

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**



**Université de Saida-Dr. Moulay Tahar**  
**Faculté des Sciences**  
**Département de Biologie**  
**Laboratoire de Biotoxicologie**  
**Pharmacologie et Valorisation Biologique des Plantes**



**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en**  
**Biologie**  
**Option : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par : Melle ITIM Rouba et Melle KHELLAF Djihad**

**Production de métabolites bioactifs par des actinomycètes :**  
**Etude de Synthèse**

**Soutenu le : 11/07/2021**

**Devant le jury:**

Mr. SI TAYEB Tayeb Professeur Université de Saïda      Président

Mr. BENREGUIEG Mokhtar Maître de conférence "A" Université de Saïda Promoteur

Mr. ADLI Djallal Eddine Houari Maître de conférence "A" Université de Saïda Examineur

**Année universitaire 2020-2021.**

# *Remerciements*

Nous remercions tout d'abord le Dieu qui nous a donné le courage et la patience dans toute notre vie et pour terminer ce modeste travail. Toujours en lui nous avons mis toute notre confiance et IL nous a jamais déçu.

*En premier lieu, nous adressons toute notre gratitude à notre encadreur*

***Monsieur BENREGUEIG***

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de diriger et d'encadrer ce travail. Nous vous remercions pour votre disponibilité, vos conseils précieux et votre soutien pendant la réalisation de ce mémoire. Nous espérons avoir été à la hauteur de vos attentes. Nous garderons un excellent souvenir de votre extrême gentillesse. Nous n'aurons pas assez de ces quelques lignes pour vous exprimer nos sincères remerciements et notre profond respect. Vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez, pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

*À notre Maître et Présidente de mémoire Monsieur SI TAYEB*

Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce mémoire avec plaisir et sans conditions. Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

*À notre examinateur Monsieur ADLI*

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi les membres de jury de ce mémoire, permettez-nous de vous témoigner toute notre admiration pour votre accueil sympathique. Nous vous prions d'accepter l'expression de notre respect et notre sincère reconnaissance.

*Merci aussi à nos enseignants*

Aucune dédicace ne peut exprimer le respect et la gratitude pour tous les sacrifices que vous avez consentis dans notre formation et notre instruction. Que Dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.

Enfin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Travail, nous exprimons nos profondes reconnaissances et gratitude à toutes.

# *Dédicaces*

JE DÉDIE CE TRAVAIL :

## *A mon très cher père*

A mon très cher père ce modeste travail est le fruit de tous sacrifices déployés  
Pour notre éducation. Vous avez toujours souhaité le meilleur pour nous.  
Vous avez fournis beaucoup d'efforts aussi bien physiques et moraux  
Moraux à notre égard. Vous n'avez jamais cessé de nous  
Encourager Et de prier pour nous. C'est grâce à vos percepts que nous  
Avions appris à compter sur nous mêmes. Vous méritez sans conteste qu'on  
Vous décerne les prix « Père Exemplaire ».

Mon Père : je t'aime et j'implore le tout puissant pour qu'il t'accorde une bonne  
santé et une vie heureuse

## *A ma très chère mère*

En ce jour mémorable, pour moi je dédie ce travail à ma mère.

Merci maman, repose en paix et sois certaine de toujours

Rester vivante en moi

## *A ma sœur*

Je vous aime tellement, j'espère que dieu vous aidera dans votre vie et  
Réaliser vos souhaits et restera à mes côtés longue vie.

## *A mes amies*

Amina et Lamia et Fatima Chaque instant en votre présence à mes côtés se transformait  
spontanément en un agréable souvenir.

Vous étiez toujours là à mes côtés dans les moments les plus difficiles de toute ma vie –  
chacun à sa manière- vous continuez à me prouver chaque instant que j'ai des vrais sœurs sur  
les quelles je peux toujours compter

A mes chers oncles et tantes, ainsi que leurs époux et épouses

A ma grand-mère

Je te remercie pour ta bénédiction

A mes chers cousins et cousines et A toute ma grande famille

Je vous remercie pour vos encouragements, votre soutien moral et votre grand Que dieu vous  
accorde santé, bonheur et longue vie

*Djihad*

## *Dédicaces*

﴿وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ﴾ (سورة هود الآية 88)

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

### *A MA CHERE MERE*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu m'as consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me porte depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes rêves tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie.*

### *A MON CHER PERE*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mes chères sœurs et frère soufiane ,Douaa ,chaimaa pour leur appui et leur encouragement. Aussi a ma binôme jihad pour leur encouragement*

*A toute ma famille ITIM et BOUDOUMI, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*A tous mes collègues et mes amies en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A Tous les enseignants de département "biologie " a toute la promotion Master II  
Microbiologie Appliquée 2020/2021*

***ROUBA***

## Résumé

La présente recherche est basé sur d'étude comparative des résultats des études précédentes sur les caractéristiques des actinomycètes expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes et antifongiques d'origines biologiques. Celles-ci sont souvent recherchées à partir des actinomycètes isolés, Quatre échantillons différents prélevés de différents écosystèmes de monde : Sol de zones semi arides région de La Sebkha de Ain M'lila, Sol de zone aride région de m'sila (Msife), Sédiment de l'eau de mer région les zones de côtière d'égypte et Sol d'écosystèmes forestiers (parc national) région du nord-est de l'inde.

