peut être naturel ou acquis, certains antibiotiques ne pénètrent dans la cellule que grâce à une perméase spécifique, c'est le cas de la streptomycine, l'absence ou le non fonctionnement de cette perméase rend la cellule imperméable à l'antibiotique en question (**Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott et al., 2003**).

MATERIEL
ET
METHODES

I. Matériels et méthodes

I.1. Objectif

L'objectif principal de ce travail est de :

- ✓ Rechercher un effet antifongique chez des actinomycètes isolés à partir des sols arides algériens.

- ✓ Production, extraction et caractérisation partielle de la molécule antimicrobienne produite lors d'un effet antifongique positif.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques du département de biologie de l'université Dr. MOULAY TAHAR – Saida, pendant la période allant de Janvier à Mai 2017.

I.2. Criblage des souches actinomycétales

I.2.1. Origine des souches

Les isolats actinomycétales étudiées sont fournies par le promoteur, celles-ci ont été isolées d'échantillons de sols arides algériens de la région d'Ain Loarak, Sebkha de Bougtob et 'El Bayadh, elles sont codées (**A2-A30**) et conservées dans des tubes de gélose inclinée contenant le milieu ISP2 préconisés lors de « l'International *Streptomyces* Project » ou ISP (**Shirling et Gottlieb, 1966**) en tubes inclinés.

I.2.2. Revivification des souches

Les isolats actinomycétales sont ensemencées sur boîtes de Pétri par stries serrés sur milieu ISP2 et Bennet, puis incubées à 28°C pendant 14 jours. La composition des milieux de culture est donnée en annexe.

I.2.3. Confirmation de l'identité des souches d'actinomycètes

Une étude morphologique et culturale est réalisée après la revivification des souches d'actinomycètes dans le but de confirmer l'identité de ces dernières.

I.2.3.1. Macromorphologie

Cette étude consiste à déterminer la couleur du mycélium aérien et du mycélium du substrat ainsi que celle des pigments solubles produits, sur les deux milieux de culture : ISP2 et Bennet après vérification de leur stérilité. L'ensemencement se fait par stries serrés à partir d'une colonie prélevée des tubes contenant les souches préalablement purifiées. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 14 à 21 jours (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Smaoui, 2010**).

Les colonies des actinomycètes sont observées et comptées à partir du troisième jour jusqu'au bout de l'incubation.

I.2.4. 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 (Bastide *et al.*, 1986).

I.2.4.1. Purification et confirmation de l'identité des souches cibles

➤ Microorganismes cibles

Les six souches fongique cibles sont fournis gracieusement du laboratoire de recherche des ressources végétales et la sécurité alimentaire des zones semi-arides du sud ouest algérienne université de Béchar, les champignons sont obtenus sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (voir composition en annexe).

Tableau 06 : les souches fongiques cibles du test d'antagonisme.

| Nom de la souche | La famille |
|------------------------------|----------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Monoliaceae |
| <i>Aspergillus niger</i> | Trichocomaceae |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Trichocomaceae |
| <i>Alternaria alternata</i> | Pleosporaceae |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | Mucoraceae |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | Dividiellaceae |

➤ Purification des souches cibles

Afin de vérifier leur pureté les souches fongiques cibles (*F.oxysporum*, *A.niger*, *A.alternata*, *R.stolonifer*, et *C.herbarum*) sont repiquées sur milieu PDA, l'ensemencement est réalisé par le dépôt d'un cylindre mycélien au centre des boîtes Pétri qui sont ensuite incubées à 25°C pendant 5 jours (Botton *et al.*, 1990).

➤ 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**).

I.2.4.2. Préparation des suspensions fongiques

Des suspensions sporales des souches cibles (*F.oxysporum*, *A.niger*, *A.alternata*, *R.stolonifer*, et *C.herbarum*) 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.

I.2.4.3. Technique des cylindres d'agar

Cette méthode consiste à ensemencer les souches fongiques-tests sur milieu ISP2 en stries très serrées, puis à les incubé pendant 14 jours à 28°C (**Hwang et Lee, 2002**).

Au bout de l'incubation, des cylindres de gélose de 6 mm 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 PDA préalablement ensemencé par les suspensions fongiques des germes cibles à l'aide d'écouvillons stériles afin d'obtenir un tapis.

Les boîtes 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 (**Lemriss et al., 2003**).

Afin d'alléger le travail, deux isolats actinomycétales ayant montré une bonne activité lors du test ci-dessus sont retenues pour le reste du travail.

I.2.5. Étude taxonomique des actinomycètes sélectionnées

Après avoir sélectionné deux souches d'actinomycètes, celles-ci sont soumises à une étude taxonomique selon le Bergey's Manual of identification afin de permettre une pré-identification.

I.2.5.1. Étude Micromorphologique

Cette étude est réalisée sur les souches sélectionnées sur le milieu ISP2, après une incubation de 7 jours afin d'obtenir des cellules matures. À l'aide d'un microscope optique, et après coloration de Gram qui est une double coloration permettant la mise en évidence des caractéristiques de la paroi bactérienne, afin de pouvoir classifier ce groupe bactérien, en utilisant différents grossissements (10x10), (10x40) et (10x100) (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Ceci, permettra de voir le type de coloration, les structures en place, la sporulation caractéristique des souches étudiées, ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

I.2.5.2. Études des caractères biochimique des souches étudiées

➤ Profil fermentaire (API 20 E)

Les tests biochimiques : recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres (Glucose, Saccharose, mannitol Rhamnose, Inositol, Mélibiose, Arabinose, Sorbitol et Amygladine) ont été réalisés en utilisant la plaque API 20E. La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans l'API médium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation de 24 heures à 30°C se traduisent par des virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (**Biomérieux, 2006**).

➤ Profil anzymatique (API Zym)

Le profil enzymatique des souches actinomycètes a été étudié grâce aux galeries API ZYM. En effet, la galerie API ZYM est une microméthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques.

Elle permet d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques dont celle de la b-glucosidase et de l'estérase, enzymes impliquées dans la dégradation de l'oleuropéine.

Pour chaque souche, une suspension bactérienne a été préparée à partir de cultures en bouillon ISP2 de 3 jours. Puis cette suspension a été distribuée dans les 20 puits de la galerie API ZYM à raison de 65 µl par puits. La galerie a ensuite été incubée 24h à 28 °C.

Après incubation, une goutte de réactif ZYM A et une goutte de réactif ZYM B ont été ajoutées dans chaque puits afin de développer les colorations révélant les activités enzymatiques. Après 10 minutes, la lecture des galeries a pu être effectuée : les activités enzymatiques positives ont été révélées par une coloration violette, orange, bleue ou marron selon les puits (**Biomérieux, 2006**).

I.2.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes retenues

Les isolats retenus sont, ensemencés sur ISP2 en stries serrées à 28°C pendant 14 jours, afin de tester leur activité antibiotique contre plusieurs souches bactériennes.

I.2.6.1. Purification et confirmation des souches bactériennes cibles

Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, huit souches bactérienne ont été utilisées dont cinq souches à Gram négatif: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Acinetobacter baumannii*, ainsi que trois souches à Gram positif : *Bacillus subtilis* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Afin de purifier les souches tests préalablement conservé sur gélose nutritive (GN) (voir la composition en annexe) en tube incliné, une colonie est prélevée de ce denier et repiquée dans 8 ml de Bouillon nutritif et incubée pendant 18h à 37°C, cette suspension bactérienne servira à ensemencer des boîtes contenant la gélose nutritive par la méthode des quadrants afin d'obtenir des cultures pures aux colonies bien distinctes (**Andriambololona, 2010**).

La pureté des souches sera ensuite confirmée par une coloration de Gram, une observation microscopique ainsi que par le test de catalase (**Camille, 2007**).

I.2.6.2. Préparation des suspensions bactériennes

A partir des souches préalablement purifiées, un prélèvement de 5 colonies bien isolées est réalisé pour chaque espèce bactérienne à l'aide d'une anse de platine dans 10 ml d'eau physiologique stérile (équivalent de 0,5 Mc Farland), puis mélangé par vortex afin d'obtenir une suspension bactérienne bien homogène.

I.2.6.3. Test de l'activité antibiotique des souches actinomycètes sélectionnées

L'activité antibactérienne des souches actinomycètes sélectionnées est testée par la méthode des cylindres d'agar cité dans (**La section I.1.4**), sauf que les germes cibles sont ensemencés par écouvillonnage sur gélose Mueller-Hinton (MH) (voir la composition en annexe) selon la technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (**Kitouni, 2005**)

Les boîtes sont placées à 4°C pour permettre une diffusion des substances bioactives synthétisées par les souches actinomycètes, puis elles sont incubées à 37°C ; les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés après 24 heures d'incubation (**Petrosyan et al., 2003**).

I.3. Production des métabolites bioactives sur milieu solide

Cette étude est réalisée uniquement pour les souches sélectionnées par le test sur milieu solide, en égard à leur activité antagoniste vis-à-vis des souches fongiques cibles. Les deux souches d'actinomycètes sélectionnées sont ensemencées chacune sur 40 boîtes contenant le milieu solide ISP2 en stries serrées et incubées pendant 14 jours à 28°C (**Boughachiche, 2012**).

I.3.1. L'extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide

Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction, deux solvants organiques à polarité différente ont été utilisés : acétate d'éthyle et méthanol. Pour cela, l'extraction de chaque souche se fera par un solvant donné.

I.3.1.1. Extraction des métabolites de fermentation par le méthanol

La gélose contenue dans les boîtes de pétri est fragmentée et récupérée dans des flacons stérile à raison de 20 ml de méthanol pour chaque boîte, ces flacons sont maintenus à température ambiante pendant 2h tout en agitant vigoureusement, puis filtré à l'aide de papier Wattman afin d'éliminer tout les résidus de gélose (**Boughachiche, 2012**).

Ce filtrat est ensuite chauffé à une température de 40°C afin d'évaporer le méthanol. L'extrait méthanolique devenu alors visqueux est récupéré dans 15 ml de méthanol (**Wink, 2014**).

I.3.1.2. Extraction des métabolites de fermentation par l'acétate d'éthyle

La gélose contenue dans les boîtes de pétri est fragmentée et récupérée dans des flacons stériles à raison de 20 ml d'acétate d'éthyle pour chaque boîte. Les flacons contenant ce mélange sont maintenus sous agitation à température ambiante pendant seulement 15 minutes. Les extraits sont filtrés à l'aide de papier Wattman afin d'éliminer les résidus de la gélose (**Boughachiche, 2012**), puis le filtrat est chauffé à 40° C afin d'évaporer l'acétate d'éthyle, l'extrait est alors récupéré dans 15 ml d'acétate d'éthyle et 5 ml de méthanol (**Wink, 2014**).

Les extraits ainsi récupérés sont centrifugés une première fois à 9000 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré puis centrifugé une deuxième fois à 11000 RPM pendant 10 minutes afin d'éliminer tous les débris cellulaires (**Wink, 2014**).

I.4. Tests de l'activité antibactérienne des extraits bruts

L'activité antibactérienne des extraits bruts est testée sur les souches suivantes :

- *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115),
- *Bacillus subtilis* (ATCC10876).
- *Salmonella Typhi*.

I.4.1. Test de l'activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des puits (kitouni, 2005).

Ces tests sont effectués sur milieu Mueller-Hinton, ensemencé par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 8 ml d'eau physiologique inoculée par 5 colonies distinctes (équivalent de 0,5 Mc Farland) de la souche bactérienne purifiée sur gélose nutritive. L'ensemencement par écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne préalablement préparée se fera de la technique NCCLS citée précédemment pour les tests des cylindres d'agar.

Les puits dans la gélose MH sont effectués après séchage de l'inoculum à l'aide d'un emporte pièce de 6 mm de diamètre, ces puits sont remplis par 30 µl de chaque extrait brut provenant de chaque souche séparément, des puits contenant les témoins des solvants d'extractions à savoir 30 µl de méthanol et 30 µl d'acétate d'éthyle - méthanol : (3-1), les témoins auront pour but de déterminer si les solvants ont une activité inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes cibles. Les boîtes Pétri sont ensuite placées à 4°C pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion des extraits dans la gélose puis incubées à 37°C pendant 24h.

Le résultat positif de l'activité sera démontré par la formation de zones d'inhibitions autour des puits contenant les extraits.

I.5. 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 fongique 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.

I.5.1. Préparation des souches fongiques cibles

Les souches utilisées pour testé l'effet antifongique ont gracieusement été fournies par notre professeur Dr. Adli :

- *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174)
- *Penicillium expansum* (CECT 2278)
- *Fusarium graminearum* (CECT 2150)

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.

I.5.2. Identification macroscopique et microscopique des souches cible

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.

I.5.3. La technique du contact direct

Selon la méthode de Fandohan et al., 2004. L'effet inhibiteur des extraits est étudié à des concentrations de **25, 12,5, 6,25, 2,5 µl/ml**, ces dernières sont obtenues par l'addition de **50, 125, 250, 500 µl** de l'extrait brut à 20 ml de milieu PDA acidifié réparti dans des tubes stériles et maintenue en surfusion à 45°C, ce mélange est vortexé afin d'assurer son homogénéité, puis coulé sur boîte Pétri.

L'inoculation des boîtes se fait par le dépôt au centre de la boîte d'un cylindre mycélien d'environ 6mm de diamètre provenant de la périphérie de la pré-culture de 3 à 5 jours.

deux boîtes Petri recevront respectivement 500µl de chaque solvant utilisé lors de l'extraction (Méthanol, Acétate d'éthyle) additionné à 20 ml de milieu PDA, pour chaque souche test, afin de déterminer s'il existe une activité inhibitrice du solvant sur celle-ci. L'incubation des boîtes se fera à une température de 28°C ± 4°C pendant 3 à 5 jours (Wang et al., 2005).

La lecture est réalisée à partir du 3ème jour en mesurant les diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au témoin et le pourcentage d'inhibition mycélienne est calculé par la formule suivante :

$$T = \frac{1-Da}{Db} \times 100$$

Avec:

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da: le diamètre de la zone de croissance de l'essai.

Db: le diamètre de la zone de croissance du témoin.

I.5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur microplaque (Beddou, 2015).

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 des extraits bruts vis-à-vis des souches tests.

I.5.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Afin de préparer la suspension bactérienne, cinq colonies sont prélevées à partir d'une culture pure de la souche cible dans 5 ml de bouillon Mueller-Hinton (MHB). La suspension doit être homogénéisée par Vortex avant l'ensemencement de la microplaque.

I.5.4.2. Préparation de la microplaque

Chaque microplaque va servir à tester un extrait donné sur les quatre souches de bactéries pathogènes citées plus haut, pour cela 100 µl de (MHB) 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, de ce fait, 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 MHB déjà existants dans le puits, du même puits 100µl du mélange (extrait + MHB) 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 (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**).

Les puits de la colonne 11 et 12 serviront respectivement de : témoin de culture (200µl de MHB + inoculum bactérien) afin de mettre en évidence la croissance bactérienne sans antibiotique et de témoin de stérilité (200µl de MHB seul) comme contrôle de contamination de la microplaque.

Une dilution de l'extrait est réalisée selon le tableau suivant de (100 µL à 0,19 µl) (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Les 10 dilutions des extraits bruts des CMI.

| N° DU PUIITS | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-----|----|----|------|------|-------|------|------|------|------|----|----|
| Dilutions (µl) | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | 0,39 | 0,19 | Tc | Ts |

Tc : témoin de culture, Ts : témoin de stérilité.

I.5.4.3. 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 bactérienne dans chaque puits à partir du puits de la colonne 1 jusqu'au puits de la colonne 11. Ce protocole se répètera pour les 4 souches bactériennes test.

Une fois l'inoculation effective et le couvercle scellé en asepsie la microplaque sera incubée dans une étuve à 37°C pendant 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), qui se confirmera par la recherche de (CMB).

I.5.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide

La concentration minimale bactéricide (CMB), est la plus petite concentration d'une substance bioactive capable d'entraîner une inhibition irréversible de la croissance bactérienne (mort bactérienne).

La détermination de la CMB des trois extraits ce fera par le transfert de 50µl des puits de la microplaque après incubations de 24h à 37°C et lecture, sur gélose Mueller-Hinton coulée sur boite Petri, cette boite sera dévisée en quatre. Le premier quart recevra 50µl du puits représentant la CMI, deux quarts receveront respectivement 50 µl des deux concentrations précédant la CMI et le dernier quart recevra 50 µl du puits suivant la CMI. L'incubation se fera à 37°C pendant 24h (**Abedini, 2014**).

Après l'incubation, le quart qui ne contiendra aucune colonie bactérienne, indiquera que la concentration contenue dans ce puits est la concentration minimale bactericide.

I.6. Caractérisation préliminaire de l'agent antimicrobien par chromatographie sur couche mince

I.6.1. Principe de la CCM

la chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation qui repose principalement sur les phénomènes d'adsorption, dont la phase mobile est un solvant ou un système solvant (mélange de deux ou plusieurs solvants de différentes polarités) qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque en verre, en plastique ou en aluminium, chaque composant de l'échantillon à analyser va se déplacer le long de la phase stationnaire transportés par la phase mobile avec une vitesse inversement proportionnelle à l'affinité existant entre le composant et la phase stationnaire (Andriambololona, 2010).

La migration des composants va être évalué à la fin de l'opération par le rapport frontal ceci est donné par la relation suivante :

$$\text{Rapport frontal} = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

I.6.1.1. Mode opératoire

A l'aide d'une micropipette, les extraits bruts des différents solvants sont déposés sur la ligne de dépôt sous forme de spots sur les plaques (Boudjella et al., 2006). Ces dernières sont placées dans des cuves chromatographiques dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec différents systèmes solvants.

