



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Dr. Moulay Taher Saïda

Faculté des Sciences

Département De Biologie Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation  
biologique des Plantes

## MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

M<sup>elle</sup>. HAKKOUM Narimene & M<sup>elle</sup>. GUENDOUDI Bakhta

Sur le thème intitulé :

**Isolement à partir de divers biotopes naturels d'Algérie des  
actinomycètes éventuellement productrices d'antibiotique**

Soutenu le : 13 - 09 - 2020.

Devant la commission de jury, composée de :

Mr. ADLID EH	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Président
Mr. ZIANI.K	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Examineur
Mr. BENREGUIEG.M	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Encadreur

Année universitaire 2019/ 2020

## Remerciements

*Nous remercions tout d'abord Dieu qui nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Nous adressons toute nos gratitudee au **Dr. Benreguiég Mokhtar** lequel ce travail n'aurait pu aboutir, Nous le remercions pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience. On lui adresse toutes nos reconnaissances pour sa patience, sa disponibilité et sa participation lors de la rédaction de mémoire. On le remercie pour ses conseils éclairés dans l'orientation de ce travail, ses nombreuses idées, ainsi que pour son soutien moral.*

*On remercie vivement **Dr. Adli D.E.H** d'avoir accepter de présider le jury de ce mémoire ainsi que **Dr. Ziani K** d'avoir accepter d'examiner ce travail.*

*Nous sommes très honorés d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos conseils précieux tout au long de ces années, quoique nous disons, on ne pourrait vous rendre ce que vous avez fait pour nous, Qu'Allah vous bénisse.*

*Nos remerciements vont tout particulièrement à tous nos professeurs de la spécialité de microbiologie appliquée, sans aucune exception, qui nous ont prodigué le savoir, tout au long de nos cursus universitaire :*

***Mr. Halla, Mr. Ghellai, Mr. Sitayab, Mr Ammam, Mr. Loth, Mr Gacemi, Mlle Amara, Mm Alioui, Mm Fares.***

*On remercie également l'équipe du laboratoire de l'Université DR Moulay Tahar saida.*

*nos sincères remerciements vont aussi à ma chère **Meglali Amina** pour leur soutient innombrable.*

*Une pensée amicale à nos collègues de la promotion et à nos amis pour leur aide, leur patience, leur compréhension et leur encouragement : **Bakhta, Amina, Sara, Soumia, houyam ....***

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près*

*ou de loin à la réalisation de ce travail et qui nous ont encouragés.*

## Dédicace

*Avant tous Je rends grâce à Dieu tout puissant pour sa miséricorde  
sans lui rien n'aurait été possible,  
Quand il y a le souci de réaliser un dessein Tout devient facile pour  
arriver à nos fins Malgré les obstacles qui s'opposent En dépit des  
difficultés qui s'interposent Les études sont avant tout Notre unique  
et seul atout.*

*Ce travail est dédié*

*à la femme qui m'a donné la force et m'a poussé et encouragé  
pour être une étoile dans le ciel quand j'étais une pierre sur*

*le sol... à ma mère*

*que dieu la conserve ;*

*et après les efforts qui a faits et qu'il fait encore et*

*toujours pour le bien de notre famille,*

*je souhaite à elle une longue et joyeuse vie*

*je remercie en particulier mon père, pour son soutien  
inconditionnel, pour sa confiance permanente et l'acceptation de  
mes choix*

*parfois ambitieux.*

*Il a toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus  
grande des compréhensions.*

*Aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.*

*Je ne peux oublier de remercier chaleureusement ma chère sœur  
pour avoir cru en moi et auxquels je souhaite une vie pleine de joie  
et de bonheur.*

*A mon ami qui présente pour moi la source de tendresse qui m'a  
encourager et pour son soutien de tous les instants merci beaucoup  
jamais j'oublie votre respect à moi que dieu te garde.*

*Et sans oublier mon amie Hayat pour le soutien au cours de mes  
années d'études.*

*Narimene*

## **Dédicace**

*Je remercie tout d'abord mon dieu de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour Leur amour, leurs encouragements incessants. Pour m'avoir Toujours écoutée et leurs soutien moral ainsi que leurs précieux Conseils toutes ces longues années d'études.*

*A mes chers frères :*

*DJILLELI.BOUBAKAR.MOHAMED.KADA.KOUIDER*

*A tous mes amis surtout :*

*NARIMENE.HOUDA.MOKHTARIA.ZAHIA.OMIMA.*

*SOUMIA.HALIMA.RAOUNEK*

*A ma belle-famille et à tous mes collègues de ma promotion.*

*A tous ceux et celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du bien  
De près ou de loin.*

**Bakhta**

## Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes extrêmes de l'Algérie sont rares.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'isolement à partir de différents écosystèmes naturels de ces bactéries et le screening des isolats obtenus pour leur activité antibactérienne.

Trois milieux de cultures différents sont utilisés pour l'isolement, Il s'agit de Gym, Bennet et ISP2. Un total de 154 isolats est obtenu sur les différents échantillons et sur les différents milieux de culture.

Le taux le plus important des isolats (60) est obtenu dans l'échantillon de l'eau thermale de Sidi Aissa (Wilaya de Saida) sur le milieu Bennet. 17 isolats sont purifiés et testés ensuite pour leur activité antibactérienne contre ' bactéries indicatrices connues par leur importance dans les pathologies humaines (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*).

Un isolat, codé M1 obtenu de l'échantillon du sol rhizosphérique de l'arbre Moringa situé dans la wilaya de Ouargla, a montré un pouvoir inhibiteur important traduit par des diamètres élevé des zones d'inhibition (17 mm contre *Bacillus cereus* et 21 mm contre *Escherichia coli*). Ce dernier est retenu pour des travaux ultérieurs de production, purification et caractérisation de ses métabolites bioactives.

La pré-identification de l'isolat a été réalisée en se basant sur les caractères physiologiques et biochimiques. La culture de l'isolat sur le milieu **GYM** donne des colonies poudreuses circulaires bossues sèches, ce qu'il rapproche du genre *Streptomyces*.

**Mots clés :** Actinomycètes, activité antibactérienne, métabolites bioactives, caractères physiologique et biochimique, *Streptomyces*.

## Abstract

Actinomycetes are bacteria responsible for the production of most bioactive molecules. Work on the isolation of these microorganisms from the extreme ecosystems of Algeria is rare.

In this work, we were interested in the isolation from different natural ecosystems of these bacteria and the screening of the isolates obtained for their antibacterial activity.

Three different culture media are used for isolation, These are Gym, Bennet and ISP2. A total of 154 isolates are obtained on the different samples and on the different culture media.

The highest rate of isolates (60) is obtained in the sample of thermal water from Sidi Aissa (Town of Saida) on Bennet medium. 17 isolates are purified and then tested for their antibacterial activity against 'indicator bacteria known for their importance in human pathologies (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus).

An isolate, coded M1 obtained from the sample of the rhizospheric soil of the Moringa tree located in the town of Ouargla, showed significant inhibitory power expressed by high diameters of the zones of inhibition (17 mm against Bacillus cereus and 21 mm against Escherichia coli). The latter is selected for subsequent work on the production, purification and characterization of its bioactive metabolites.

Pre-identification of the isolate was performed based on physiological and biochemical characteristics. Cultivation of the isolate on **GYM** medium yields circular, powdery, hunched, dry colonies, which resemble the genus *Streptomyces*.

**Keywords:** Actinomycetes, antibacterial activity, Bioactive metabolic, physiological and biochemical characteristics, *Streptomyces*.

## ملخص

الأكتينومييسات هي بكتيريا مسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيًا. إن العمل على عزل هذه الكائنات الدقيقة عن النظم البيئية المتطرفة في الجزائر أمر نادر الحدوث .

في هذا العمل، كنا مهتمين بعزل هذه البكتيريا من النظم البيئية الطبيعية المختلفة و فحص العينة التي تم الحصول عليها لنشاطها المضاد للبكتيريا . تم استخدام ثلاث وسائط زراعية مختلفة للعزل، وهي Gym و Bennet و ISP2 تم الحصول على إجمالي 154 نوع من البكتيريا من العينات المختلفة وعلى أوساط الاستزراع المختلفة .

تم الحصول على أعلى معدل للبكتيريا (60) في عينة المياه الحرارية من سيدي عيسى ولاية سعيدة على وسط Bennet. تم انتقاء 17 بكتيريا تم اختبار نشاطها المضاد ضد البكتيريا المعروفة بأهميتها في الأمراض البشرية

*Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus* , *Pseudomonas aeruginosa*.

أظهرت البكتيريا المشفرة M1 المأخوذة من عينة التربة لجذور شجرة المورينجا الواقعة في ولاية ورقلة، قوة مثبطة كبيرة معبرًا عنها بأقطار عالية من مناطق التثبيط 17 ملم ضد *Bacillus cereus* و 21 ملم ضد *Escherichia coli*. تم اختيار الأخيرة للعمل عليها لاحقًا في إنتاج وتنقية وتوصيف الجزيئات النشطة بيولوجيًا .

تم إجراء التحديد المسبق للبكتيريا المعزولة بناءً على الخصائص الفيزيولوجية و الكيميائية الحيوية . زراعة البكتيريا المعزولة على الوسط GYM نتج عنه جماعة منعزلة دائرية، محببة، جافة، تشبه سلالة *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية :الأكتينومييسات، النشاط المضاد للبكتيريا، الجزيئات النشطة بيولوجيا، الخصائص الفيزيولوجية و الكيميائية الحيوية ، *Streptomyces* ،

## Liste des abréviations

- ❖ %: Pourcentage.
- ❖  $\mu\text{L}$ : Microlitre.
- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ❖ **AF** : Actinomycète fermentation.
- ❖ **ARN** : Acide ribonucléique.
- ❖ **ATB** : Antibiotique.
- ❖ **ATCC**: American Type Culture Collection.
- ❖ **ATP** : Adénine triphosphate.
- ❖ **BN**: Bouillon nutritif.
- ❖  $\text{C}^\circ$ : Degré.
- ❖ **CaCO<sub>3</sub>** : Carbonate de calcium.
- ❖ **CCM** : Chromatographie sur couche mince.
- ❖ **CMB** : Concentration minimale bactéricide.
- ❖ **CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- ❖ **DO** : Densité optique.
- ❖ **EUCAST** : Comité Européen pour les tests de Susceptibilité Antimicrobien.
- ❖ **G** : Grossissement.
- ❖ **G/C** : Guanine et Cytosine.
- ❖ **G**: Gramme.
- ❖ **GN**: Gélose nutritif.
- ❖ **Gram-** : Gram négative.
- ❖ **Gram+** : Gram positive.
- ❖ **GYM** : glucose-Extrait de levure -Malt.
- ❖ **H**: heure.
- ❖ **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.
- ❖ **H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'hydrogène.
- ❖ **ISP2** : International Streptomyces Project.
- ❖ **ISP7**:International Streptomyces Project.
- ❖ **MA** : Mycélium aérien.
- ❖ **MHB** : Bouillon Muller Hinton.
- ❖ **Min** : Minute.



- ❖ **ml**: Millilitre.
- ❖ **MS** : Mycélium de substrat.
- ❖ **NaCl** : Chlorure de sodium.
- ❖ **nm**: Nanomètre.
- ❖ **O<sub>2</sub>** : Oxygène.
- ❖ **P/V** : poids sur volume.
- ❖ **PCR** : Polymerase Chain Reaction.
- ❖ **PH** : Potentiel d'hydrogène.
- ❖ **Rf** : Rapport frontale
- ❖ **Rpm** : rotation par minute.
- ❖ **S/cl**: Sous classe.
- ❖ **S/O**: Sous ordre.
- ❖ **S**: Seconde.
- ❖ **TSE**: Tryptone, sel, eau.
- ❖ **UFC**: Unite formant colonies.
- ❖ **Ug** : Microgramme.
- ❖ **V/V** : Volume sur volume.
- ❖ **V**: volume.

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	La classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S	6
2	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représenté	8
3	Croissance abondante d'isolat d' <i>Actinobacteria</i> sur milieu gélose amidon caséine.a). Mycélium aérien. b). Verso de la plaque montrant le mycélium du substrat.	9
4	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i>	13
5	des isolats d' <i>Actinobacteria</i> sur une plaque de gélose à la caséine d'amidon. (a, c)Vue en plaque des isolats actinobactériens. (b, d) Morphologie des colonies individuelles.	16
6	observation de la surface des spores au microscope électronique à balayage	17
7	Type de structure sporulée chez les streptomycètes.	17
8	Application biotechnologiques des actinobactéries.	27
9	Antibiotiques d'actinobactéries.	28
10	Différents types d'enzymes produits par <i>Actinobacteria</i> . (a). Amylase. (b). Protéase. (c). Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation <i>Actinobacteria</i> confirme la production d'une enzyme particulière	30
11	Pigment diffusible produit par diverses Actinobactéries en milieu gélose amidon caséine	34
12	Protocole d'isolement non sélectif d'actinomycètes de sols.	53
13	Technique de culture sur lamelle.	56
14	Ensemencement de la microplaque.	64

<b>15</b>	Aspect macroscopique des souches d'actinomycètes.	<b>69</b>
<b>16</b>	Observation microscopique après coloration de Gram. (Gx100)	<b>70</b>
<b>17</b>	Résultats du test d'antagonisme des isolats d'actinomycètes (cylindre d'agar).	<b>72</b>
<b>18</b>	Aspect micromorphologique d'isolat M1 (G×40) sur milieu GYM.	<b>75</b>
<b>19</b>	L'utilisation de citrate comme source de carbones par l'isolat M1.	<b>76</b>
<b>20</b>	Résultats de test de l'uréase.	<b>76</b>

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	isolement des actinomycètes à partir de divers habitats écologiques	<b>7</b>
<b>2</b>	Critères chimiques d'identification des Actinomycètes	<b>20</b>
<b>3</b>	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	<b>22</b>
<b>4</b>	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes	<b>23</b>
<b>5</b>	Spécificités des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie des Streptomyces	<b>24</b>
<b>6</b>	Pigments d'actinobactéries	<b>33</b>
<b>7</b>	Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires	<b>37</b>
<b>8</b>	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.	<b>40</b>
<b>9</b>	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes	<b>41</b>
<b>10</b>	Situation géographique des stations d'échantillonnage.	<b>51</b>
<b>11</b>	L'isolement de souches actinomycètes à partir des échantillons de sol.	<b>66</b>
<b>12</b>	Tableau synthétique des différents caractères macromorphologique des 5 souches d'actinomycètes.	<b>68</b>
<b>13</b>	Aspect macroscopique et microscopique des souches cible utilisées.	<b>71</b>
<b>14</b>	Résultats de l'activité antibactérienne (mm) des isolats d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminé par la méthode des cylindres d'agar.	<b>72</b>
<b>15</b>	Etude macromorphologique et caractères cultureux d'isolat actif.	<b>74</b>
<b>16</b>	Les caractéristiques physiologiques et biochimiques d'isolat actif.	<b>75</b>

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
ملخص .....	iii
Liste des abréviations .....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux .....	viii
Introduction .....	1

### Synthèse bibliographique

<b>Chapitre I : Les actinomycètes</b> .....	4
1. Définition.....	4
2. Taxonomie .....	5
3. Les principaux caractères des actinomycètes .....	6
3.1. Habitat.....	6
3.2. Morphologie.....	8
3.2.1. Mycélium aérien.....	9
3.2.2. Substrat mycélium :.....	9
3. Physiologie et métabolisme .....	10
3.1. Physiologie.....	10
3.2. Métabolisme.....	10
3.2.1. Le métabolisme primaire.....	11
3. 2.2. Le métabolisme secondaire .....	11
4. Cycle de développement des actinomycètes .....	12
5. Le matériel génétique .....	13
5.1. ADN chromosomique .....	14
5.2. ADN plasmique et ADN phagique .....	15
6. Critères d'identification des actinomycètes.....	15
6.1. Critères morphologiques .....	15
6.2. Caractères macromorphologiques.....	15
6.3. Caractères micromorphologiques .....	16
6.4. Critères physiologiques.....	18
6.5. Critères chimiques .....	18
6.5.1. Composition pariétale en acides aminés .....	18

6.5.2. Composition cellulaire en sucres.....	19
6.5.3. Classification des actinomycètes en chimiotypes .....	19
6.5.4. Composition en lipides .....	21
6.6. Critères moléculaires .....	22
6.6.1. Composition en GC%.....	23
6.6.2. Hybridations ADN-ADN .....	24
6.6.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (LFRFA).....	25
6.6.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD-PCR).....	25
6.6.5. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S et phylogénique .....	25
7. Application des actinomycètes .....	26
7.1. Antimicrobiens.....	27
7.2. Enzymes.....	29
7.3. Bioherbicides .....	30
7.4. Probiotiques .....	30
7.4.1. Pheromones peptidiques agrégatives .....	31
7.5. Biosurfactants .....	32
7.6. vitamines.....	32
7.7. Pigments.....	33
7.8. Synthèse de nanoparticules .....	34
7.9. Bioremédiation.....	35
7.10. Amélioration de la croissance des plantes .....	35
7.11. Biolarvicides .....	36
<b>Chapitre II : Les métabolites secondaires .....</b>	<b>37</b>
1. Métabolisme des actinomycètes .....	37
2. Les antibiotiques.....	38
2.1. Historique.....	38
2.2. Définition d'antibiotiques .....	38
2.3. Les antibiotiques produits par les actinomycètes.....	39
2.4. Classification des antibiotiques .....	43
2.4.1. Familles des $\beta$ -lactamines .....	43
2.4.2. Les pénicillines.....	44
2.4.3. Les céphalosporines .....	44
2.4.4. Les aminosides .....	44

2.4.5. Les phénicolés.....	45
2.4.6. Les tétracyclines.....	45
2.4.7. Les macrolides.....	45
2.4.8. Les quinolones.....	46
2.4.9. Les polypeptides.....	46
3 .Mode d'action des antibiotiques.....	47
3.1. Action sur la paroi bactérienne.....	47
3.2. Action sur la membrane cellulaire.....	47
3.3. Synthèse des protéines.....	48
3.4. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques.....	48
3.5. Autres activités.....	48
4. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	49
4.1. Définition.....	49
4.2. Types de résistance.....	49
4.2.1. Résistance naturelle.....	49
4.2.2. Résistance acquise.....	50

### **Synthèse expérimentale**

<b>Chapitre III : Matériels et Méthodes</b> .....	50
1. Objectif.....	50
2. Origine du prélèvement des échantillons.....	51
3. Technique du prélèvement, transport et conservation.....	51
4. Isolement, dénombrement, purification et conservation des souches.....	52
4.1. Prétraitement des échantillons.....	52
4.2. Technique d'ensemencement et conditions d'incubation.....	52
4.2.1. Préparation et ensemencement.....	52
4.2.2. L'incubation.....	52
4.3. Dénombrement.....	54
4.4. Observation microscopique.....	54
4.5. Purification et conservation des souches isolées.....	54
5. Etude morphologique.....	55
5.1. Etude macromorphologique.....	55
5.2. Etude micromorphologique.....	55
6. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes.....	57

6.1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide.....	57
6.2. Etude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées.....	58
6.2.1. Sélection des souches d'actinomycètes.....	58
6.2.2. Etude des caractères morphologiques .....	59
6.2.3. Etude physiologique et biochimique .....	59
6.3. Production et extraction des métabolites secondaires.....	62
6.3.1. Fermentation solide .....	62
6.3.2. Fermentation liquide .....	62
6.3.3. Technique des disques de diffusion .....	62
6.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	62
6.4. Caractérisation de la molécule bioactive .....	65
6.4.1. Chromatographie sur couche mince.....	65
6.4.2. Bioautographie des molécules bioactives .....	65
<b>Chapitre IV : Résultats et Discussion</b> .....	<b>66</b>
1. Isolement des actinomycètes .....	66
2. Etudes morphologiques des souches d'actinomycètes .....	67
2.1. Aspect macroscopique (Caractères cultureux) .....	67
2.2. Aspect microscopique.....	70
3. Recherche de l'activité antibactérienne.....	70
3.1. Purification et confirmation de l'identité des bactéries-tests.....	70
3.2. Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives .....	72
4. Identification des souches d'actinomycètes actives .....	74
4.1. Résultats de l'étude morphologique .....	74
<b>Conclusion</b> .....	<b>77</b>
<b>Référence bibliographique</b> .....	<b>83</b>
<b>Annexes</b>	



# **Introduction**

# Introduction

---

## Introduction

Depuis le siècle dernier, un grand progrès a été réalisé dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, permettant ainsi de lutter de manière efficace contre la plupart des agents infectieux. Cependant, face à l'évolution de nouvelles maladies infectieuses, et au nombre croissant des cas de résistance à certains antibiotiques et à la toxicité de certains d'entre eux, il était essentiel et urgent de rechercher de nouveaux antibiotiques (Strohl, 1997). Ceux-ci peuvent être obtenus par fermentation microbienne ou par modification chimique d'un produit microbien (hémi synthèse) ou encore par synthèse chimique totale (Donadio et al., 2002).

Les microorganismes et les plantes constituent la principale source naturelle d'antibiotiques (Lazzarini et al., 2000). Kim et al., 2000) rapportent que les antibiotiques naturels présentent des caractéristiques prometteuses permettant le contrôle des maladies infectieuses car ils sont facilement et rapidement biodégradables et faiblement toxiques. De plus, la diversité de leurs activités biologiques et leurs structures chimiques fournit des modes d'action intéressants (Tanaka et Omura, 1993 ; Thiele-Bruhn, 2003). Outre leurs activité antimicrobiennes, les antibiotiques sont souvent doués d'autres activités biologiques telles que les activités antitumorales, hypocholestérolémique, inhibitrice d'enzymes, ou encore antiparasitaire, insecticide et herbicide, etc. (Demain, 1999). En agriculture par exemple, les métabolites d'origine microbienne pourraient résoudre les problèmes liés à l'utilisation d'antibiotiques synthétiques et des autres produits chimiques, à savoir, leur toxicité vis-à-vis des cellules végétales, leur faible biodégradabilité entraînant l'accumulation de résidus néfastes dans le sol et l'induction de résistance chez les souches phytopathogènes (Kim et al., 2000).

Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont les plus grands producteurs d'antibiotiques (Sanglier et al., 1993 ; Takahashi et Omura, 2003). Le genre *Streptomyces* est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de plusieurs laboratoires dans le monde. Il sécrète près de 80 % des antibiotiques naturels commercialisés et utilisés en médecine (Miyadoh, 1993 ; Watve et al., 2001). Strohl (1997) estime que sur 12000 molécules provenant de microorganismes, 55% sont produites par les actinomycètes du genre *Streptomyces*. Cependant, avec l'apparition de plus en plus croissante de souches pathogènes résistantes (Demain, 2000). Plusieurs de ces antibiotiques sont devenus aujourd'hui peu ou non efficaces

## Introduction

---

(Demain,2000). Plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces (Stead,1997). L'une d'elles vise des souches de genres rares d'actinomycètes ( autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes( de température , de salinité , de ph, etc.),ces actinomycètes rares disposeraient d'un système enzymatique et d'un métabolisme particuliers leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques . En effet, cette fraction d'actinomycètes s'est révélée être une source potentielle d'antibiotiques (Lazzarini et al.,2000 ;Newman et al.,2003 ;Gathogo et al.,2004).

Les actinomycètes rares sont faiblement représentés dans le sol. Leur croissance sur les boîtes d'isolement est très lente et ne peuvent rivaliser avec les autres microorganismes à croissance plus rapide. Leur isolement nécessite de ce fait , l'application de méthodes sélectives particuliers. Les échantillons de sol sont prétraités par des moyens physiques et ou chimiques de manière à éliminer les formes microbiennes végétatives non résistantes.

Les milieux de culture sont composés d'éléments nutritifs qui favorisent spécifiquement la croissance de ces genres et peuvent être additionnées d'agents chimiques germicides inhibant les microorganismes indésirables (Steele et Stowers,1991). Ces stratégies ont permis la découverte de nombreux genres et espèces nouveaux et également plusieurs substances originales dont des antibiotiques.

Les sols sahariens d'Algérie représentent des écosystèmes particuliers. Leur exploration a montré leur richesse et leur biodiversité en actinomycètes, des plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou et al.,1992).

L'objectif de cette étude est de contribuer à la caractérisation préliminaire des molécules bioactives produites par des actinomycètes isolées antérieurement à partir de différents régions.

L'objectif principal de notre travail consiste en :

Isolement de souches actinomycètes à partir de différents échantillons sur différents milieux Bennet, GYM, ISP2.

Recherche de l'activité antibactérienne contre les souches les plus répandues dans les problèmes sanitaires et technologiques

## Introduction

---

Pré-identification des isolats actifs en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

La production des métabolites secondaires par fermentation sur milieu solide et en milieu liquide afin de comparer les rendements des deux méthodes qualitativement et quantitativement.

La caractérisation partielle de la molécule bioactive impliquée dans le processus d'inhibition en utilisant les techniques physicochimiques disponibles au niveau de notre laboratoire.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique détaillée sur les actinomycètes en général.

Nous avons présenté leur taxonomie et leur importance dans les différents domaines (industriel, agro-alimentaire, médical) avec un intérêt particulier consacré à leur grande aptitude à produire des antibiotiques.

La seconde partie a trait aux différents matériels et méthodes utilisés et la troisième partie, aux résultats obtenus et à leurs discussions.

# **Synthèse bibliographique**

## Chapitre I : Les actinomycètes

### 1. Définition

Les actinobactéries sont des bactéries gram-positives omniprésentes à haute teneur en guanine et en cytosine dans l'ADN, ayant une caractéristique morphologie filamenteuse (**Gurushankara H.P et al ., 2019**).

Les actinomycètes, organismes procaryotes, sont classés parmi les bactéries. Elles sont incluses dans l'Ordre des actinomycètes défini dans la huitième édition du manuel de **BERGEY (1974)** comme regroupant : «des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés, lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$  mais est généralement inférieur à 1 $\mu\text{m}$ .

Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries. (**Bakdi et Lounis, 2016**).

Les actinomycètes sont des micro-organismes de forme et de fonction intermédiaires entre les bactéries et les champignons. Ce sont des organismes hétérotrophes qui prospèrent sur la matière organique décomposable et prolifèrent dans des sols riches en résidus végétaux et animaux. Ils sont plus répandus dans les sols chauds et arides. Les actinomycètes forment généralement des réseaux filamenteux ramifiés et sont capables de décomposer des composés récalcitrants tels que la cellulose. Ces organismes libèrent généralement l'arôme terreux souvent remarqué lors de l'épandage de compost ou du binage d'un sol riche en humus (**Hillel, 2008**).

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables d'être chimio-autotrophes. Certains ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tels que le charbon par pénétration mécanique de la matrice et peuvent dégrader les protéines insolubles comme les kératines et les hémicelluloses, comme la cellulose et le xylène (**Taibietal., 2012**).

2. Taxonomie

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires.

Selon la classification du « Taxonomic Outline of The Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », (Garrity et al., 2004), le phylum *Actinobacteria* (bactérie Gram positif et à G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « Actinobactéries ».

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes (Figure 01) (Garrity et al., 2004): *Acidimicrobiales*, *Rubrobacteriales*, *Coriobacteriales*, *Sphaerobacteriales*, *Actinobacteriales*

Phylum <i>Actinobacteria</i>					
Classe <i>Actinobacteria</i>					
S/c	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Rubrobacteriales</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Sphaerobacteriales</i>	<i>Actinobacteriales</i>

s/c	<i>Actinobacteriales</i>				
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i>		Actinomycetales		

ordre Actinomycetales					
s/o	<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Micrimonosporineae</i>	<i>Propionibacterineae</i>

famille	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
---------	-------------------------	---	--	---------------------------	---

s/o	<i>Pseudonocardinea</i>	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptosporangineae</i>	<i>Frankinea</i>	<i>Glicomycineae</i>
famille	<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>

**Figure 01:** La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004).

### 3. Les principaux caractères des actinomycètes

#### 3.1. Habitat

Les actinomycètes sont largement distribués dans la nature, on peut les trouver dans le sol, les sédiments marins, les eaux usées (Tableau 01).



**Tableau 01** : isolement des actinomycètes à partir de divers habitats écologiques (Khan, J.A, et al., 2011).

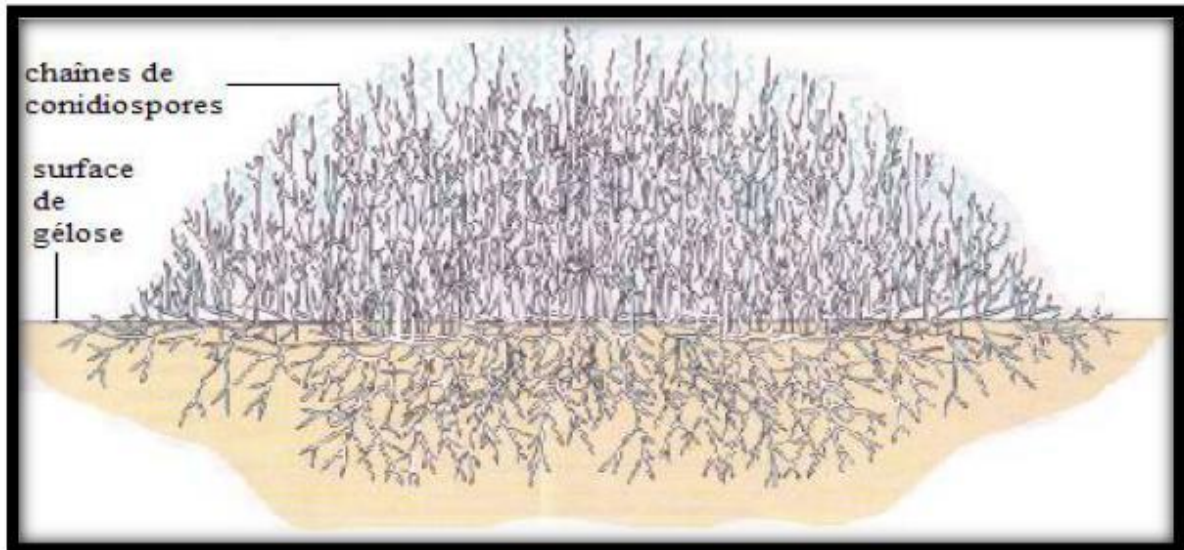
Nombre d'échantillons	Actinomycetes	Habitats
1	<i>Actinomadura, Actinosynnema, Amycolatopsis, Arthrobacter, Frankia, Geodermatophilus, Gordonia, Kitasatospora, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardioides, Nocardiosis, Nonomurea, Psuedonocardia, Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salinispora, Streptomyces, Streptosporangium, Tsukamurella, Verrucosispora, Williamsia</i>	Marin
2	<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Bogoriella, Kribbella, Microbispora, Micromonospora, Nocardia, Nonomurea, Nocardiosis</i>	Sol acide et sol alcalin
3	<i>Bifidobacterium, Rhodococcus, Nocardia, Gordonia</i>	Eaux usées
4	<i>Micromonospora, Actinoplanes, Streptosporangium.</i>	Sources thermales
5	<i>Streptomyces, Nocardia, Micromonospora</i>	Sol désertique
6	<i>Thermoactinomyces, Sacharomonospora, Microbispora, Micropolyspora, Pseudonocardia.</i>	compost
7	<i>Arthrobacter, Friedmanniella, Modestobacterium, Nocardia, Nocardiosis</i>	Échantillons glaciaires
8	<i>Streptomyces</i>	Traitement par radiation
9	<i>Amycolatopsis, Arsenicococcus, Fodinicola</i>	Rhizosphère
10	<i>Actinoplanes, Couchiplanes, Microbispora</i>	Agriculture
11	<i>Streptomyces scabies, Actinomyces bovis, Micropolyspora faeni</i>	Échantillons clinique humain et animal

### 3.2. Morphologie

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive (NANJWAD *et al.*,2010). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (SMAOUI, 2010).

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifié.

Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier.



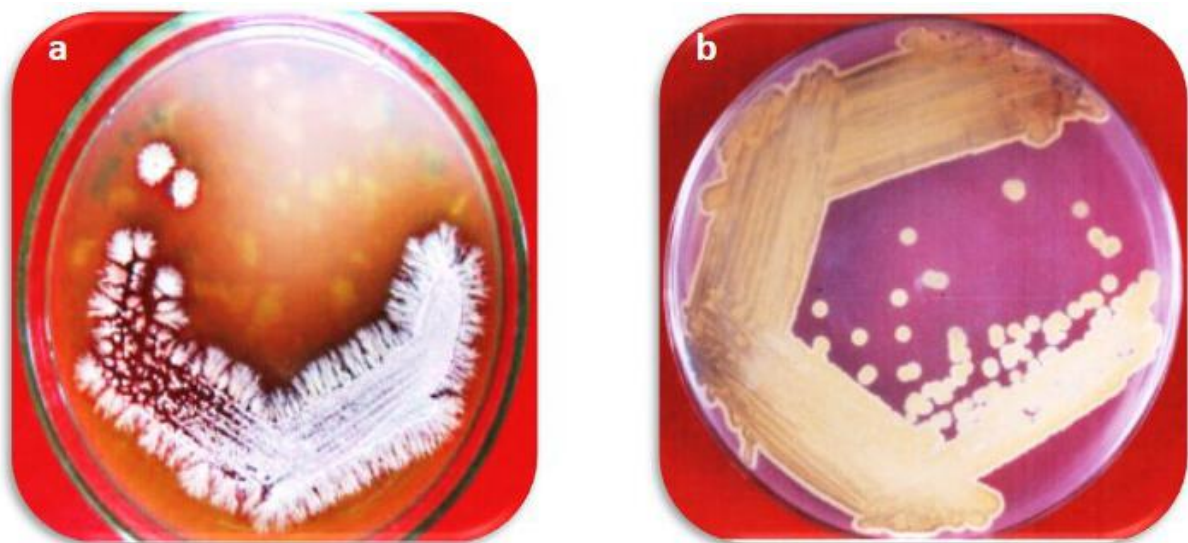
**Figure 02** : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représenté (Habibeche ,2013)

### 3.2.1. Mycélium aérien

Le mycélium aérien est généralement plus épais que le mycélium du substrat (figure 3a). L'antenne de mycélium montre une différenciation suffisante pour qu'un assortiment divers d'isolats puisse être séparé en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires sous état. Ceci est désigné comme l'un des critères les plus importants pour la classification des genres *Streptomyces* en espèces, comprenant la structure (cotonneuse, veloutée ou poudreuse), la formation d'anneaux ou de zones concentriques, et pigmentation (Anandan et al., 2016).

### 3.2.2. Substrat mycélium :

Le mycélium substrat des Actinobactéries varie en taille, en forme et en épaisseur (figure 3b). Sa couleur varie du blanc ou pratiquement incolore au jaune, brun, rouge, rose, orange, vert ou noir.



**Figure 03** : Croissance abondante d'isolat d'Actinobacteria sur milieu gélose amidon caséine.a). Mycélium aérien. b). Verso de la plaque montrant le mycélium du substrat (ANANDAN et al.,2016).

### 3. Physiologie et métabolisme

#### 3.1. Physiologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**). En second lieu, les formes oxydatives, aérobie, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air. Dans ce dernier, les spores sont considérées comme des contaminants (**Reponenet al., 1998**). Certains genres d'actinomycètes sont des chimio-organotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

#### 3.2. Métabolisme

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (**Choulet, 2006**). Deux des propriétés les plus significatives des Actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs.

En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces*. D'après **Tarkka et Hampp (2008)**, les métabolites secondaires des Streptomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique : Agents antagonistes, comportant des antibiotiques, des antifongiques, des anti-protozoaires et même des antiviraux. Agents pharmacologiques tels que des anti-tumoraux et des inhibiteurs d'enzymes. Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides. Composés à activité régulatrice, tels que des facteurs de croissance. Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien. La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription

contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (Ounadjela,2016).

### 3.2.1. Le métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des Actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Ounadjela,2016).

### 3. 2.2. Le métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (Ounadjela, 2016). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

Parmi les microorganismes producteurs de métabolites secondaires possédant une activité anti-cellulaire, 70% appartiennent au groupe des Actinomycètes et parmi eux, on trouve 95% de *Streptomyces*. Environ 21% de ces métabolites présentent une activité antifongique se répartissant également entre substances de structure polyénique et non polyénique (Ounadjela, 2016).

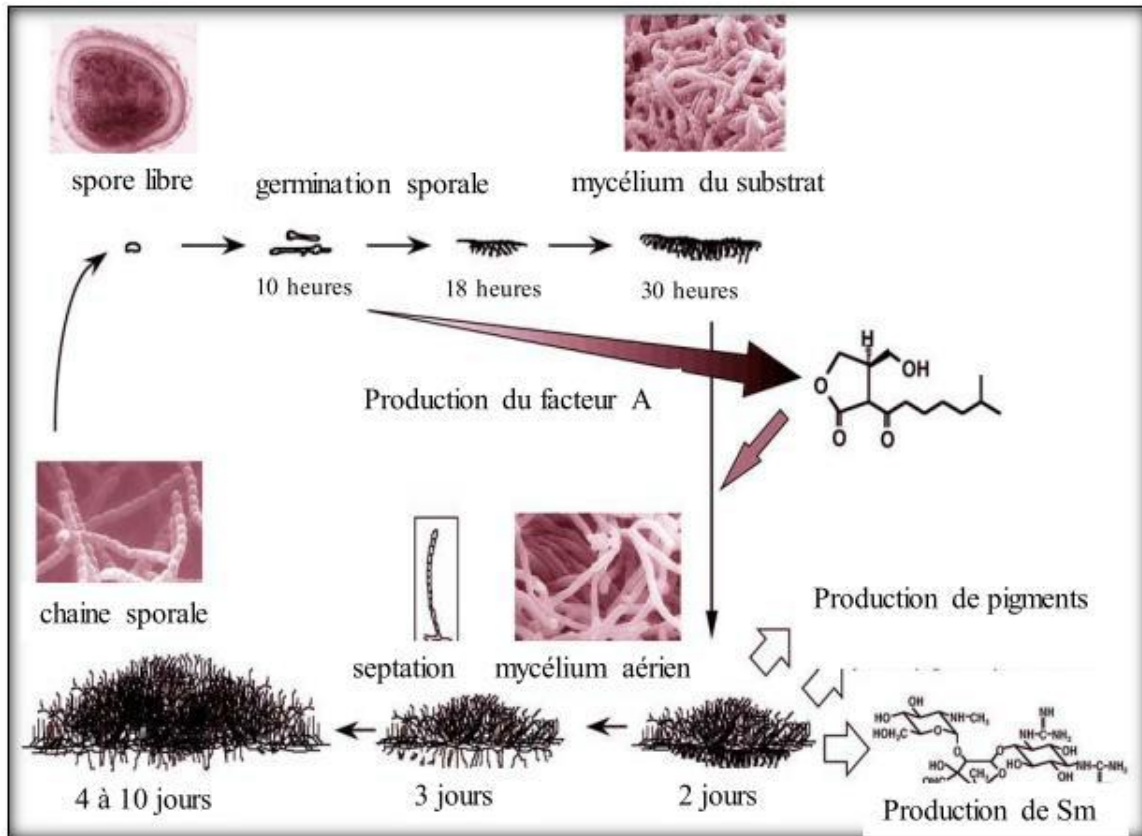
Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (Ounadjela, 2016). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (Ounadjela, 2016). Des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Park et al., 2002). Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (ex : pronase) (Ounadjela, 2016).Par ailleurs, les Actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de  $\beta$ -1-3- glucanase et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des germes pathogènes (Bouchaib et Fares, 2017).

#### 4. Cycle de développement des actinomycètes

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores, Processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (OGARA *et al.*, 2008).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriment). Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinomycètes sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*....etc. (PRESCOTT *et al*, 2010). Exemple : Cycle de développement de *Streptomyces griseus*.

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni-nucléées comme le montre la figure 04.



**Figure 04:** Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Bakdi et Lounis, 2016).

## 5. Le matériel génétique

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3,7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E. coli* (*Escherichia coli*) la Durée de répllication de l'ADN est de 50 à 65minutes. (Bakdi et Lounis, 2016).

Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques.

Le matériel génétique des actinomycètes est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par de l'ADN plasmatique ou de l'ADN phagique, un caractère majeur est la proportion élevée environ 70% de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes, explique que les enzymes de restriction reconnaissent des sites à G+C % important donnent naissance à des fragments d'ADN petits et nombreux (**Theilleux,1993**).

### 5.1. ADN chromosomique

L'ADN chromosomique des Streptomyces est linéaire et mesure environ 8000 kilobases. Cette linéarité permet de définir deux bras chromosomiques de taille équivalente dont les extrémités portent des répétitions terminales inversées (**Bentley et al.,2002**).

Le cytoplasme des hyphes est compartimenté par des septa, l'ADN est présent dans ces compartiments sous une forme condensée nucléidique. Généralement, plusieurs copies coexistent dans chaque compartiment hyphal mais une seule est incluse dans chaque spore (**Hopwood et Glauert ,1960**).

A chaque nucléotide correspondrait une molécule d'ADN continue et circulaire. Chez Streptomyces, ce chromosome circulaire contient environ trois fois plus d'ADN que chez *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. Des séquences répétitives environ quatre copies par génome haploïde constituent 5% du génome (**Antonov et al .,1977**).

La technique classique de conjugaison et d'étude des recombinants a permis de construire des cartes génétiques notamment chez plusieurs espèces de *Streptomyces* et chez *Nocardia mediterranei*, plus de 100 gènes ont été ainsi localisés sur la carte génétique de *Streptomyces coelicolor*, la souche d'actinomycète la mieux étudiée aujourd'hui.

Par ailleurs, les cartes génétiques de différentes espèces de *Streptomyces* montrent une similitude considérable. Enfin, l'instabilité génétique et l'amplification de séquences génomiques, sur lesquelles nous reviendrons dans le cadre des mutations, sont deux caractéristiques importantes des *Streptomyces* (**Theilleux,1993**).



## 5.2. ADN plasmique et ADN phagique

Des plasmides de tailles très diverses de 2Kb et en nombre très variable de copies de 1 à plusieurs centaines ont été mise en évidence chez les *Streptomyces*. Ces plasmides généralement circulaires, dans quelques cas linéaires, sont impliqués dans le contrôle de caractères phénotypiques touchant notamment la différenciation, la fertilité, la production d'antibiotiques et la résistance à ceux-ci. Ainsi, certains de ces plasmides sont des plasmides de fertilité capables de s'intégrer de façon réversible au chromosome hôte. C'est le cas des facteurs sexuels SCP1 et SCP2 de *Streptomyces coelicolor* A. le plasmide SCP1 comprend d'autre part des gènes codant pour la biosynthèse de la méthylénomycine et la résistance à celle-ci.

Les actinophages sont largement répandus dans la nature et peuvent être isolés du sol. Les phages virulents ou tempérés à ADN décrits par **Chater (1980)** ont un génome variant de 40 à 100Kb et un contenu G+C de 55% à 73%. Séquences d'insertion et transposons forment un dernier groupe d'éléments transposables (**Theilleux, 1993**).

## 6. Critères d'identification des actinomycètes

### 6.1. Critères morphologiques

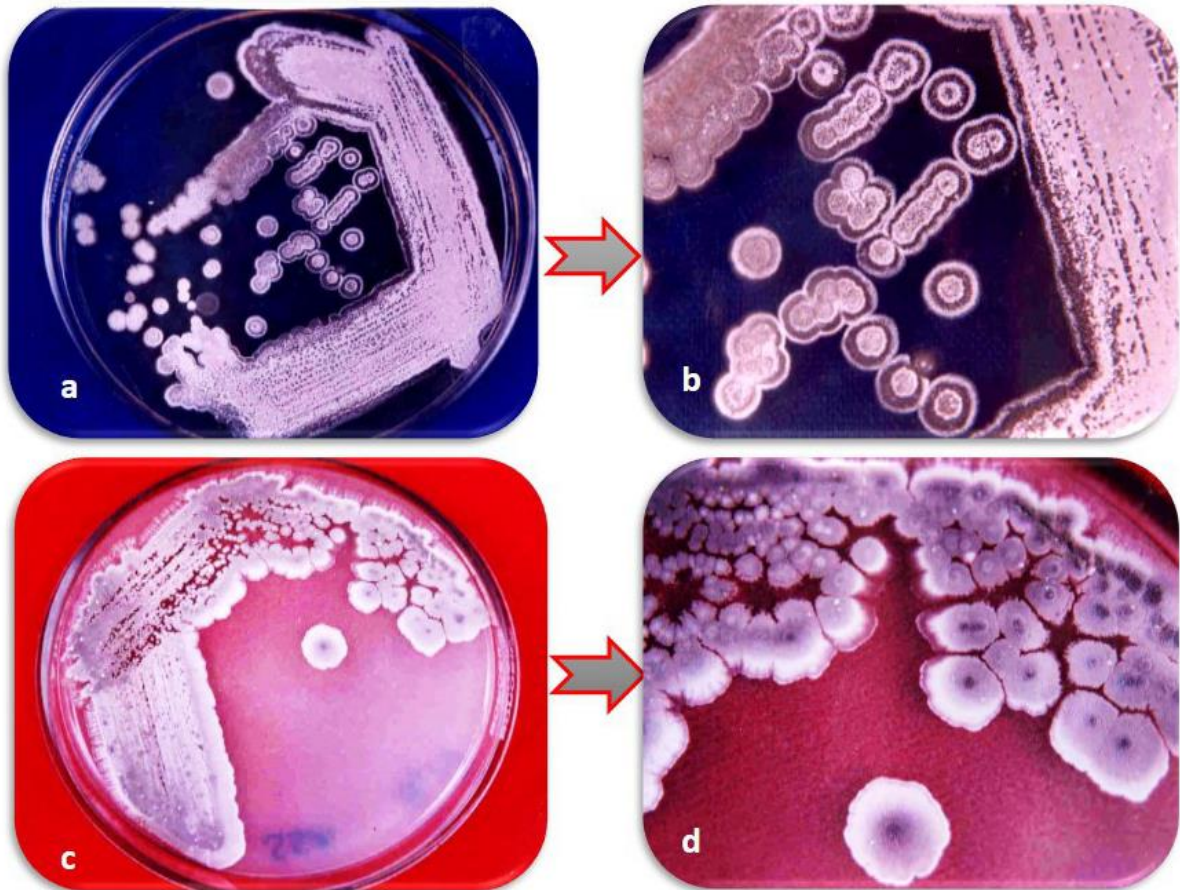
Les caractères morphologiques importants permettant de différencier les genres d'actinobactéries entre eux, sont les suivants:

### 6.2. Caractères macromorphologiques

Les caractères macromorphologiques reposent sur une observation à l'œil nu. Il s'agit de noter :

- La production ou non du mycélium aérien (MA).
- La présence ou non du mycélium du substrat (MS).
- La couleur du MA, du MS et des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs, telle par exemple, la charte de **Kelly et Judd (1976)** ou « Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC –NBS » (**Saker, 2015**).