Nous avons comparé les résultats d'isolement, les tests d'identification (morphologiques, moléculaire et physiologique), ainsi les résultats des activités antimicrobienne contre divers microorganismes pathogène, La technique des cylindres d'agar est généralement employée pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien. la souche du Sol d'écosystèmes forestiers (parc national ) montré une activité antimicrobienne importante et aussi la souche Sédiment de l'eau de mer région les zones de côtière d'égypte montré une activité importante (11) contre *Bacillus subtilis*

La méthode utiliser pour l'extraction de leurs antibiotiques, c'est la technique d'extraction liquide-liquide, par des solvants organiques de différentes polarités.

Et purification des biomolécule de différentes références présentes dans les extraits testés, sont analyses et purifier par différentes techniques de caractérisation à savoir les techniques chromatographiques (l'HPLC, CCM), UV visible. D'après les résultats obtenu on a pu constater que la majorité des isolats ont une large variété culturelle sur la gamme des milieux GLM et Amidon Caséine agar.

Nous résume alors que le Sol d'écosystèmes forestiers (parc national) région du nord-est de l'inde le milieu le plus riche en actinomycètes.

**Mots clés :** Actinomycètes, , étude comparative, identification, molécules biologiques , extraction, GLM, SCA antimicrobienne.

## Abstract

The present research is based on a comparative study of the results of previous studies on the characteristics of actinomycetes explain the urgency to have new antimicrobial and antifungal molecules of biological origins. These are often sought from isolated actinomycetes, Four samples different samples taken from different ecosystems of the world: Soil of semi arid zones region of La Sebkha de Ain M'lila, Soil of arid zone region of m'sila (Msife), Sediment of sea water region coastal zones of egypt and soil of forest ecosystems (national park) region of northeast india. We compared the results of isolation, identification tests (morphological, molecular and physiological), as well as the results of antimicrobial activities against various pathogenic microorganisms. The technique of agar cylinders is generally used for the detection of antimicrobial power. Soil strain from forest ecosystems (national park) showed significant antimicrobial activity and also the Sediment strain from seawater region coastal areas of Egypt showed significant activity (11) against *Bacillus subtilis*. The method used for the extraction of their antibiotics is the liquid-liquid extraction technique, with organic solvents of different polarities. And purification of the biomolecules of different references present in the extracts tested, are analyzed and purified by different characterization techniques, namely chromatographic techniques (HPLC, TLC), UV visible. From the results obtained it was found that the majority of the isolates have a wide cultural variety on the range of GLM and Starch Casein agar media. We then summarize that the Soil of forest ecosystems (national park) region of northeastern India is the richest medium in actinomycetes. **Keywords:** Actinomycetes,, comparative study, identification, biological molecules, extraction, GLM, antimicrobial SCA.

**Keywords :** Actinomycetes,, comparative study, identification, biological molecules, extraction, GLM, SCA, antimicrobial.

## ملخص

عتمد البحث الحالي على دراسة مقارنة لنتائج الدراسات السابقة حول خصائص الفطريات الشعاعية التي توضح الحاجة الملحة إلى الحصول على جزيئات جديدة من مضادات الميكروبات والفطريات من أصول بيولوجية ، وغالبًا ما يتم البحث عنها من الفطريات الشعاعية المعزولة ، أربع عينات مختلفة مأخوذة من أنظمة بيئية مختلفة من العالم: تربة المناطق شبه القاحلة بمنطقة لاسبخة عين مليلة ، تربة المنطقة القاحلة من المسيلة (مصيف) ، رواسب منطقة مياه البحر ، المناطق قمنا بمقارنة نتائج .الساحلية في مصر ، وتربة النظم الإيكولوجية للغابات (الحديقة الوطنية) في مصر. شمال شرق الهند العزل واختبارات التحديد (المورفولوجية والجزيئية والفسولوجية) ، وكذلك نتائج الأنشطة المضادة للميكروبات ضد الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض المختلفة تستخدم تقنية أسطوانات الأجار بشكل عام للكشف عن القوة المضادة للميكروبات. أظهرت سلالة التربة من النظم الإيكولوجية للغابات (الحديقة الوطنية) نشاطًا كبيرًا في مجال مضادات *Bacillus* الميكروبات ، كما أظهرت سلالة الرواسب من المناطق الساحلية لمياه البحر في مصر نشاطًا كبيرًا (11) ضد الطريقة المستخدمة لاستخراج المضادات الحيوية الخاصة بهم هي تقنية الاستخلاص السائل السائل ، مع *subtilis* وتنقية الجزيئات الحيوية من المراجع المختلفة الموجودة في المستخلصات .المذيبات العضوية ذات الأقطاب المختلفة ، (TLC ، HPLC) المختبرة ، يتم تحليلها وتنقيتها بواسطة تقنيات توصيف مختلفة ، وهي تقنيات الكروماتوغرافيا الأشعة فوق البنفسجية المرئية. من النتائج التي تم الحصول عليها وجد أن غالبية العزلات لديها تنوع ثقافي واسع في ثم نلخص بعد ذلك أن تربة منطقة النظم الإيكولوجية للغابات *Starch Casein* و *GLM* مجموعة من وسائط أجار (الحديقة الوطنية) في شمال شرق الهند هي أغنى وسط في الفطريات الشعاعية