I.6.2. Choix du système solvant

Afin de choisir un système solvant permettant une bonne séparation des différents composants des extraits et en se basant sur des travaux déjà réalisés dans la séparation des molécules bioactives, nous avons utilisés les systèmes solvants suivants :

Tableau 08 : Les systèmes solvants employé pour la séparation par CCM

| Système solvant | rapport (v/v) | référence |
|--------------------|---------------|--|
| Acétonitrile – Eau | (70 : 30) | Tighidet, 2011 d'après Boudjella, 2007, et Hozzein <i>et al.</i> , 2011. |
| Acétonitrile – Eau | (90: 10) | |

Après développement, et au moment où le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt, les plaques sont mises à sécher, dans le but d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme test lors de la bioautographie (**Boughachiche, 2012**).

Une fois séchées, les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 365 nm et pouvoir calculer le RF de chacune d'entre elles (**Boudjella et al., 2006**).

Les tâches sont alors délimitées, ce qui permettra de situer nos molécules bioactives entre elles et par rapport aux composés non actifs. Ceci facilitera ultérieurement le processus de purification.

I.6.3. La bioautographie

Chaque tache apparue sur la plaque de silice après la migration, est découpée séparément afin de déterminer si celle-ci possède une activité antimicrobienne, la mise en évidence de cette activité se fait par le dépôt des bandelettes contenant les différentes taches à la surface d'une gélose Mueller-Hinton ensemencée par écouvillonnage selon la méthode NCCLS ,à partir d'une suspension bactérienne, préparée par 8 ml d'eau physiologique contenant 5 colonies bien distinctes provenant d'une culture pure du germe cible (équivalent à 0,5 Mc Farland) (**Hozzein et al., 2011 ; Kitouni, 2007**).

Après une diffusion de 2h à 4°C, les boîtes sont incubées a une température de 37°C pendant 24h. L'apparition de zones d'inhibition autour des bandelettes indiquera une activité antimicrobienne.

I.7. La semi-purification des fractions séparées par CCM

Les trois extraits bruts sont semi-purifiés sur couche mince de silice, par chromatographie et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes des fractions séparées afin de pouvoir déterminer lesquelles d'entre elles sont bioactives.

Un volume de 250 à 600 µl de chaque extrait concentré est déposé en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné au préalable, afin de localiser avec précision les taches correspondant aux différents composants séparés (une bioautographie est toujours réalisée en parallèle).

Une fois la migration terminée, la silice montrant des taches est alors récupérée, en découpant la feuille en bandelettes au niveau de chaque tache, celles-ci sont introduites séparément dans des tubes secs contenant chacun 2 ml de méthanol (**Boucheffa, 2011 ; Tighidet, 2011**), une fois la silice complètement dissoute dans le méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée par filtration .

Les filtrats méthanoliques limpides sont recueillis et leur activité est contrôlée (**Lamari, 2006**).

I.8. Contrôle de l'activité de chaque composants séparés

Après l'extraction et la semi-purification des fractions séparée, il est indispensable de tester l'activité inhibitrice de celles-ci, par la méthode des puits sur gélose MHensemencé par écouvillonnage selon la méthode NCCLS à partir d'une suspension bactérienne préparée à partir d'une culture pure du germe cible le plus sensible (**Lamari, 2006 ; Tighidet, 2011**).

Chaque puits recevra le volume de 20 µl de chaque fraction séparée par chromatographie précédemment, l'existence d'un puits témoin contenant le même volume de méthanol est indispensable afin de démontrer si ce dernier a une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche cible testée.

Les boîtes sont ensuite déposées à une température de 4°C pendant 2h pour permettre une bonne diffusion des substances dans la gélose. L'incubation se fait ensuite à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont mesurés en mm.

II. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

II.1. Criblage des souches actinomycètes

II.1.1. Résultat de la revivification des souches

Au bout d'une incubation de 2 jours à 28°C, les actinomycètes apparaissent, sur milieu ISP2 et Bennet et se développent lentement. Les colonies ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique aux actinomycètes. Elles apparaissent ronde, de texture sèches ou rugueuses, colorées ou non, incrustées dans la gélose. Certaines d'entre elles montrent seulement un mycélium de substrat.

II.1.1.1. Confirmation de l'identité des souches d'actinomycètes

Le résultat d'une étude morphologique et culturale est démontré dans (**Tableau 09**) et (**Figure 16**).

Tableau 09: Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches revivifiées.

| Code des souches | ISP2 | Bennet | MS | MA | Pigment diffusibles |
|------------------|------|--------|-----------------|--------------|---------------------|
| A2 | + | - | Rouge foncé | Blanc | marron |
| A4 | + | - | Blanc | Beige jaune | beige |
| A7 | ++ | - | Marron | Beige | - |
| A8 | - | - | / | / | - |
| A9 | - | - | / | / | - |
| A13 | + | - | beige | Marron clair | - |
| A14 | + | - | Gris blanchâtre | Beige | - |
| A18 | ++ | - | Blanc gris | Gris | Marron rougeâtre |
| A20 | + | - | orange | Beige | - |
| A26 | ++ | - | gris | blanc | - |
| A30 | ++ | - | Marron | Beige | - |

(MA) : Mycélium aérien, (MS) : Mycélium de substrat.

Après l'ensemencement des 11 souches d'actinomycètes sur les deux milieux ISP2 et Bennet, des colonies apparaissent après 48h d'incubation à 28°C sur le milieu ISP2 tandis que le milieu Bennet ne montre qu'un faible développement de croissance.



A2



A4



A7



A13



A14



A18



A20



A26

Figure 16 : Aspect culturale sur milieu ISP2 pour les souches actinomycétales revivifiées.

Une augmentation du nombre de colonie est observée sur le milieu ISP2 à partir du troisième jour d'incubation, tandis qu'une absence de croissance persiste sur le milieu Bennet.

Une croissance importante est remarquée à partir du septième jour avec un début de production de pigment pour les souches **A2, A4 et A18**, sauf pour souches **A8 et A9** qui ont montrées une très faible croissance sur le milieu ISP2 est une absence totale de croissance sur le milieu Bennet.

Au dernier jour d'incubation, les cultures apparues sur le milieu ISP2 sont des colonies de différentes tailles avec le même aspect rugueux et poudreux à la surface, incrustées dans la gélose avec production de pigments diffusibles pour les souches **A2, A4 et A18**. La souche **A8 et A9** ont été éliminé à cause de leur très faible croissance sur les deux milieux.



II.1.2. Mise en évidence de l'activité antifongique des souches actinomycètes







Un criblage préliminaire pour la recherche d'activité antifongique a été effectué sur les 9 souches préalablement revivifiées. La technique utilisée pour la mise en évidence des antagonismes est celle des cylindres d'agar.



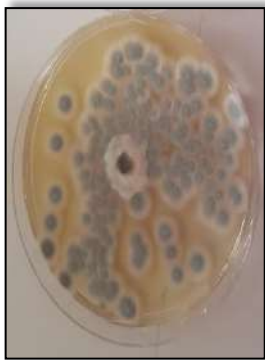



II.1.2.1. Résultat de la purification et confirmation de l'identité des souches cibles

Après cinq jours d'incubation à 28°C, les cinq souches cibles repiquées sur le milieu PDA ont montrées des caractéristiques culturelles et microscopiques spécifiques à chacune d'entre elles (**Tableau 10**).

Tableau 10: confirmation des caractéristiques culturelles et microscopiques des souches fongiques cibles

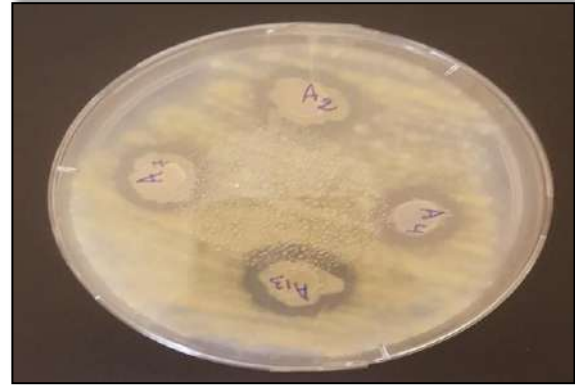
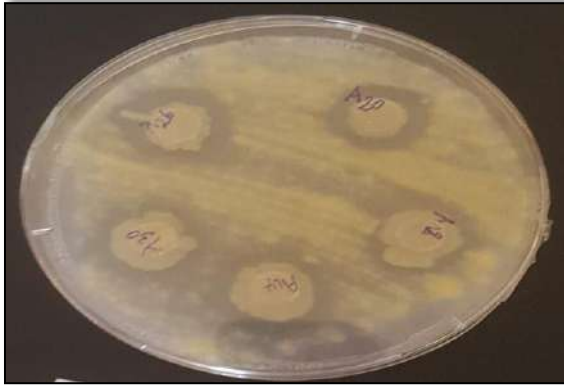
| Nom de la souche | Aspect cultural | Caractéristique cultural | Aspect microscopique | Caractéristique microscopique |
|--------------------------|---|---|--|--|
| <i>Aspergillus niger</i> |  | Colonie d'abord blanche, puis jaune et enfin granuleuse noires, avec un revers de boîte incolore. |  | Conidiophore hyalin très long, et conidies globuleuses, brunes et échenillées en Chaîne. |

| | | | | |
|------------------------------------|---|--|--|---|
| <p><i>Rhizopus stolonifer</i></p> |  | <p>Colonie extensive, cotonneuse devenant brun-noir à maturité. Après envahissement de la boîte on distingue une moisissure duveteuse blanchâtre puis gris</p> |  | <p>Le sporocyste comporte dans le prolongement de l'axe du sporocystophore, une formation globuleuse.</p> |
| <p><i>Alternaria alternata</i></p> |  | <p>Thalle vert foncé avec revert de la boîte noir.</p> |  | <p>Blastospores pluricellulaires bruns de grande taille.</p> |
| <p><i>Cladosporium herbrum</i></p> |  | <p>Les colonies apparaissent tout d'abord blanchâtre, vire au jaune verdâtre pour finir en vert jaunâtre assez foncé d'aspect laineux.</p> |  | <p>Hyphe séptés, les conodies forment des chaînes plus ou moins longues.</p> |

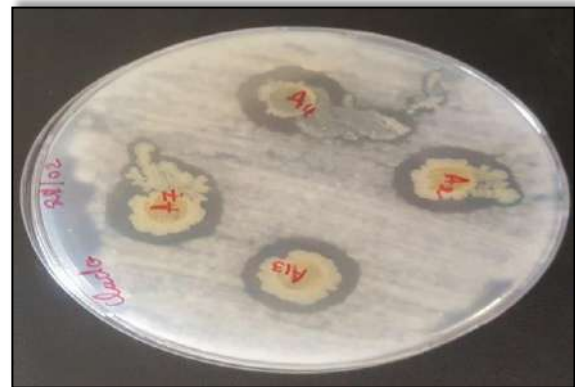
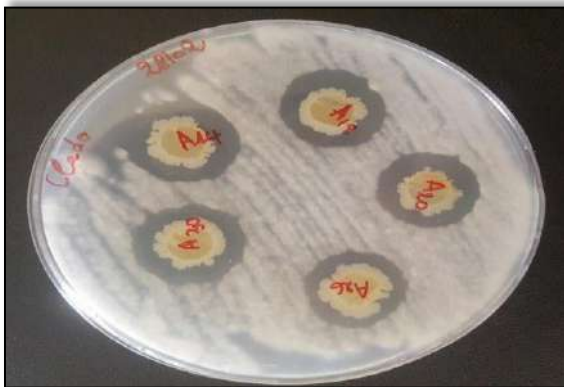
| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| <p><i>Aspergillus ochraceus</i> (NRRL 3174)</p> |  | <p>Colonie poudreuse de couleur jaune revers de la boite incolore</p> |  | <p>Tête sporifère globu leuse, Conidiophore rond rugueux</p> |
| <p><i>Penicillium expansum</i> (CECT 2278)</p> |  | <p>Colonie duveteuse, poudreuse de couleur verte avec un revers de boite incolore</p> |  | <p>Les conidiophores sont portés par des hyphes</p> |
| <p><i>Fusarium graminearum</i> (CECT 2150)</p> |  | <p>Colonie poudreuse et duveteuse de couleur blanche au départ puis rose</p> |  | <p>Les macroconidies sont hyalines, fusoides et moyennement allongées avec 3 à 7 cloisons fines et un bec apical long et pointu. Elles sont de forme légèrement incurvée</p> |

II.1.3. Résultats du test des cylindres d'agar

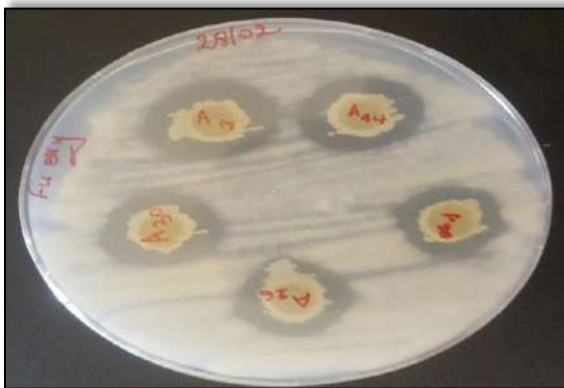
Les résultats obtenus et illustrés dans la (Figure 17) montrent un antagonisme intéressant des neuf souches actinomycétales à l'égard des champignons utilisés. (Tableau 10)



Aspergillus niger



Cladosporium herbarum



Fusarium oxysporum

Figure 17 : Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des champignons cible sur gélose PDA.

Les 11 souches actinomycètes ont présenté une activité antifongique vis-à-vis les Champignons filamenteux. Les résultats des tests d'activité sur milieu solide sont rassemblés dans le (Tableau 11) ci-après.

A partir de ce tableau, on constate que toute les souches actinomycètes ont montrées une activité antifongiques contre toutes les souches cible a l'exception de *Alternaria alternata*

qui a montré une résistance totale à l'ensemble des actinomycètes les zones d'inhibition les plus importantes sont obtenues à l'égard de *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*, une inhibition moyenne obtenue en ce qui concerne *Cladosporium herbarum*, tandis qu'une inhibition plus faible est observée contre *Rhizopus stolonifer*. La plus grande zone d'inhibition (24 mm) a été obtenue par la souche **A18** contre *F.oxysporum*.

Tableau 11 : Pouvoir antifongiques des actinomycètes obtenus par la méthode des cylindres d'agar

| Les actinomycètes | DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITION (mm) | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|---------------------|
| | <i>A.alternata</i> | <i>C.herbarum</i> | <i>R.stolonifer</i> | <i>A.niger</i> | <i>F.oxysporium</i> |
| A2 | 06 | 18 | 11 | 19 | 19 |
| A4 | 06 | 18 | 11 | 16 | 18 |
| A7 | 06 | 20 | 12 | 20 | 19 |
| A13 | 06 | 20 | 13 | 23 | 20 |
| A14 | 06 | 12 | 14 | 24 | 22 |
| A18 | 06 | 12 | 15 | 22 | 24 |
| A20 | 06 | 12 | 11 | 19 | 17 |
| A26 | 06 | 10 | 13 | 22 | 20 |
| A30 | 06 | 09 | 12 | 21 | 21 |

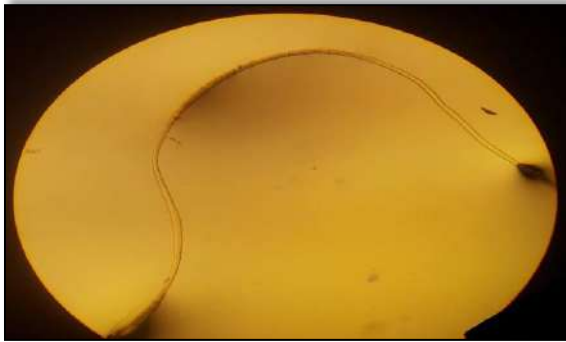
En se basant sur les résultats précédents, les souches actinomycétales sélectionnées pour les tests suivants seront : l'isolat **A7** et l'isolat **A18**.

II.2. Résultat de l'étude taxonomique des actinomycètes sélectionnées

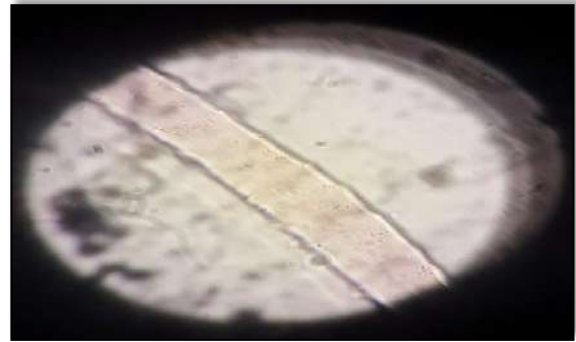
Après avoir choisis les deux isolats **A7** et **A18**, celles-ci sont soumises à une pré-identification.

II.2.1. Résultat de l'observation microscopique

La coloration de gram réalisée sur les isolats **A7** et **A18** après 7 jours d'incubation a montré que les souches sont des Gram + (**Figure 18**), les mycéliums des deux souches se présentent sous une forme de long filament ramifié, fragmenté pour la souche **A18**.



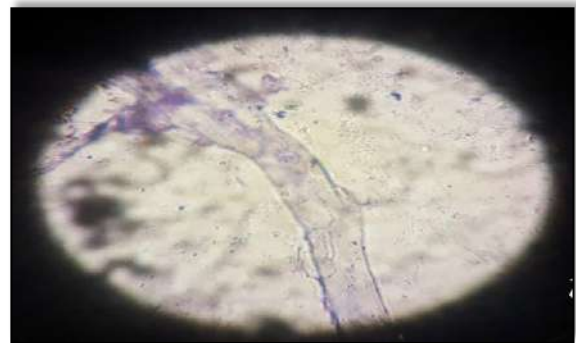
LA SOUCHE A18 (G X 40)



LA SOUCHE A 18 (G X 100)



LA SOUCHE A7 (G X 40)



LA SOUCHE A7 (G X 100)

Figure 18 : Aspect microscopique des souches actinomycètes.