**Figure 05** : Des isolats d'Actinobacteria sur une plaque de gélose à la caséine d'amidon.(a, c)Vue en plaque des isolats actinobactériens. (b, d) Morphologie des colonies individuelles (ANANDAN et al.,2016).

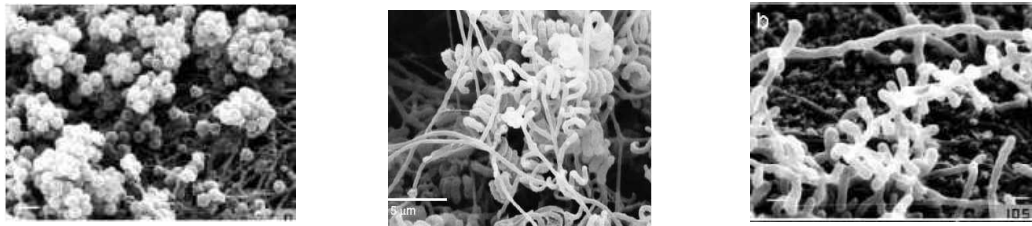
### 6.3. Caractères micromorphologiques

La micromorphologie des actinobactéries est réalisée par observation au microscope optique (et parfois électronique) des colonies poussant sur milieux gélosés.

Il s'agit de noter:

- La fragmentation ou non du MS.
- La présence ou non, sur le MA et/ou le MS, de spores, leur agencement (isolées, par deux ou en chaînes), la forme des chaînes de spores et l'ornementation de la surface des spores.
- La présence de structures particulières comme les sporanges et les synnemata sur le MA.

La surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) est quant à elle observée au microscope électronique à balayage. (Saker, 2015)



(a) *Micromonospora* sp. (b) *Saccharomonospora* sp. (c) *Streptomyces violaceusniger*

Figure 06 : observation de la surface des spores au microscope électronique à balayage (Saker,2015).

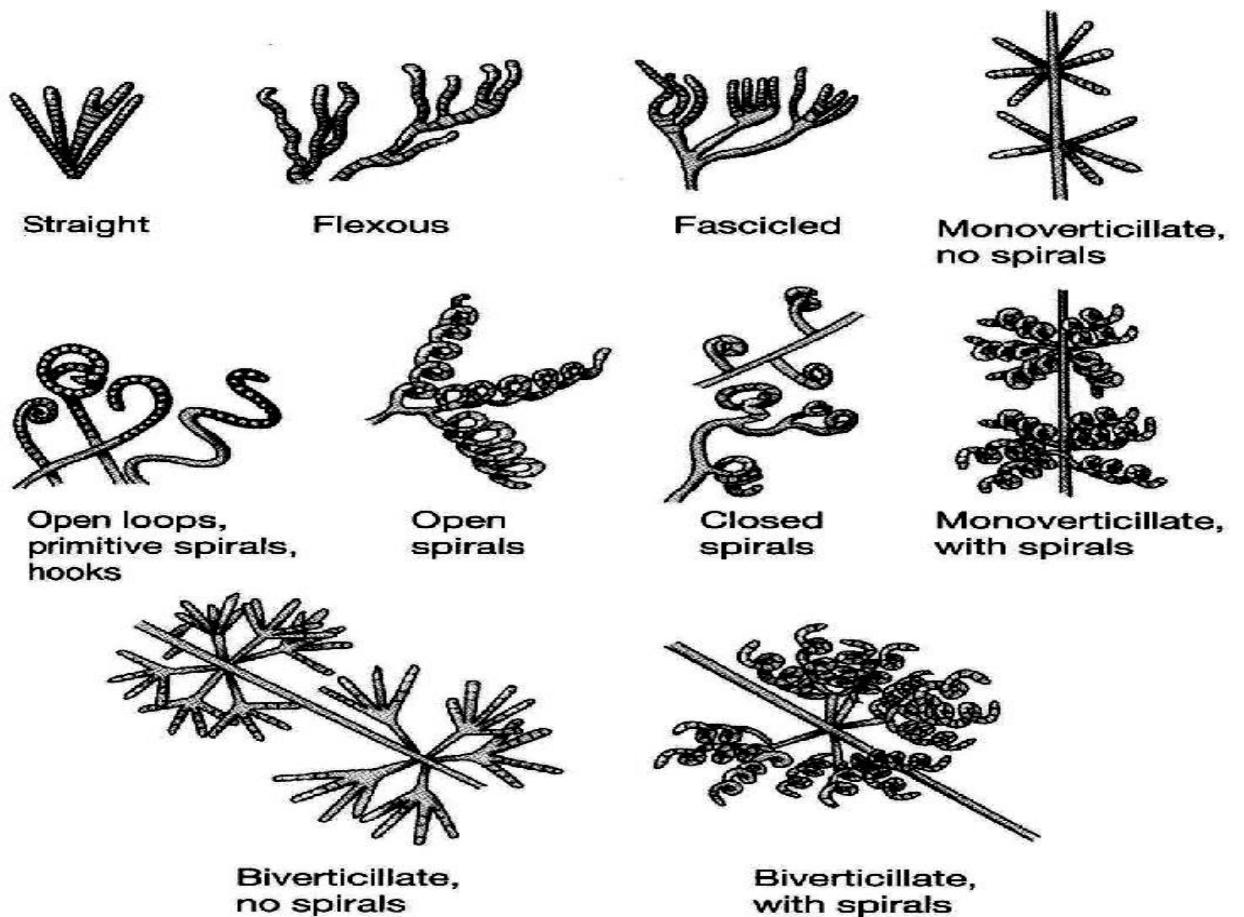


Figure 07 : Type de structure sporulée chez les streptomycètes. (ANANDAN et al.,2016).

#### 6.4. Critères physiologiques

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés organiques (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.)(**Boudjelal, 2012**), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au PH, à la température, la salinité, etc.(**Saker,2015**). Lorsque les tests physiologiques sont très nombreux, les résultats deviennent difficilement exploitables. Ce qui a amené les systématiciens à appliquer durant une longue période la taxonomie numérique aux actinobactéries. Cette technique a apporté plus de clarté dans la reconnaissance des espèces et les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, le nombre d'espèces de ce genre, qui était de 463 a été réduit à 142 (**Harrir, 2018**).

#### 6.5. Critères chimiques

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, comme c'est le cas de *Streptomyces*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, etc., la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocardioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.), nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires.(**Boudjella,2007**).

La chimiotaxonomie est basée sur l'analyse des acides aminés pariétaux, des glucides, des cellules entières et des lipides membranaires (**Boudjella ,2007**).les ménaquinones et les acides gras sont parfois également analysés pour certains groupes d'actinomycètes. **Becker et al.,(1965)**, **Yamaguchi (1965)** et **Lechevalier et Lechevalier (1970)** et **Boudjella (2007)** divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaire.

##### 6.5.1. Composition pariétale en acides aminés

En plus, de la N-acétyl 1 glucosamine, de l'acide N-acétyl muramique, de l'acide glutamique et de l'alanine (L et D), la paroi de la plupart des bactéries non mycéliennes possède de la lysine, ou surtout de l'acide diaminopimélique (D.A.P). Chez les actinomycètes, le D.A.P. peut être sous forme d'isomères LL ou DL (méso) et ce, suivant les genres .un autre acide aminé, la glycine, est variablement présent. chez les actinomycètes ne formant pas de véritable mycélium, le D.A.P. est remplacé par de la

lysine, de l'ornithine ou de l'acide diaminobutyrique (Becker et al., 1965). Selon la composition en acides aminés, les actinomycètes sont classés dans les chimiotypes. (Boudjella, 2007).

### **6.5.2. Composition cellulaire en sucres**

Les sucres ayant une importance taxonomique pour les actinomycètes sont les couples « arabinose-galactose », « arabinose-xylose », ainsi que le madurose ou 3-O-méthyl-galactose (Lechevalier et Lechevalier ,1970b). Les sucres déterminent ainsi les chimiotypes A, B, C, D et E (voir paragraphe 1, 2,3). Les actinomycètes ne possédant pas de sucres taxonomiquement importants sont classés dans le chimiotype C.

### **6.5.3. Classification des actinomycètes en chimiotypes**

Les actinomycètes ont été classées dans dix chimiotypes selon leur composition cellulaire en acides aminés (Becker et al.,1965 ; Yamaguchi, 1965)et en sucres. Chaque chimiotype regroupe un certain nombre de genres qui peuvent être différenciés sur la base de l'étude morphologique et aussi d'autres études chimiques (notamment les lipides).

**Tableau 02:** Critères chimiques d'identification des Actinomycètes (Bakdi et Lounis, 2016).

<b>Types</b>	<b>genres</b>
<b>Type I:</b> LL-DAP, Glycine	<i>Streptomyces, Streptoverticillium, Nocardioides, Intraspangium, Kineosporia,</i>
<b>Type II:</b> mésoDAP, Glycine, arabinose	<i>Micromonospora, Glycomyces, Actinoplanètes, Dactylosporangium, Pilimelia</i>
<b>Type III:</b> méso DAP, Galactose	<i>Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces, Nocardiosis, Streptosporangium, Geodermatophilus, Microtetraspora, Brevibacterium, Dermatophilus, Frankia, Maduromycetes</i>
<b>Type IV:</b> méso DAP, Arabinose, Galactose	<i>Kibdelosporangium, Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora</i>
<b>Type V:</b> Lysine, Ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
<b>Type VI:</b> Lysine, Acide Aspartique	<i>Actinomyces bovis, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Arcanobacterium</i>
<b>Type VII:</b> DAB Glycine, Lysine (+/-)	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
<b>Type VIII:</b> Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

#### 6.5.4. Composition en lipides

Les lipides taxonomiquement importants peuvent être représentés par trois groupes : Les lipides polaires, les ménaquinones et les acides mycoliques.

**-Les lipides polaires:** les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides d'origine membranaire (ALLIKI,2013)

Lechevalier et al. (1977) ont distingué 5 types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes qui sont présentés dans le tableau N°3. L'analyse de ces composés a permis de distinguer plusieurs genres entre eux ayant la même morphologie et le même type pariétal (composition en acides aminés et sucres), tels que *Pseudonocardia* et *Amycolatopsis* (ALLIKI,2013).

**-Les ménaquinones :** les ménaquinones sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (ALLIKI,2013). Par exemple, le genre *Planomonospora* caractérisé par une ménaquinone MK9 (H2) : ménaquinone avec neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées. Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

**-Les acides gras :** sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Les types d'acides gras et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres. Les acides gras rencontrés chez les actinomycètes sont :

- Soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone (ALLIKI,2013)
- Soit un groupe d'acides mycoliques qui sont des acides gras pariétaux complexes, insaturés, contenant 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. (ALLIKI,2013)

Tableau 03 : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes. (ALLIKI,2013)

Types de phospholipides	Phosphatidyl éthanolamine (PE)	Phosphatidyl Choline (PC)	Phospholipides avec glucosamine (PG)	Phosphatidyl glycérol
PI	-	-	-	v
PII	+	-	-	-
PIII	-	+	-	v
PIV	+	-	+	-
PV	-	-	+	+

### 6.6. Critères moléculaires

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commencent lentement à être remplacés par les techniques moléculaires. Grâce à la biologie moléculaire, plusieurs alternatives sont maintenant possibles dans un délai de quelques jours seulement à comparer à quelques semaines avec les méthodes traditionnelles.

Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques. (DJINNI ,2009)



### 6.6.1. Composition en GC%

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre.

Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN. (Bakdi et Lounis., 2016).

**Tableau 04 :** Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (Larpent et al.,1989).

Genre	G+C%
<i>Actinomadura</i>	64 à 69
<i>Nocardia</i>	64 à 72
<i>Streptomyces</i>	69 à 78
<i>Micromonospora</i>	71 à 73
<i>Actinoplane</i>	72 à 73
<i>Actinopolyspora</i>	64
<i>Agromyces</i>	71 à 77
<i>Frankia</i>	66 à 71
<i>Glycomyces</i>	71 à 73
<i>Nocardiosis</i>	64 à 69
<i>Rhodococcus</i>	63 à 72
<i>Streptosporangium</i>	69 à 71
<i>Streptoverticillium</i>	69 à 73
<i>Thermoactinomycines</i>	53 à 55

### 6.6.2. Hybridations ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur le contrôle de la réassociation de monobrans d'ADN de différents organismes. Le degré de cette réassociation est exprimé en pourcentage (%) d'homologie, et l'organisme est considéré appartenir à l'espèce lorsque ce pourcentage est  $> 70\%$  et la divergence est  $> 5\%$ , à une température  $\leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dans les mêmes conditions de dénaturation (Bakdi el Lounis., 2016).

**Tableau 05** : Spécificités des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie des Streptomyces (Belabed, 2014).

Cible	Méthode	Spécificité
ADN chromosomique total	- Hybridation ADN-ADN	Genre, espèce
	Restriction par des endonucléases (RFLP, LFRLA)	Espèce, sous espèce
Amplification aléatoire de fragments d'ADN	Isolement et clonage de fragments non hybrides par le croisement.	Espèce, sous espèce
Gènes codants des protéines ou des fragments du gène codant le ARNr ou 23S	Isolement et séquençage de gènes ou de fragment.	Espèce, sous espèce
	-Analyse comparative des séquences	Famille, genre, espèce

### 6.6.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (LFRFA)

L'analyse des fragments de restriction à basse fréquence (LFRFA) est une technique qui utilise la totalité du chromosome bactérien, le principe repose sur la digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction. Les fragments qui en résultent sont analysés par électrophorèse sur gel à champ de pulsation (PFGE) qui donne un profil d'empreintes de bandes affirmant l'hybridation qui sont utilisées pour déterminer l'apparenté entre les organismes. Cette méthode est utilisée pour déterminer les souches très étroitement reliées mais elle ne peut pas résoudre le problème des relations interspécifiques (pour la même souche) et elle peut donner des erreurs s'il y a des amplifications et délétions chromosomiques assez importantes (**ANDERSON et WELLINGTON, 2001**).

### 6.6.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD-PCR)

La RAPD-PCR est une méthode rapide pour le criblage de souches similaires des actinomycètes mais elle exige une optimisation stricte de l'amorce, la température de l'alignement et le mélange de la réaction. Dans cette technique nous utilisons une amorce courte de séquence définie arbitrairement pour amplifier, par PCR, l'ADN génomique, en utilisant une température basse d'alignement, ainsi le polymorphisme peut être détecté. Le produit de PCR donne une bande caractéristique qui permet de différencier entre les chromosomes des souches sans faire appel à des connaissances préalables sur les séquences chromosomiques. Cette méthode peut être utilisée pour la discrimination entre les souches de la même espèce (**Bakdi et Lounis, 2016**).

### 6.6.5. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S et phylogénique

Il s'agit du séquençage de gène codant pour l'ARN ribosomique de la sous unité 16S. L'intérêt pour ce gène chromosomique, d'environ 1500 paires de base, présent chez toutes les bactéries, repose d'une part, sur son important polymorphisme à l'échelle inter-espèces et d'autre part, sur la présence de séquences de 15 paires de base aux deux extrémités de ce gène qui sont conservés chez tous les procaryotes. Ainsi, ces caractéristiques sont idéales pour la conception d'amorces génériques extensibles par PCR et dont les produits (ADNr16S) sont séquencés puis comparés, afin d'établir la phylogénie des microorganismes-sources. En effet, les séquences obtenues sont comparées avec des séquences de références disponibles dans les banques génomiques libres sur internet telles que « EzTaxon », qui regroupe les séquences de toutes les souches –types validées des bactéries. Cette comparaison nécessite un traitement préalable des séquences

nucléotidiques partielles obtenues en général, après séquençage et reconstitution de la séquence complète (ou presque complète) de l'ADNr16S. Ce traitement utilise des outils d'alignement de séquences tels que « Clustal W et Muscle » (Harrir,2018) et de comparaison avec les banques génomiques tels que « Blast ».

Ainsi, le séquençage de l'ADNr16S constitue un outil très rapide pour l'identification des taxa. Il faut cependant noter qu'un taux d'homologie compris entre 97% et 100% n'indique pas nécessairement que l'espèce soit identique, surtout si cette dernière fait partie d'un genre comptant un grand nombre d'espèces comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces*. (HARIR, 2018).

## 7. Application des actinomycètes

Les actinobactéries sont bien connues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines.

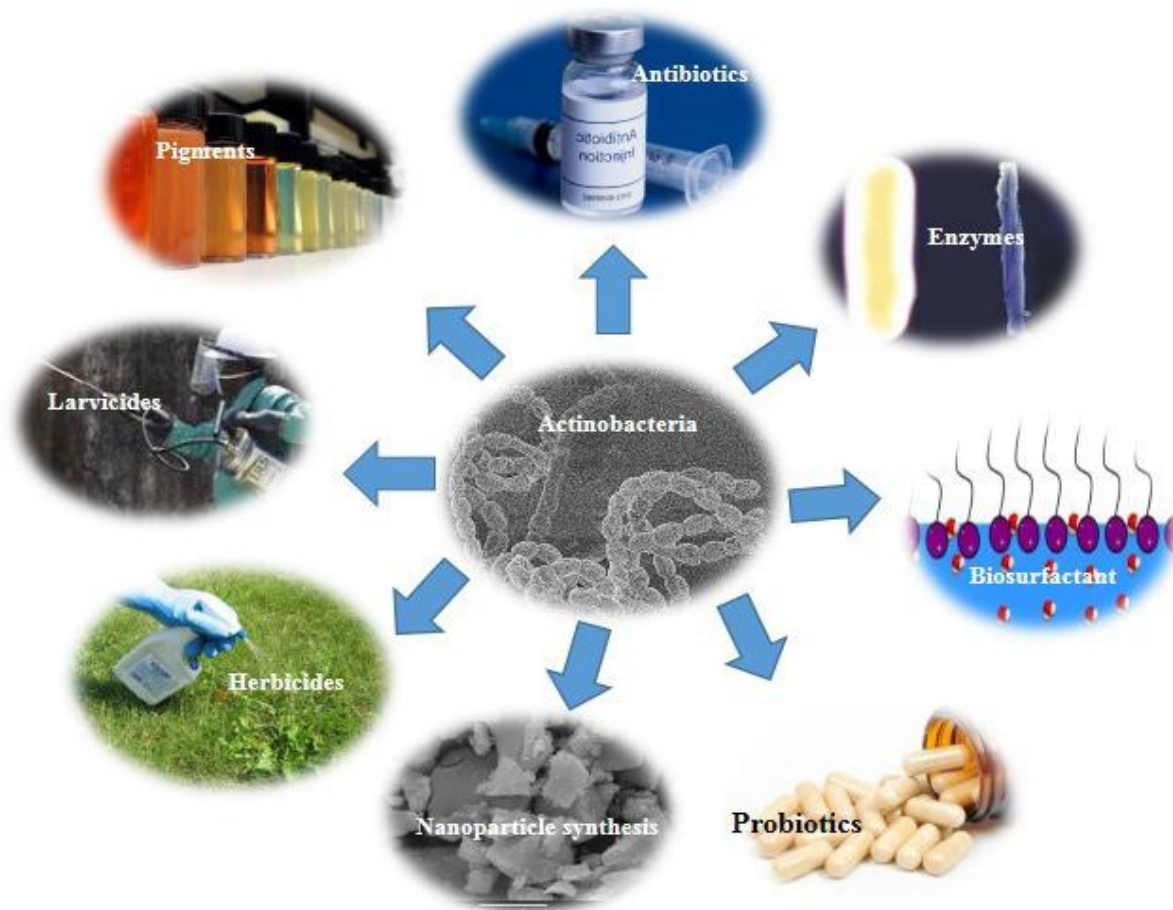
Ils sont également une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle. Une grande partie des antibiotiques sur le marché provient des Actinobactéries.

Ils produisent des inhibiteurs d'enzymes utiles pour le traitement du cancer et des immunomodificateurs qui améliorent la réponse immunitaire.

Ils ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques et aromatiques.

Ils effectuent des transformations microbiennes de composés organiques, un domaine de grande valeur commerciale. Les membres de nombreux genres d'actinobactéries peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion de déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de grande valeur des produits.

Les actinobactéries sont également importantes en biotechnologie végétale, car les souches ayant une activité antagoniste contre les agents phytopathogènes sont utiles dans la lutte biologique. Leur potentiel métabolique offre un fort champ de recherche. Ici, nous avons une brève description des applications importantes d'Actinobactéries. (ANANDAN et al.,2016)



**Figure 08** : Application biotechnologiques des actinobactéries. (ANANDAN et al.,2016).

### 7.1. Antimicrobiens

Les actinobactéries jouent un rôle important dans la production de divers médicaments extrêmement importants pour notre santé et notre nutrition. Récemment, les maladies dues aux bactéries pathogènes multirésistantes sont en augmentation constante, et la recherche de nouveaux antibiotiques est donc efficace contre les agents pathogènes multirésistants. Il a été observé que les produits naturels ayant de nouvelles structures possèdent des activités biologiques utiles. La nature reste toujours la source la plus riche et la plus polyvalente propice pour de nouveaux antibiotiques, bien qu'il y ait des progrès considérables dans les domaines de la synthèse chimique et de la biosynthèse artificielle des composés antibactériens.(ANANDAN et al.,2016).