**الكلمات المفتاحية** لفطريات الشعاعية ، الدراسة المقارنة ، التحديد ، الجزيئات البيولوجية ، الاستخلاص ،

## **Lists d'abréviation**

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ATTC:** American Type Culture Collection

**BLAST:** Basic Local Aligement Search Tool

**BET:** Bromure d'éthydium

**CCM:** Chromatographie sur couche mince

**DAP:** Acide diaminopimélique

**dNTP:** Désoxyribonucléotide triphosphate

**EDTA:** Ethylenediaminetetra acetic acid

**GLU:**Glucose **GN:** Gélose nutritive

**MA:** Mycélium aérien

**MS:** Mycélium du substrat

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**RF:** Rapport frontal

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**ISP:** International Streptomyces Project

**CaCO<sub>3</sub>:** carbonate de calcium

**GC:** guanine cytosine

**M:** molaire

**Na Cl:** chlorure de sodium

**UFC:** unite formant colonies

**ARN:** Acid Ribonucléique

**MK:** Ménaquinones

**Pb:** Paire de base

**MH:** Muller Hilton

**KDa:** Kilo Dalton

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**UV:** Ultraviolet

**V/V:** Volum par Volum

**GYM :** Glucose-yeast extract-malt extract agar

**SCA :** Starch -Casein Agar

**ELL :** Extraction liquide-liquide

**ADNr 16S:** ADN Ribosomique 16S

**E. coli:** Escheria coli

**R\*:** radicaux libre

**L:** litre

**SIDA :** Syndrome d'Immuno déficience acquise

**O<sub>2</sub> :** oxygène

**O<sup>-2</sup> :** Anion peroxyde

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peroxyde hydrogène OH<sup>-</sup> : Radical hydroxyle

**e<sup>-</sup> :** Électron

**ERO :** Espèces réactives d'oxygène

**ROS :** Espèce réactive de l'oxygène

**Bn :** Bennett

**SM :** spectre de mass

**UV-visible :** Ultraviolet-visible

**PH :** potentiel d'hydrogène.

**Aw :** Activity of water.

**Tm:** Température ambiante

**G:** Grossissement

**DO:** Densité Optique

**% :** Pourcentage

**C°:** degré Celsius

**< :** Inférieur

**Mm :** millimètre

**µm :** micromètre

## Tables des Figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 01</b> : la forme des actinomycètes .....   | 04 |
| <b>Figure 02</b> : Diversité des types de surface de spores.....  | 10 |
| <b>Figure 03</b> : colonies d'actinomycètes montrant le mycélium de substrat et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores.....             | 11 |
| <b>Figure 04</b> : morphologies rencontrée au cours de cultures liquides.....   | 11 |
| <b>Figure 05</b> : Caractéristiques culturelles de certaines souches d'actinobactéries.....   | 12 |
| <b>Figure 06</b> : structure générales des ménaquinones.....  | 16 |
| <b>Figure 07</b> : structure générale de l'acide mycoliques .....   | 17 |
| <b>Figure 08</b> : les différentes formes des spores .....  | 23 |
| <b>Figure 09</b> : cycle de développement des actinomycètes.....  | 24 |
| <b>Figure 10</b> : nocardiose pulmonaire b: nocardiose cérébrale, c: nocardiose cutanée.....  | 25 |
| <b>Figure 11</b> : infections par Actinomadura sp. a: mycétome de la cheville par A. pelletieri, b: lyse osseuse du tarse par A.madura.....           | 26 |
| <b>Figure 12</b> : Application biotechnologiques des actinobactéries.....   | 30 |
| <b>Figure 13</b> : Répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses..... | 36 |
| <b>Figure 14</b> : antibiotique produit par les actinomycètes.....  | 37 |
| <b>Figure 15</b> : chronologie de la découverte des différents agents antifongiques.....  | 39 |
| <b>Figure 16</b> : cible d'action des différents classe d'antifongiques sur la cellules eucaryote.....  | 40 |
| <b>Figure 17</b> : la structure chimique d'oligomycine A (21) et 210-A (22).....  | 42 |
| <b>Figure 18</b> : la structure chimique de streptomyces TK-VL_333.....   | 43 |
| <b>Figure 19</b> : Mode d'action de l'alpha-amylase.....  | 45 |
| <b>Figure 20</b> : séchage des échantillons de sol dans un dessiccateur sous vide.....  | 56 |
| <b>Figure 21</b> : Préparation des dilutions de sol.....  | 57 |
| <b>Figure 22</b> : les étapes suivies pour l'isolement des actinomycètes à partir d'échantillons de   |    |