II.2.2. Études des caractéristiques biochimiques

➤ Profil fermentaire (API 20 E)

Le profil fermentaire et en particulier l'utilisation de différents sucres par les actinomycètes représente une étape très importante dans l'identification et la classification de ces bactéries. Le **Tableau 12** représente les principales caractéristiques biochimiques de nos isolats.

Tableau 12 : caractères biochimiques de deux souches d'actinomycètes bioactives

| Test | A7 | A18 |
|----------------------------|----|-----|
| Production de l'indol | + | + |
| Urée | - | - |
| Dégradation de la gélatine | + | - |
| Glucose | + | + |
| Mannose | + | - |
| Inositol | + | - |

| | | |
|-------------------|---|---|
| Sorbitol | + | - |
| Rhamnose | - | - |
| Saccharose | + | - |
| Melibiose | - | - |
| Amylose | + | + |
| Arabinose | + | + |

➤ **Profil enzymatique (API Zym)**

L'activité enzymatique des deux isolats a été étudiée en utilisant les galeries API Zym (**Biomérieux**). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : activité enzymatique des deux isolats d'actinomycètes bioactives.

| N° | Enzyme | A7 | A18 |
|----|--------------------------------|-----|-----|
| 1 | Témoin | 0 | 0 |
| 2 | Phosphatase alcaline | 4 | 4 |
| 3 | Esterase | 2 | 2 |
| 4 | Esterase lipase | 2 | 3 |
| 5 | Lipase | 0 | 0 |
| 6 | Leucine arylamidase | 1 | 1-2 |
| 7 | Valine arylamidase | 0-1 | 0-1 |
| 8 | Cystine arylamidase | 0-1 | 1 |
| 9 | Trypsine | 1 | 0-1 |
| 10 | Chymotrypsine | 0 | 1 |
| 11 | Phosphatase acide | 2 | 2 |
| 12 | Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase | 3 | 3 |
| 13 | Galactosidase 1 | 0 | 0 |
| 14 | Galactosidase 2 | 0 | 0 |
| 15 | Glucuronidase | 0 | 0 |
| 16 | Glucosidase 1 | 3 | 1-2 |
| 17 | Glucosidase 2 | 4 | 3-4 |
| 18 | N-acetyl-glucoseamidase | 0-1 | 0 |
| 19 | Mannosidase | 0 | 0 |
| 20 | Fucosidase | 0 | 0 |

Les chiffre de 0 à 5 représentent la quantité de substrat hydrolysé :

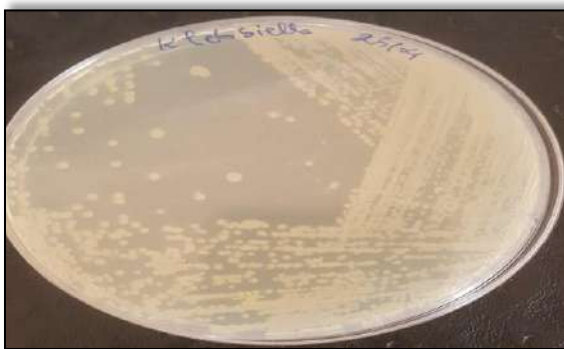
0 = 0 nanomoles, 1 = 10 nanomoles, 2 = 20 nanomoles, 3 = 30 nanomoles, 4 = 40 nanomoles, 5 = 50 nanomoles.

II.3. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sélectionnées

Après avoir sélectionné les souches A7 et A18 comme souches de travail, l'effet antibactérien de celles-ci a été testé par la méthode des cylindres d'agar sur des bactéries cibles.

II.3.1. Résultat de la purification et la confirmation de l'identité des souches bactériennes cibles

L'aspect cultural des bactéries cibles après purification sur gélose nutritive est illustré sur la (Figure 19).



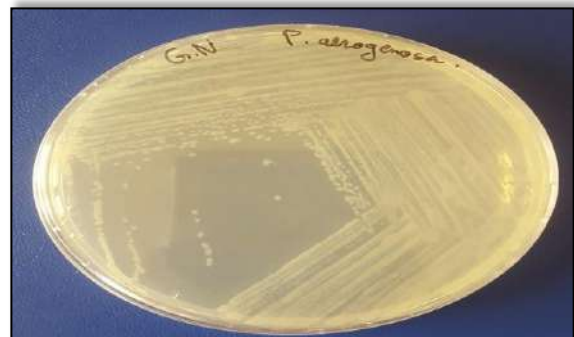
Klebsiella pneumoniae



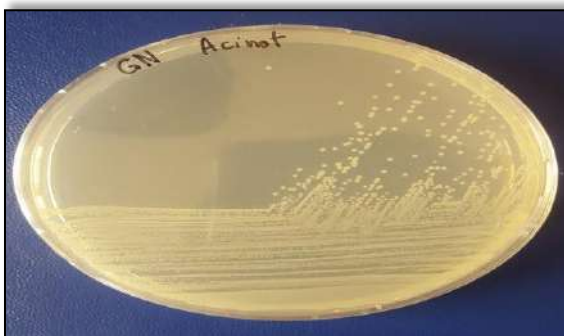
Escherichia coli



Salmonella Typhi



Pseudomonas aeruginosa



Acinetobacter baumannii



Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis

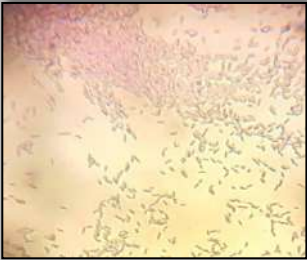
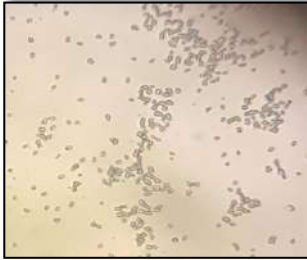




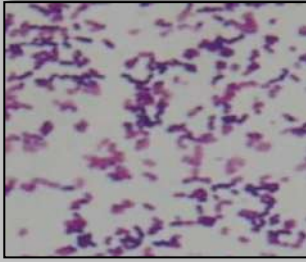

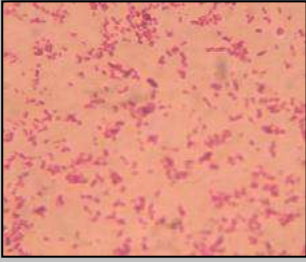
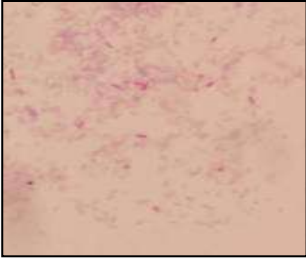
Listeria monocytogenes

Figure 19 : Aspect macroscopique des bactéries pathogènes tests.

Après coloration de Gram, les résultats obtenus sont démontrés sur la (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Les résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes cibles

| Les bactéries cibles | Observation microscopique | Caractéristique microscopique |
|--------------------------------|---|---|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> |  | Bacille à coloration de Gram négative, catalase positive |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> |  | Coccobacille à coloration de gram négative. catalase positive |
| <i>Staphylococcus aureus</i> |  | Cocci assemblée en amas (grappe de raisin) à coloration de gram positive. Catalase positive |

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| <i>Bacillus subtilis</i> |  | Bacille à coloration de Gram positive, catalase positive |
| <i>Listeria monocytogenes</i> |  | Coccobacille à coloration de Gram positive. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |  | Bacille à coloration de Gram négative. Catalase positive. |
| <i>Escherichia coli</i> |  | Bacille à coloration de Gram négative. Catalase positive. |
| <i>Salmonella Typhi</i> |  | Bacille à coloration de Gram négative. Catalase positive. |

II.3.2. Résultat de l'activité antibactérienne testé par la technique des cylindres d'agar

La **Figure 20** regroupe les résultats des tests de l'activité antibactérienne des souches actinomycétales, les valeurs mentionnées représentent les différents diamètres des zones d'inhibitions mesurées autour des cylindres d'agar déposés sur gélose MH ensemencée en surface par les germes tests.

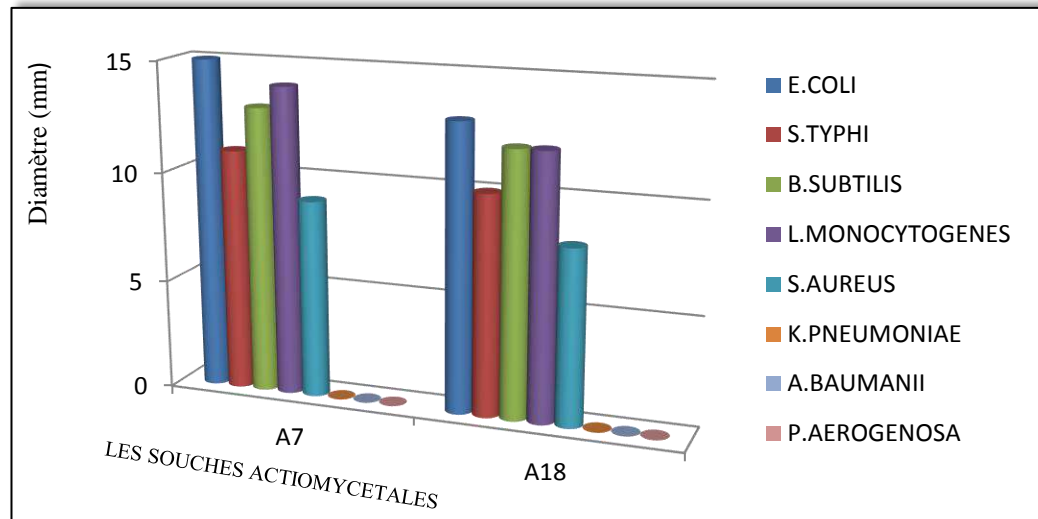


Figure 20 : diagramme présentant la zone inhibition des isolats actinomycétales contre les bactéries tests.

La souche **A7** possède une activité importante contre *E.coli* (15 mm) qui représente la plus grande zone d'inhibition du test, contre *L.monocytogenes* (14 mm) et contre *B.subtilis* (13 mm), tandis que la souche **A18** est légèrement moins active contre les souches test, avec des zones d'inhibition moins large : (13 mm) contre *E.coli*, (12 mm) contre *L.monocytogenes* et (12 mm) contre *B.subtilis*.

Une activité antibactérienne moyenne est observée contre *S.Typhi* avec des zones d'inhibition de (11 mm) pour l'isolat **A7** et (10 mm) pour l'isolat **A18**, alors que leur l'activité contre *S.aureus* est relativement faible avec une zone d'inhibition de (09 mm) pour **A7** et (08 mm) pour **A18**.

Les bactéries test : *K.pneumoniae*, *A.baunamii* et *P. aerogenosa* ont démontrées une résistance totale aux souches actinomycètes **A7** et **A18**.

De ceci on conclut que parmi des deux souches actinomycètes la souche **A7** est la plus active contre les bactéries tests, avec la meilleure activité contre *E.coli*.

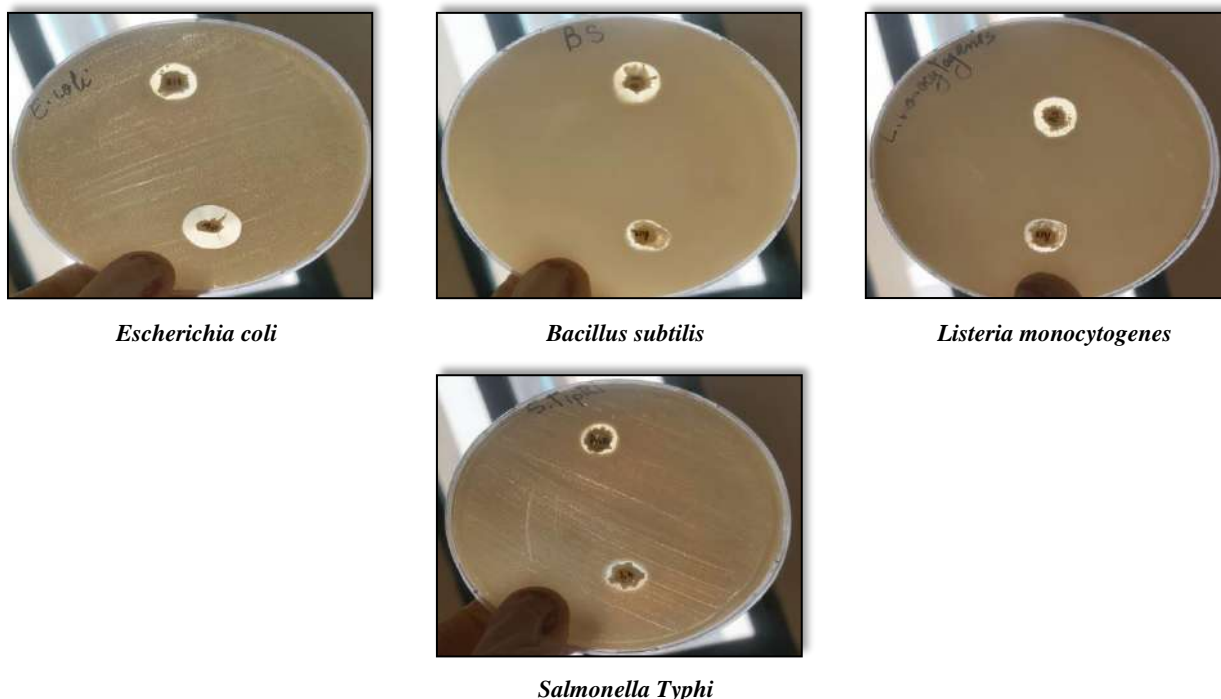


Figure 21 : activité antibactérienne des souches actinomycètes démontrée par la méthode des cylindres d'agar.

II.4. Production des métabolites bioactives par les souches actinomycètes sur milieu solide.

Les deux souches d'Actinomycètes sélectionnées sont cultivées par fermentation sur le milieu IPS2 afin de produire les métabolites bioactives pendant une période d'incubation de 14 jours à 28°C.

II.4.1. Résultat de l'extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide

Les métabolites bioactives produites par les deux souches d'Actinomycètes, lors de la fermentation pendant une incubation de 14 jours sur le milieu solide ISP2, ont été récupérés avec deux solvants organiques différents : méthanol et acétate d'éthyle, afin de déterminer lequel est le meilleur pour l'extraction des métabolites secondaires produits par les actinomycètes.

Les métabolites secondaires produits par les souches d'Actinomycètes, lors de la fermentation pendant une incubation de 14 jours sur milieu ISP 2 solide, ont été récupérés avec les deux solvants organiques : méthanol et acétate d'éthyle, afin de déterminer le meilleur pour ce type d'extraction, la (**Figure 22**) résumera les grandes étapes d'extraction.

Après filtration et centrifugation, l'extraction à partir de 40 boîtes de Pétri contenant les cultures de la souche **A7** a permis d'obtenir un volume de 10 ml d'extrait méthanolique opaque, de couleur marron et 10 ml d'extrait à l'acétate d'éthyle limpide de couleur jaune clair ; quand à la souche **A18** dont les métabolites ont été extrait seulement par l'acétate d'éthyle, la culture de 40 boîtes Pétri nous a permis d'obtenir un volume de 18 ml d'extrait (**Figure 23**).

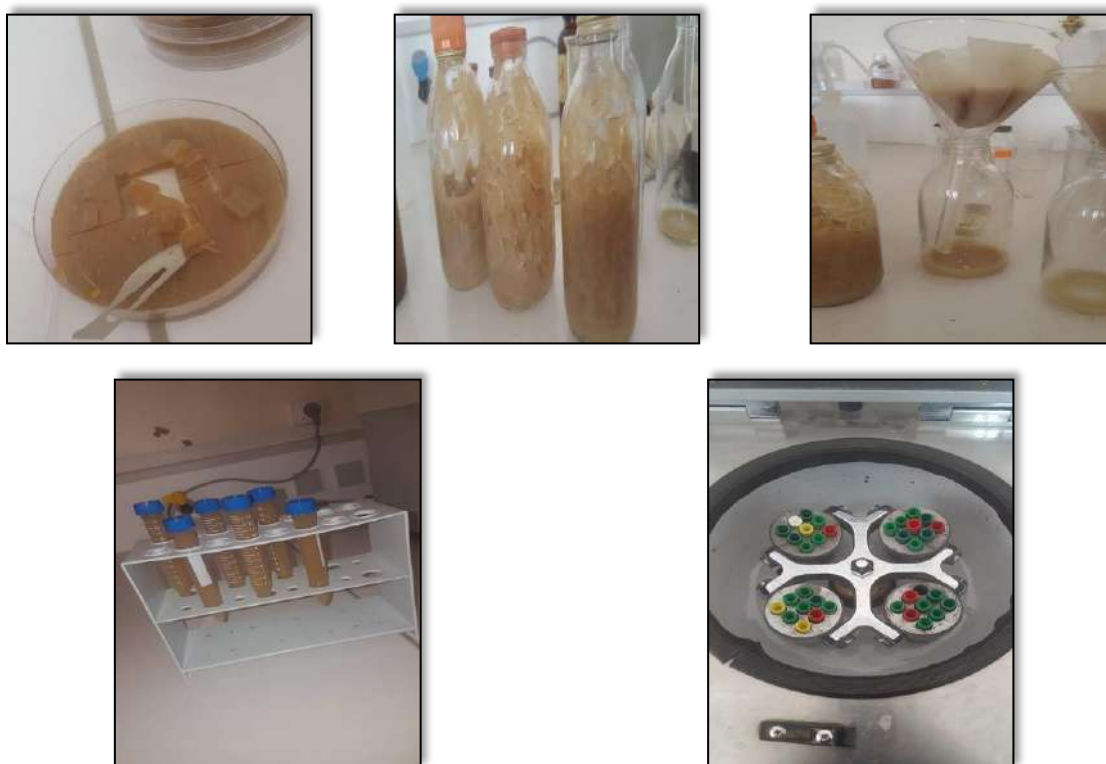


Figure 22: illustration résumant les étapes de l'extraction des métabolites bioactives a partir du milieu solide ISP2.