La nature toxique de certains antibiotiques a conduit à leur utilisation limitée, bien que des milliers d'antibiotiques aient été découverts jusqu'à ce jour. Pour surmonter ce problème, la recherche de nouveaux antibiotiques plus efficaces et sans effets secondaires

toxiques est en cours. Comme déjà mentionné, l'un des principaux problèmes de santé est la résistance aux antibiotiques. Une approche pour résoudre ce problème consiste à rechercher de nouveaux antibiotiques avec un nouveau mécanisme d'action.

La figure 9 montre qu'une majorité d'antibiotiques sont dérivés de micro-organismes, en particulier de l'espèce Actinobacteria. On sait que près de 80% des antibiotiques dans le monde sont dérivés d'actinobactéries, principalement des genres *Streptomyces* et *Micromonospora*. (Anandan et al.,2016).

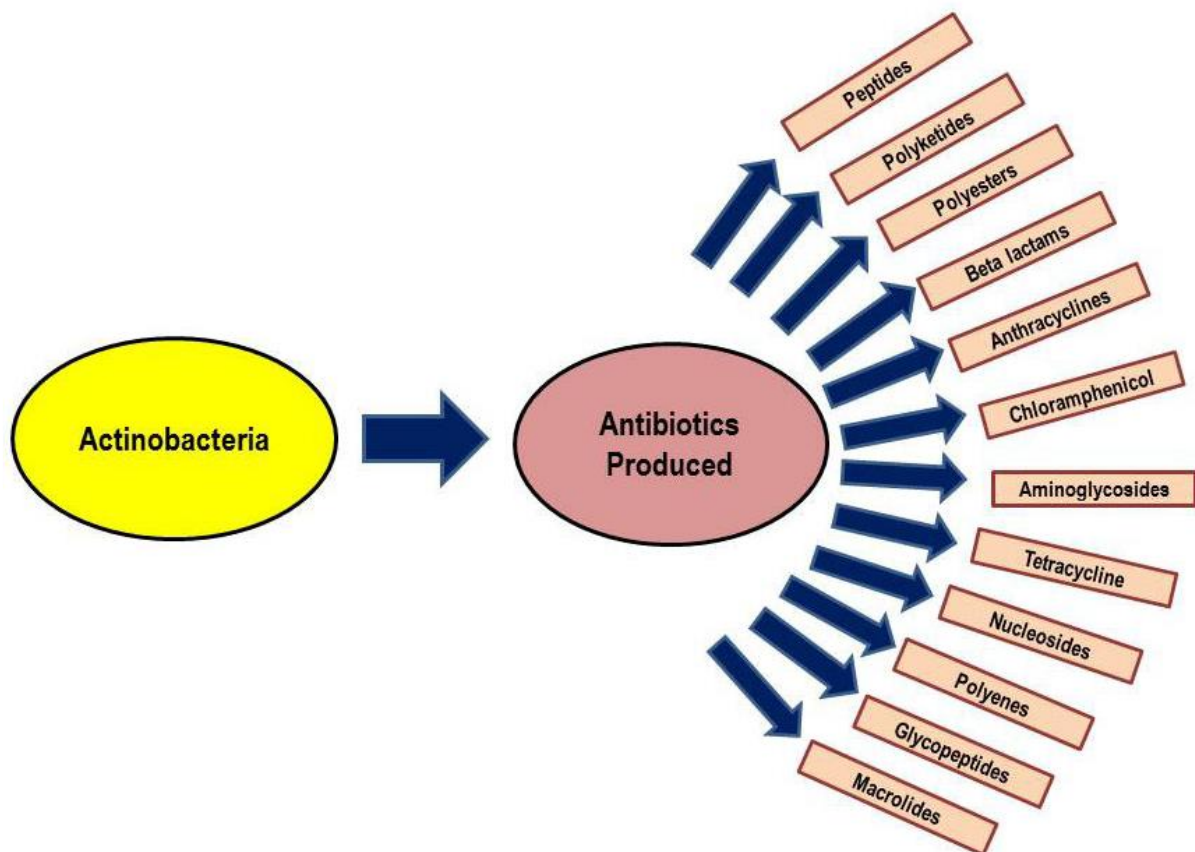


Figure 09 : Antibiotiques d'actinobactéries (Anandan ,2016).

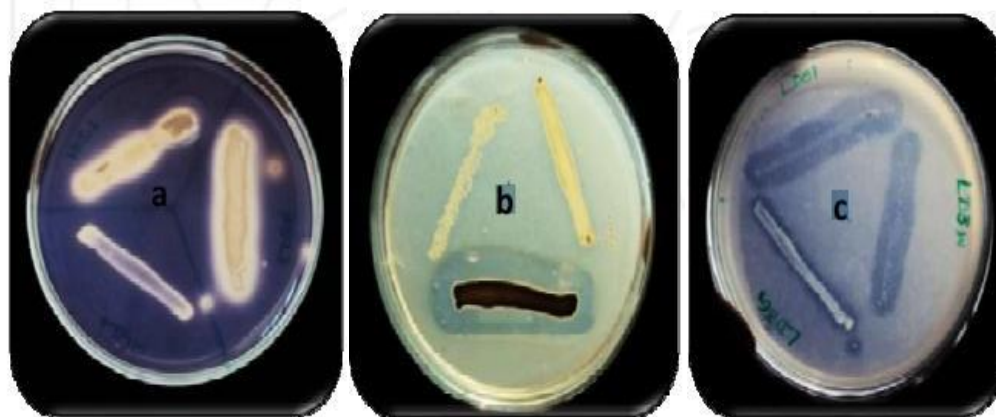
## 7.2. Enzymes

Une grande variété d'enzymes biologiquement actives sont produites à la fois par des actinobactéries marines et terrestres. Ils sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules, ce qui les aide à effectuer une digestion extracellulaire. Cette enzyme est très importante dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier en raison de leur capacité à dégrader l'amidon (ABBES et BOUTERAA,2017) .

Un autre aspect important de Actinobacteria est la production de cellulases, qui constituent une collection d'enzymes hydrolytiques qui hydrolysent les liaisons glucosidiques de la cellulose et des dérivés apparentés de cello-digosaccharide. La lipase est produite à partir de divers actinobactéries, bactéries et champignons et est utilisée dans les industries des détergents, des denrées alimentaires, des oléochimiques, des paramètres de diagnostics, et aussi dans les industries de domaine pharmaceutiques (ANANDAN et al.,2016).

Beaucoup d'actinobactéries ont été isolées de diverses sources naturelles, ainsi que dans les tissus végétaux et les sols rhizosphérique. Les fonctions biologiques des Actinobactéries dépendent principalement de sources à partir desquelles les bactéries sont isolées. Les actinobactéries, en particulier les streptomycètes, sont connues pour sécréter des protéases multiples dans le milieu de culture (Sharmin *et al.*, 2005). De même, les Actinobactéries ont été révélées être une excellente ressource pour l'asparaginase, qui est produite par une gamme d'Actinobactéries, principalement celles isolées des sols, telles que *S. griseus*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces albidoflavus* et *Nocardia sp* (ABBES et BOUTERAA,2017) .

Les racines et les rhizomes de plusieurs plantes médicinales thaïlandaises telles que le citron (*Cymbopogon citratus*) et le gingembre (*Zingiber officinale*) ont longtemps été utilisés dans la médecine traditionnelle thaïlandaise pour les maux d'estomac et le traitement de l'asthme. Le sol de Rhizosphère de ces plantes peut être une source attrayante d'actinobactéries, qui a la capacité de produire de nouveaux métabolites secondaires. Des enzymes telles que la catalase, la chitinase et l'uréase sont également produites à partir d'actinobactéries. Plus intéressant, la kératinase, une enzyme qui dégrade la plume de poulet de volaille, a été produite avec succès à partir de *Nocardiosis sp.*SD5 isolé des déchets de plumes dans Tamil Nadu, Inde. De même, les Actinobactéries isolées à partir d'intestins de poulet et de chèvre ont montré la présence de diverses enzymes telles que l'amylase, la protéase, la phytase et la lipase (ABBES et BOUTERAA,2017).



**Figure 10** : Différents types d'enzymes produits par Actinobacteria. (a). Amylase. (b). Protéase. (c). Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation Actinobacteria confirme la production d'une enzyme particulière. (ANANDAN et al.,2016).

### 7.3. Bioherbicides

Une autre application intéressante des Actinobactéries est l'utilisation de leurs métabolites secondaires comme herbicides contre les herbes et les mauvaises herbes indésirables. *Streptomyces saganonensis* produit des herbicidines et des herbimycines qui suppriment les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. L'anisomycine, qui est produite par *Streptomyces sp.*, est un type d'inhibiteur de croissance pour les mauvaises herbes annuelles comme la basse-cour et la digitale commune et les mauvaises herbes à feuilles larges; l'anisomycine peut détruire la capacité des plantes à synthétiser la chlorophylle. De même, le bialaphos, un métabolite de *Streptomyces viridochromogenes*, est largement utilisé pour lutter contre les mauvaises herbes herbacées annuelles et vivaces et les mauvaises herbes à feuilles larges en inhibant la synthèse de la glutamine. L'anisomycine peut faire mourir de petits semis de basse-cour et la digitale commune au-dessus de 50 ppm et inhiber la croissance des racicules en dessous de 12,5 ppm. (ANANDAN et al.,2016).

### 7.4. Probiotiques

Les probiotiques sont l'adjonction microbienne vivante qui a un effet bénéfique sur l'hôte par divers moyens, tels que la modification de la communauté microbienne ambiante ou associée à l'hôte, en garantissant une meilleure utilisation de l'aliment ou en améliorant sa valeur nutritionnelle, en améliorant la réponse de l'hôte à la maladie. , ou en améliorant la qualité de son environnement ambiant. Malgré plusieurs autres applications importantes,



les actinobactéries marines ont fait l'objet d'une attention particulière pour leur utilisation comme probiotiques.(ANANDAN et al.,2016).

Le potentiel des Actinobactéries contre les crevettes pathogènes *Vibrio spp.* fait des actinobactéries marines des souches probiotiques potentielles en raison de leur capacité à dégrader les macromolécules, telles que l'amidon et les protéines, dans l'eau de l'étang de culture; la production d'agents antimicrobiens; et la formation de spores résistantes à la chaleur et à la dessiccation.(You J et al.,2007) .Récemment, quelques études ont été faites sur l'utilisation possible des actinobactéries marines dans la prévention des maladies contre les agents pathogènes aquatiques.DAS et al.,2006dans leur étude préliminaire ont rapporté l'utilisation de *Streptomyces sp.* sur la croissance des crevettes tigrées noires.

#### 7.4.1. Phéromones peptidiques agrégatives

L'agrégation est l'un des critères les plus importants pour la sélection d'un bon candidat probiotique, qui est le processus d'accumulation réversible de cellules avec une ou plusieurs souches. Pour que ce processus d'agrégation ait lieu, la production de phéromones est l'un des principaux critères qui implique la défense contre les prédateurs, la sélection des partenaires et la maîtrise de la résistance de l'hôte par une attaque de masse. En particulier, il a été démontré que les peptides de phéromones sexuelles dans les surnageants de culture favoriser l'agrégation non seulement avec la même espèce mais aussi avec des espèces apparentées (Yagi Y et al.,1983).

Ainsi, la capacité d'auto-agrégation d'un probiotique est une condition préalable à la colonisation du tractus gastro-intestinal, tandis que la coagrégation fournit une interaction étroite avec des bactéries pathogènes. Bien qu'il existe un certain nombre d'études conformément à la signalisation médiée par les phéromones peptidiques, il manque dans le cas des actinobactéries, et donc un nouveau rapport sur l'isolement et la purification du facteur favorisant l'agrégation diffusible, c'est-à-dire les phéromones provenant du probiont actinobactérien puissant *Streptomyces werraensis* LD22 isolée de la région intestinale de la chèvre a été décrite par (Muthu et al.,2016). La propension à l'agrégation et améliore la capacité de formation de biofilm d'autres isolats d'actinobactéries.(ANANDAN et al.,2016).

### 7.5. Biosurfactants

Les biosurfactants sont les composés d'origine microbienne qui partagent des fractions hydrophiles et hydrophobes qui sont tensioactives. Par rapport aux tensioactifs dérivés chimiquement, les biosurfactants sont indépendants de l'huile minérale comme matière première; ils sont facilement biodégradables et peuvent être produits à basse température. Les biosurfactants peuvent être appliqués dans divers domaines, tels que les industries des nutriments, des cosmétiques, des textiles, des vernis, des produits pharmaceutiques, des mines et de la récupération du pétrole (**Henkel Met al.,2012**).

L'antibiotique lipopeptidique daptomycine est un biosurfactant actinobactérien qui est déjà entré sur le marché et est utilisé dans le traitement des maladies causées par des agents pathogènes à Gram positif et a été commercialisé sous le nom de Cubicin par Cubist Pharmaceuticals. Divers types de biosurfactants ou bio-émulsifiants ont été décrits comme étant produits dans la classe des Actinobactéries. Parmi les biosurfactants les mieux décrits, on trouve les glycolipides à base de glucose, dont la plupart ont un squelette hydrophile consistant en des unités de glucose liées au glycoside formant un groupement tréhalose. (**ANANDAN et al.,2016**).

### 7.6. vitamines

La vitamine B12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des actinobactéries (**RobbinsW.Jet al.,1950**). L'isolement de la vitamine B12 des fermentations d'actinobactéries **Rickes EL et al.,1948** a suscité un intérêt considérable pour une éventuelle production de vitamine par les fermentations microbiennes. L'addition de sels de cobalt aux milieux semble servir de précurseur à la production de vitamine de toutes les actinobactéries. Le cobalt étant un agent bactéricide plutôt efficace, ce précurseur doit être ajouté avec précaution.

Les fermentations produisant les antibiotiques streptomycines, auréomycine, griséine et néomycine produiront également de la vitamine B12 si le milieu est supplémenté en cobalt sans affecter apparemment les rendements des substances antibiotiques. Plusieurs autres études suggèrent que certaines Actinobactéries qui ne sont pas des cultures productrices d'antibiotiques produisent plus de cette vitamine que celles produisant des antibiotiques (**ANANDAN et al.,2016**).

### 7.7. Pigments

Étant donné que les colorants synthétiques ont certaines limites telles que l'utilisation de produits chimiques dangereux pour leur production, créant des problèmes de sécurité pour les travailleurs et la génération de déchets dangereux, les pigments micro-orientés sont très préoccupants. En particulier, les actinobactéries sont caractérisées par la production de divers pigments sur des milieux naturels ou synthétiques (figure 11) et sont considérés comme une caractéristique culturelle importante dans la description des organismes. Tout changement phénotypique induit par des influences environnementales aidera les actinobactéries car elles présentent des morphologies de colonie distinctes et produisent une variété de pigments et de filaments de ramification aérienne appelés hyphes, qui leur donnent un aspect flou caractéristique. Ces pigments se présentent généralement sous diverses formes nuances de bleu, violet, rouge, rose, jaune, vert, marron et noir, qui peuvent être dissoutes dans le milieu ou retenues dans le mycélium. Les pigments produits par *Streptomyces* peuvent être soit des endopigments (liés à certaines structures cellulaires) soit des exopigments (excrétés dans le milieu environnant). Parfois, différents antibiotiques produits par les actinobactéries sont considérés comme des pigments. Étant donné que la formation de pigments est influencée par le pH du milieu, l'aération, la température de la croissance et les sources de carbone et d'azote, on sait peu de choses sur la nature chimique exacte des pigments. Sa formation est également liée aux mécanismes respiratoires, aux mécanismes de défense et à la protection contre les ultraviolets. (ANANDAN et al.,2016).

**Tableau N° 06 :Pigments d'actinobactéries (ANANDAN et al.,2016).**

Pigment	classe	Actinobacteria
Rhodomycline	Glycoside d'anthracycline	<i>Synodontis violaceus</i>
Actinomycine	Phenoxazinone	<i>Streptomyces sp.</i>
Granaticine	Naphthoquinone	<i>Streptomyces litmocidin</i>



**Figure 11** : Pigment diffusible produit par diverses Actinobactéries en milieu gélose amidon caséine.(ABBES et BOUTERAA,2017).

### 7.8. Synthèse de nanoparticules

Les nanoparticules présentent un grand intérêt scientifique car elles comblent le fossé entre les matériaux en vrac et les structures atomiques ou moléculaires. Généralement, les méthodes chimiques sont peu coûteuses pour un volume élevé; cependant, leurs inconvénients incluent la contamination par des précurseurs chimiques, l'utilisation de solvants toxiques et la génération de sous-produits dangereux. Par conséquent, il existe un besoin croissant de développer des procédures à haut rendement, à faible coût, non toxiques et respectueuses de l'environnement pour la synthèse de nanoparticules métalliques. Par conséquent, l'approche biologique pour la synthèse des nanoparticules devient importante. En fait, les Actinobactéries sont des producteurs efficaces de nanoparticules, qui présentent une gamme de propriétés biologiques, à savoir antibactérien, antifongique, anticancéreux, antibiofouling, antipaludique, antiparasitaire et antioxydant. Les genres *Streptomyces* et *Arthrobacter* ont été étudiés comme de possibles «nanofactories» pour le développement de méthodes propres et non toxiques de synthèse de nanoparticules d'argent et d'or. (Ranjani A et al.,2016).

Un exemple récent de synthèse de nanoparticules d'argent à partir d'une *Actinobacteria* *Streptomyces* sp. « GRD » (Gopinath et al.,2015)

### 7.9. Bioremédiation

Les actinobactéries possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour une application en biorestauration de sols contaminés par des polluants organiques. Dans certains sites contaminés, les actinobactéries représentent le groupe dominant parmi les dégradeurs (**Johnsen et al.,2002**) Ils jouent un rôle important dans le recyclage du carbone organique et sont capables de dégrader les polymères complexes.

**Sanscartier et al.,2009** ont rapporté que l'utilisation accrue d'hydrocarbures pétroliers qui sont largement utilisés dans notre vie quotidienne comme composés chimiques et comme carburant est devenue l'un des contaminants les plus courants des grandes surfaces du sol et est finalement considérée comme un problème environnemental majeur. (**Radwan SS et al ., 1998**) Certains rapports suggèrent que la flore de Streptomyces pourrait jouer un rôle très important dans la dégradation des hydrocarbures (**Barabas G et al.,2001**).

### 7.10. Amélioration de la croissance des plantes

Malgré les antécédents bien documentés de Streptomyces en lutte biologique et les preuves préliminaires de leur capacité à améliorer la croissance des plantes, (**Aldesuquy HS et al .,1998**) les espèces de Streptomyces ont été mal étudiées spécifiquement pour leur potentiel en tant que PGPR. Bien que l'effet bénéfique de certaines souches de PGPR sur certaines cultures soit certain, les mécanismes employés par PGPR ne sont pas clairs. (**Glick BR,1995**) Le PGPR peut affecter la croissance des plantes de deux manières générales, directement ou indirectement. Promotion indirecte survient lorsque le PGPR atténue ou prévient les effets nocifs d'un ou de plusieurs micro-organismes nuisibles, principalement par le biais de la lutte biologique ou de l'antagonisme des agents pathogènes des plantes du sol. Plus précisément, la colonisation ou la biosynthèse d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires peuvent empêcher l'invasion et l'établissement de pathogènes. La promotion directe de la croissance des plantes par le PGPR se produit lorsque la plante est alimentée par un composé synthétisé par les bactéries, ou lorsque le PGPR facilite autrement l'absorption par la plante des nutriments du sol.

**Merriman et al.,1974** ont rapporté l'utilisation de *S. griseus* pour le traitement des semences d'orge, d'avoine, de blé et de carotte pour augmenter leur croissance. L'isolat a

été initialement sélectionné pour le contrôle biologique de *Rhizoctonia solani*. Bien que l'isolat de *Streptomyces griseus* ait augmenté le rendement moyen en grains, le poids du feuillage sec, le nombre de tiges et l'émergence avancée de la tête pour le blé et l'avoine par rapport aux témoins, les différences n'étaient pas statistiquement significatives. Les informations disponibles sur les streptomycètes en tant que promoteurs de croissance des plantes sont limitées, de même que les informations décrivant la possibilité de leurs mécanismes directs de promotion de la croissance. Comme la plupart des rhizobactéries, il semble hautement probable que les streptomycètes sont capables d'améliorer directement la croissance des plantes.

### 7.11. Biolarvicides

L'utilisation intensive d'insecticides chimiques pour lutter contre le paludisme, la filaria, la dengue, la chikungunya, l'encéphalite japonaise et d'autres moustiques a entraîné des risques pour l'environnement et provoqué le développement d'une résistance chez les moustiques vecteurs. En conséquence, divers agents de lutte biologique ont gagné en importance avec d'innombrables avantages par rapport aux insecticides chimiques. À de très faibles doses, ces biolarvicides sont très efficaces contre les larves de moustiques et sont totalement sans danger pour les autres organismes non ciblés, l'environnement, l'homme et la vie sauvage. Plusieurs variétés de micro-organismes, notamment des champignons, des bactéries et des nématodes, ont été signalées comme stratégies de lutte biologique contre les vecteurs. Plus précisément, les actinobactéries produisent de nombreux composés bioactifs importants de grande valeur commerciale et continuent d'être systématiquement recherchés pour de nouvelles substances bioactives. Dans **Rajesh et al., 2013** une étude réalisée par **Vijayan et Balaraman, 1991**, des métabolites secondaires extracellulaires ont été produits à partir de 35 isolats Actinobactériens différents qui ont montré une activité larvicide élevée contre les moustiques *Culex* et Anophèles. **Dhanasekaran et al., 2010** ont rapporté que les isolats *Streptomyces sp.*, *Streptosporangium sp.* et *Micropolyspora sp.* avait une activité larvicide élevée contre les larves de moustiques anophèle sont synthétisé des nanoparticules d'argent de *Streptomyces sp.*

## Chapitre II : Les métabolites secondaires

### 1. Métabolisme des actinomycètes

En général, les actinomycètes sont des bactéries chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais, plusieurs espèces sont capables aussi d'une croissance chimio-autotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**). Les métabolismes des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (**Strub, 2008**). Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés (**Delaunay et al. 2003**).