|   |    |
|---|----|
| Sol.....  | 58 |
| <b>Figure 23</b> : observation microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de Gram.....  | 61 |
| <b>Figure 24</b> : présentation schématique de la technique de culture sur lamelle.....   | 61 |
| <b>Figure 25</b> : technique de cylindre d'agar.....  | 64 |
| <b>Figure 26</b> : technique de cylindre d'agar.....  | 64 |
| <b>Figure 27</b> : Réaction de test DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).....   | 64 |
| <b>Figure 28</b> : Protocole expérimentale pour la mesure du piégeage du radical DPPH°.....   | 65 |
| <b>Figure 29</b> : Observation microscopique des trois isolats d'actinobactérie (Gr. x1000) après coloration de Gram.....                                 | 75 |
| <b>Figure 30</b> : activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                 | 76 |
| <b>Figure 31</b> : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre <i>B.subt.</i> .....  | 77 |
| <b>Figure 32</b> : Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des champignons cible <i>Fusarium oxysporum</i> .....   | 78 |
| <b>Figure 32</b> :étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide.....   | 79 |
| <b>Figure 33</b> :Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Toluène - acide acétique..... | 82 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries.....  | 07 |
| <b>Tableau 02</b> : détermination de différentes genres d'actinomycètes basée sur la composition chimique de la paroi.....                              | 15 |
| <b>Tableau 03</b> : G+C% de quelque genre d'actinomycètes.....  | 19 |
| <b>Tableau 04</b> : Habitats de certains actinobactéries.....   | 21 |
| <b>Tableau 05</b> : Habitats de certains actinobactéries.....   | 27 |
| <b>Tableau 06</b> : Certaines maladies causées par des actinomycètes pathogènes.....  | 28 |
| <b>Tableau 07</b> : Métabolites secondaires produits par les actinomycètes.....   | 32 |
| <b>Tableau 08</b> : Enzymes commercialement importantes produites par les actinomycètes, leurs caractéristiques et leurs utilisations potentielles..... | 46 |
| <b>Tableau 09</b> : Exemples de molécules antioxydants produites par des quelques espèces d'actinobactéries.....  | 53 |
| <b>Tableau 10</b> : Isolement d'actinobactéries par différents chercheurs .....   | 72 |
| <b>Tableau 11</b> : Identification des isolats.....   | 75 |
| <b>Tableau 12</b> : Activités antimicrobiennes.....   | 76 |
| <b>Tableau 13</b> : Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction.....   | 80 |
| <b>Tableau 14</b> : Caractérisation et purification des principes actifs.....   | 82 |