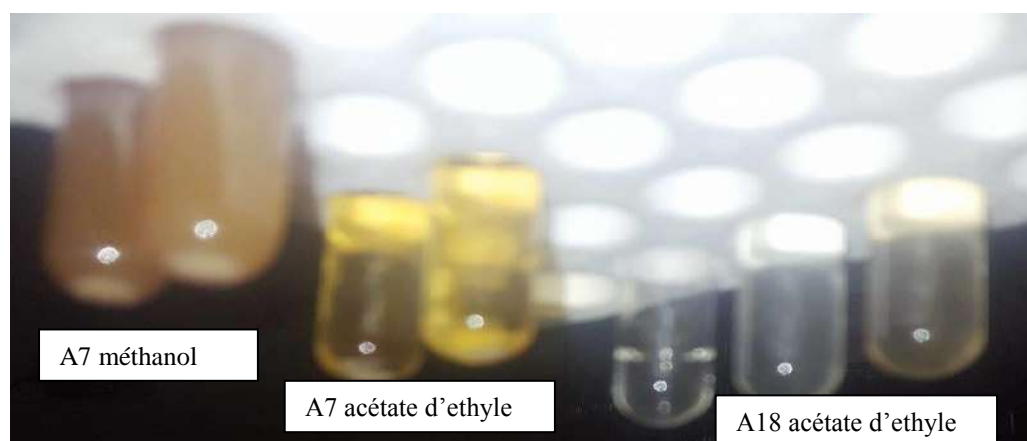


Figure 23 : illustration des 3 extraits produits de la fermentation sur milieu solide.

II.5. Resultat de l'activité antibactérienne des extraits bruts

La méthode des puits utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits a démontré que les trois extraits sont actifs sur trois des quatre bactérie-test, cette activité est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puits contenant un volume de 30 μ l de l'extrait brut, les résultats des tests sont démontré dans le (Tableau 15).

Tableau 15 : Les zones d'inhibition provoquées par les extraits bruts des souches sélectionnées contre *E.coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhi* et *B.subtilis*.

| Extraits | DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITION (mm) | | | |
|--|--------------------------------------|-----------------|-------------------|------------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>S. Typhi</i> | <i>B.subtilis</i> | <i>L.monocytogenes</i> |
| A7 Méthanol | 10 | 00 | 14 | 06 |
| A7 Acétate d'éthyle | 19 | 18 | 00 | 06 |
| A18 Acétated'éthyle | 14 | 16 | 16 | 06 |
| Temoin Méthanol | 06 | 06 | 06 | 06 |
| Temoin (acetate d'éthyle-methanol)(3:1) | 06 | 06 | 00 | 06 |

D'après les résultats obtenus, on constate que les 3 extraits bruts des 2 souches d'actinomycètes ont présenté une activité contre les bactéries testées excepté pour *L.monocytogenes*, qui a montrée une résistance aux 3 extraits.

L'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat **A7** a présenté la plus forte activité avec un diamètre de zone d'inhibition de 19 mm et ceci contre *E.coli*, ainsi qu'une bonne activité qui s'est traduite par un diamètre de 18 mm contre *S. Typhi*. Néanmoins *B. subtilis* a montrée une résistance vis-à-vis de cet extrait.

L'extrait méthanolique de l'isolat **A7** a inhibé *B. subtilis* avec un diamètre de 14 mm ainsi que *E.coli* avec un diamètre de 10 mm, tandis que *S. Typhi* a montrée une résistance à cet extrait.

L'extrait de l'isolat **A18** a montré une activité contre *S. Typhi* et *B. subtilis* avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 16 mm et 14 mm pour *E. coli*.

Les résultats de ce test démontrent que l'activité des extraits à l'acétate d'éthyle est plus puissante que l'activité de l'extrait méthanolique.

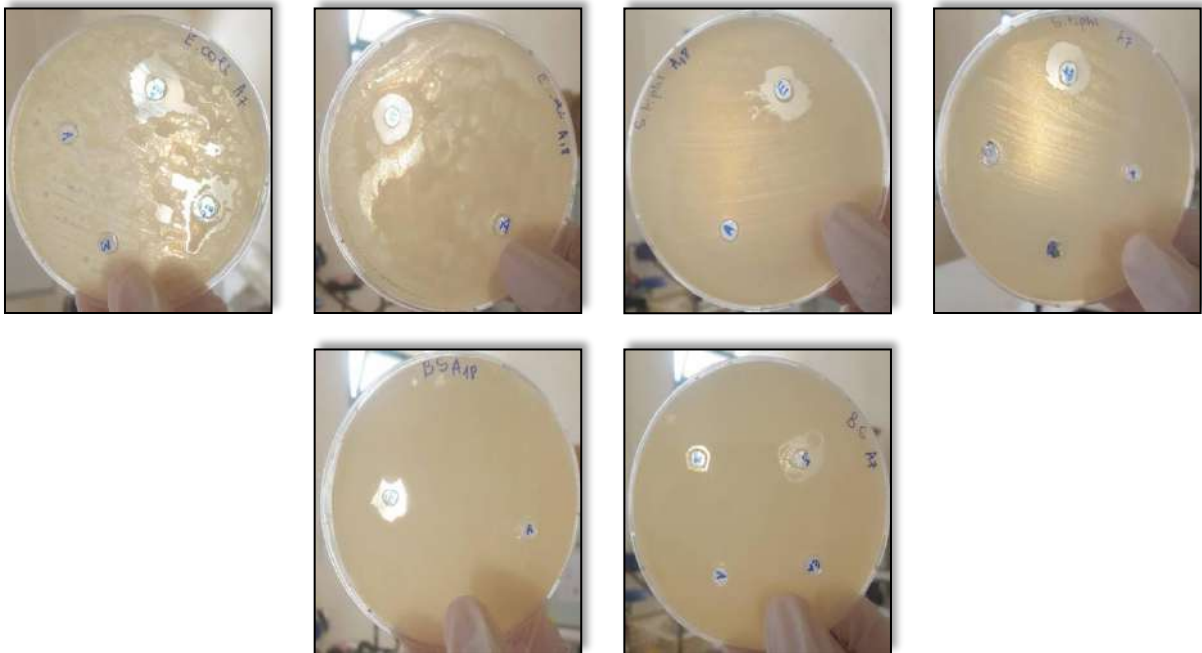


Figure 24 : zones d'inhibition obtenues par les extraits bruts testée sur les bactéries cibles.

II.6. Résultat de l'activité antifongique des extraits par la méthode du contact direct

L'activité antifongique des trois extraits bruts des isolats actinomycétales à été évaluée sur les souches fongiques cibles dont le résultat de la purification et l'identification

sont citées dans le **Tableau 10**, par la méthode de contact direct qui nécessite une incubation de 07 jours.

Les résultats obtenue sont rapportés dans le (**Tableau 16**) et (**Figure 25, 216, 27**).

Tableau 16 : résultats des indices antifongiques des extraits bruts.

| Extrait brut de l'acétate d'éthyle de l'isolat A7 | | | | |
|---|------------|-------------|-------------|-----------|
| Concentration µl/ml Espèce Fongique | 2,5 | 6,25 | 12,5 | 25 |
| <i>A. ochraceus</i> | 1% | 25% | 39% | 57% |
| <i>P. expansum</i> | 3.5% | 31.1% | 52% | 72.5% |
| Extrait brut méthanolique de l'isolat A7 | | | | |
| <i>A. ochraceus</i> | 47% | 57.6% | 68.2% | 75.3% |
| <i>P. expansum</i> | 40% | 56.7% | 64% | 70% |
| <i>F. graminearum</i> | 50% | 59% | 68.2% | 73% |
| Extrait brut de l'acétate d'éthyle de l'isolat A18 | | | | |
| <i>A. ochraceus</i> | 22.7% | 47% | 54.1% | 68.2% |
| <i>P. expansum</i> | 30% | 33% | 60% | 73% |
| <i>F. graminearm</i> | 10% | 13% | 50% | 50% |

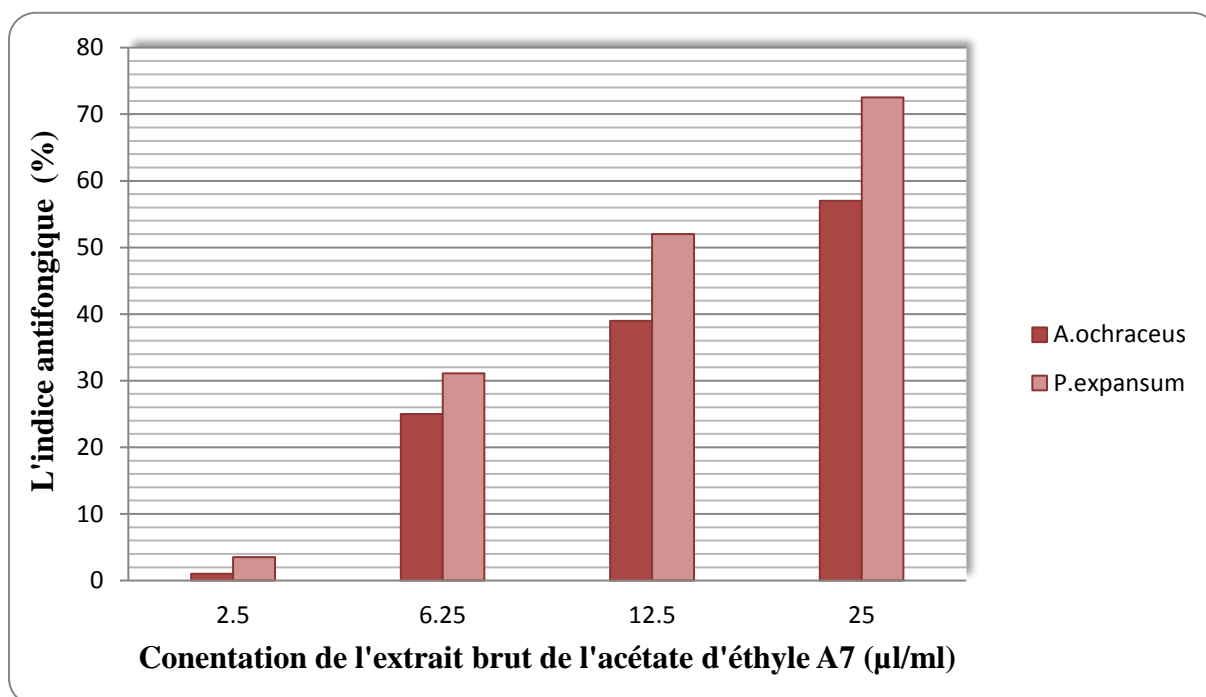


Figure 25 : l'indice antifongique de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de l'isolat A7.

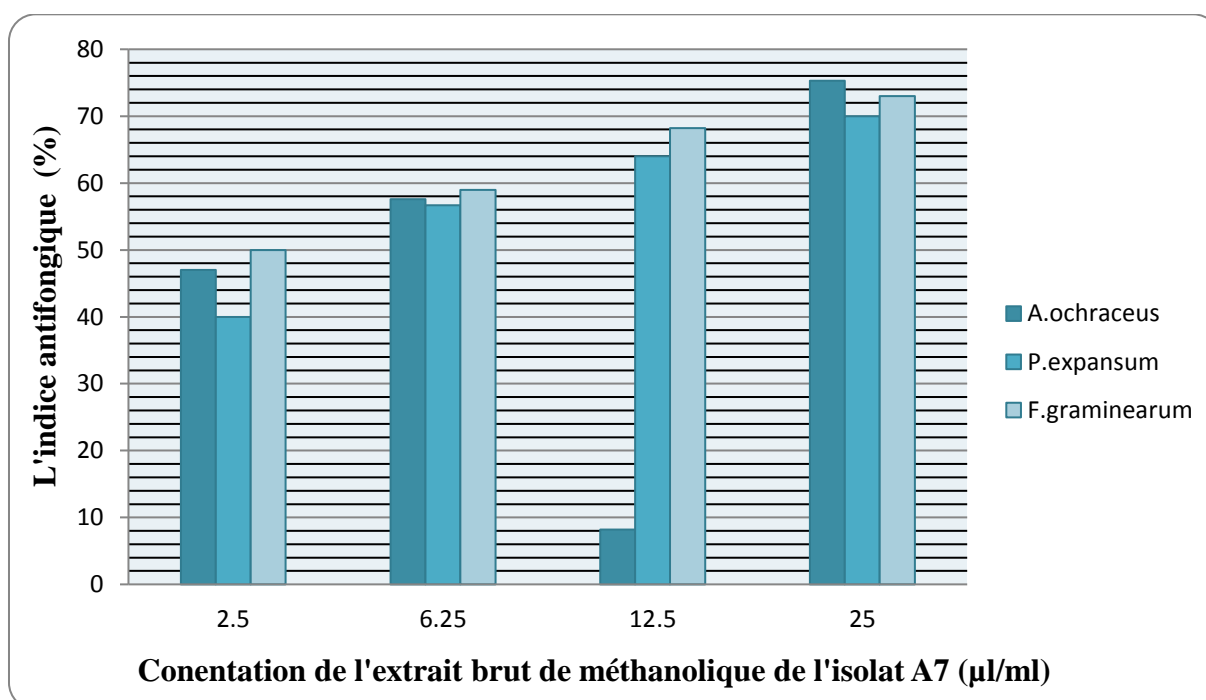


Figure 26 : l'indice antifongique de l'extrait brut méthanolique de l'isolat A7.

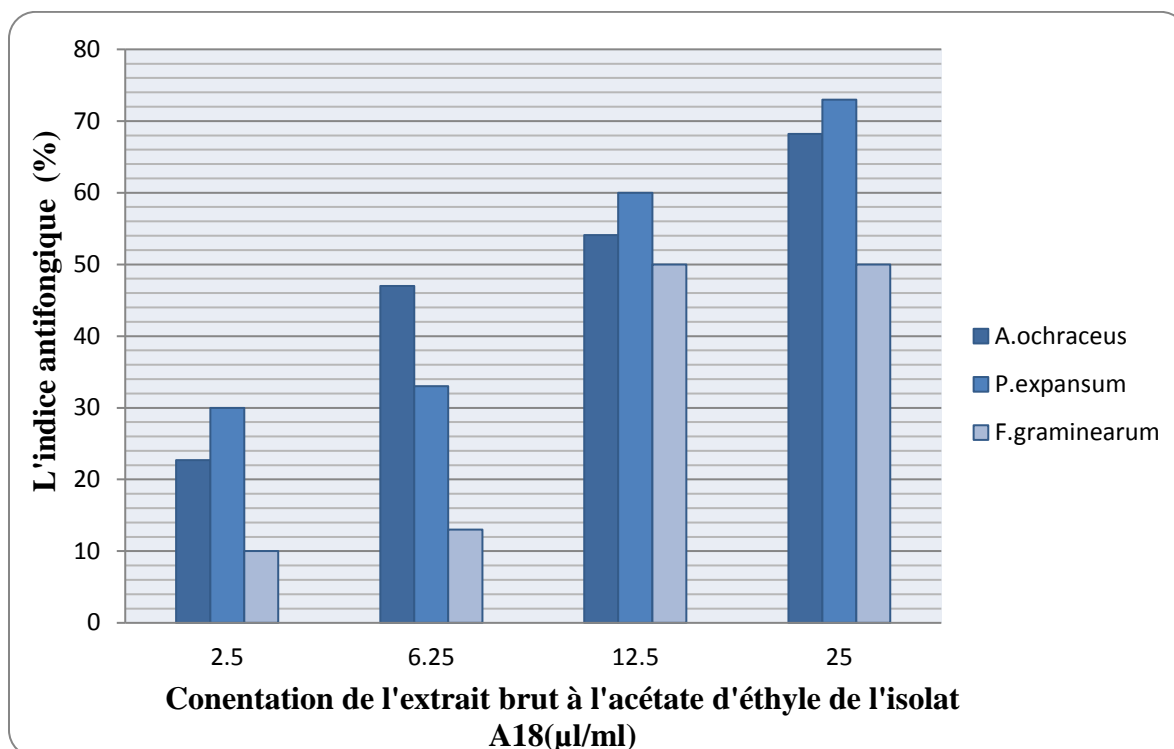


Figure 27 : l'indice antifongique de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle de l'isolat A18

II.6.1. L'activité inhibitrice de l'extrait brut acétate d'éthyle de l'isolat A18 :

D'après le profil inhibiteur de l'extrait à **25 µl/ml** vis-à-vis les souches testées, nous remarquons en terme de sensibilité que les deux souches : *A. ochraceus* et *P. expansum* ont présenté une très bonne sensibilité avec des pourcentages satisfaisants de (57%) et (72.5%) respectivement.

La concentration **12.5 µl/ml** aussi a permis une inhibition remarquable des deux souches testées avec un pourcentage de (39%) pour *A. ochraceus* et (52%) *P. expansum* ;

L'inhibition reste moyennement acceptable à une concentration de **6.25µl/ml** pour *A. ochraceus* et *P. expansum* avec les pourcentages respectifs de (25%) et (31.1%).