**Tableau 07** : Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires  
(**Delaunay et al., 2003**)

<b>Métabolites primaire</b>	<b>Métabolites secondaire</b>
Synthétisé pendant la trophophase	Synthétisé pendant l'idiophase
Présent tout au long du cycle cellulaire	Apparition à un moment du cycle cellulaire
Nécessaire à la croissance	Inutile pour la croissance
Rôle physiologique connu	Rôle physiologique mal connu
"turn-over" élevé	"turn-over" pratiquement nul
Produit dans des conditions de culture diverses	Produit dans des conditions de culture bien définies
Ubiquitaire	Spécifique
Enzymes à spécificité étroite	Enzymes à spécificité large
Voies de synthèse simple et courte	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit parfaitement défini	Synthèse d'un mélange de produits
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

## 2. Les antibiotiques

### 2.1. Historique

L'histoire des antibiotiques est vieille de seulement soixante-dix ans au regard du premier succès mondial de la pénicilline.

Les différents travaux commencent tout d'abord par la thèse du **Dr Duchesne (médecin militaire)** en 1887 qui met en évidence une concurrence biologique entre des moisissures et des bactéries. Puis, en 1928 le **Dr Fleming (bactériologiste)** redécouvre par hasard la pénicilline au retour de ses vacances en observant sur des boîtes de pétri à l'abandon une moisissure qui détruit des *Staphylocoques* (bactéries responsables de multiples infections des plus banales aux plus graves) ; il identifie cette moisissure comme étant un penicillium.

En 1939, le **Dr Chain (chimiste)** et le **Dr Florey (clinicien)** s'associent pour former le groupe d'Oxford afin de reprendre les travaux du **Dr Fleming**. Ils arrivent à fabriquer la pénicilline à échelle industrielle à partir de septembre 1943. Cette avancée est alors considérée comme un miracle dans un monde en guerre comme l'illustre cette campagne publicitaire qui vante les mérites de la pénicilline donnée aux soldats britanniques et américains.

### 2.2. Définition d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire (**Coates et Hu, 2007**).

Ils exercent un effet majeur sur la santé, la nutrition et l'économie de la société. Sur 8100 molécules qui ont été recensées vers la fin de l'année 1999, 45,6% ont été produits par le genre *Streptomyces*, 16,0% par des actinomycètes autres que *Streptomyces*, 16,9% par d'autres bactéries et 21,5% par des champignons (**Demain et Lancini, 2006**).

En plus du nombre important de ces molécules, un autre aspect impressionnant des antibiotiques est la diversité de leurs structures chimiques. En effet, toutes les classes de la chimie organique y sont représentées : des chaînes aliphatiques, des cycles aromatiques isolés ou condensés, des hétérocycles et des oligopeptides, des oligosaccharides ... etc., (**Demain et Lancini, 2006**).



Les antibiotiques sont communément classés en familles en fonction de leurs structures chimiques. Une famille renferme toutes les molécules ayant une structure chimique similaire et partageant le même mode d'action antimicrobien. Ce qui suit est un aperçu des familles d'antibiotiques classiques utilisées en thérapeutique humaine avec des exemples d'espèces d'actinomycètes productrices.

### 2.3. Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (**Williams *et al.*, 1993; Lopes *et al.*, 1999 ; Katsifasetal., 1999**).

Les tableaux 06, 07 et 08 illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes. En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité antifongique envers *Candida albicans* (**SanasametNingthoujam, 2010**), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis de dermatophyte *Trichophyton rubrum*. (**Lakshmiathy et Krishnan, 2009**).

Les actinomycètes sont également la source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine), insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressive et immunostimulantes (**Chun *et al.*, 1997 ; Sanglier et Trujillo, 1997 ; Moore *et al.*, 1999 ; Petrosyan *et al.*, 2003**).

Néanmoins, les actinomycètes sont surtout importants du fait qu'ils sont à l'origine de nombreux antibiotiques. Parmi les 25 000 antibiotiques actuellement décrits, environ 70% sont synthétisés par les microorganismes, dont 60% par les actinomycètes (**Leclerc *et al.*, 1986**). Il est à noter que parmi les actinomycètes, le genre *Streptomyces* est la source la plus importante d'antibiotiques (**Okami et Hotta, 1988 ; Long et Wildman, 1993 ; Sanchez, 1996 ; Hwangetal., 2001**).

**Tableau 08** : Quelques exemples d' antibiotiques produits par les actinomycètes.  
(Loucif , 2011)

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
<b>1/Les agents antibactériens</b>		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostromycine	<b>Takahashi et al.,2003</b>
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidine	<b>Jinenezetal.,2009</b>
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	<b>Liu et al.,2007</b>
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	<b>Inoueetal.,2007</b>
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	<b>SturdikovàetSturdik, 2009</b>
<i>Verrucosipora sp.</i>	Abyssomycine	<b>SturdikovàetSturdik, 2009</b>
<b>2/ Les agents antifongiques</b>		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	<b>Fukunagaetal.,2008</b>
<i>Streptomyces humidus</i>	Phenylacétate	<b>Hwangetal.,2001</b>
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	<b>Mukaietal.,2006</b>
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine	<b>Carle et al.,2003</b>
<b>3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosad. Insecticide neurotoxique	<b>Williamson et al.,2006</b>
<i>Actinomadura sp</i>	Herbicides. <b>Exemple 1.</b> 2,4-Dihydro-4-( $\beta$ -D ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one	<b>Schmitzeretal.,2000</b>
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicides. <b>Exemple 2.</b> Herbimycine	<b>Omuraetal.,2006</b>

**Tableau 09:** Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes (Loucif , 2011).

Actinomycète producteur	Molécules bioactives	Références
<b>1/ Les agents anti parasitaires</b>		
<i>Streptomyces sp</i>	Trioxacarcine	Maskeyetal.,2004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Prodiginine	Williamson et al.,2006
<b>2/ Les agents anti viraux</b>		
<i>Streptomyces antibioticus</i>	9-β-D arabinofuranosyladénine	Madiganetal.,1997
<i>Streptomyces sp</i>	Panosialine	Aoyagietal.,2006
<b>3/ L'agent hypocholestérolémique</b>		
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Rapamycine	Chen et al.,1999
<b>4/ Les agents anti tumoraux</b>		
<i>Nocardia asteroides</i>	Asterobactine	Nemotoetal.,2002
<i>Salinispora tropica</i>	Salinosporamide A	Fenicaletal.,2006
<i>Thermoactinomyces sp</i>	Mechercharmycine	Kanohetal.,2005
<i>Marinospora sp</i>	Marinomycine	Kwonetal.,2006
<i>Streptomyces sp</i>	Borrelidine	VinoetLokesh, 2008
<i>Actinomadura sp</i>	IB-00208	Malet-Casconetal.,2009
<b>5/ Les agents immunostimulateurs</b>		
<i>Nocardia rubra</i>	Rubratine	De boer et al.,2000
<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Bestatine	Ichinoseetal.,2003
<i>Kitasatosporia kifunense</i>	FR-900494	Iwamietal.,2006
<b>6/ Les agents immunosuppresseurs</b>		
<i>Streptomyces filipinensis</i>	Pentalenolactone	Uyedaetal.,2001
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Brasilicardine A	Komatsu et al.,2005
<b>7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale)</b>		
<i>Streptomyces spp</i>	L- asparaginase	SaleemBashaetal.,2009
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	L- glutaminase	Balagurunathaetal.,2010



## 2.4. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques en tenant compte du spectre antimicrobien ne paraît pas être la meilleure en raison de l'évolution de la résistance bactérienne. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques. Enfin, celle basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotiques (WALSH, 2000).

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles-mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques, ....etc.(SMAOUI, 2010).

### 2.4.1. Familles des $\beta$ -lactamines

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique (CAVALLO et al., 2004). Les  $\beta$ -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane (CAVALLO et al. 2004). Ils exercent une action bactéricide sur de nombreuses espèces bactériennes. La thienamycine connu sous le nom de imipénème, l'un des derniers antibiotiques découvert possédant un cycle lactame et doté d'un large spectre d'action, est produit par l'espèce actinomycétales, *Streptomyces cattleya* (DEMAIN et LANCINI, 2006).

#### 2.4.2. Les pénicillines

Le terme pénicilline regroupe plus de 50 antibiotiques chimiquement apparentés. Toutes les pénicillines ont une structure commune dans laquelle la chaîne cyclique  $\beta$ -lactame tient lieu de noyau. De ce fait, on les appelle aussi  $\beta$ -lactamines. Elles se distinguent par les chaînes latérales chimiques qui sont rattachés au noyau. Les pénicillines sont produites par voie naturel ou par voie sous-mis synthétique (TORTORA, 2012)

Elles agissent en fusant obstacle à l'assemblage du réseau macromoléculaire du peptidoglycane ; ce qui bloque les dernières étapes de la formation de la paroi cellulaire ; en particulier celle des bactéries à Gram positif. Du même coup, elles inhibent la croissance du microbe. Dépourvu de protection, celui-ci meurt rapidement (TORTORA, 2012)

#### 2.4.3. Les céphalosporines

Les céphalosporines appartiennent à la classe des céphèmes. Elles ont été classées en quatre générations selon leur spectre d'activité (Jacques, 2004). La céphalosporine est un antibiotique naturel extrait du *cephalosporidium*, un champignon. Elle fut le premier membre de cette famille. Celle-ci s'étoffa peu à peu sous l'impulsion des chercheurs, qui ont synthétisé des molécules de plus en plus efficaces et de moins en moins sensibles aux défenses des bactéries. On parle de céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération. Ces dernières ont la particularité d'être efficaces sur des zones de l'organisme qui ne pouvaient être traitées jusque-là, comme le liquide céphalo-rachidien. On peut citer les plus avancées : céfépime et cefpirome (NATHAN ET ÉBERLIN, 1994).

#### 2.4.4. Les aminosides

Les aminoglycosides, ou aminosides, forment une famille d'antibiotiques dont les molécules sont reliées par des liaisons glycosidiques. Ils comprennent la streptomycine et la gentamicine, qui perturbent les premières étapes de la synthèse des protéines en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. Il en résulte des erreurs de lecture du code génétique des ARNm (TORTORA, 2012). L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamycine produite par *Micromonospora purpurea* (DEMAIN et LANCINI, 2006).

#### 2.4.5. Les phénicols

On retrouve dans ce groupe le chloramphénicol, facile à synthétiser. Ce sont des antibiotiques à large spectre, capables de traiter de nombreuses zones de l'organisme, dont le système nerveux central, mais à toxicité élevée. On les utilise par exemple dans le traitement des méningites (NATHAN et ÉBERLIN, 1994).

Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre qui perturbe la synthèse des protéines. En se liant à la sous unité 50S du ribosome, il inhibe la formation des liaisons peptidiques dans les polypeptides en croissance. Du fait de sa structure chimique relativement simple, il est moins dispendieux à synthétiser chimiquement qu'à isoler à partir de culture de *Streptomyces*. Sa faible taille moléculaire facilite sa diffusion dans des régions du corps habituellement inaccessibles à beaucoup d'autres agents (TORTORA, 2012)

#### 2.4.6. Les tétracyclines

Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaînes latérales. Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminocyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien (PRESCOTT et al., 2007). Elles s'interposent entre les ARN t porteurs des acides aminés et la sous-unité 30S du ribosome, ce qui empêche l'ajoute de nouveaux acides aminés au polypeptide en formation (TORTORA, 2012).

#### 2.4.7. Les macrolides

Les macrolides font partie d'une famille d'antibiotiques qui tire son nom du macrocycle lactone que ces agents renferment (TORTORA, 2012). Les macrolides comportent un grand cycle de 14, 15 ou 16 carbones. Ils ont un spectre étroit. Ces antibiotiques traversent les membranes bactériennes pour parvenir dans le cytoplasme de la bactérie où ils vont se fixer sur leur cible : l'unité 50S du ribosome. Cette fixation perturbe la synthèse des protéines (JACQUES, 2004). Ce groupe agit par blocage de la synthèse protéique des germes résistant aux  $\beta$ -lactamine et aux tétracyclines (en particulier les staphylocoques). Il se caractérise par une forte élimination biliaire pour la spiramycine et, à moindres degrés, l'érythromycine (RUCKEBUSCH et TOUTAIN, 1982).

#### 2.4.8. Les quinolones

Les quinolones sont des composés cycliques et l'ajoute de fluor sur la structure de base a permis d'obtenir le fluor quinolones. Toutes les molécules de cette famille inhibent la réplication de l'ADN bactérienne. Pour ce faire, elles se fixent sur une enzyme indispensable à la réplication : la gyrase ou ADN gyrase, cette enzyme était intra-cytoplasmique. La quinolone doit traverser les différentes membranes bactériennes (JACQUES, 2004).

#### 2.4.9. Les polypeptides

Ce sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit, on les utilise dans les infections sévères à bacilles gram négatif. Ce sont les antibiotiques de références pour le traitement des endocardites. La famille de polypeptide, qui comprend la colistine, lapolymyxine B, la bacitracine et la tyrothricine, présente les caractéristiques communes suivantes :

- structure polypeptidique
- activité contre les bacilles gram positifs sauf la bacitracine
- faible absorption; d'où leur usage en antibiothérapie digestive.

La colistine entre dans la composition de nombreuses spécialités où elle est associéeauxsulfamides, aux  $\beta$ - lactamines et aux macrolides (Ruckebusch et Toutain, 1982).



### 3 .Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire les cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte. Comme le montre la figure 03, le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre (SMAOUI, 2010) :

#### 3.1. Action sur la paroi bactérienne

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram-. La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : la première qui se passe à l'intérieur de la bactérie, consiste en la formation des unités de base, l'UDP-N-acétylglucosamine et l'UDP-N-acéthylmuramyl-pentapeptide.

La deuxième étape permet le passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide. Au cours de la troisième étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade, deux enzymes essentielles interviennent : une transglycosylase qui permet l'attachement des disaccharides-pentapeptides entre elles aboutissant à la formation des chaînes polysaccharidiques, et une transpeptidase qui réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide-pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine. Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les  $\beta$ -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (SMAOUI, 2010)

#### 3.2. Action sur la membrane cellulaire

La membrane plasmique des microbes, située juste après la paroi cellulaire, est la cible de nombreux agents antimicrobiens. Essentielle à la cellule, cette membrane joue un rôle actif dans la régulation de l'entrée des nutriments et de l'élimination des déchets. Certains antibiotiques, en particulier les antibiotiques polypeptidiques, influent sur la perméabilité de la membrane plasmique des bactéries. Ces modifications engendrent la rupture de la membrane et, par conséquent, la perte d'importants métabolites cellulaires (TORTORA, 2012).

### 3.3. Synthèse des protéines

Plusieurs antibiotiques antibactériens ont comme site d'action les ribosomes et inhibent ainsi la synthèse protéique (tétracyclines, érythromycine, chloramphénicol, etc.). A ce niveau, ils peuvent empêcher la fixation de l'ARN de transfert porteur d'acides aminés, la translocation et la transpeptidation. D'autres (ex.: streptomycine) provoquent des erreurs de lecture du code génétique. Chez les eucaryotes, la synthèse des chaînes polypeptidiques est arrêtée par la fixation de la kasugamycine sur la sous-unité 40S des ribosomes (**Gale et al., 1981**). La translocation des ribosomes sur l'ARN messager est bloquée par le cycloheximide qui se fixe sur la sous-unité ribosomique 60S (**Deacon, 1984**). La synthèse des protéines est aussi inhibée par la blasticidine S qui bloque l'incorporation des acides aminés (**Caudy et Buxerand, 2005**).

### 3.4. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

La mitomycine et l'acide nalidixique empêchent respectivement la réplication de l'ADN (en se fixant sur les deux brins d'ADN) et sa synthèse (par inhibition de l'incorporation de la thymine). L'actinomycine empêche la transcription de l'ADN en ARN messager (**Caudy et Bertrand, 2005**).

### 3.5. Autres activités

Certains antibiotiques agissent sur l'activité d'une enzyme ou d'un système enzymatique de la cellule, comme par exemple les enzymes du système respiratoire qui sont inhibées par les dérivés de l'imidazole chez les champignons.

## 4. Résistance des bactéries aux antibiotiques

### 4.1. Définition

La résistance bactérienne se définit comme étant la capacité de souches à se développer dans un milieu où la concentration en antibiotiques est plus élevée que celle qui inhibe normalement des souches sensibles de la même espèce. Malheureusement, le phénomène de résistance ne cesse de prendre de l'ampleur dans la plupart des pays. En effet, plusieurs bactéries ont trouvé des moyens efficaces pour résister à l'action des antibiotiques le plus souvent utilisés dans la pratique clinique. À titre d'exemple, des bactéries ont développé différents mécanismes pour résister aux P-lactamines. De plus, certaines bactéries sont capables de résister simultanément à plusieurs classes d'antibiotiques. Celles-ci sont dites multirésistantes.

Parmi les exemples les plus importants, on retrouve les *Streptococcus pneumoniae* résistants à la pénicilline (SPRP), les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) et les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) (Alekhshun & Levy, 2007; Levy, 2002). Les antibiotiques devenus de moins en moins efficaces contre les infections bactériennes représentent un sérieux problème de santé publique car peu de nouveaux antibiotiques sont disponibles sur le marché. Aujourd'hui, les firmes pharmaceutiques tournent leur attention vers des marchés plus lucratifs comme la vente de médicaments servant à traiter les maladies chroniques ou à améliorer la qualité de vie de la population (Projan, 2003).

### 4.2. Types de résistance

Sur le plan génétique, la résistance des bactéries aux antibiotiques résulte soit d'une résistance naturelle ou soit d'une résistance acquise.

#### 4.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, dont le support génétique est le chromosome bactérien, est une caractéristique qui est présente de façon intrinsèque chez toutes les souches d'une même espèce à un antibiotique. Elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques. À titre d'exemples, les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont naturellement résistants aux macrolides car ceux-ci ne peuvent pas traverser la membrane externe de la paroi de ces bactéries à Gram négatif (Normark et Normark, 2002). Un autre exemple peut être illustré par les PLPs des entérocoques qui ont une faible affinité pour les P-lactamines, en particulier les pénicillines M (oxacilline) (Rossolini et al, 2010).

#### 4.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise apparaît généralement au sein de populations bactériennes à la suite de l'utilisation d'antibiotiques. Certaines souches acquièrent des modifications génétiques qui sont de nature chromosomique ou extra-chromosomique (**Neu, 1992**). Dans le premier cas, la résistance est due à des mutations spontanées qui ont lieu aléatoirement dans un ou plusieurs gènes chromosomiques.

Dans un deuxième cas, la résistance est d'origine extra-chromosomique. Les gènes de résistance sont échangés dans l'environnement entre des souches bactériennes provenant de la même espèce ou de genres phylogénétiquement éloignés par différents modes de transferts génétiques horizontaux tels que la transformation, la transduction ou la conjugaison (**Tenover, 2006**). La transformation est effectuée par des bactéries dites compétentes. Celles-ci ont la capacité d'incorporer dans leur génome de l'ADN exogène libre qui est présent dans le milieu et d'acquérir potentiellement des gènes de résistance aux antibiotiques en provenance d'autres espèces bactériennes. *Streptococcus pneumoniae* est un bon exemple de bactérie utilisant la transformation pour acquérir du matériel étranger (**Normark et Normark, 2002**). Quant à la transduction, elle consiste à transférer des gènes de résistance bactériens par l'intermédiaire d'un vecteur, soit le bactériophage. En se répliquant, le bactériophage intègre une partie du génome bactérien. En quittant la cellule, il contient des gènes supplémentaires qui pourront être transmis à d'autres bactéries (**Frost et al, 2005**). La conjugaison nécessite un contact cellulaire étroit pour transférer des gènes de résistance d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par le biais d'un pilus (**Tenover, 2006**).

# Matériel et méthodes

**Chapitre III : Matériels et Méthodes****1. Objectif**

L'objectif de cette étude est de contribuer à la caractérisation préliminaire des molécules bioactives produites par des actinomycètes isolées antérieurement à partir de différents régions.

L'objectif principal de notre travail consiste en :

- ✚ Isolement de souches actinomycètes à partir de différents échantillons sur différents milieux Bennet, GYM, ISP2.
- ✚ Recherche de l'activité antibactérienne contre les souches les plus répandues dans les problèmes sanitaires et technologiques
- ✚ Pré-identification des isolats actifs en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.
- ✚ La production des métabolites secondaires par fermentation sur milieu solide et en milieu liquide fin de comparer les rendements des deux méthodes qualitativement et quantitativement.
- ✚ La caractérisation partielle de la molécule bioactive impliquée dans le processus d'inhibition en utilisant les techniques physicochimiques disponibles au niveau de notre laboratoire.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires de l'université Dr Moulay Tahar –Saida, faculté des sciences Département de biologie, pendant la période allant de janvier à Mars 2020.

## 2. Origine du prélèvement des échantillons

Six échantillons ont été prélevés à partir de :

- ✚ Sedra de la région Daoud.
- ✚ Sebkha de la région de Bougtob.
- ✚ Sebkha de la région d'Adrar.
- ✚ La grotte d'El ogbane la wilaya de Saida.
- ✚ Moringa de la région d'Ouargla.
- ✚ Eau thermale de Sidi -Aissa la wilaya de Saida.

**Tableau 10** : Situation géographique des stations d'échantillonnage.

Région	Altitude (m)	Latitude (nord)	Longitude	Étage bioclimatique
<b>ADRAR</b>	279	27°52'00'	0°17'00' ouest	Arde
<b>BOGTOB</b>		34°02'33'	0°05'21' est	Arde
<b>SAIDA</b>	868	34°50'00'	0°09'00' est	Semi-aride
<b>OUERGLA</b>	123-315	31°57'47'	5°20'31' est	Arde
<b>DAOUD</b>	650	34°55'12'	0°12'34'ouest	Semi-aride

## 3. Technique du prélèvement, transport et conservation

(a) **Sédiment** : selon la technique de **Pochon et Tardieux, (1962)**, les prélèvements des échantillons ont été effectués dans des conditions d'asepsie à l'aide d'une grande spatule stérile à 15 cm de profondeur en écartant les cinq premiers cm de la couche superficielle du sol. Les échantillons du sol ont été transportés dans des flacons stériles au laboratoire et à température ambiante.

(b) **Eau** : le prélèvement d'échantillons d'eau thermale a été réalisé manuellement, l'échantillon est prélevé dans un flacon stérile puis fermé aseptiquement.

Les échantillons sont soigneusement étiquetés et transportés au laboratoire puis conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

**4. Isolement, dénombrement, purification et conservation des souches****4.1. Prétraitement des échantillons**

Concernant les sédiments laisser sécher à l'air libre pendant 15 jours jusqu'à 20 jours.