# Tables des matieres

|         |  |    |
|---------|--|----|
| I.      | Introduction .....                                       | 1  |
|         | partie I : revue bibliographique                         |    |
| II.     | Les Actinomycètes .....                                  | 3  |
| 1.      | Historique.....  | 3  |
| 2.      | Définition .....   | 4  |
| 3.      | Taxonomie .....  | 5  |
| 3.1     | Mycobacteriacée .....                                    | 6  |
| 3.2     | Actinomycètacées .....                                   | 6  |
| 3.3     | Les streptomycétacées .....                              | 6  |
| 4.      | Les critères d'identification des actinomycètes .....    | 9  |
| 4.1     | Caractères morphologiques .....                          | 9  |
| 4.2     | Caractères culturaux .....                               | 11 |
| 4.3     | Caractères physiologique :.....                          | 12 |
| 4.3.1   | Activité de l'eau ( AW).....                             | 12 |
| 4.3.2   | La température.....                                      | 12 |
| 4.3.3   | pH.....  | 13 |
| 4.3.4   | L'oxygène.....   | 13 |
| 4.3.5   | La matière organique.....                                | 13 |
| 4.3.6   | Tolérance en NaCl.....                                   | 13 |
| 4.4     | Caractères chimio-taxonomiques.....                      | 14 |
| 4.4.1   | La composition de paroi cellulaire : .....               | 14 |
| 4.4.1.1 | Les acides aminés : .....                                | 14 |
| 4.4.1.2 | Composition en sucre : .....                             | 14 |
| 4.4.2   | Compositions membranaire et pariétale en lipides : ..... | 15 |
| 4.4.2.1 | les acides gras : .....                                  | 15 |
| 4.4.2.2 | les ménaquinones : .....                                 | 16 |
| 4.4.2.3 | Les acides mycoliques : .....                            | 16 |
| 4.4.2.4 | Les phospholipides : .....                               | 17 |
| 4.5     | caractères moléculaires .....                            | 17 |
| 4.5.1   | ARN 16S ribosomiques.....                                | 17 |
| 4.5.2   | Hybridation ADN/ADN .....                                | 18 |
| 4.5.3   | composition de en GC % .....                             | 18 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.5.4 | Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction ( LFRFA).....   | 19 |
| 5.    | Ecologie .....  | 19 |
| 6.    | cycle de développement .....  | 22 |
| 7.    | Phytopathogenicité : .....  | 24 |
| 7.1   | Nocardiose .....  | 24 |
| 7.2   | Actinomycétomes .....   | 25 |
| 7.3   | Streptomyces : .....  | 26 |
| 7.4   | corynobactérium .....   | 26 |
| 1.    | L'importance des actinomycètes.....   | 29 |
| 2.    | Métabolisme des Actinomycètes .....   | 30 |
| 2.1   | Métabolisme primaire :.....   | 30 |
| 2.2   | Métabolites secondaire .....  | 31 |
| 3.    | Substances bioactives produites par les actinomycètes .....   | 32 |
| 3.1   | Les antibiotiques .....   | 32 |
| 3.1.1 | Historique .....  | 32 |
| 3.1.2 | Les antibiotiques produits par les actinomycètes .....  | 35 |
| 4.    | Les principales sources d'antibiotiques microbiens sont les groupes de micro-organismes suivants : (a) les actinomycétales, (b) les bactéries et (c) les champignons microscopiques... 35 |    |
| 4.1.1 | Développement de nouvelles classes d'antibiotiques .....  | 36 |
| 4.2   | Les antifongiques :.....  | 37 |
| 4.2.1 | Généralité : .....  | 37 |
| 4.2.2 | Activités antifongiques des actinomycètes : .....   | 40 |
| 4.3   | Production des enzymes .....  | 43 |
| 4.3.1 | Généralités :.....  | 43 |
| 4.3.2 | Les principaux enzymes synthétisées par les actinomycètes .....   | 43 |
| 4.4   | . Les anticancéreux .....   | 47 |
| 4.5   | les antioxydants : .....  | 48 |
| 4.5.1 | Les radicaux libres : .....   | 49 |
| 4.5.2 | Le stress oxydatives : .....  | 50 |
| 4.5.3 | L'activité antioxydants des actinomycètes :.....  | 51 |
| 4.6   | Les vitamines .....   | 54 |
| 4.7   | Antivirale .....  | 54 |

## partie II : materiels et méthodes

|  |    |
|--|----|
| Objectif .....   | 54 |
| 1. Prélèvement des échantillons .....                                | 55 |
| 1.1 Sol : .....  | 55 |
| 1.2 Eau : .....  | 55 |
| 2. Traitement des échantillons .....                                 | 55 |
| 2.1 Séchage .....  | 55 |
| 3. Dénombrement et isolement des colonies d'Actinomycètes .....      | 56 |
| 3.1 Isolement : .....  | 56 |
| 3.1.1 Milieux de cultures pour l'isolement des actinomycètes : ..... | 56 |
| 3.1.2 Préparations des dilutions décimales .....                     | 56 |
| 3.1.3 Ensemencement et incubation .....                              | 57 |
| 3.1.3.1 Ensemencement en masse .....                                 | 58 |
| 3.1.3.2 Ensemencement en surface .....                               | 58 |
| 3.2 Dénombrements : .....  | 59 |
| 4. purification et Conservation des souches d'actinomycètes .....    | 59 |
| 5. Identification des actinomycètes : .....                          | 59 |
| 5.1 Caractérisations macroscopiques : .....                          | 59 |
| 5.2 Caractérisations microscopiques .....                            | 60 |
| 5.3 Culture sur lamelle (Cross 1989) .....                           | 61 |
| 6. La mise en évidence des activités : .....                         | 62 |
| 6.1 Recherche de l'Activité antifongiques -: .....                   | 62 |
| 6.1.1 Préparation des suspensions fongiques : .....                  | 62 |
| 6.1.2 Technique en double couche .....                               | 62 |
| 6.1.3 Technique des cylindres d'agar .....                           | 62 |
| 6.2 Recherche de l'activité antibactérienne .....                    | 63 |
| 6.2.1 Technique des cylindres d'agar : .....                         | 63 |
| 6.3 Recherche de l'activité antioxydante .....                       | 64 |
| 6.3.1 Le piégeage du radical du DPPH .....                           | 64 |
| 6.3.2 Etude du pouvoir réducteur .....                               | 65 |
| 6.3.3 Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) : .....          | 66 |
| 7. Extraction des métabolites .....                                  | 66 |
| 7.1 Méthode d'extraction liquide-liquide .....                       | 66 |
| 8. purification et caractérisation des souches .....                 | 67 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 8.1   | Mode opératoire de la CCM : .....                                       | 67 |
| 8.2   | Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....                 | 67 |
| 8.3   | Spectre UV-visible.....   | 68 |
| 8.4   | Etude moléculaire : .....   | 69 |
| 8.4.1   | Extraction de l'ADN : .....   | 69 |
| 8.4.2   | Electrophorèse sur gel d'agarose .....                                  | 69 |
| 8.4.3   | Séquencage .....  | 69 |
| <b>partie III : résultats et interprétation</b> |   |    |
| 9.  | Résultats et interprétation.....  | 71 |
| 1.  | Isolement.....  | 71 |
| 2.  | Identification des isolats.....   | 73 |
| 3.  | Activité antimicrobienne.....   | 76 |
| 4.  | Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction..... | 79 |
| 5.  | Caractérisation et purification des principes actifs .....              | 81 |
| 6.  | Les actinomycètes isolées de différents biotopes de l'Algérie .....     | 83 |
|   | conclusion.....   | 83 |
|   | Référence.....  | 85 |