Cependant les deux souches testées ont montrées une résistance vis-à-vis de cet extrait avec une concentration de **2.5µl/ml** par les très faibles pourcentages de (1%) pour *A. ochraceus* et 3.5% pour *P. expansum*.

II.6.2. L'activité inhibitrice de l'extrait brut méthanolique de l'isolat A7:

L'activité de et extrait à la concentration de **25 µl/ml** contre les trois souches fongiques testées : *A. ochraceus*, *P. expansum* et *F. graminearum* apparaît très puissantes avec des pourcentages de : (75.3%), (70%) et (73 %) respectivement.

À une concentration de **12.5 µl/ml** une très bonne sensibilité avec des pourcentages satisfaisants de (68.2%) pour *A. ochraceus* et *F. graminearum* et (64%) pour *P. expansum*.

L'activité inhibitrice de l'extrait diminue légèrement mais reste néanmoins bonne à une concentration de **6.25µl/ml** pour les trois souches testées : *A. ochraceus*, *P. expansum* et *F. graminearum* avec des pourcentages de : (57.6%), (56.7%) et (59%) respectivement.

L'inhibition des trois souches testées reste remarquablement acceptable même à une concentration de **2.5µl/ml** qui est la plus petite concentration du test, avec des pourcentages de : (47%) pour *A. ochraceus*, (40%) pour *P. expansum* et (50%) pour *F. graminearum* avec les pourcentages respectives de (25%) et (31.1%).

II.6.3. L'activité inhibitrice de l'extrait brut acétate d'éthyle de l'isolat A18:

La concentration de 25µl/ml montre que l'indice antifongique de *A. ochraceus* (68.2%) et *P. expansum* (73,5%) est très élevé ce qui implique qu'elle est très sensible, en revanche *F. graminearum* avec un indice de (50%) montre une sensibilité modérée vis-à-vis de l'extrait.

Avec une concentration de **12.5µl/ml** l'inhibition de l'extrait diminue légèrement mais reste néanmoins bonne avec le pourcentage de (68.2%) pour *A. ochraceus*, (73,5%) pour *P. expansum* et (50%) pour *F. graminearum*.

Une inhibition médiocre est observée pour la concentration **6.25µl/ml** avec le pourcentage de (47%) pour *A. ochraceus* et (33%) pour *P. expansum*, en revanche la souche *F. graminearum* montre une résistance avec le pourcentage de (10%).

Une résistance est observée contre l'extrait avec la concentration de 2.5µl/ml et ce pour les trois souches testées : *A. ochraceus*, *P. expansum* et *F. graminearum* avec les pourcentages respectifs de : (22.7%), (30%) et (10%).

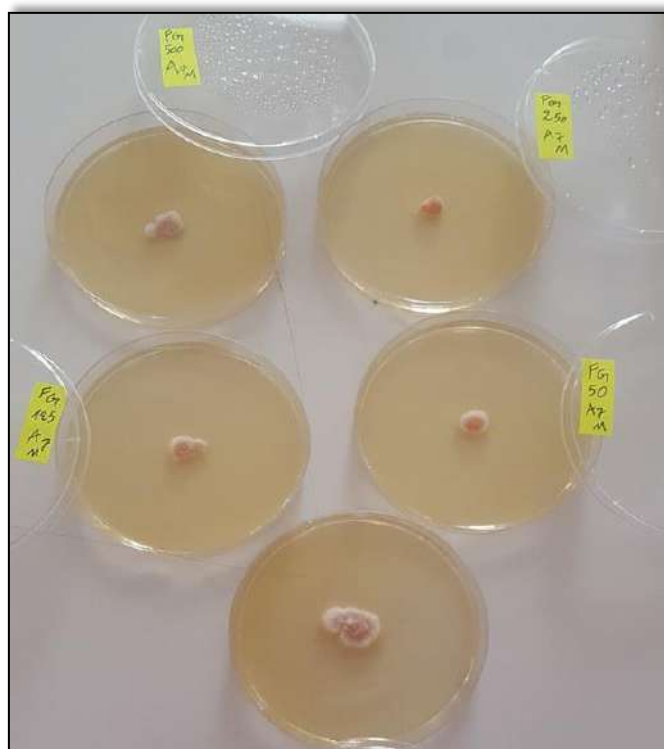


Figure 28 : résultat du contact direct sur la souche *F. graminearum*

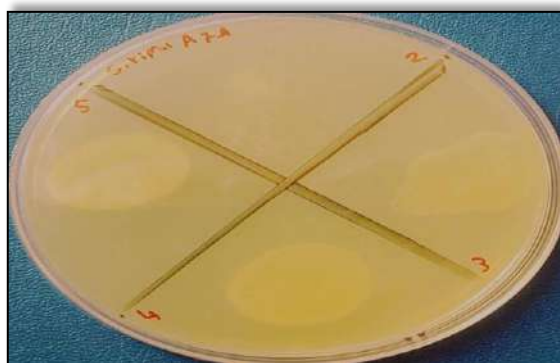
II.7. Résultat de détermination de la CMI et la CMB

La détermination des paramètres de CMI et CMB des trois extraits bruts, a été effectuée grâce à la méthode de dilution en série en milieu liquide (MH) contre quatre bactérie- test, dont deux à Gram + (*S. Typhi* et *E. coli*) et deux à Gram - (*L. monocytogenes* et *B. subtilis*). Les résultats obtenus sont démontrés sur les tableaux suivants :

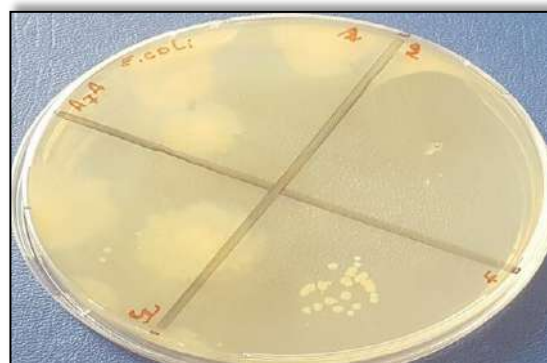
Tableau 17 : résultats des CMI et CMB de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle de la souche A7 sur les bactéries-tests.

| N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-----|-----|-----|----|----|------|------|-------|------|------|----|----|
| souche | | | | | | | | | | | | |
| concentration (µl/ml) | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | Tc | Ts |
| <i>E.coli</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>L.monocytogenes</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| <i>B.subtilis</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>S.Typhi</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |

D'après les résultats consignés dans le (Tableau 17), les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait l'acétate d'éthyle de la souche A7, étaient comprises entre 12,5 et 200 µl/ml. Ainsi, nous constatons que la souche *L.monocytogenes* a une valeur de CMI optimale (12,5µl/ml). Les concentrations minimales bactéricides CMB de cet extrait étaient plus élevées que les CMI correspondantes, avec des valeurs de (200µl/ml) pour *E.coli* et *S.Typhi* (Figure 29).



CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A7 testé sur *S.Typhi*



CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A7 testé sur *E.coli*

Figure 29 : illustrations des CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A7.

Tableau 18 : résultats des CMI et CMB de l'extrait brut méthanolique de la souche A7 sur les bactéries-tests.

| N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-----|-----|-----|----|----|------|------|-------|------|------|----|----|
| concentration (µl/ml) | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | Tc | Ts |
| <i>E. coli</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>L. monocytogenes</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>B. subtilis</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>S.Typhi</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

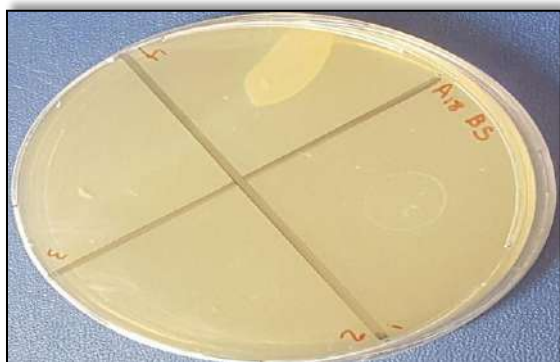
Les résultats obtenus dans le Tableau 18 montrent que la CMB de l'extrait méthanolique de la souche A7 varie entre (50 µl/ml) et (100µl/ml), tandis qu'une absence de CMB est observée pour les quatre souches bactériennes testées.

Tableau 19 : résultats des CMI et CMB de l'extrait brut de l'acétate d'éthyle la souche A18 sur les bactéries-tests.

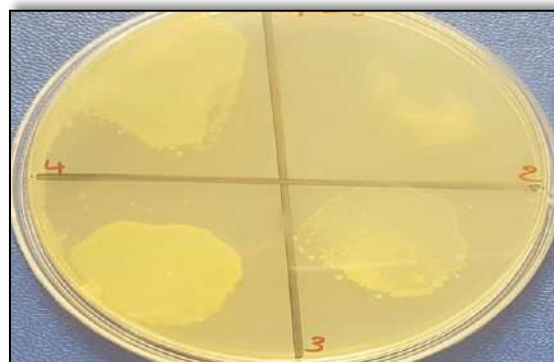
| souche \ N° | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------------|-----|-----|-----|----|----|------|------|-------|------|------|----|----|
| concentration (µl/ml) | 400 | 200 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | Tc | Ts |
| <i>E.coli</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>L.monocytogenes</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| <i>B.subtilis</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>S. Typhi</i> | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - |

Le (Tableau 19) montre que l'extrait acétate d'éthyle de la souche A18 possède un large intervalle de CMI allant de (200µl/ml) à (12,5µl/ml).

La CMB ce dévoile à une concentration de (200µl/ml) pour les deux souches *E.coli* et *S.Typhi*, néanmoins elle est absente pour les deux souches *S.Typhi* et *L.monocytogenes* (Figure 30).



CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A18 testé sur *B.subtilis*



CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A18 testé sur *B.subtilis*

Figure 30 : illustrations des CMB de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A18

D'après les résultats obtenues lors de ce test, nous pouvons conclure que les deux extraits à l'acétate d'éthyle montre une activité plus puissante que celle de l'extrait méthanolique, ceci nous permet de dire que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant d'extraction et ce pour les deux isolats A7 et A18.

II.8. La caractérisation préliminaire de l'agent antimicrobien par chromatographie sur couche mince

II.8.1. Résultat de la CCM

Une fois le meilleur solvant d'extraction est mis en évidence pour chaque souche étudiée, il est nécessaire de déterminer le meilleur système de séparation par migration en réalisant une chromatographie sur plaques de gel de silice. La (**Figure 31**) démontre la feuille de silice lors du processus de migration.



Figure 31 : illustration montrant le processus de séparation par CCM

La détection du meilleur système de migration se fait grâce à la visualisation sous UV et les résultats des chromatogrammes élués par les différents systèmes de migration sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 20: résultat de la CCM des trois extraits des isolats actinomycétales.

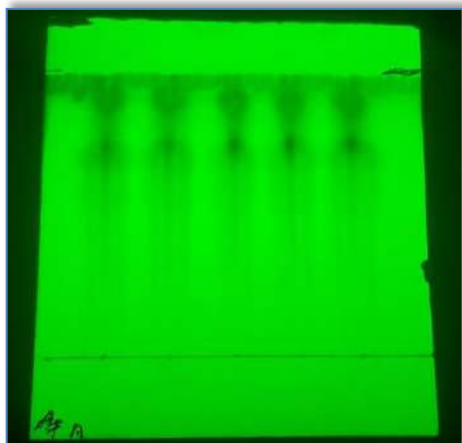
| Les systèmes solvants | Les rapports frontaux (Rf) | | |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | Extrait Acétate d'éthyle A7 | Extrait méthanolique A7 | Extrait Acétate d'éthyle A18 |
| Acétonitrile – eau (70 : 30) | 0 | 0 | 0 |
| Acétonitrile – eau (90 : 10) | 0,09 | 0,04 | 0,66 |
| | 0,22 | 0,25 | 0,76 |
| | 0,36 | 0,41 | 0,81 |
| | 0,50 | 0,43 | 0,93 |
| | 0,60 | 0,61 | |
| | 0,67 | 0,64 | |
| | 0,81 | 0,71 | |
| | 0,89 | 0,77 | |
| | 0,95 | 0,89 | |

La visualisation sous UV (à 254 nm) et la détection des molécules fluorescentes (à 365nm) des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les différents systèmes de solvants, révèle que celui qui permet une bonne séparation des bandes est le système Acétonitrile-eau (90 : 10) et ce, pour les trois extraits.

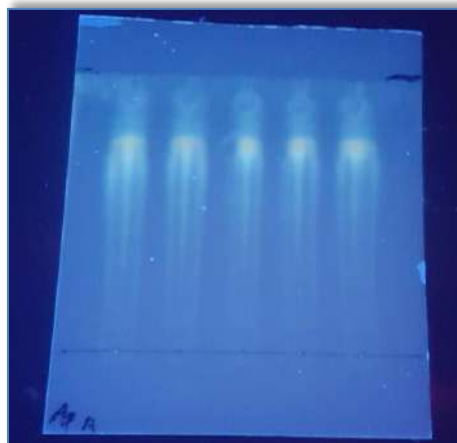
Pour l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de l'isolat **A7**, neuf taches sont observées dont 8 taches avec les Rf (**0,09 - 0,22 - 0,36 - 0,50 - 0,60 - 0,67 - 0,81 - 0,95**) apparaissent la lampe UV à 253 nm, et une seule tache et une seule tache fluorescente détectée à 365 nm avec un Rf de **0.89**.

En ce qui concerne la séparation de l'extrait brut méthanolique de l'isolat **A7**, elle révèle dix taches dont huit sont observées sous UV à 254 nm possédant des Rf de (0,04 - 0,25 - 0,41 - 0,61 - 0,71 - 0,77 - 0,89), les deux taches restantes sont fluorescentes avec des rapports frontaux de (0,43- 0,64).

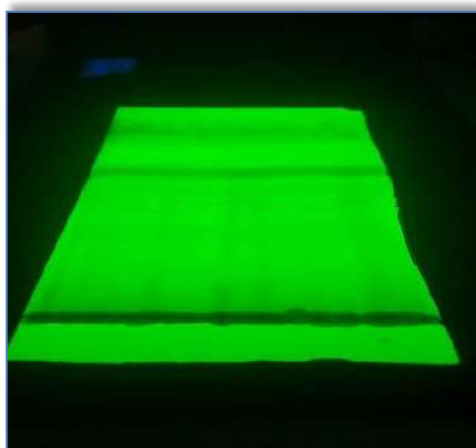
L'extrait brut à l'acétate d'éthyle de l'isolat A18 a présenté quatre taches, dont trois avec des Rf de (0,66 – 0,76 – 0,81 – 0,93) observée sous lampe UV à 254 nm, et une seule tache de Rf(0,81) détectée à 365 nm.



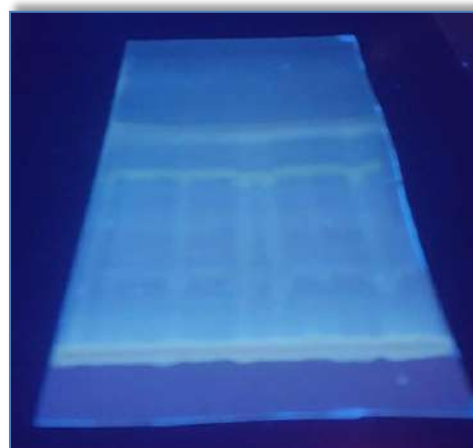
Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat A7 à 254 nm (UV)



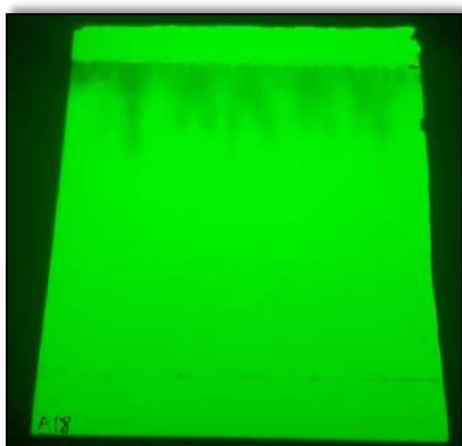
Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat A7 à 365 nm (fluorescence)



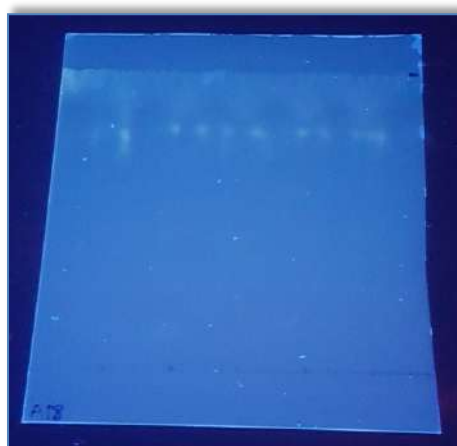
Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A7 à 254 nm (UV)



Chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'isolat A7 à 365 nm (Fluorescence)



Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat A18 à 254 nm (UV)



Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat A18 à 365 nm (Fluorescence)

Figure 32 : Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.

II.8.2. Résultat de la bioautographie

Après sélection du solvant d'extraction ayant permis la meilleure récupération des activités antimicrobiennes par antibiographie qui c'est révélé être l'acétate d'éthyle, et après choix du meilleur système d'élution permettant une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts à savoir l'Acétonitrile - Eau (90 : 10 v : v) ; l'autobiographie des fractions séparées par CCM a montrée un résultat négatif.

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été néanmoins impossible de distinguer l'activité antibactérienne par bioautographie et cela malgré le nombre de répétition (2) (**Figure 33**).

Cela s'explique, très probablement, par la faible quantité de substances antimicrobiennes présente au sein de la plaque de cilice.