**4.2. Technique d'ensemencement et conditions d'incubation****4.2.1. Préparation et ensemencement**

Un gramme de sol est introduit dans un tube à vis contenant 9ml d'eau physiologique stérile (9g NaCl /1L d'eau distillée) puis bien agité au Vortex. Des dilutions décimales (10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>,10<sup>-5</sup>)ont été effectuées à partir de la solution mère préalablement obtenue.

Pour l'eau thermale, on a introduit dans un tube à vis contenant 9ml d'eau physiologique stérile 1ml d'eau thermale puis bien agité au vortex. Des dilutions décimales comme on a fait pour le sol ont été effectuées à partir de la solution mère préalablement obtenue.

100µL de chaque dilution sont étalés sur la surface des boites de Pétri contenant chacune un milieu de culture (3boites par milieu et par dilution). **(Boudjella et al., 2006).**

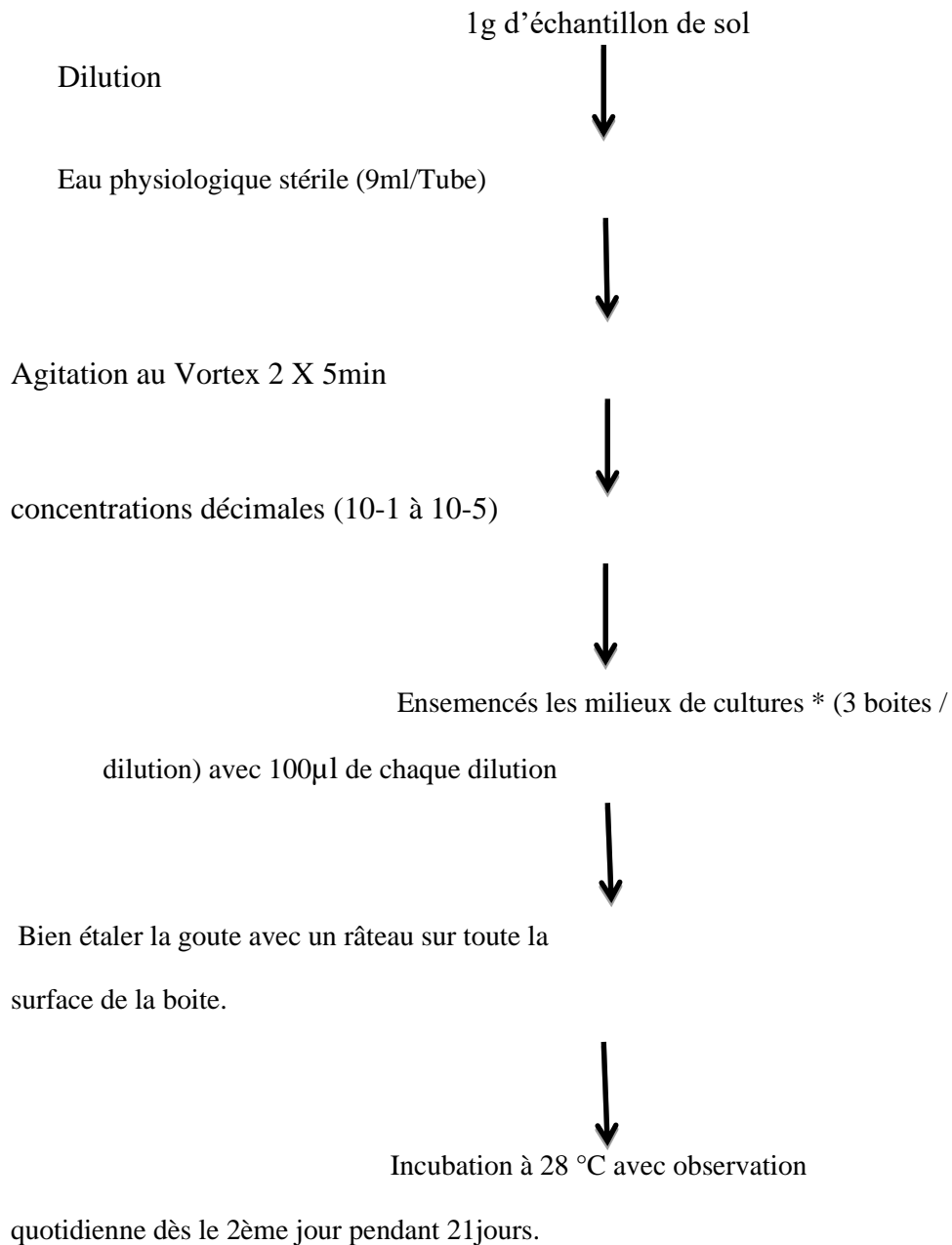
Les trois (03) milieux utilisés sont les suivants : milieu Glucose extrait de Malt et extrait de levure(GYM) International Streptomyces Project (ISP2), Bennett, leurs compositions sont données en Annexe(1).

Les milieux d'isolement utilisés ne sont pas additionnés d'antifongique et d'antibactérien.

**4.2.2. L'incubation**

Les boites ont été incubées à 28°C pendant une durée pouvant atteindre 21 jours. La lecture est faite quotidiennement à partir du 2ème jour(voir figure N°12).





**Figure 12** : Protocole d'isolement non sélectif d'actinomycètes de sols.

### **4.3. Dénombrement**

Le dénombrement des colonies d'actinobactéries est effectué après 21 jours d'incubation. Seules les colonies présentant les caractéristiques macroscopiques des bactéries d'Actinomycétales sont dénombrées.

### **4.4. Observation microscopique**

Toutes les colonies bactériennes qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques aux actinobactéries : colonies dures et incrustées dans la gélose et présence de mycélium aérien, sont observées au microscope optique, en utilisant la coloration simple au bleu de méthylène ainsi que la coloration de Gram. L'observation au microscope optique est effectuée avec les différents grossissements (**Kalyani et al., 2012**). L'ensemble des isolats obtenus des différents échantillons sont repiqués sur le même milieu qui a servi à l'isolement.

### **4.5. Purification et conservation des souches isolées**

Les colonies d'actinomycètes obtenues subissent une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires. Les souches obtenues sont conservées selon trois techniques :

- ✚ Conservation en gélose inclinée sur milieu GYM à 4 °C pour une durée de deux mois environ.
- ✚ Au congélateur à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.
- ✚ Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu GYM sont remplis de l'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation. (**BOUDEMAGH, 2007**)

## 5. Etude morphologique

### 5.1. Etude macromorphologique

Cette étude consiste à noter, au 7ème, 14ème et 21ème jours d'incubation à 30°C, la croissance des souches, l'aspect et la couleur des mycélium aérien et du substrat et la production et la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture suivants: l'ISP2, (**Shirling et Gottlieb, 1966**), Bennett. La composition des milieux est donnée en annexe 1. Les différentes couleurs sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS). (**Belhout, 2013**)

### 5.2. Etude micromorphologique

Afin de mettre en évidence l'aspect filamentueux caractéristique des actinomycètes, toutes les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques à ces derniers, colonies dures et incrustées dans la gélose, sont observées au microscope optique (**Belfrekh et Megoura, 2016**) en utilisant la coloration simple par le bleu de méthylène, ainsi que la coloration de Gram. L'observation au microscope optique est effectuée avec des grossissements gradués ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ) (**Kalyani et al., 2012**).

#### Observation à l'état frais

Elle permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie. La méthode consiste à déposer une petite goutte d'eau distillée stérile sur une lame, puis on prélève une fraction de colonies sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci, en faisant une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement (afin de ne pas casser le mycélium) ; ensuite, la lame a été recouverte d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air et en évitant que le liquide déborde. L'observation a été faite à différents grossissements (10X puis 40X).

#### Coloration de gram

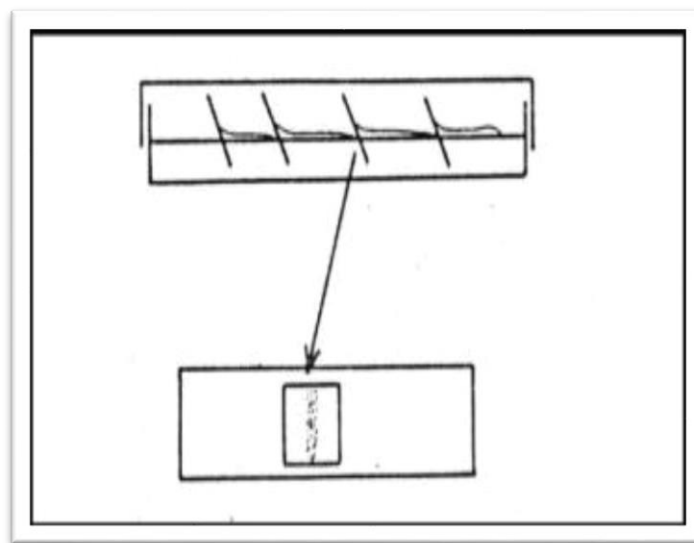
- ✓ Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen.
- ✓ Coloration par violet de gentiane, laissez agir 30 secondes à 1min.
- ✓ Rincer à l'eau distillée.
- ✓ Mordançage au lugol pendant 1 min, puis rinçage à l'eau distillée.
- ✓ Décoloration par l'alcool pendant 30s, rincé à l'eau.
- ✓ Recoloration à la fuchsine pendant 1 min, rinçage à l'eau puis séchage.

- ✓ Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100(G×100).

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (**Camille, 2007**)

#### ✚ Technique de culture sur lamelle

La culture sur lamelle permet une observation de la partie aérienne du mycélium en conservant sa structure et sa morphologie. Pour ce faire, une lamelle stérile a été introduite délicatement dans le milieu gélosé ISP2 de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° (figure 16). Une goutte de l'inoculum a été déposée contre la lamelle en contact avec le milieu de culture. Après 5 jours d'incubation, les lamelles ont été retirées délicatement pour éviter l'altération de mycélium, puis placées sur des lames et observées au microscope optique au grossissement 40 X (**BOUCHAIB et FARES, 2017**).



**Figure 13 :** Technique de culture sur lamelle.

## 6. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes

### 6.1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide

#### Matériel biologique

##### Microorganisme cible

Afin de mettre en évidence l'activité des souches d'actinomycètes, les isolats purifiés ont été testés pour leur activité antibiotique vis-à-vis des microorganismes cibles suivantes :

- ❖ Bactéries à gram négatif : *Escherichia coli* ATCC25922. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.
- ❖ Bactéries à gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC25923. *Bacillus cereus* ATCC11778.

##### Revivification des bactéries tests

Chaque bactérie test est revivifiée dans 9ml de bouillon puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées dans le cas contraire le milieu reste limpide.

A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture est ensemencée en stries sur une boîte de pétri contenant du milieu gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées.

##### Tests de confirmation de l'identité et de la pureté des bactéries indicatrices

Les bactéries indicatrices ont fait l'objet de tests physiologiques et biochimiques afin de confirmer leur identité et de s'assurer de leur pureté.

Nous avons vérifié la pureté des souches de référence cibles par observation microscopique qui nous a permis de mettre en évidence la forme, l'arrangement cellulaire, la taille et le gram.

Par faute de moyen, d'autres tests biochimiques n'ont pas pu être effectués à savoir, le test de catalase de *S.aureus* (différencie les coques positifs) API 20E pour *E. coli*, oxydase et API20NE pour le diagnostic des bacilles Gram négatif (*P.aeruginosa*).

### Préparation des inocula de bactéries –tests

A partir d'une culture de 18h sur gélose nutritif (GN), 5 colonies de chaque bactéries testes en 5ml eau physiologie est préparer.

La densité cellulaire de chaque suspension par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0.5 Mc Farland (une densité optique égale à 650nm) de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$ UFC/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Cavalla et Eberlin, 1994).

### Technique des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes sont ensemences en stries serrées à la surface des milieux Bennet, GYM, ISP2. Après 14 jours d'incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6mm de diamètre sont prélevés, déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries tests. Les boîtes de pétri portant les cylindres d'agar sont placées à 4°C pendant 4 heures pour permettre un pré diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heure. Les diamètres sont alors mesurés (Petrosyan et al., 2003).

## 6.2. Etude taxonomique des souches d'actinomycètes sélectionnées

### 6.2.1. Sélection des souches d'actinomycètes

L'étude taxonomique a été réalisée sur des souches pures isolées et sélectionnées sur la base de leur activité antagoniste vis-à-vis des 4 germes cibles testés :

- Bactéries à gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- Bactéries à gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

Les souches d'actinomycètes qui représentent le plus d'activité (la plus grande zone d'inhibition) et le plus large spectre (active sur tous les germes cibles utilisés) ainsi que le plus petit temps de génération ont été retenues pour une étude taxonomique.

### 6.2.2. Etude des caractères morphologiques

#### Macromorphologie

Il s'agit de déterminer l'aspect des colonies, la couleur du mycélium aérien (MA) et celui du substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles sur différents milieux de culture tels que l'ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7 et l'ISP9 préconisés par «l'International *Streptomyces* Project» (Shirling et Gottlieb, 1966) ainsi que sur milieu GYEA (Athalye et al., 1981). Les compositions de ces derniers ont été données en annexe (1).

Les colonies d'actinomycètes cultivées sur les différents milieux cités précédemment sont observées à l'œil nu et à la loupe binoculaire : CARL ZIESS 475002 (au grossissement 10 x 0,8 et 10 x 2,5). L'évaluation de la croissance et du développement du mycélium aérien ainsi que la présence de pigments diffusibles sur chaque milieu ont été observé et notés après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C.

#### Micromorphologie

Les observations micromorphologiques ont été réalisées directement sur boîtes de Pétri et ce pour étudier le mycélium en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (Williams et al., 1989). Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique (CARL ZIESS) à deux grossissements (10x40 et 10x100) après 7 et 14 jours d'incubation (Alliki, 2013).

### 6.2.3. Etude physiologique et biochimique

#### Etude physiologique

##### a. Détermination des pigments mélanoïdes et des pigments diffusibles :

La mise en évidence des pigments mélanoïdes produits par les souches actives est réalisée sur le milieu **ISP7**. Une boîte non ensemencée sert de témoin. L'observation de la couleur brune noir caractéristique des pigments mélanoïdes se fait au 2<sup>ème</sup> et au 4<sup>ème</sup> jusqu'au 7<sup>ème</sup> jours, en comparant les boîtes ensemencées avec le témoin (Shirling et Gottlieb, 1966 ; Mocheva et al., 2002). S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes autre que la couleur brune-noir caractéristique des pigments mélanoïdes, la couleur est notée (Shirling et Gottlieb, 1966).

##### b. Hydrolyse de l'amidon :

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de Gordon et Smith (1953). Après 14 jours d'incubation à 30°C, la gélose est

recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de la coloration autour des colonies. A l'inverse les zones contenant d'amidon se colorent en brun.

**c. Hydrolyse de la caséine :**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)** et de **Gordon et Smith (1953)** sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 30°C témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**Yalaoui, 2012**).

**d. Action sur le lait écrémé :**

Des tubes contenant une solution de 10% de lait écrémé en poudre en eau distillée sont ensemencés et incubés à 28°C. Après 14 jours, la coagulation et la peptonisation sont notées (**Singleton, 1999 ; Boughachiche, 2012**).

**e. Hydrolyse de la gélatine :**

Les souches sont ensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% (P/V) de gélatine puis incubées 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Geraldine et al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

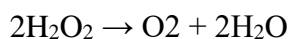
**Etude biochimique :**

**f. Dégradation du Tween 80 :**

Ce test met en évidence la dégradation du Tween 80 (composition du milieu donnée en 2 annexes) qui se manifeste par une auréole opaque autour des colonies (**Saker, 2015**).

**g. Recherche de la catalase:**

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), selon la réaction suivante :



Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée. Pour chaque souche une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame stérile sur laquelle quelques colonies sont réparties. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (**Zermane, 2008**).

**h. Utilisation du citrate comme seule source de carbone :**



La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec l'inoculum lavé de la souche. L'incubation s'effectue à 30°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine.

### **i. Recherche de l'uréase :**

4.5ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole sont ensemencés par 0.5ml de la souche. La lecture est effectuée après incubation à 30°C pendant 24 heures.

✚ Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc Uréase positive.

✚ Si la couleur du milieu reste jaune donc Uréase négative.

### **j. Recherche de la production de l'indole :**

4.5ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole sont ensemencés par 0.5ml de la souche. La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 30°C. 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à 1ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

### **k. Utilisation des différents substrats carbonés et production de l'H<sub>2</sub>S :**

Des tubes contenant le milieu TSI (Three Sugar Iron) sont ensemencés par piqure centrale et en surface puis incubés pendant 7 à 14 jours à 30°C.

Les résultats se manifestent comme suit :

✚ Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune.

✚ Glucose positif : culot jaune.

✚ La production de H<sub>2</sub>S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu.

### 6.3. Production et extraction des métabolites secondaires

Cette étape a pour but de préparer des extraits à partir du milieu de culture des espèces d'actinobactéries purifiées.

#### 6.3.1. Fermentation solide

La souche étudiée est ensemencée en stries serrée sur milieu AF. Après incubation à 28 °C pendant 7 à 14 jours, la gélose est fragmentée puis repartie dans des Erlenmeyers contenant 70 ml du solvant: méthanol. Après agitation vigoureuse, les extraits organiques sont récupérés par centrifugation à 3000 g pendant 20 mn puis testés par la technique des disques de diffusions (**Boughachiche, 2012**).

#### 6.3.2. Fermentation liquide

À partir de la culture d'actinobactéries, des colonies sont ensemencées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 70 ml de milieu AF liquide. Ensuite les cultures sont incubées pendant 7 à 14 jours à 28 °C sous agitation constante à 180 rpm. Après la durée d'incubation, les cultures sont centrifugées pendant 20 min à 3000 g. Chaque 70 ml de surnageant est mélangé avec 70 ml de solvant. Les extraits obtenus sont concentrés par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif -55 °C. Les résidus secs de chaque solvant sont ensuite repris dans 1 ml de méthanol et sont transvasés dans des Eppendorfs (**Souheyer, 2018**).

#### 6.3.3. Technique des disques de diffusion

Les extraits organiques obtenus à partir des cultures liquides et solides sont testés par la technique des disques de diffusion. Des volumes de 50 µl sont déposés par fractions sur des disques de papier Wattman N°3 (6 mm de diamètre) stériles qui sont séchés. Les disques sont, ensuite, déposés sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, préalablement ensemencée par les souches testes cibles. Les boîtes sont incubées à 37 °C pour les bactéries. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation pour les bactéries.

#### 6.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'extrait pour laquelle il n'y a pas de croissance de germe visible. La CMI peut être déterminée :

- En milieu solide, la CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait qui provoque l'apparition d'un spectre d'inhibition ou une zone d'inhibition

La CMI recherche contre les 4 bactéries testées précédemment une série de 7 dilutions dans le méthanol (coefficient de dilution égal à 0.5) est réalisée à partir de l'extrait actif 50mg/ml des 2 isolats. Les concentrations sont donc de 25mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25mg/ml, 3.12mg/ml, 1.56mg/ml, 0.78mg/ml, 0.39mg/ml. Des disques stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 25 µl de chacun des extraits de différentes concentrations préparées précédemment. Ils sont ensuite séchés pendant 15min dans une étuve, et déposés sur la culture dans la boîte pétri. Après 24h d'incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par observation de la présence d'halo d'inhibition.

- En milieu liquide, la technique utilisée a été décrite par le **Comité Européen pour les tests de Susceptibilité Antimicrobienne** (EUCAST) en 2003. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilution de la substance antimicrobienne.

Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Le bouillon Mueller Hinton (MHB) supplémenté en cation est largement utilisé comme milieu standard pour la micro dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes.

A partir d'une préculture bactérienne en milieu solide (Muller Hinton gélosé) de 24h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons suspendu dans un bouillon BHIB ou bien TSB (Tryptic Soy Broth). Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37°C jusqu'à l'obtention de concentration cellulaire de  $10^8$  cellules/ml (une DO de 0.08 à 0.1,  $\lambda = 625\text{nm}$ ).

Nous avons effectué ensuite une dilution au 1/100<sup>ème</sup> pour avoir un inoculum final de  $10^6$  cellules/ml.

- Préparation de la microplaque :

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 100µl de Bouillon Muller Hinton (MHB) dans les 12 puits à l'exception du puits N°2. Le puit N°1 servira de témoin négatif. Nous avons ensuite ajouté 100µl de l'extrait à tester dans les puits N°2 et 3.

Après avoir bien mélangé le contenu du troisième puit, nous avons prélevé 100µl que nous avons mis dans le quatrième puit, puis du quatrième au cinquième et ainsi de suite

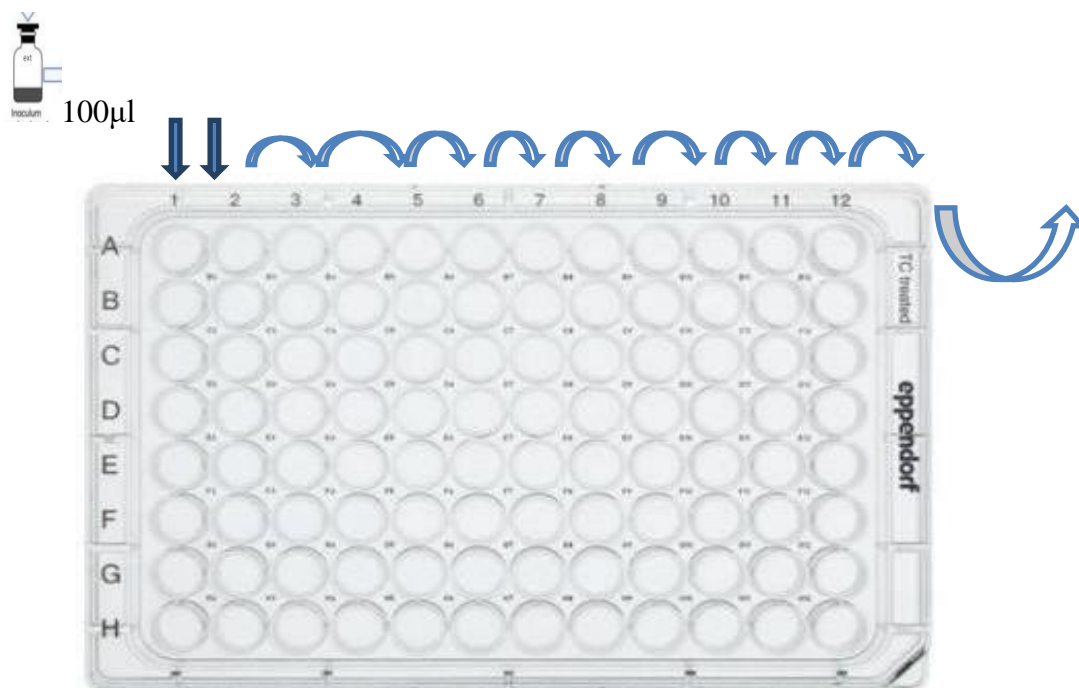
jusqu'au dernier puit de façon à obtenir des dilutions successives de demi en demi. Les 100µl du dernier puit qui restent doivent être éliminés (voir figure 14).