# Introduction

## I. Introduction

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux). Les sols sont des habitats d'une grande diversité de microorganismes. Ils sont importants pour les fonctions qui entretiennent des écosystèmes **(De Gannes et al., 2015)**. Une gamme de micro-organismes peut établir des interactions entre les plantes soit bénéfiques ou nuisibles à la plante. Parmi ces microorganismes, on trouve les actinomycètes qui sont des bactéries à Gram positif et filamenteux qui se trouvent librement ou saprophyte dans différents habitats comme le sol, l'eau chaude, les sédiments marins etc. Les actinomycètes sont universellement répandus. Ils constituent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique **(Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976)**.

La taxonomie des actinomycètes est extrêmement complexe, la classification avec les méthodes traditionnelles, qui sont basées sur les caractères morphologiques et physiologiques a conduit à beaucoup de groupes hétérogènes. Récemment trois principales approches sont suggérées pour l'identification des espèces d'actinomycètes: la chimiotaxonomie, la différenciation phénotypique et l'étude moléculaire, la combinaison entre ces trois techniques donne des résultats plus complets **(Silva et al., 2013)**

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines: dans le domaine industriel, dans le domaine médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro-alimentaire, etc. **(George et al., 2012; Solecka et al., 2012)**.

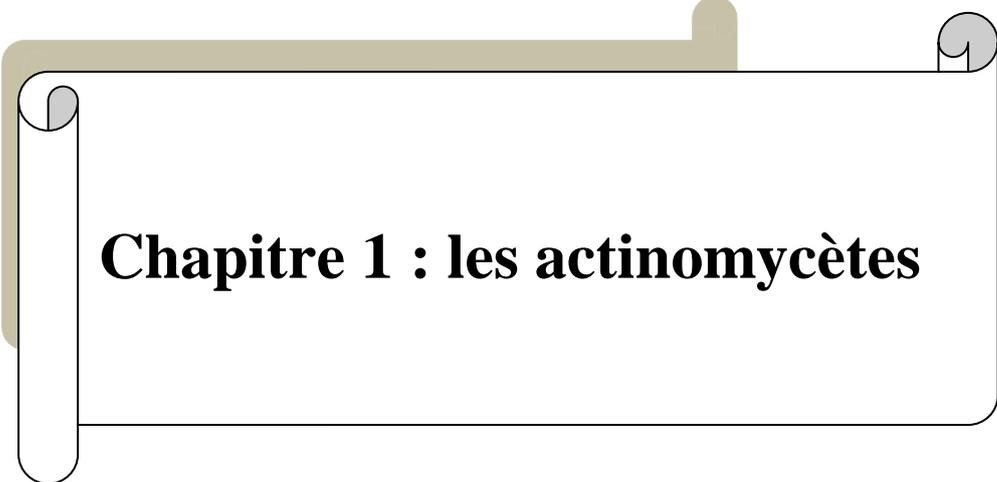
Les actinomycètes ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie **(Smaoui, 2010)**. Ces microorganismes sont parmi les principales sources de molécules bioactives, particulièrement ceux appartenant aux groupes d'Actinomycètes **(Finance et al., 1985)**. Les Streptomyces sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, les métabolites secondaires produits par les Actinomycètes représentent une large source de composés de diversité structurale très vaste tels que les vitamines, les hormones de croissance des plantes, les enzymes et les inhibiteurs d'enzymes **(Tanaka et al., 1993)**. De plus, environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture sont produits par ce genre de microorganismes **(Sujatha et al., 2005; Smaoui, 2010)**

A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients, associés à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses comme le genre *Mycobacterium*, agent infectieux, responsable du plus grand nombre de décès dues aux maladies infectieuses (Gao et Gupta, 2012; Kumar et al., 2012) ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques.

L'objectif principal de notre étude consiste en une synthèse bibliographique sur la production des métabolites bioactifs par des actinomycètes isolés de différents biotopes naturels de l'Algérie.