Une autre hypothèse suggère la présence d'un effet synergique entre deux ou plusieurs composants bioactive de chaque extrait qui, après séparation leur activité a considérablement diminué.

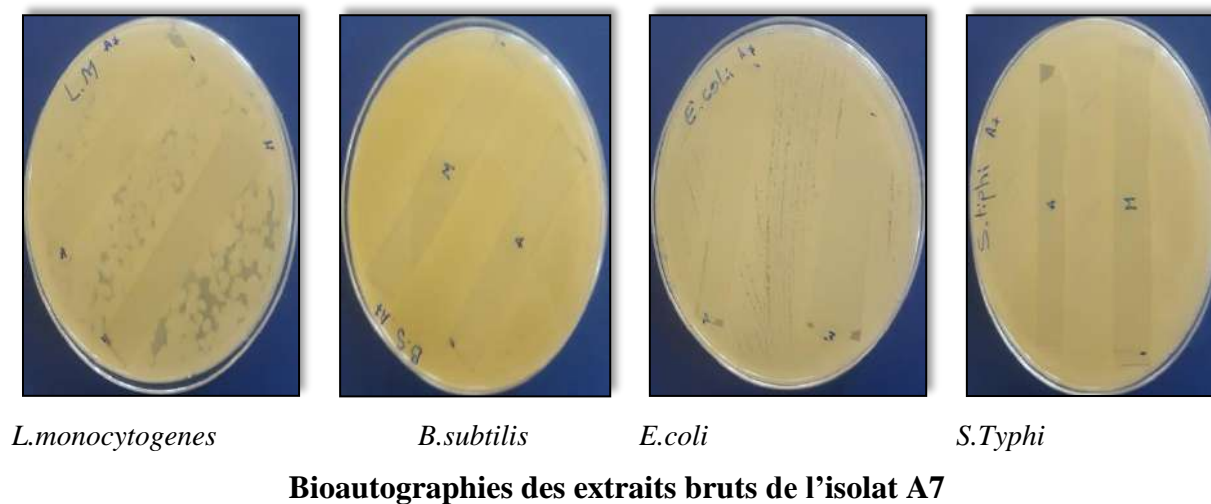


Figure 33 : Illustration du résultat de la bioautographie contre les germes cibles

II.9. Purification des molécules bioactives

Un volume de 600 µl de chaque extrait concentré est déposé en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci, sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné auparavant.

Après migration et grattage des différentes bandes séparément, le contenu des taches actives révélées par UV à 254 nm et les taches fluorescentes à 365 nm sont dissoutes dans 2ml de méthanol. Une filtration est effectuée pour éliminer la silice et garder le surnageant contenant les activités (**Figure 34**).

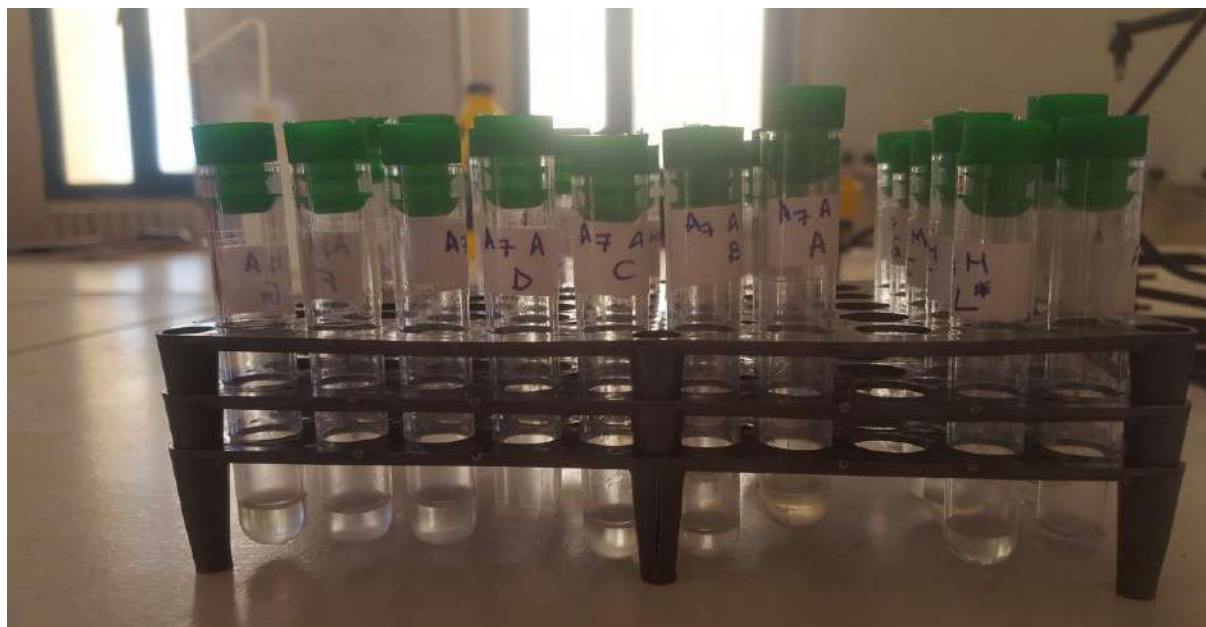
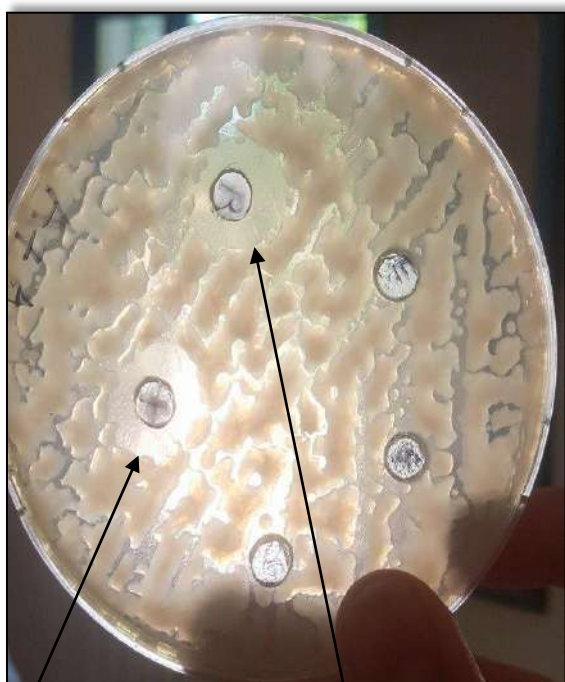


Figure 34 : illustration des différentes fractions obtenues par CCM après purification.

L'activité des filtrats est testée sur la bactérie-test *E.coli*, le (**Tableau 21**) et la (**Figure 34**) démontrent les rapports frontaux des fractions actives, ainsi que les diamètres des zones d'inhibitions obtenues après incubations de 24h.

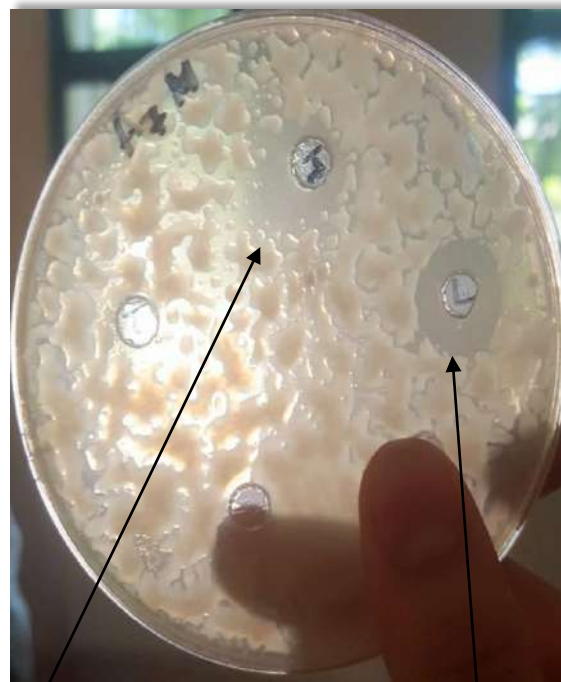
Tableau 21 : Résultat du test d'activité des extraits semi purifiés et les Rf des fractions actives.

| Les extraits bruts | Les rapports frontaux (Rf) | | Zones d'inhibition (mm) |
|---|----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | 254 nm (UV) | 365 nm (Fluorescence) | |
| Extrait à l'acétate d'éthyle A7 | 0,95 | 0,89 | 14 mm 15 mm |
| Extrait méthanolique A7 | 0,89 | 0,64 | 15 mm 13 mm |
| Extrait à l'acétate d'éthyle A18 | 0,93 | | 13 mm |



Rf (0,95)

Rf (0,8)



Rf(0,95)

Rf (0,64)

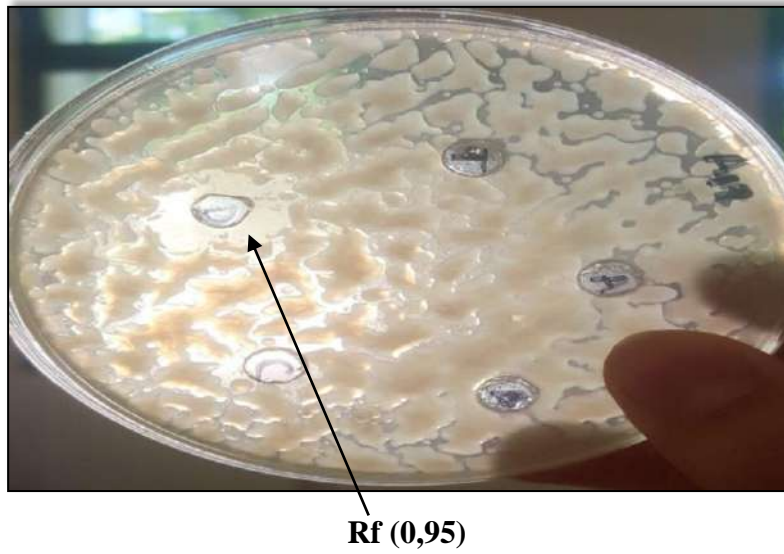


Figure 35 : illustrations des zones d'inhibitions des fractions actives purifiées

DISCUSSION

Discussion

Les actinomycètes sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, aérobies et hétérotrophes. Elles présentent certaines analogies avec les champignons : structure mycélienne présentant des ramifications, formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidie, etc...Leurs filaments mycéliens sont très fins (1- 1.5 μm). Elles sont considérées comme le groupe majeur de la population tellurique et sont largement distribuées dans les sols (**Williams, 1964**). Elles se développent très lentement par rapport à la plupart des bactéries et des champignons, leur croissance sera donc masquée sur des milieux de culture ordinaires (**Otto et Glathe, 1968**). Ce groupe de procaryotes est connu par son activité à fixer l'azote et à produire des métabolites secondaires et des enzymes (**Barreto et al., 2008**).

antibiotiques dans le champ d'application s'étend non seulement aux divers domaines thérapeutique humaine et vétérinaire mais aussi à l'agriculture, s'ajoutent d'autre produits comme des enzymes et lorsque ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Et des inhibiteurs d'enzymes dont certains manifestent des activités pharmacologiques soulignant encore l'intérêt de ces microorganismes (**Theilleux, 1993**).

Les souches d'actinomycètes servant d'objet de ce travail ont été isolées d'échantillons du sol aride de la région d'Ain Loarak qui est un sol aride dur et dépourvue de végétation et présente un pH de 6,55.

Ces souches appartiennent au genre *Streptomyces* (**Naimi, 2014**). Les isolats ont subi une revivification par repiquage sur le milieu de culture ISP2 qui est connue pour son utilisation dans l'étude morphologique des actinomycètes (**Da Silva et al., 2011 ; Yuan et al., 2008**). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 14 jours d'incubation et les premières colonies apparaissent au bout de 48h, ceci 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*.

Arrivé à terme de l'incubation, 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**). Tandis que la coloration du mycélium du substrat varie selon les isolats du beige au jaune marron

La majorité des souches actives développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. Le mécanisme de la morphogenèse 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.

Selon **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

D'après **Williams et al., (1989)**, les *Streptomyces* sont des bactérie aérobies a coloration de Gram positive, qui poussent en produisant un mycélium végétatif (mycélium de substrat) ramifié et un mycélium aérien portant des chaines d'arthrospores. Les mycéliums de substrat et les spores peuvent être pigmentés, mais peuvent produire également des pigments diffusibles.

Les souches **A2** produit des pigments beige-marron pour et **A4** le pigment diffusé est de couleur beige tandis que la souche **A18** produit un pigment beige- jaune.

Selon **Margalith (1992)** ces pigments peuvent être des substances bioactives, tel est le cas de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune **Beppu (1994)**.

L'observation au microscope optique des hyphes du mycélium végétatif des souches **A7** et **A18** (Gram+) a montré que les filaments sont de taille moyenne peu ramifié et

fragmenté pour la souche **A18** Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien.

L'activité antibactérienne et antifongique des souches actinomycétales revivifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les neuf isolats actinomycétales ont montrés une activité contre quatre des cinq souches fongiques tests *C. herbarum*, *A. niger* *F. oxysporum*, *R. stolonifer*.

Les zones d'inhibition des isolats actinomycétales testées contre les espèces fongiques cibles citées plus haut montrent des diamètres allant de 09 mm contre *C. herbarum* à 24 mm contre *A. flavus*, et *F. oxysporum*.

L'activité la plus importante des souches actinomycétales étudiées est observée contre les deux genres *Aspergillus* et *Fusarium*, ces résultats sont confirmés par **Tighridet (2011)** et **Boucheffa (2011)** qui ont obtenue une activité importante de leurs isolats actinomycétales contre le genre *aspergillus*. **Morakhchi (2011)** qui a travaillé sur l'activité antagoniste des souches *streptomyces* isolées a partir du lac Oubeira a pue obtenir des résultats satisfaisants contre l'espèce *A. niger*.

(Augustine et al., 2005) montre que les souches filamenteuse du genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives produites par les actinomycètes.

Tandis que, nos résultats contre le genre *Fusarium* avec une zone d'inhibition de 24 mm avec la souche **A18**, contredisent ceux de **Kitouni (2007)** qui démontre que *F. oxysporum* est résistante à deux des trois isolats étudiés, et ceux de **Boughachiche (2012)** qui démontre aussi une résistance de *F. oxysporum* contre des *streptomyces* isolés de Sebka.

Les deux souches **A7** et **A18** sont retenues pour le reste du travail, et leur effet antibactérien est testé par la méthode des cylindre d'agar contre les bactéries test, dont cinq souches à Gram négatif: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) *Pseudomonas aerogenosa* (ATCC 27853) et *Acinetobacter baumannii*, ainsi que trois souches à Gram positif : *Bacillus subtilis* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Le résultat démontre que seul *B. subtilis*, *E.coli*, *S.Typhi*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* parmi les huit bactérie-test utilisée ont été inhibées par les deux souches **A7** et **A18** ont avec des diamètres variant de 08mm à 15 mm.

Le meilleur résultat a été obtenu par **A7** contre la bactérie à Gram négatif *E. coli* (ATCC 25922) avec un diamètre de 15 mm et 13 mm obtenue par **A18**. Ses résultats sont similaire à ceux mentionné par **kitouni (2007)** qui a obtenu un effet inhibiteur sur *E. coli* par seulement 3 des isolats parmi un ensemble de 45 isolés a partir de différents écosystèmes, ainsi que **Messaoudi (2013)** qui indique que parmi 18 isolats actinomycétales 10 ont pus inhiber *E. coli* avec des zones d'inhibition ne dépassant pas les 10 mm de diamètre.

Zerizer et al. (2005) ont mentionnée que parmi 10 isolats de sols arides de la région de Biskra seule 2 souches actinomycétales sont actives contre *E. coli* avec des zones d'inhibition de 12 et 18 mm de diamètres. Les résultats obtenus par **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.

L. monocytogenes (ATCC 19115), a montrée une bonne sensibilité vis-à-vis **d'A7** et **A18** avec des diamètres de 14 mm et 12 mm respectivement.

B. subtilis (ATCC 10876) montre une sensibilité vis-à-vis des deux souches **A7** et **A18** avec un diamètre de 13 mm et 12 mm respectivement, confirmé par **Messaoudi (2013)** qui cite que 8 parmi 18 de ses isolats actinomycètes ont été active contre cette bactérie avec un diamètre de variant entre 07 à 12 mm maximum.

S. aureus (ATCC 25923) a montrée une sensibilité modérée avec des zones de 09 mm pour **A7** et 10 mm pour **A18**, résultat confirmé par **Kitouni (2007)** qui a démontré une activité d'une seule souches parmi les 45 isolés de différents écosystèmes contre cette bactérie, et **Boughachiche (2013)** qui a obtenue une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre contre cette dernière.

P. aeruginosae (ATCC 27853) a montré une résistance vis-à-vis aux deux souches **A7** et **A18**, un résultat contredit par **Messaoudi (2013)** qui a obtenu un résultat de 19 mm de diamètre avec un seul isolat des 18 étudiés et testés par cette méthode.

L'étude des caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches retenues a été faite selon le Bergey's manual of systematic. Des galeries API 20 E et API Zym ont été utilisées pour vérifier le profil fermentaire et l'activité enzymatique. Les résultats obtenus ont rapproché les isolats au genre *Streptomyces*.

Les deux souches sélectionnées **A7** et **A18** sont mise en culture sur le milieu solide ISP2 à 24°C pendant 14 jours, afin de produire les molécules bioactives. Les deux souches ont données des colonies poudreuses et granuleuses. La synthèse des métabolites dites secondaire se fait après 8 à 14 jours d'incubation, celles-ci sont dispersées dans la gélose et extraites par deux solvant organique : Acétate d'éthyle et méthanol, dans lequel la culture est macérée pendant 2h, l'extrait est par la suite filtré et centrifugé à 11 000 rpm pour éliminer tout débris cellulaires.