Enfin, nous avons introduit 100µl de l'inoculum dans chaque puits. Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

Cet indicateur coloré est préparé en extemporané à 0.4 mg/ml dans l'eau distillée. 40µl de la solution de INT sont rajoutés dans chaque puit. La microplaque est incubée à nouveau à 37°C pendant 30 minutes.

Le tétrazolium sert comme un accepteur d'électrons, sous sa forme réduite il prend une couleur rouge. Lorsqu'il est ajouté aux puits où il y a une croissance microbienne avec libération d'électrons, il se transforme sous une forme réduite et le contenu de puit devient rouge. Quand les bactéries sont inhibées, le contenu des puits reste clair après l'incubation en présence de tétrazolium.

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance n'est considérée comme la plus faible concentration inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la recherche de CMB (Mohamed, 2016).



**Figure 14:** Ensemencement de la microplaque.

## 6.4. Caractérisation de la molécule bioactive

### 6.4.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium (Serrab et Thabet, 2018).

Elle constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des métabolites secondaires. Elle se fait sur une plaque de silice gel sur laquelle est déposé un spot de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluion constitué de toluène-acide acétique (8 :2), respectivement. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 15 cm à partir du point de dépôt. A la fin, le chromatogramme est observé sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm).

Les molécules bioactives sont révélées sur le papier en utilisant les vapeurs d'iode : 10 à 20 grammes de cristaux d'iode sont introduits dans une cuve parfaitement étanche et sont laissés une période suffisante pour saturation complète de la cuve, les chromatogrammes sont ensuite introduits pendant quelques minutes. Après avoir retiré le papier, l'iode sublime rapidement et les emplacements des molécules bioactives se colorent en brun à l'œil nu.

### 6.4.2. Bioautographie des molécules bioactives

Cette méthode consiste d'une part, à détecter les taches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leurs rapports frontaux (Rf), respectifs. La plaque CCM qui préalablement servie à la séparation des métabolites des deux extraits des souches est placée dans une boîte de Pétri de 100 mm de diamètre. Un volume de 100 ml de la gélose Muller Hinton en surfusion est inoculé avec 10 ml de la suspension bactériennes ciblées. Ce milieu est réparti de façon homogène et uniforme sur la plaque CCM. Après solidification, la boîte est mise à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion de substance antibiotique dans le milieu puis incubée à 37°C. Les zones d'inhibition représentées par l'absence de fluorescence sont notées après 24 h (Serrab et Thabet, 2018).

# **Résultats et discussion**

## Chapitre IV : Résultats et Discussion

### 1. Isolement des actinomycètes

Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C en milieu solide, les premières colonies d'actinomycètes ont commencé à apparaître. Reconnues par leur aspect morphologique caractéristique, elles apparaissent sèches, rugueuses, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, avec une grande variété de couleur, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Elles se développent lentement par rapport aux champignons et aux bactéries qui envahissent les boîtes de Pétri.

Tous les repiquages des isolats ont été effectués sur les milieux Bennet, Gym et ISP2 avec incubation à 28°C dans le but de purifier les souches.

Les résultats de l'isolement d'actinomycètes sont présentés dans le tableau N°11 :

**Tableau 11** : L'isolement de souches actinomycètes à partir des échantillons de sol et l'eau thermale.

Echantillon		Sebkha Sa (Ba)	Sebkha Sb (Bb)	Sedra D	Grotte G	Moringa M	Eau de source E
Origine du sol		ADRAR	BOUGTOB	DAOUD	Vieux de SAIDA	Ouargla	Hammam SIDI-AISSA
Milieux utilisés et le nombre d'isolats obtenus	Bennet	1	1	0	11	0	60
	GYM	3	7	20	8	6	7
	ISP2	3	3	13	3	2	6

L'utilisation de certaines sources de carbone (amidon) et d'azote (caséine) ainsi que le carbonate de calcium dans le milieu GYM rend le milieu moins favorable à la croissance des bactéries autres que les actinomycètes et donc minimise les contaminants.

Les milieux Bennet et GYM permettent un bon isolement d'actinomycètes par rapport au ISP2 cela peut être dû à la richesse des deux premiers milieux en matière organique.

L'eau provenant de hammam Sidi-Aissa isolées sur les trois milieux donnés que sur le milieu Bennet et donne un bon rendement en actinomycètes par rapport aux autres.

Les résultats de **Kitouni (2007)** ont montré que  $\text{CaCO}_3$  favorise la sporulation en augmentant le nombre des actinomycètes par rapport aux autres.

## **2. Etudes morphologiques des souches d'actinomycètes**

### **2.1. Aspect macroscopique (Caractères cultureux)**

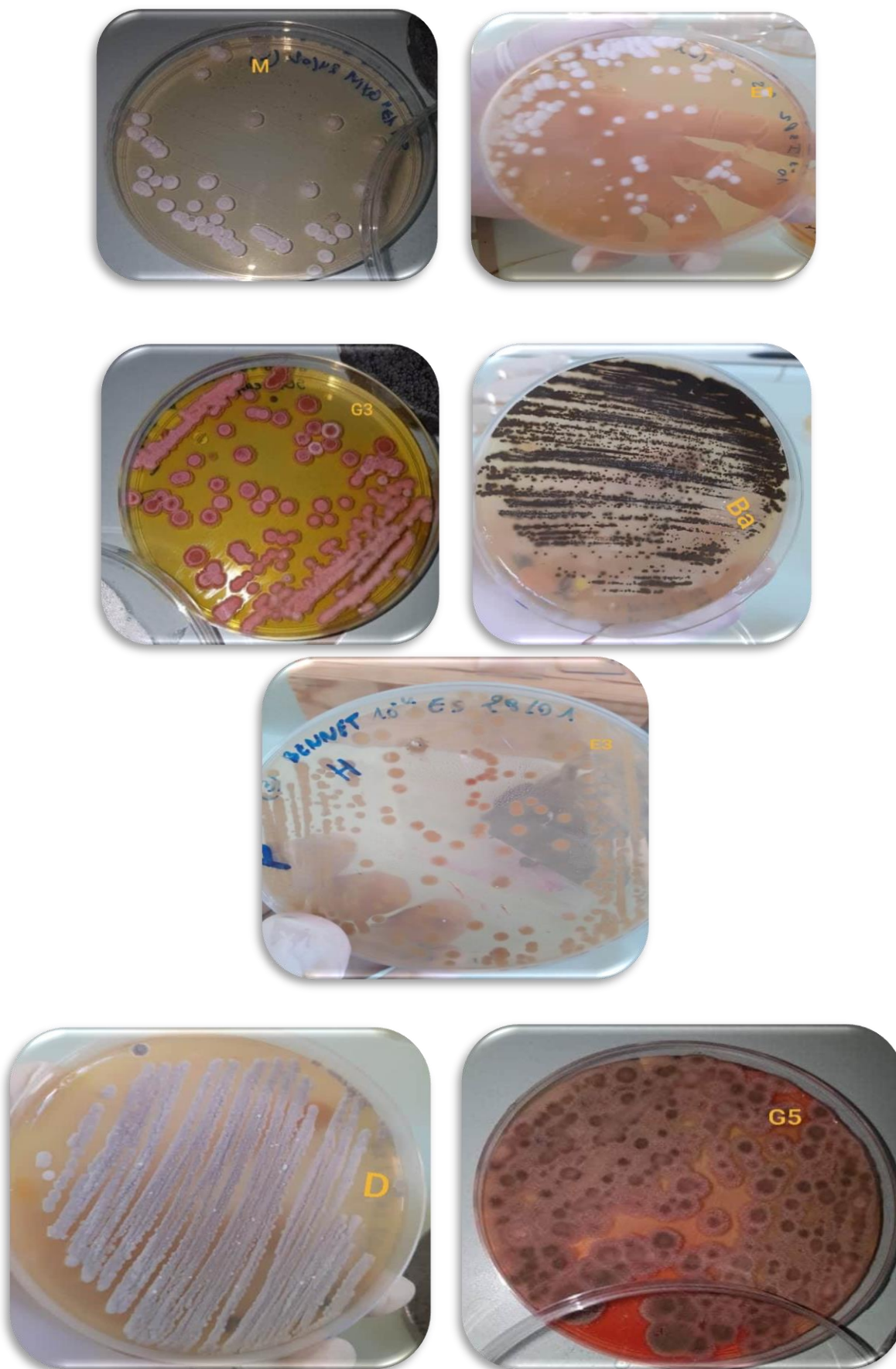
Les colonies des différents isolats apparaissent au bout de trois jours d'incubation à 28°C, après ensemencement sur différents milieux de culture gélosés (Bennet, GYM, ISP2).

Les caractères cultureux de ces isolats sur les trois milieux de culture gélosés utilisés sont rassemblés dans le tableau 12.



**Tableau 12** : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologique des souches d'actinomycètes.

<b>Caractères souche</b>	<b>Plan</b>	<b>Surface</b>	<b>Bord</b>	<b>Élévation</b>	<b>Couleur</b>	<b>Consistance</b>	<b>Filament</b>	<b>Pigments diffusibles</b>
<b>D</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	bombé	gris	Sèche	+	-
<b>E1</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	bombé	blanche	Sèche	+	-
<b>E3</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	convexe	Orange/beige	Sèche	+	+
<b>G5</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	bossue	Gris noire	Sèche	+	-
<b>Ba</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	convexe	Noire	Sèche	+	-
<b>G3</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	convexe	Rose	Sèche	+	+
<b>M</b>	Circulaire	Rugueuse	Réguliers	Bossue	Blanche	Sèche	+	-

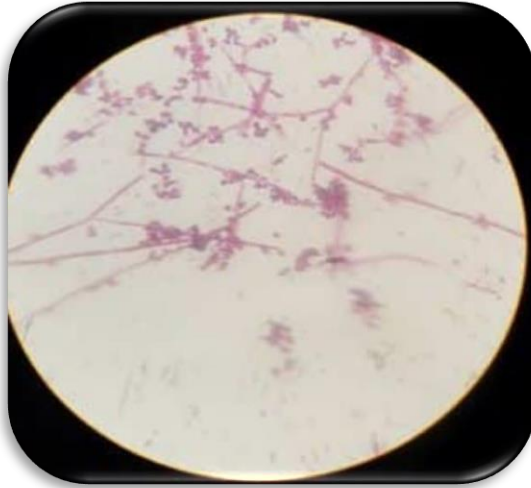


**Figure 15 :** Aspect macroscopique des souches d'actinomycètes.

## 2.2. Aspect microscopique

### ✚ Coloration de Gram

Après observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à immersion Gx100, il s'est révélé que la souche d'actinomycète isolée est une bactérie filamenteuse à coloration de gram positive, donc elle est de l'ordre des Actinomycetales.




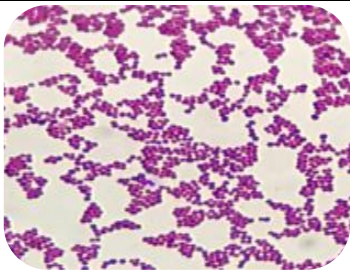

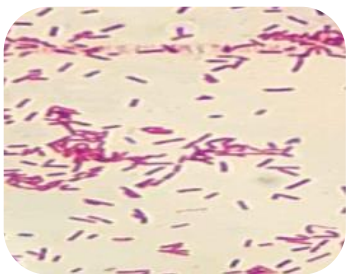
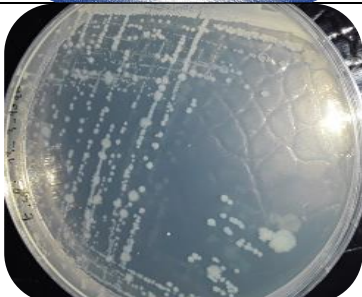
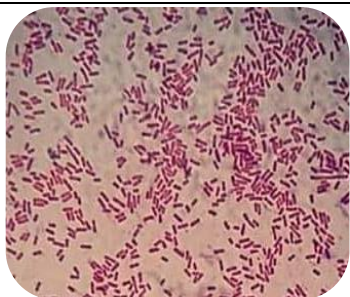


**Figure 16 :** Observation microscopique après coloration de Gram. (Gx100)

## 3. Recherche de l'activité antibactérienne

### 3.1. Purification et confirmation de l'identité des bactéries-tests

Le tableau 13 regroupe les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des bactéries indicatrices utilisées dans notre étude.

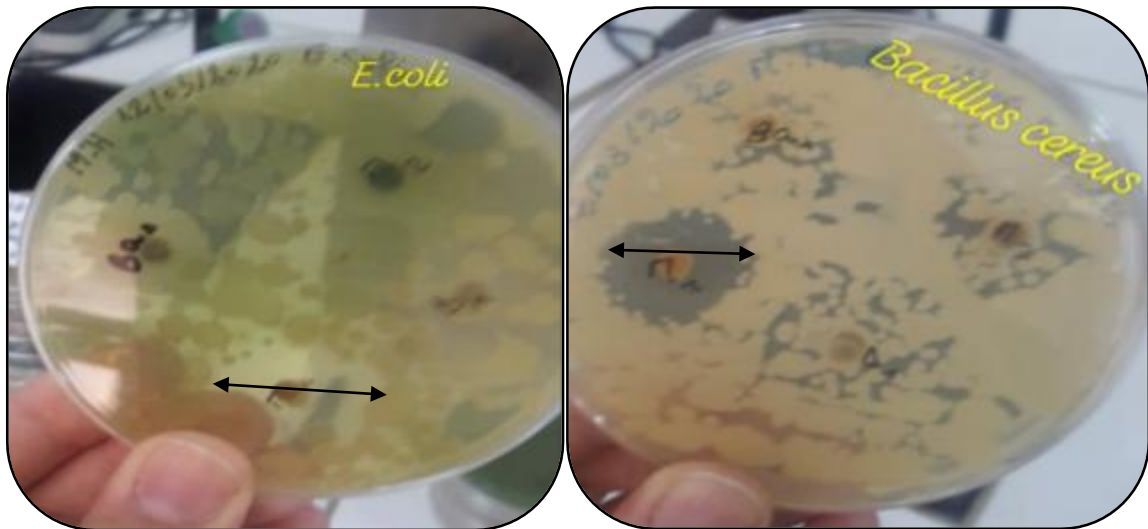
Tableau 13 : Aspect macroscopique et microscopique des souches cible utilisées.

Souches de références	Observation macroscopique	Notes	Observation microscopique (Gx100)	Notes
<i>Staphylococcus aureus</i>		Colonies de taille moyenne		Cocci Gram positif regroupés en grappes de raisin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Colonies de taille moyenne bombées muqueuses, contour régulier		Des bâtonnets très fins Gram négatif
<i>Escherichia coli</i>		Colonies de taille moyenne, contour régulier, lisse, bombées de couleur beige		Des bâtonnets Gram négatif de longueur et diamètre moyen
<i>Bacillus cereus</i>		Colonie de forme ronde à irrégulière, convexe de couleur blanche cassé, crémeux		bâtonnets de 2µm de diamètre, Gram positif, de longueur de 7µm

### 3.2. Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives

#### ✚ Test des cylindres d'agar

Nous avons testé l'activité antibactérienne des souches purifiées d'actinomycètes par la technique de cylindre d'agar (**figure 17**), afin de sélectionner les souches les plus productrices de substances antibactériennes. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 14.



**Figure 17** : Résultats du test d'antagonisme des isolats d'actinomycètes (cylindre d'agar).

**Tableau 14** : Résultats de l'activité antibactérienne (mm) des isolats d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminé par la méthode des cylindres d'agar.

Zone d'inhibition (mm)				
Code	Gram +		Gram-	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<b>Ba1</b>	0	0	0	0
<b>M2</b>	0	0	0	0
<b>D1</b>	0	0	0	0
<b>M1</b>	0	17	0	21
<b>G1</b>	0	0	0	0
<b>G2</b>	0	0	0	0
<b>G3</b>	0	0	0	0
<b>G4</b>	0	0	0	0
<b>G4'</b>	0	0	0	0
<b>G5</b>	0	0	0	0
<b>G6</b>	0	0	0	0
<b>E1</b>	0	0	0	0
<b>E2</b>	0	0	0	0
<b>E3</b>	0	0	0	0
<b>E4</b>	0	0	0	0
<b>E5</b>	0	0	0	0
<b>E6</b>	0	0	0	0

Parmi 17 isolats, le test d'antagonisme montre que seulement une souche d'actinomycètes est active contre deux bactéries tests avec une différence de niveau d'activité ; M1 est la plus active contre *E. coli* (21mm) tandis que M1 est moins active contre *B.cereus* (17mm) tandis que les souches Ba1, M2, D1 ne présentent aucune activité contre les mêmes bactéries tests. Alors qu'aucune des souches n'est active vis-à-vis de *S.aureus* et *P.aerugenosa*.

Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que la souche M1 est active sur une bactérie à Gram positif et Gram négatif. En effet les bactéries de coloration de Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (Sateesh et al.,2011).

L'isolat M1 a été sélectionné pour leur pouvoir antibactérien remarquable.

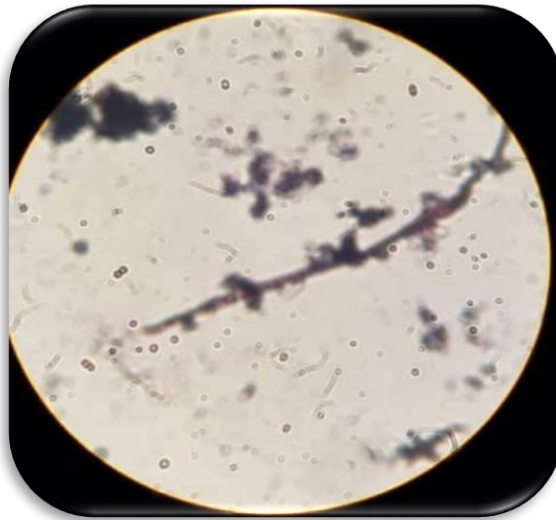
#### 4. Identification des souches d'actinomycètes actives

##### 4.1. Résultats de l'étude morphologique

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux d'isolat actif sont résumés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Etude macromorphologique et caractères cultureux d'isolat actif.

code	Milieu de culture	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Pigments diffusibles
M1	Gym	Blanc	beige	-



**Figure 18** : Aspect micromorphologique d'isolat M1 (G×40) sur milieu GYM.

#### 4.2. Résultats de l'étude physiologique et biochimique

Le tableau 16 résume les résultats de l'étude physiologique et biochimique des isolats sélectionnés.

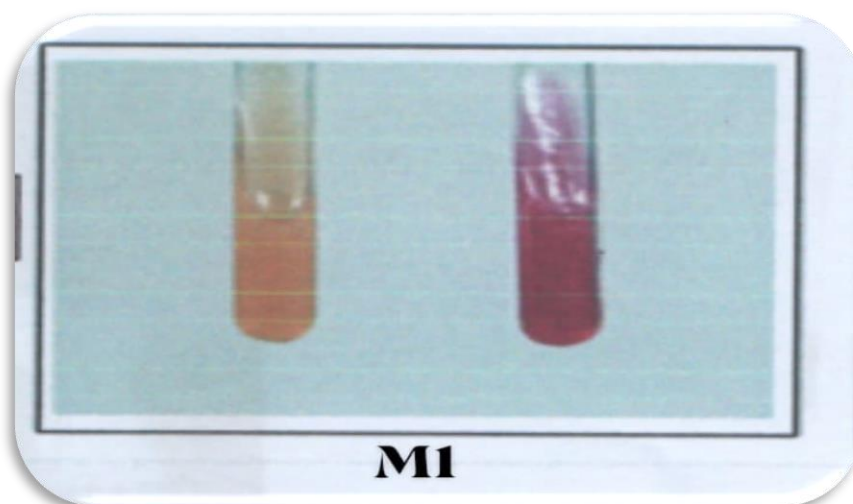
**Tableau 16** : Les caractéristiques physiologiques et biochimiques d'isolat actif.

Test isolat	Recherche de Catalase	hydrolyse de L'amidon	hydrolyse de gélatine	dégradation de l'urée	Citrate	Production de H <sub>2</sub> S	Glucose
M1	+	+	-	+	+	-	+





**Figure 19** : L'utilisation de citrate comme source de carbones par l'isolat M1.



**Figure 20** : Résultats de test de l'uréase.

# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion

Le but de ce travail consiste à sélectionner des souches d'actinomycètes productrices de substances antibactérienne vis-à-vis de bactéries les plus incriminées dans les pathologies infectieuses humaines.

Six sites d'échantillonnages situés dans des zones géographiques différentes de point de vue climatologique, sont choisis pour réaliser l'isolement. Le sol salin est représenté par deux échantillons prélevés dans des lacs, le premier est situés dans la région de Bougteb dans la wilaya d'El bayedh alors que le deuxième se trouve dans la wilaya d'Adrar. Le troisième échantillon est prélevé dans la grotte située près de la ville de Saida, alors que le quatrième présente l'eau thermale de Hamam Sidi Aissa. Les deux autres échantillons représentent le sol de rhizosphérique de deux plantes *Ziziphus spina-christi* et *Moringa oleifera*.

Trois milieux de cultures différents sont utilisés pour l'isolement, Il s'agit de Gym, Bennet et ISP2. Un total de 154 isolats est obtenu sur les différents échantillons et sur les différents milieux de culture. Le taux le plus important des isolats (60) est obtenu dans l'échantillon de l'eau thermale de Sidi Aissa. Les plus faibles nombre de colonies d'actinomycètes sont obtenus sur les sols salins ce qui nous a orienté vers l'utilisation d'autres milieux de cultures plus ou moins alcalins pour un meilleur rendement dans des travaux d'avenir. Les résultats obtenus lors de l'isolement ont montré que le milieu Bennet est le plus favorable pour la croissance des actinomycètes parmi les trois milieux utilisés. Nous pouvons conclure aussi que pour un milieu favorable comme le Bennet, l'utilisation des agents sélectifs notamment des antifongiques est nécessaire pour minimiser le risque de contamination.

Au totale, 26 isolats sont purifiés et 17 seulement sont testés ensuite, après avoir perdre 9 par l'envahissement par des champignons, pour leur activité antibactérienne contre des bactéries indicatrices connues par leur importance dans les pathologies humaines (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*).