L'étude a portée sur les étapes suivantes :

- La première partie c'est La mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de notre travail qui présente les connaissances sur les actinomycètes en générales.
- La deuxième partie est relative à la production des substances bioactif par des actinomycètes.
- La troisième partie c'est la description des techniques expérimentales d'études des actinomycètes et la synthèse des différents travaux (les articles) regroupent l'étude des actinomycètes isolées à partir de différentes biotopes au monde.



# **Chapitre 1 : les actinomycètes**

## II. Les Actinomycètes

### 1. Historique

En 1827, le nom *Actinomyces* a été accepté comme un nom d'un genre bactérien pour deux raisons, premièrement parce que le nom est orthographié différemment, et deuxièmement le nom *Actinomyces* n'a été utilisé que par son auteur Meyen.

Selon Waksman, l'histoire des actinomycètes peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui va de 1875 à 1900, a été nommée " période médicale" du fait que l'intérêt de la découverte de leur rôle de la pathologie (**Baldacci, 1962**). En 1875, Cohn découvre le plus ancien genre d'actinomycètes aérobie, a été appelé *Streptothrix*. En 1877, Harz isole l'agent responsable des actinomycoses de bœuf, a été appelé *Actinomyces bovis* (l'agent causal d'une tumeur de la joue des bovins), a été décrite comme étant une moisissure. En 1888, le vétérinaire Edmond Nocard isole le premier microorganisme classé dans le genre *Nocardia*. En 1898, la découverte du premier actinomycète thermophile, en 1894, Vincent a isolé et décrit l'agent causatif de la maladie du pied à Madura appelé *Actinomadura* qui a été observé en Algérie.

"Seconde période" qui va de 1900 à 1940 se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol (**Mariat et Sebald, 1990**) en 1909, Orla Yensen créa la famille des Actinomycetaceae qui comprend un seul genre *Actinomyces*, en 1917, Buchanan propose l'ordre des Actinomycetales. Avant les années 1940 les actinomycètes étaient intéressants en raison de leur couleur et odeur distinctives lorsqu'ils étaient cultivés sur des milieux de laboratoires.

"Troisième période" Elle commence en 1940, Waksman découvre des antibiotiques produits par les actinomycètes. Lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1943, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Waksman et Woodruff, 1940**)

Le genre *Streptomyces* est proposé comme combinaison des deux noms qui pour la première fois ont été attribués aux actinomycètes: *Streptothrix* et *Actinomyces*.

"Quatrième période" peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes. En 1958, il a été

suggéré un système de classification des *streptomyces* basé sur la morphologie des chaînes de spores et la couleur du mycélium aérien (Etting, 1958) .

" Cinquième période " depuis les années 1960, la mise au point des techniques chimiotaxonomiques, et l'essor des méthodes de génétique puis génomique. Et 1980, on peut noter les travaux de professeur SabouNasser Eddine en Algérie.

## 2. Définition

Les véritables Actinomycètes, également connus sous le nom d'actinobactéria. Le mot Actinomycètes a été dérivé des mots grec «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants». Expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fungi*) et aussi en allemand et en russe(Lamari, 2006). Les actinomycètes sont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons, un ensemble des caractères qui rapprochent les Actinomycètes a des champignons principalement la structure de leur mycélium présentent des ramifications, malgré ces analogies entre les Actinomycètes et les champignons mais il ya des différences fondamentales confirmer leur classification parmi les procaryotes( bactéries) sont : le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (0.5 à 1.2 $\mu$ m), ainsi la sensibilité aux attaques des actinophages à des antibiotiques, antibactériens et aux lysozymes,et aussi Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries.

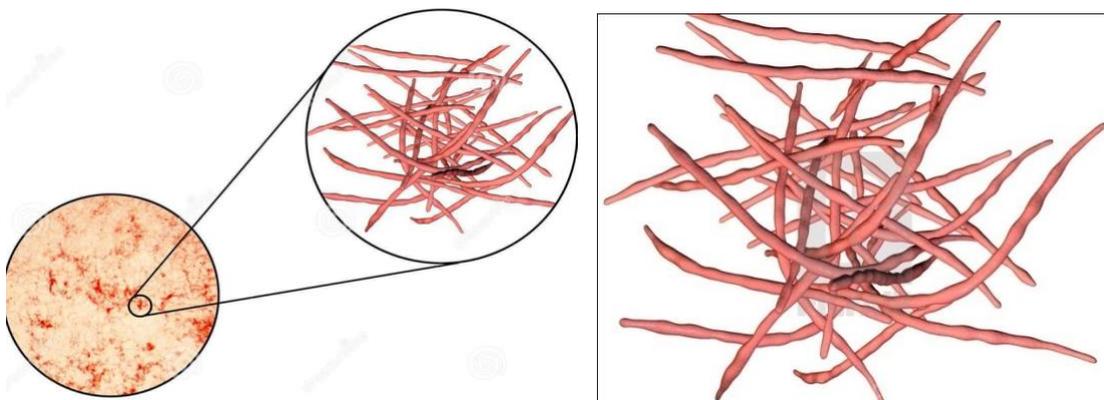


Figure 01 : la forme des actinomycètes ( kateryna, 2018)

Les Actinomycètes sont des microorganismes à coloration de Gram positive, à structure végétatif de type mycélium (Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997), contenant Une proportion de cytosine et guanine (coefficient de ChargaffG+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 %, (Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997).