Tous les extraits organiques étudiés des deux souches présentent des activités antibactériennes, ce qui montre que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**). D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme **Bushell, (1993)**.

Les trois extraits bruts sont testés sur des bactéries de références par la méthode des puits qui est une méthode de diffusion, ceci va non seulement permettre de démontrer si les extraits sont bioactives mais aussi si la substance active est un composé exo-cellulaire ou endo-cellulaire. L'extrait mis dans le puits va ainsi se propager sur la gélose de façon radiale inhibant la croissance des germes.

L'inhibition est représentée sous forme de zone claire (zone d'inhibition) sur la culture microbienne. Elle permet également de déterminer la sensibilité d'une souche à un extrait donné par la mesure des diamètres de ces zones d'inhibition. La sensibilité du germe à l'égard de l'extrait est d'autant plus importante que le diamètre de la zone d'inhibition est grande (**Andriambololona, 2010**)

Ce test à été effectué sur 4 bactéries tests : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhi*, *Bacillus subtilis* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), mais seulement *E. coli*, *S. Typhi* et *B. subtilis* ont montrées une sensibilité vis-à-vis des extraits.

L'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche **A7** a montré la meilleure activité de ce test avec une zone d'inhibition de 19 mm de diamètre contre *E. coli* et 18 mm de diamètre contre *S. Typhi*, tandis que *B. subtilis* et *L. monocytogenes* ont montré une résistance vis-à-vis du même extrait. L'extrait méthanolique de la même souche montre une activité moins bonne que l'extrait à m'acétate d'éthyle avec 10 mm pour *E. coli*, 14 mm pour *B. subtilis* et une résistance totale de *S. Typhi* vis-à-vis de ce dernier, ce résultat sont en accord avec ceux obtenus par **Boughachiche (2012)** qui a montré que l'activité des deux extraits à l'acétate d'éthyle est la meilleure activité obtenue sur 4 solvants d'extraction utilisés dont le méthanol.

L'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A18 montre une inhibition assez satisfaisante sur : *E. coli* avec une zone d'inhibition de 14 mm et 16 mm pour *S. Typhi* et *B. subtilis*.

La recherche de l'activité des extraits a été approfondie par l'étude des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB). Les 3 extraits issus des deux souches d'actinomycètes sélectionnées sont testés contre les quatre souches de bactéries pathogènes sur lesquelles le test des puits a été effectué. Les résultats obtenus montrent que l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche A7 a pu inhiber *E. coli* à une concentration de 100µl/ml et *S. Typhi* à 50µl/ml avec un effet bactéricide à 500µl/ml. Les deux bactéries à Gram + *B. subtilis* et *L. monocytogenes* ont été inhibé à des concentrations de 100µl/ml et 12,5µl/ml respectivement.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Cwala et al. (2011)** qui a marqué des CMI de l'ordre 5µg/ml contre *E. coli* et de 2,5µg/ml contre *B. subtilis* lorsqu'il a utilisé un extrait à l'acétate d'éthyle d'une souche actinomycétale isolée à partir de milieu aquatique du sud Afrique. **Mariadhas et al.(2013)** ont pu obtenir une inhibition de *E. coli* et *B. subtilis* à une concentration de 250µg/ml et ce avec un extrait à l'acétate d'éthyle d'une souche de *Streptomyces* issue de milieu marin.

L'activité de notre extrait sur *S. Typhi* a été remarquable, car en tenant compte de la bibliographie, **Zakir et al. (2002)** ont pu obtenir lors d'un travail sur une souche isolée du sol du Bangladesh, une inhibition sur *S. Typhi* à une concentration de 64 µg/ml.

L'extrait de la souche **A18** à l'acétate d'éthyle à des concentrations de 100µl/ml, 50µl/ml, 25µl/ml et 12,5 µl/ml a pu inhiber *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhi*, *L.monocytogenes* respectivement, et à une concentration de 200µl/ml il a eu un effet létal sur les deux bactéries test *E. coli* et *B. subtilis*. Ceci montre que l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche **A18** est le plus active que celui de la souche **A7**.

L'extrait méthanolique de la souche **A7** malgré son activité sur les 4 souches bactériennes test à CMI de 50µl/ml contre *E. coli* et 100µl/ml contre les trois autres bactéries test, celui-ci n'a pas montré une activité aussi importante que les deux autres extraits ainsi qu'une absence de concentration minimale bactéricide. Ceci est en accord avec de nombreuses recherches qui affirment que l'acétate d'éthyle est meilleur par rapport au méthanol pour l'extraction de métabolites antibactériennes (**Valan arasu et al., 2009 ; khamna et al., 2009**).

Le test de contact direct qui a été effectué sur 3 souches fongiques : *Aspergillus ochraceus* (NRRL 3174), *Penicillium expansum* (CECT 2278) et *Fusarium graminearum* (CECT 2150) afin de déterminer la concentration minimale fongicide des extraits bruts, a permis d'obtenir un interval d'inhibition allant de 1% à 75,3% avec une gamme de concentration de 2,5 µl/ml à 25µl/ml, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition de l'extrait méthanolique **A7** est élevé même à une concentration faible 2,5µl/ml nous constatons que le pourcentage d'inhibition est allé jusqu'à 40% pour l'espèce *P.expansum*. Tandis que les extraits à l'acétate d'éthyle des deux souches, malgré leur capacité à inhiber les 3 souches, ils n'ont atteint un pourcentage élevé qu'à des concentration relativement élevée.

Dans le but d'une purification et identification préliminaire des composants actifs de nos extraits, nous avons procédé à une CCM. 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 (**Lousif, 2011**).

Les systèmes solvant utilisé comme phase mobile lors de cette séparation sont :

- ✓ Acétonitrile/eau (70/30 V/V),

✓ Acétonitrile/eau (90/10 V/V).

D'après nos résultats nous avons constaté qu'aucune migration n'est observée pour les extraits avec le système solvant Acétonitrile/eau (70/30 V/V) alors que les travaux de **Tighridet (2011)** ont démontré qu'avec ce même système solvant l'apparition d'une seule tache pour chaque extrait étudié était possible, néanmoins ces taches n'étaient pas bioactives.

Le système solvant Acétonitrile/eau (90/10 V/V), a permis l'apparition de **9** taches pour chacun des deux extraits de la souche **A7**, ainsi que **4** taches sont apparues pour l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche **A18**. Dans des travaux similaires menés par **Boucheffa (2011)** ce même système solvant n'a permis l'obtention que d'une seule tache par extrait.

Suite aux essais précédents le système solvant Acétonitrile/eau (90/10 V/V) c'est avéré être le meilleur système permettant une migration rapide des molécules, une bonne séparation et ainsi une bonne purification des extraits.

Une bioautographie a été réalisée par les mêmes plaques CCM afin de déterminer le *R_f* des fractions actives et ce pour les 3 extraits. Il a été néanmoins impossible de distinguer l'activité antibactérienne contre le germe cible utilisé par le biais de ce test, bien que la migration des substances soit bonne, ceci peut s'expliquer par la concentration des extraits sur les plaques qui n'était peut-être pas suffisante pour une inhibition, ou par la quantité d'antibiotiques produite. En effet, la production a été réalisée dans un volume réduit et une bonne partie des substances actives a été perdue durant les étapes successives d'extraction et de purification (**Boucheffa, 2011**).

Puisque le résultat de la bioautographie s'est révélé négatif, nous avons procédé à une purification sur couche mince de gel de silice par dépôt d'une bande mince et continue de chaque extrait. Après migration et purification des différents composants de chaque extrait ceux-ci sont testés pour leur activité antimicrobienne sur le germe cible *E. coli* par la méthode des puits.

D'après les résultats de la purification, les 3 extraits ont présentés un total de 5 taches ayant montrées une activité antimicrobienne contre la souche cible avec des rapports frontaux de :

- ✓ La souche **A7** : (0,89 et 0,95 et 0,64)
- ✓ La souche **A18** : (0,93).

Sachant que, le *Rf* est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant donné sur un système support-phase stationnaire donnée est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange, et ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (**Morakchi, 2011**), nous pouvons déduire que les substances que nous avons pu purifier sont les mêmes qui ont été séparées et purifiées de la mêmes méthode par **Tighridet (2011)** et **Boucheffa (2011)**.

Tighridet (2011), qui a purifiée les substances aux *Rf* (0,93 et 0,95), dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antibiotiques produits a pu obtenir des révélations positives par révélateurs chimiques pulvérisés sur les plaques de cilice suite à une CCM élue par le système solvant sélectionné.

Des résultats positifs ont été obtenus lors de la révélation qu'a soumise la substance au *Rf* 0,93 avec les révélateurs chimique suivants :

- ✓ **Diphénylamine-aniline** : révélation des Glucides
- ✓ **Vanilline-H₂SO₄** : révélation des Alcools supérieurs, stéroïdes, huiles étherées
- ✓ **Réactif de Tollens** : révélation des Substances réductrices

Ces résultats suggèrent que l'extrait de la souche **A18** contient un ou plusieurs sucres. La présence d'alcools supérieurs, stéroïdes, d'huiles étherées ou de substances réductrices n'est pas exclue. En revanche, cela suppose l'absence de phénols et d'acides hydroxamiques.

Nous remarquons que certaines tâches de même *Rf* (rapport frontal) ont été révélées positivement à la fois avec la vanilline (alcool supérieurs, stéroïdes ou huiles étherés) et avec le diphénylamine-aniline (glucides). Ce résultat peut être expliqué par l'appartenance de ces molécules à la famille des polyéthers comme rapporté par certains auteurs (**Dembitsky, 2005**).

Selon **Liu et al., (1978)**, ces molécules constituent une large classe d'antibiotiques comportant un grand nombre de composés découverts depuis la mise en évidence de la nigéricine en 1951. Jusqu'en 1980, une soixantaine d'antibiotiques polyéthers ont été mis en évidence (**Westley et al., 1981**).

Les antibiotiques polyéthers sont des métabolites d'origine microbienne, produits largement par le genre *Streptomyces* mais également par d'autres genres d'actinomycètes tels que : *Streptoverticillium* (Cassinelli et al., 1967).

Des révélations positives ont été obtenues pour la molécule au **Rf 0,95** uniquement avec le diphénylamine-aniline et le réactif de Tollens. Cela suggère que l'extrait de la souche **A7** de cette souche contient un ou plusieurs sucres ainsi que des substances réductrices. A ce stade, nous pouvons déduire l'absence des composés ayant des fonctions alcool supérieurs, stéroïdes ou huiles éthers (révélées par la vanilline-H₂SO₄) et de composés de phénols et acides hydroxamiques (révélés par le FeCl₃).

El sheekh, (2006) rapporte que la molécule active de *Nostoc muscorum* ne contient ni sucre, ni protéine ou phosphore. Il est évident que cette dernière ne fait pas partie des macrolides ni des tétracyclines.

Selon **Boucheffa (2011)**, des révélations positives ont été enregistrés pour la molécule au **Rf 0,89** avec le diphénylamine aniline (révélateur des glucides) pour les deux extraits des deux souches étudiés, ce qui suggère la présence d'un ou de plusieurs sucres dans l'extrait de la souche **A7**.

Les sucres participent habituellement dans l'interaction de la molécule avec la cible cellulaire, leur présence étant importante si ce n'est essentiel pour l'activité biologique.

Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont une grande source de substances naturelles bioactives, et comptabilisent les deux tiers des molécules produites par les microorganismes.

Les produits naturels bioactifs sont fréquemment glycosylés, avec des chaînes saccharidiques de différentes longueurs, et dans lesquels ces sucres contribuent dans les interactions spécifiques avec la cible biologique (**Mendes et Salas, 2007**).

Ces observations restent toutefois à relativiser, ces résultats doivent être menés avec des tests complémentaires essentiels tel qu'une purification préalable (chromatographie sur colonne, HPLC), et l'utilisation des techniques spectroscopiques, (IR, RMN, spectroscopie de masse).

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans ce présent travail, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche de métabolites secondaires biologiquement actifs, nous nous sommes intéressés aux aspects microbiologiques, taxonomiques, biochimiques et spectroscopiques des activités antimicrobiennes de deux souches actinomycétales.

Dans le cadre de cette étude, on s'est fixé des objectifs. Ces derniers sont détaillés dans différentes parties qui se succèdent :

- Le criblage des souches d'actinomycètes productrices : ce test a permis de mettre en évidence l'activité antifongiques de neuf souches actinomycétales pour ne choisir que les deux souches A7 et A18 en se basant sur la méthode des cylindres d'agar.
- Étude taxonomique : Sur la base de ces résultats, les deux souches étudiées semblent appartenir au genre *Streptomyces*. Sachant que nos souches n'ont fait l'objet que d'une étude morphologique, chimique et physiologique limitées. Sans l'étude moléculaire, il est impossible d'affirmer avec certitude l'espèce de chaque souche.
- Les métabolites bioactives des deux souches dispersés dans le milieu ISP2 : ont été extraits par deux solvants organiques : Acétate d'éthyle et Méthanol.
- L'étude de ces molécules produites par ces souches a permit de mettre une évidence une activité antibactérienne satisfaisante, avec des zones d'inhibitions variant entre 14 mm contre *B. subtilis* et 19 mm contre *E. coli*, avec 16 mm contre *S. Typhi*.
- L'étude des CMI et CMB : a démontrée une bonne activité de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle et ce avec une concentration inhibitrice de 3,125 µl/ml contre *L. monocytogenes*, 12,5 µl/ml contre *S. Typhi* et 25 µl/ml contre *E.coli* ainsi qu'une CMB de 50 µl/ml contre *S. Typhi* et *E. coli*.

- L'indice antifongique des extraits bruts : a permis d'obtenir le pourcentage maximal de 75,3% de l'extrait méthanolique de la souche **A7** a une concentration de 50 µl/ml contre la souche *A. ochraceus*.
- Le choix du meilleur solvant d'extraction de ces substances : qui s'est révélés être l'acétate d'éthyle pour l'extraction des substances antibactérienne et le méthanol pour l'extraction des substances antifongiques et ce, pour les deux **A7** et **A18**.
- La détermination du meilleur système de migration : C'est l'Acétonitrile/eau (90/10 V/V), qui a permis une séparation optimale des substances bioactives des deux souches.
- La semi-purification des antimicrobiens à permis de déterminer le *R_f* des fractions actives.

Il est à signaler qu'il serait nécessaire d'approfondir l'étude sur les antimicrobiens purifiés de manière à connaître leur toxicité vis-à-vis des cellules animales.

En effet, d'autres analyses plus fines visant à la purification et à la détermination des structures chimiques des antibiotiques telles que l'HPLC, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de masse ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont indispensables pour affiner nos résultats.

Ces investigations ont permis de répondre à un certain nombre de questions. Mais, vu le besoin accru d'antimicrobiens lié a la forte incidence des infections bactériennes et fongiques une recherche dans ce domaine parait prometteuse. Les résultats obtenus bien que préliminaires, sont très intéressants et méritent d'être approfondis.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Références Bibliographiques

- **Adegboye. M. F & Babalola. O. O. 2012.** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. African Journal of Agricultural Research. Vol 7. N° 15. Pp: 2255-2261.
- **Alauzet. C. 2009.** Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification a la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse doc : université Nancy. Pp : 348.
- **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., Daberna H., Denis F. and Monteil H. (1992).** Bactériologie Clinique. Seconde édition, Marketing, Paris. 490-498.
- **Badji. B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. **Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.**
- **Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986)** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique *mircen J. 2 : 453-466.*
- **Beddou ,F (2015) ,** Etude phytochimique et activités biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L et Anvuillea radiata Coss & dur* , Thèse de Doctorat, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- **Beker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A.,(1964)** Rapid differentiation between Nocardia and Srepomyces by paper chromaography of wholcell hydrolysates .Appl.Microbiol., 12, 421-423.
- **Belkherroubi.L. (2009).** Biologie cellulaire et Moléculaire : Effet de l'état physique des antifongiques polyéniques sur leur activité cellulaire : exemple de l'amphotericine B. **Thèse de doctotrat. Université aboubekr belkaid tlemcen.pp132.**
- **Benallaoua S.,Nguyen Van P.,De Meo M P.,Coulon J.,Dumenil G et Bonaly R.(1990).** Recherches sur le mode d'action d'un antifongique non polyénique (desertomycine) produit par une souche de *Streptomyces spectabilis*. *Can .J. Microbiol.36: 609-616.*
- **Beppu T. (1992).** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Genes*. 115, 159-165.