Un isolat, codé M1 obtenu de l'échantillon du sol rhizosphérique de l'arbre *Moringa* situé dans la wilaya de Ouargla, a montré un pouvoir inhibiteur important traduit par des diamètres élevé des zones d'inhibition (17 mm contre *Bacillus cereus* et 21 mm

## Conclusion et perspective

---

contre *Escherichia coli*) . Ce dernier est retenu pour des travaux ultérieurs de production, purification et caractérisation de ses métabolites bioactives.

La pré-identification de l'isolat a été réalisée en se basant sur les caractères physiologiques et biochimiques. La culture de l'isolat sur le milieu **GYM** donne des colonies poudreuses circulaires bossues sèches, ce qu'il rapproche du genre *Streptomyces*.

L'intérêt de ces métabolites dans le domaine médicale et la santé publique nécessite leur étude d'une manière plus approfondie en procédant à :

- ✚ L'identification moléculaire des isolats producteurs de ces métabolites.
- ✚ Purification par chromatographie liquide à haute performance HPLC.
- ✚ Etude de la solubilité et de la thermo-stabilité de ces molécules antibactériennes.
- ✚ La réalisation de la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13, afin de déterminer la structure chimique de cette molécule antibactérienne.

# **Références bibliographique**

## Références bibliographique

---

### Référence bibliographique

- Abbes, S., and Bouteraa, I. 2017. Identification phénotypique de quelques isolats d'actinobactéries présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes pathogènes .Master en biotechnologie végétale et métagénomique. Université Mohamed Boudiaf, Msila.
- Aldesuquy, H.S., Mansour, F.A., and Abo-Hamed, S.A (1998). Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiol.* 43(5): 465-470.
- Aleshchenkova, Z. M., Samsonova ,A.S., Baikova ,S.V., and Kukulianskaia ,T.A. (1996). The degradation of plasticizers by *Rhodococcus erythropolis* 40F. *Microbiol. Z.* 58, 34-38.
- Allik, M. L.(2013). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques « Essai d'identification phénotypique et chimiotaxonomique » .Master en Microbiologie Appliquée. Université A.MIRA, Bejaia.
- AMEUR, H. 2014. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Doctorat en sciences. Université Ferhat Abbas, Sétif 1.
- Anandan, R., Dhanasekaran, D., and Gopinath, P .M (2016). An Introduction to Actinobacteria. Basics and Biotechnological Applications, 1.1-37, <http://dx.doi.org/10.5772/62329> .
- Anderson, A.S., Wellington, E.M.H.(2001). The taxonomy of
- Antoun, H., Bordeleacu, L.M., Agnoent, G, G., and Lachance, R.A (1978). Actinomycetes antagonistes de champignons et n'affectant pas le *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 24:558-562.
- Bakdi, K. and Lounis, A (2016). Evaluation de l'activité antimicrobienne et de la capacité de production enzymatique des Actinomycètes. Master en biotechnologie microbienne .Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- Barabas, G (2001). N-Alkane uptake and utilization by *Streptomyces* strains. *A Van Leeuw.* 79(3-4):269-276.
- Bastide, A., de Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M. and Duménil, G (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *Microbiol. J.* :2, pp. 453-466.

## Références bibliographique

---

- Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E. and Lechevalier H. A., (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12: 421 – 423.
- Becker, B., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. (1965). - Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, 236-242.
- Belfrekh, A., and Megoura, M (2016). Isolement des actinomycètes à partir d'un sol Saharien et d'une Sebkha de la région d'El-Oued et mise en évidence de leur capacité à dégrader quelques pesticides. Master en Microbiologie Générale et Biologie moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri, Constantine.
- Benouaugni, S (2014). Recherche de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de molécules antifongiques (cas des eaux du lac Mellah d'El Kala). Doctorat en microbiologie appliquée. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, T., Hornsby, S., Howarth, C.-H., Huang, T., Kieser, L., Larke, L., Murphy, Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. and Hopwood, D.A. (2002). – Complete genome sequence of the model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
- Boudemagh, A (2007). Isolement à partir des sols Sahariens de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat Etat En Microbiologie Appliquée. Université
- Boudjelal-Bencheikh, F (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus sp.* AH97. Doctorat en sciences agronomique. Ecole nationale supérieure agronomique, El-Harrach Alger.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., F. Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N (2007). Isolation and partial characterization of pigment like antibiotics produced

## Références bibliographique

---

- by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil, journal of applied microbiology, n°103, p.228-236.1364-5072.
- Boughachiche, F (2012).Etude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre Streptomyces, isolées de Sebkh. Doctorat en Sciences Option Biotechnologies Microbiennes. Université Mentouri, Constantine.
  - Camille, D(2014).Pratique en microbiologie de laboratoire.Paris.Lavoisier.
  - Caudy, C. and Buxerand, J. (2005). – Antibiotiques, pharmacologie et thérapeutique. Collection Pharma, Editions Elsevier 269 pp.
  - Cavalla,M., and Eberlin, T(1994). Isolement des Streptomyces du sol. L'opéron,XIX, 13-17.
  - Cavallo, J., Fabre, D., Jehlf, R., RAPP, C., and Garrabé, E. (2004).Betalactamantibiotics. EMC-Maladies Infectieuses: 1, 129–202.
  - Chaphalkar, S.R.and Dey, S (1996).Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actinomycete*. 7(2): 47-54.
  - Characteristics of airborne actinomycetes spores. Appl. Environm. Microbiol. 64, 3807-3812.
  - chez*Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INPENSAT. France. 174p.
  - Choulet, F. 2006. Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210.
  - Coates, A.R. and Hu, Y (2006).New strategies for antibacterial drug design: targeting non-multiplying latent bacteria. *Drugs R D*; 7:133–151.
  - Coates,A.R., Hu ,Y., Bax R., and Page, C (2002).The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 1:895–910.
  - Colombié, V (2005). Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens.Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées deToulouse. pp174.
  - Colombié, V(2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*.Modélisation métabolique, simulation et capteurlogiciel. Thèse de Doctorat.Institut National des Sciences Appliquées deToulouse. pp174.



## Références bibliographique

---

- Das, S., Lyla P.S., and Khan, S.A (2006). Marine Microbiol diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr Sci.*; 90(10):1325-35.
- Deacon, J.W. (1984). - "Introduction to modern mycology". Vol.7, 2nd.Ed. 239 p.
- Demain , A.L.(1999).Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms.*App.Microbiol Biotechnol.*Vol 52:455-463.
- Demain, A.L. and Lancini ,G. (2006). - Bacterial Pharmaceutical Products *in* *Procaryotes*, 1, 812–833p.
- Dhanasekaran, D.Sakthi, V., Thajuddin, N., and Panneerselvam, A( 2010). Preliminary evaluation of *Anopheles* mosquito larvicidal efficacy of mangrove Actinobacteria. *Int J Appl Biol Pharm Techno*; 1(2):374-381.
- Djenni, I(2009).Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées
- Donadio S., Monciardini ,P., Alduina ,R., Massa, P., Chiocchini, C., Cavaletti ,L., Sosio ,M., and Puglia ,A.M.(2002). Microbiol technologies for the discovery of novel bioactive metabolite. *J. Biotechnol*, 99, 187-198p.
- Eberlin, T. (1994) Les antibiotiques: classification, mode d'action, utilisation thérapeutique. *Nathan, Paris*, 13(5): 606.
- Gale, E.F., Cundcliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H. and Waring M.J. (1981). - Antibiotics affecting the function of the cytoplasmic membrane. Chap.4 In: the molecular basis of antibiotic action. 2nd edn. Wiley, London.
- GARRITY, G.M. ., BELL, J.A., and LILHURN, T.G (2004). Taxonomic Outline of the Procaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition Release 5.0, SpringerVerlag, New York. 1-399. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>.
- Geraldine M., Schofield M. and Schaal, K.P (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbial*. 127: 237-259.
- Glick, B.R (1995).The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Cand J Microbiol*; 41(2):109-117.
- Gopinath, P.M., Dhanasekaran, D., Ranjani, A., Thajuddin, N., Akbarsha, M.A., Velmurugan, M, M., and Panneerselvam, A(2015).Optimization of sporicidal activity and environmental Actinobacteria - Basics and Biotechnological

## Références bibliographique

---

- Applications bacillus endospores decontamination by biogenic silver nanoparticle. *Future Microbiol.* 10(5):725-741.
- Gordon, R. E. and Smith, M. M (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.*, 66: 41-48.
  - Gurushankara ,H.P.,Shilpa,O.,Anet ,A.,Anupama,K. P.(2019).Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry.Chap .22 in: Present Status and Future Perspectives of Marine Actinobacterial Metabolites .India. Edition Science Direct. 319p.
  - Habibeche, L (2012). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques .Mémoire du diplôme master en biotechnologie microbienne. université Abderrahmane, Bejaia.
  - Henkel, Muller, M.M., Kugler, J.H., Lovaglio, R.B., Contiero, J., Syltatk, C., and Hausmann, R (2012).Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation Rhamnolipids production. *Process Biochem.* 47(8):1207-1219.
  - Hillel, D(2008) .Soil biodiversity. *Soil in the environment*, 1.163-174.
  - Holt, J.G., Krieg, N.R., Sheath, P.H.A., Staley,J.T., and Williams ,S.T(1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. William and Wilkins.Baltore.
  - Hopwood,D .A., and GLAUERT,A.M.(1960).The Fine Structure of *Streptomyces coelicolor*: I. The Cytoplasmic Membrane System.*The Journal of biophysical and biochemical cytology* 7(3):479-88.
  - Hwang,B.K., Lim,S.W., Kim, B.S., Lee, J.Y., and Moon, S.S. (2001). Isolation
  - In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 3739-3745.
  - Jaques,B. (2004). *Le technicien d'analyse biologique*. 2eEdition, Paris : 1201p.
  - Johnsen, AR., Winding, A., Karlson, U., and Roslev, P(2002).Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of <sup>13</sup>C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol.*68(12):6106-6113.
  - Kalyani, A.L.T.,RamyaSravani ,K. M., and Annapurna ,J. B(2012). isolation and characterization of antibiotic producing Actinomycetes from marine soil samples.*International Journal of Current Pharmaceutical Research*.Vol: 4. N°: 2. 109-112p.

## Références bibliographique

---

- Khan J.A. and Patel A.S(2011).Extraction and purification of antibacterial metabolites from Actinomycetes SPP .Isolated from soil sample .International journal of pharmaceutical research and development.3 (10), 63-71.
- Kim B.,Altai A.M., Kim,S., Somsuundarm,B.,Michael,P.,and Goodfellow,M(2000).*Streptomyces thermocoprophilus sp.nov* . A cellulose free endoxylanase producing Streptomyces .International Journal of systematic and evolutionary.(50).505-509.
- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Doctorat en Microbiologie : Université Mentouri, Constantine.
- Lacey ,J. (1997). - Actinomycetes in composts. Ann Agric Environ Med, 4, 113–121.
- LAIB, S .and Saoudi,S( 2017).Production et extraction des molécules bioactives à partir d'une souche d'actinobactérie (*Streptomyces* SRO1).Doctorat en microbiologie appliquée. Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi.
- Lancini, A. (2006).Performance et Gestion des Connaissances: Contribution à la construction d'un cadre d'analyse“, Actes des Journée des IAE, Congrès du cinquantenaire, Montpellier, France. vol.18, n°1, p 215-233.
- Larpent, J.P., and Sanglier, J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Editions Masson. Paris, 481p.
- Lazzarini,A., Cavaletti, L.,Toppo, G., and Marinelli, F. (2000). - Rare genera of actinomycetes aspotential producers of new antibiotics.Antonie van Leeuwenhoek, 78, (3-4), 399-405.
- Lechevalier ,M.P. and Lechevalier ,H(1970)(a).Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes:20(4).pp.435-443.
- Lopes, A., Coelho, R. R., Meirelles, M. N. I., Branquinha, M. H., and Vermelho, A. B(1999). Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. Men. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro. 94: 763-770.
- Loucif, K(2011). Recherche des substances antibactériennes à partir d'une collection des souchesd'actinomycètes .caractérisation préliminaires de molécules

## Références bibliographique

---

- bioactives. Mémoire de magister demicrobiologie, Université Mentouri ,Constantine.
- Mariat, T. and Sebald, M (1990).Les actinomycètes, dans : Leminor L. Bactériologie médicale. Médecine Science Flammarion, France : 54-62.
  - Merriman, P.R., Price, R.D., Kollmorgen, J.F., Piggott, T., and Ridge, E.H(1974). Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Crop Pasture Sci.* 25(2):219-226.
  - Microbiol., 10, 135-156 et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp : 157.
  - Miyadoh,S. (1993). – Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*, 9, 100-106.
  - Mocheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. andBogatzevska N. (2002). Characteristics of actinomycetes from Antarctica *J.Cult.Collect.* 3:3-4.
  - Mohamed, H(2018). Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi-arides d'Algérie. Doctorat en sciences. université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran.
  - Mohamed, M.A (2016).Contribution à la production, l'extraction et la caractérisation partielle des métabolites secondaires à effet antibactérien produits par des actinomycètes. Mémoire de diplôme de master en microbiologie appliqué. université Dr Moulay Tahar, Saida
  - Muthu Selvam, R., Vinothini, G., Palliyarai Thaiyammal, S., Latha, S., Arunachalam,C.C., Al-harbi, S., Dhanasekaran ,D., Padmanabhan ,P., and Archunan ,G(2016). Cell aggregating propensity of probiotic Actinobacterial isolates: isolation and characterization of the aggregation inducing peptide pheromone. *Biofouling.* 32(1): 71-80.
  - Nanjwad, B., Chandrashehara,S., Goudanavars,P.S., Shamareza,M., Manvi,F. (2010). Productionnouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Production ofantibioticsfromsoilisolateactinomycetes and evaluation of theirantimicrobialactivities.
  - Nathan, and Eberlin. (1994) Antibiotiques : classification et mode d'action,utilisation thérapeutique-Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007).Microbiologie. De Boeck et Larcier, que, 9-23.

## Références bibliographique

---

- Neu, H.C. (1992). - The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257, 1064-1073.
- O'Gara, F., Dowling, D. N., and Boesten, B. (2008). *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. John Wiley & Sons: Weinheim. 192p.
- Omura, S. (1992). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind.*
- Ounadjela F. Z. (2016). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema). Master en microbiologie appliquée. Université de Tlemcen, Tlemcen.
- Park, J.O., El-Tarabily, K.A., Ghisalberti, E.L., and Sivasithamparam, K. (2002). - Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 361–365.
- Petrosyan, P., Garcia-Varela, M., Luz-Madrigal, A., Huitron, C., and Flores, M.E (2003). *Streptomyces mexican* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*: 53(pt1):269-273.
- Prescott, L. M., Harley, J.P. and Klein, D.A (2007). *Microbiologie*. De Boeck & Larcier, Bruxelles : 805-825.
- Prescott, L.M., Harley, J. P., and Klein, D. A (2010). *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition 1088p.
- Radwan, S.S., Barabás, G., Sorkhoh, N.A., Damjanovich, S., Szabo, I., Szollosi, J., Matko, J., Penyige, A., Hirano, T., and Szabo, I.M. (1998). Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*. 169(1):87-94.
- Rajesh, K., Padmavathi, K.C., Ranjani, A., Gopinath, P.M., Dhanasekaran, D., and Archunan, G (2013). Green Synthesis, characterization and larvicidal activity of AgNps against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* Larvae. *Am J Drug Disc Develop*. 3(4):245-253.
- Ranjani, A., Gopinath, P.M., Rajesh, K., Dhanasekaran, D., and Priyadharsini, P. (2016). Diversity of silver nanoparticle synthesizing Actinobacteria isolated from marine soil, Tamil Nadu, India. *Arab J Sci Eng*. 41(1):25-32.
- Reponen, T.A., Gazonko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K. and Cole E.C. (1998).
- Rickes, E.L., Brink, N.G., Koniuszy, F.R., Wood, T.R., and Folkers, K (1948). Crystalline vitamin B12. *Sci*. 107(2781):396-397.

## Références bibliographique

---

- Robbins, W.J., Hervey, A., and Stebbins, M.E.(1950).Studies on Euglena and vitamin B12. Bull Torrey Bot Club. 423-441.
- Sabaou, N., Hacène,H., Bennadji ,A., Bennadji, H .,and Bounaga ,N. (1992). - Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. Can. J. Microbiol., 38, 1066-1073.
- Saker, R(2015). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de doctorat 3eme cycle microbiologie. université Ferhat Abbas, Sétif.
- Sanglier, J.J., Haag ,T.A., Huck ,T.A., and Fehr ,T (1993).Review of Actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **5**, 207-223p.
- Sanglier, J.J., Wellington, E.M.H., Kamoun, A., Kelly C., Mercer D.K., Prinzi,S. and Trigo ,C.(1993). Novel bioactive compounds from Actinomycetes. Res. Microbiol. 144,661-663.
- Sanscartier, D., Zeeb, B., Koch, I., and Reimer, K(2009).Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. Cold Reg Sci Technol. 55(1):167-173.
- Serrab, N. A. and Thabet, K(2018).Etude de l'activité biologique de quelques métabolitessecondaires des souches actinomycétales isolées du sol .Master en microbiologie appliquée.Université Larbi Ben mhidi,Oum el Bouaghi.
- Shirling, E.B., and Gottlieb. D. (1966). Methods for characterization of Streptomyces species.Int. J. Sys. Bacteriol. 16 (3), 313-340.
- Singleton, P(1999). Bacteria in biology, bacteriology and medicine. *Wiley, Chi Chester UK*: 236.
- Sinot,J.(1985).Evaluation de l'activité des antibiotiques *in vitro*.In LeminorL.Bactériologie médicale.Doin éditeur.p111.
- 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.
- Strub, C. (2008).Modélisation et optimisation de la production de thiolutine
- Takahashi, Y., Omura, S. (2003). Isolation of new Actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. Journal of Genetic Applied Microbiology.

## Références bibliographique

---

- 49: 141-154. The case of streptogramins. *Cur Drug Targets Infect Disord.* 1: 215-225.
- Tanaka, Y., and Omura, S (1990). – Metabolism and products of Actinomycetes- an introduction. *Actinomycetologica*, 4 (1), 13-14.
  - Tarkka, M., and Hampp, R. (2008). -Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions in Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Soil Biology*, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
  - Theilleux, J. (1993). - les actinomycètes *in* Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.
  - Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (2012) Introduction à la microbiologie. Edition de Renouveau pédagogique, Québec: 152-408.
  - Vijayan, V., and Balaraman, K(1991). Metabolites of fungi & Actinomycetes active against mosquito larvae. *Indian J Med Res.* 93:115-117.
  - Walch, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406: 775-781.
  - Watve, M.G., Tichoo, R., Jog, M.M and Bhole, B.D (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch. Microbiol.* Vol 176:386-390.
  - Williams, S. T. and Cross, T(1971). Actinomycetes. In: *Methods in microbiology. Booth D.Ed., Academic Press, London.* 4: 295-334.
  - Williams, S.T., Goodfellow. and Alderson. (1989) Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (volume 4). Williams ET Wilkins, USA: 2452-2492.
  - Williamson, N.R., Fineran, C.P., Leeper, F.J., and Salmon ,P.C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review.* Vol 4.
  - Yagi, Y., Kessler, R.E., Shaw, J.H., Lopatin, D.E., and, Clewell, D.B(1983). Plasmid content of *Streptococcus faecalis* strain 39-5 and identification of a pheromone (cPD1)-induced surface antigen. *J Gen Microbiol.* 129(4):1207-1215.
  - Yamaguchi, T (1965). - Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 89 (2), 444–453.
  - You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., and Zhou, S(2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine Actinomycete strain A66. *Appl*

## Références bibliographique

---

Microbiol Biotechnol. 76(5):1137-1144.

- Zermane, F(2007). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Magistère en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri, Constantine.



# **Annexes**

## Annexes

---

### Milieux de culture

#### **Bennet**

Extrait de levure 1g  
Extrait de viande de bœuf 1g  
Peptone pancréatique de caséine 2g  
Glucose 10g  
Agar 15g  
Eau distillée qsp 1000ml  
Ph=7.3

#### **GYM (Glucose- Extrait de levure –malt)**

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

#### **ISP2 (international Streptomyces project)**

Extrait de levure 4g  
Extrait de malt 10g  
Glucose 4g  
Agar 20g  
Eau distillée qsp 1000ml  
Ph=7.3  
  
(TSE) Tryptone –Sel-Eau  
Tryptone 1g  
NaCl 8.5g

## Annexes

---

Eau distillée qsp 1000ml

### **Eau physiologie**

NaCl 9g

Eau distillée qsp 1000g

### **(MH) Mueller-Hinton**

Infusion de viande 300g

Hydrolysant de caséine 17.5g

Amidon 1.5g

Agar 17g

Eau distillée qsp 1000ml

Ph=7.4

### **(BN) Bouillon nutritif**

Peptone 10g

Extrait de levure 5g

NaCl 5g

Eau distillée qsp 1000ml

Ph =7.2

### **(GN) Gélose nutritive**

Peptone 10g

Extrait de levure 5g

NaCl 5g

Agar 15-20g

Eau distillée qsp 1000ml

Ph =7.2

### **Gélose TSI (Triple Sugar Iron)**

Peptone de viande 15g

Protéase peptone 5g

## Annexes

---

Extrait de viande 3g  
Extrait de levure 3g  
Glucose 1g  
Saccharose 10g  
Lactose 10g  
Citrate de fer ammoniac 0.3g  
NaCl 5g  
Sodium thiosulfate 0.3g  
Rouge de phenol 0.05g  
Agar 18g  
Eau distillée qsp 1000ml  
Ph =7.2

### **Citrate de Simmons**

Citrate de sodium	1,0 g
Bleu de bromothymol	0,08 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Hydrogénophosphate de potassium	1,0 g
Hydrogénophosphate d'ammonium	1,0 g
Agar	15,0 g

Ph =6.8

### **Urée -indole**

L-tryptophane 3 g  
Urée 20 g  
Monohydrogénophosphate de potassium 1 g  
Dihydrogénophosphate de potassium 1 g

## Annexes

---

Chlorure de sodium 5 g  
Rouge de phénol 2,5 g  
Eau distillée qsp 1000ml  
Ph=6.8

### **Milieu AF**

Extrait de levure 4g  
Extrait de malt 10g  
Glucose 2g  
NaCl 2.5g  
CaCO<sub>3</sub> 1g  
Agar 15g  
Eau distillée qsp 1000ml  
Ph =7

### **Les colorants**

Lugol  
Fuschine  
Violet de gentiane