- **Theilleux J., (1993).** Les actinomycètes *In* : Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier, Tech et Doc, V 612p, pp 425.
- **Berdy, J. 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58. Pp: 1-26.
- **Bergey's Manuel. (2007).**Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. Jand Tindall. B.J. *In*: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright Michigan State University Board of Trustees.
- **Barreto, T, R. & al. 2008.** Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of theobroma cacao. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol: 39.N: °3. Pp. 464-465.
- **Bergogne-Bérézin E., Brogard J. M.(1999),** Bases biologiques de l'antibiothérapie. ed., Masson, p. 27.
- **Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
- **Boucheffa K. (2011).** Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes : Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. *Mémoire de magister. Université Abderrahmane Mira Bejaia.*
- **Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., (2007).**Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, 161, 288-298.
- **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.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. 1989.** Organismes producteurs: biologie,Ctaxonomie et écologie. In "Biotechnologie des Antibiotiques". Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson : Paris. Pp: 33-70.
- **Camille D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.
- **Carle S. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel. 36 (1), 25-41.*

-
- **Cwala Z., Igbinsa E. O. and Okoh A. I (2011).** Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(2), pp. 118-124.
 - **Mariadhas V.A., Naif A.A., Valsalam S., Veeramuthu D., Chinnasamy M. (2013)** Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*, *BMC Microbiol.* 2013; 13: 105.
 - **Valan AM, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. (2009).** Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamilnadu. *J Mycologie Med.* 2008;18:147–153.
 - **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.
 - **Khamna S, Yokota A, Lumyong S (2009).** Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soil: diversity and screening of antifungal compound, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:649-655.
 - **Zakir A, Bengtsson M, Hansson BS, Witzgall P, Anderson P. 2009.** Herbivore-induced volatiles reduce egg laying in Egyptian cotton leafworm. Poster presentation in the 25th annual meeting of International Society of Chemical ecology (ISCE), Neuchâtel, Switzerland.
 - **Chitte R. R., Nalawade V. K. et Dey S. (1999).** Keratinolytic activity from the broth of a featherdegrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 131-136.
 - **Cox.P. W, Paul. G. C & Thomas. C. R. 1998.** Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology.* Vol 144. Pp: 817–827.
 - **Crawford D.I., Lynch., Whipps.JM., Ousley M.A.(1993).** Isolation and Characterisation of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *App. Environ. Microbiol.* 59, 3899-3905.
 - **Demain A.L. and Solmon N.A., (1985).** Biology of industrial micro-organisms. The Benjamin/ummins publishing company , INC. California.
 - **Drouhet E. (1978).** Antifungal agents. *Antibiot. Chemother., 25: 253-288.*
-

- **El-Sheekh M.M., Mohamed E.H. Osman, Mohamed A. Dyab, Mohamed S. Amer. (2006)** Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Envir. Toxicol. Pharmacol.* **21**: 42–50.
- **Ensign J. C., Normand p., Burden J. P. et Yallop C. A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**, 657-660.
- **Eunice J. A and Prosser J.I. (1983).** Mycelial growth and branching of streptomyces coelicolor .A3(2) on solid medium.J.gen. Microbil. 129 .2029-2036
- **Falkow. S., Rosenberg. E., Schleifer. K. H., Stackebrandt. E. (2006).** The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Springer. Pp: 1146.
- **Fandohan P., gbenou J. D. and gnonlofin B. (2004).** Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticilloides* and Fumonisin Contamination in Corn. *J. Agric. Food Chem.* **52**, pp. 6824-6829.
- **Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A. and Willeke K. (1998).** Analyse of airborne actinomycete spores witch fluorogenic substrates . *Appl. Environ. Microbiol.* **64**. 4410-4415.
- **Gladek A., Mordarski M., Goodfellow M. and Williams S.T.,(1985)** Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of streptomyces .*FEMS Microbiol.lett.* **26** : 175-180.
- **Goodfellow M. and Williams S. T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev Microbiol.* **37**. 189_216.
- **Gottlieb D .,(1973)** General considération and implication of the actionmycetes.In : actionmycetes characteristics and pratical importance . Edited by G sykes and F.A. skinner. Academic press, London , New York .
- **Grafe U., Eritt I. et Fleck W. F. (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. *Actinom.* **18**, 220-246.
- **Hawker. L.E. & Linton A.H. 1971.** Mico-organismes. Pp: 325-333. 56. Hop.
- **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 2340–234.
- **Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, I. M. & Schrempf, H. (1985).** *Genetic Manipulation Streptomyces: a Laboratory Manual*. Norwich : John Innes Foundation.
- **Hozzein WN., Ahmed MB., Abdel Tawab MS. (2008).** Microbial community structure in a wastewater treatment plant in Beni-Suef City. *New Egypt. J. Microb.* **20**: 189-201.

-
- **Hulin. A, Deguillaume.A.Mm Bretagne.S.,** Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergillose invasives. *J Pharm Clin.* 2005 ; 24(3) :125-38.
 - **Hwang B.K.,Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., and Moon S.S. (2001).**isolation and in vivo and vitro antifungal activity of phenylacetie acid and sodium phenylacetate from *Streptomyce humius*.*Appl. Environ. Microbiol.***67.**3730-3745.
 - **Inoue O. O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R. (2007).** Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology.* 38: 58-61.
 - **Janssen J.J., Strack Van Schijndel R.J., Van Der Poest Clement E.H. (1996).** Outcome of ICU treatment in invasive aspergillosis. *Intensive Care Med* **22** : 1315-22.
 - **Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca.* **2: 63-74.**
 - **Judd. S. W, Campbell. C.S , Kellogg. E. A, Stevens. P. (2001).** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck : Bruxelles. Pp : 467.
 - **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 W., Spear ED., Ng DT. (2005).**Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* 19(6):753-64.
 - **Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H et al., 2005.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal of Medical Mycology.* **15: 45-51.**
 - **Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* 4, 113-121.
 - **Larpent J. P. 2000.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. Lavoisier. France.**4 : 183-212.**
 - **Larpent J.p.et Sanglier J. J., (1989).** Biotechnologie des antibiotiques . Masson. Paris.
 - **Lechevalier H.A.,and le chevalier M.P. (1981),**introduction to the order actionmycetes.In : the prokaryotes ,vol.2 (star M. P.,H stlop, H.G. Truper.A ballows and H.G.schlegel .Eds.), springer-verlag , berlin. P.1915.1921.
 - **Lechevalier M.P and Lechevalier H. (1970).** chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int.j.Syst.Bacteriol.***20.** 435-443
-

- **Lefebvre. O. (2005).** Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse de doctorat. **Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. pp 271**
- **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.
- **Liu Zhiheng, Shi Yanlin, Zhang Yamei, Zhou Zhihong, Lu Zhitang, Li Wei, Huang Ying, Rodriguez C. Goodfellow M. (2005).** Classification of the *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of *Microstreptospora cinerea* to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp.nov. *IJSEM.* 55: 1605-1610.
- **Méndez C, Salas JA.** Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends Biotechnol.* 2001;19:449–456.
- **Westley. J.W; Evans. R.H Jr; Sello. L.H; Troupe. N; Liu. C; Blount. J.F; Pitcher. R.G; Williams.T.H; and Miller. P.A. (1981).** Isolation and characterization of the first halogen containing polyether antibiotic x-14766a, a product of *Streptomyces malachitofuscus subsp. downeyi*. *J. Antibio.,* 34 (2), 139- 147.
- **Cassinelli. G ; Grein. A ; Orezzi. P ; Pennella. P ; and Sanfilippo. A. (1967).** New Antibiotics Produced by *Streptovercillium orinoci*, n. sp. *Archiv. Für Mikrobiol.* 55 : 358-368.
- **El-Sheekh M.M., Mohamed E.H. Osman, Mohamed A. Dyab, Mohamed S. Amer.(2006)** Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Envir. Toxicol. Pharmacol.* 21: 42– 50
- **Locci R.,(1976.** »Developmental micromorphology of actinomycetes «. In *actinomycetes.the boundary microorganisms*.Arai T.Ed.Tokyo.170-180.
- **Mariat F. et Sebald M. (1990).** Les actinomycètes. In: *Bactériologie médicale. Le Minor.* Edition Médecine-Science. Flammarion. France.935-949.
- **Martin J.E. (1992).** Clusters of genes for biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Indus. Microbiol.* 9: 73-90
- **Mason M. G., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. et Wilson M. T. (2001).** Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes : A case of Mistaken identity. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(10), 4512-4519.

-
- **Messaoudi O., (2013)** . Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien : contribution à la caractérisation des actinomycètes productrices de métabolites antimicrobiens isolés de la Sebka de Knadsa (Bechar), **Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.**
 - **McKinney. R.E. 2004.** Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448.
 - **Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. 2000.** *Streptomyces*: A new model to study cell death. J. Cell. Biol. 3: 153–158.
 - **Million L. (2006).** Antifongiques : traitement des mycoses invasives. DIU chimiothérapie anti infectieuse.
 - **Minikin D. E., Patel P. V., Alshanaony L., Goodfellow M. 1977.** Polar lipid composition in the classification of Nocardia and related bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 27: 104-7.
 - **P. Margalith, P. Z..** Edition. 1st ed. Published. London ; New York : Chapman & Hall, 1992. Physical Description, 2009.
 - **Augustine S.K., Bhavsar S.P. and Kapadnis B.P. (2005)** Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indien J. Med. Res.* 121:164-170.
 - **Mustin M. (1987).** Le Compost, gestion de la matière organique. Ed : François Dubusc. Paris, 954.
 - **Marrakchi R, Chouchani C, Cherif M, Boudabbous A, Ramotar D, (2011)** The isomerase Rrd1 mediates rapid loss of the Sgs1 helicase in response to rapamycin. *Biochem Cell Biol* 89(3):332-40.
 - **Dembitsky V. M. (2005).** Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 2. Polyether Glycosidic Ionophores and Macrocyclic Glycosides. Rev. Department of Organic Chemistry and School of Pharmacy, Hebrew University, Jerusalem, Israel., In: Lipids,40: 219–248.
 - **Nanjani. S. G & Soni. H. P. 2011.** Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. *Bioinformatica* .Vol: 1. N°: 1. Pp: 1-15.
 - **Neyra, M. (1992).** Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/rhizobium. Food & Agriculture Org. Pp: 200.

- **Nonomura H., hayakawa (1988).** New methods for selective isolation of soil actinomycetes. In Okami y., Beppu T. and ozawara H., (ed.) *Biology of actinomycetes.* Japan scientific societies Press Tokyo. pp 288-293.
- **Omura s., (1992)** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer. Verlag. New York.
- **Ostrosky-zeichner Luis,arturo casadevall,john N.Galgiani, Frank C.Odds and john H.Rex. (2010).** An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond.nature Reviews Drog Discovery.
- **Ouhdouch. Y. Barakate. M. Finance. C. 2001.** Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *European Journal of Soil Biology.* Vol: 37. N°: 2. Pp: 69–74.
- **Otto. H. J. 1998. Écologie forestière.** institue pour le développement forestier : Paris. Pp : 397.
- **Petinate S.D.G., Martin R.M., Coelho R.R.R., Meirelles M.N.L., Branquinha M.H. and Vermelho A.B. 1999.** Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. *Mémoire de l'institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 91(6): 755–760.
- **Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal 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).
- **Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2010.** *Microbiologie.* De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088.
- **Pridham. T. G & Gottlieb. D. 1949.** The utilisation of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* Vol 56. Pp: 107-114.
- **Rangaswami. G. Bagyaraj. D. J. Bagyaraj D.G. 2004.** *Agricultural Microbiology.* PHI : New Delhi. Pp : 440.
- **Rautemaa R.,Richardson M.,Michael A.,faller P., Perheentupa J., saxen H.(2008).** Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconazole and Voriconazole against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 62 :182-185
- **Reponen T.A., Gizenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K.and Cole E.C ;(1998)** Characteristics of airborne actionmycete spores. *Appl. Environ. microbiol.* 64.3807-3812.

- **Rivas R., Sanchez M., Trujillo M. E., Zurdo-pineiro J. L., Mateos P. F., Martinez- Molina E. et Velazquez E. (2003).** *Xylanimonas cellulosityca* gen. Nov., sp. Nov., a xylolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 99-103.
- **Sabaou. N. 1988.** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et ecologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.
- **Sanglier J.J. et Trujillo M.,(1997)** substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches .*bull. Soc.Fr.Microbiol.*, 12, (13) pages.
- **Schmitzer P.R., Graupner R.R., Chapin E.L., Fields S.C., Gilbert J.R., Gray J.A et al., (2000).** Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation. *Natural Products.* 63: 777-781
- **Schofield G.M. and Schaal K.P. 1981.** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetales* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 121: 237–259.
- **Shirling E.B . and Gottlieb D., (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst.Bact.*,16,313-340
- **Shukla. G. Soil Enzymology. 2010.** Springer: Berlin. Pp: 384.
- **Smaoui S. 2010.** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement.Université de Toulouse. France. 251p.
- **Smaoui.S (2010).** Génie de Procédés et Environnement : Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. **Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse.pp182.**
- **Song j., Weon H. Y., Yoon S. H., Parrk D. S., Go S. J. and Suh J. W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic Actinomycetes and *Thermoactinomycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16s r RNA gene sequence analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 202, 97-102. *Streptomyces humidis. Applied and Environmental Microbiology.* 67: 3739-3745.
- **Sturdikova M., Sturdik E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgimica Slovaca.* 2: 63-74.
- **Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A. (2002).** Media for cultivation of indoor *streptomyces*. *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.

-
- **Bushell, M.E. 1993.** A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering*. Vol: 76. N°: 2. Pp: 89-93.
 - **Naimi S. (2014).** Test d'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes éventuellement productrices d'antibiotiques isolées à partir des sols des zones arides dans la région d'El Bayadh. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'états en biologie. Option control de qualité et analyse. Université Dr Moulay Tahar. Saida.
 - **Takahashi Y., Omura S. 2003.** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. **49: 141-154.**
 - **Theilleux J. (1993) In Levreau J. Y., Bouix M. O.** Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch **6 : 425-481.**
 - **Thenmozhi. M and Kannabiran. K 2010.** Studies on Isolation, Classification and Phylogenetic Characterization of Novel Antifungal *Streptomyces* sp. VITSTK7 in India. Vol: 2. N°: 5: 306-312.
 - **da Silva FR, Tassis AC, Ferreira PF, Rangel LP, Garcia-Gomes AS, Pereira FR, Berlinck RG, Muricy G, Ferreira-Pereira A. (2011).** Oroidin inhibits the activity of the multidrug resistance target pdr5p from yeast plasma membranes. *J Nat Prod* 74(2):279-82
 - **Yuan Y et Wilson R. (2008).** Partial mixture model for tight clustering of gene expression time course. *BMC Bioinformatics* 9:287
 - **Nodwell, J. R., and R. Losick.** 1998. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180:1334-1337.
 - **Tighidet S. (2011).** Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes : *Caractérisation d'antifongiques non polyéniques produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production. Mémoire de magister. Université Abderrahmane Mira Bejaia*
 - **Tulkens P., Van Bambeke V. (2008).** Pharmacologie et Pharmacothérapie Antiinfectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie.
 - **Vandeputte. V. (2008).** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France). pp 168.
-

- **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. 1961.**The actinomycetes. vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC : Baltimore. Pp : 327.
- **Wang L; Huang. Y; Liu. Z; Goodfellow. M & Rodri guez. C. 2006.** *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. J. Sys. Ev. Microbiol. Vol 56. Pp: 1257-1261.
- **Weyland H. (1981).** Distribution of actinomycetes on the sea floor. In : Actinomycetes. Eds : K. Schaal, G. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. *Zbl. Bakt. Suppl.* 11, 185-193
- **Wildermuth H. and Hopwood D.A. 1970.** Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Micobiol. 60: 51–59.
- **Williams S.T.,Iocci R.,Beswick A .,Kurboke D.I.,Kunznetsov V.D.,Le Monnier F.J., Long P.f., Mycrof k.A., palmaR.A., petrolini B ., Quaroni S., Todd J.i. and West M.,(1993)** detection and identification of novel actinomycetes. Pres Microbiol.144.p.653_656
- **Wink J.** Laboratory studies: Actinobacteria, Taxonomic evolution and microbial drug screening, HELMHOLTZ CENTRE FOR INFECTION RESEARCH.
- **Winn. W. C, Koneman. E. W. 2006.** Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Williams & Wilkins: Washington. Pp: 1565.
- **Xu l.H., Li Q. Rand JiangC.I., (1996)** Diversity of soil actinomycetes in yunnan , China. Appl. Environ. Microbiol., 62,244-248
- **Zaitlin B., Watson S. b., Ridal J., Satchwill T. et Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario : Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* 95 (2), 113-118.
- **Zitouni. A; Boudjella. H; Lamari. L; Badji. B; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. N. (2005).** *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol., 156 : 984–993.*
- **Zvyagintsev. D. G; Zenova. G. M ; Sudnizin. I. I ; Doroshenko. E. A. 2005.** The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.
- **Zerizer H., Oulmi L., Boughachiche F., Reghioua S., Boudemagh A., Kitouni M., Boulahrouf A. (2005).** Identification d'une Actinomycétale productrice d'antibactérienne isolée

de sols Arides de la région de Biskra. Laboratoire de Génie Microbiologique et application –
Faculté des sciences-Université Mentouri-Constantine. Algérie. Ch 6 : 155-178.

ANNEXES

Milieux de culture**Bennett**

| | |
|---------------------------------|--------|
| Extrait de levure | 1g |
| Extrait de viande de boeuf | 1g |
| Peptone pancréatique de caséine | 2g |
| Glucose | 10g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH 7.3

Mueller Hinton

| | |
|------------------------------|--------|
| Extrait de viande | 2g |
| Hydrolysate acide de caséine | 17,5g |
| Amidon | 1,5g |
| Agar | 10g |
| Eau distillée | 1000ml |

pH 7,4

Mueller Hinton Bouillon (MHB)

| | |
|------------------------------|--------|
| Extrait de viande | 2g |
| Hydrolysate acide de caséine | 17,5g |
| Amidon | 1,5g |
| Eau distillée | 1000ml |

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 20g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,2

Eau physiologie

Na Cl 9g

Eau distillée 1000ml

ISP2 (International Streptomyces Project)

Extrait de levure 4g

Extrait de malt 10g

Glucose 4g

Agar 20g

Eau distillée 1000ml

pH 7.3

Potato Dextrose Agar (PDA)

Infusion de pomme de terre (300g de Pomme de terre + 500ml eau distillée)

Agar 15g

Glucose 20g

Eau distillée QSP 1000ml

Les colorants

Lugol

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

Violet de gentiane

| | |
|--------------------|--------|
| Violet de gentiane | 1g |
| Ethanol à 90 | 10g |
| Phénol | 2g |
| Eau distillés | 1000ml |

Fuchsine

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