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, utilisant des molécule organique préfabriquées mais plusieurs espèces sont capable aussi de croissance chimio-organotrophe utilisant un grand variété de source d'énergie y compris des polymères complexe, il ya aussi de croissance chimio-autotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone, Certaines ont des exigences nutritionnelles tels que les vitamines et certains acides aminés.ils peuvent vivre dans les écosystèmes riches en matière inorganique. Certain genre sont mobile ( produisent des spores flagellées) permettant leur désertion dans les habitat aquatique. La plupart des Actinomycètes sont des aérobies dont quelque unes sontaffeteux avec peu d'oxygène (micro-aérophile).

### 3. Taxonomie

La taxonomie est l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle recouvre trois domaines différents : la classification, la nomenclature et l'identification. La toxonomie des actinomycètes évoluée au cours des 20à 30 derniers années. En 1989 Les différentes éditions du Manuel de Bergey ont apporté des définitions actualisées des actinobactéries avec des données fournies par des travaux récents par rapport à l'époque de chaque édition.

Dans le **Bergey'sManual** de 2012, Ces microorganismes sont classés actuellement dans le règne des Procaryote,le Domaine des Bacteriaou Eubacteria, le phylum des Actinobacteria et la classe des Actinomycètes etla Sous-Classe des Actinobacteridae(**Euzéby, 2015**).L'ordre des Actinomycetales a été subdivisé en plusieurs ordres (Actinomycetales, Streptomycetales, Streptosporangiales, Micromonosporales, Micrococcales, etc).Les Actinobacteria sont classées, depuis 2012, en 5 classes etdans 15 ordres, 43 familles et 203 genres,dont les plus répondussont présentés dans **le Tableau 1**

### 3.1 Mycobacteriacée

Cette famille est représentée par le genre *mycobactérium*, caractérisé par une propriété tinctoriale essentielle : ce sont des bacilles acido-alcool résistants (BAAR). Toutes les mycobactéries sont des BAAR. (Carbonelle et al, 2003).

La synthèse des acides mycolique : Ces acides gras insaturé sa longue chaîne carbonée (C60à C90) sont le support de l'acido-alcool-résistance et constituent un critère taxonomique de choix car leur structure varie selon les espèces, le pourcentage en G+C varie de 62 à 70 à l'exception de *Mycobacterium leprae* dont le GC% est compris entre 54 et 57%. (Freneyj, 1994).

### 3.2 Actinomycètacées

Cette famille est représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces*. Le genre *Nocardia* comprend de nombreuses espèces très répandues dans le sol. Les colonies, difficiles à distinguer des colonies bactériennes (Alexander, 1977).

### 3.3 Les streptomycètacées

Cette famille est représentée par les genres *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente souvent 70 à 90 % des actinomycètes. Le genre *Micromonospora* est caractérisé par un développement faible ou nul du mycélium aérien; les conidies, isolées ou en grappes, sont portées directement par le mycélium végétatif, il se distingue des *Nocardia* par leur mycélium végétatif persistant quel que soit le stade de développement et une reproduction par des conidies en chaîne.

**Tableau1. Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries(Goodfellow et *al.*, 2012).**

| Classes        | Ordres             | Familles  |
|----------------|--------------------|---|
| Actinobacteria | Actinomycetales    | Actinomycetaceae  |
|                | Actinopolysporales | Actinopolysporaceae   |
|                | Bifidobacteriales  | Bifidobacteriaceae  |
|                | Catenulisporales   | Catenulisporaceae, Actinospicaceae  |
|                | Corynebacteriales  | Corynebacteriaceae, Dietziaceae,<br>Mycobacteriaceae, Nocardiaceae,<br>Segniliparaceae, Tsukamerullaceae  |
|                | Frankiales         | Frankiaceae, Acidothermaceae,<br>Cryptosporangiaceae,<br>Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae   |
|                |                    | Glycomycetaceae   |
|                | Glycomycetales     | Micrococcaceae, Beutenbergiaceae,<br>Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae,<br>Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae,<br>Dermacoccaceae,<br>Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae,<br>Jonesiaceae, Micobacteriaceae,<br>Promicomonosporaceae,<br>Rarobacteriaceae, Ruaniaceae |
|                | Micrococcales      | Micromonosporaceae  |
|                |                    | Streptomycetaceae   |

|                |                     |   |
|----------------|---------------------|---|
|                | Micromonosporales   | Streptosporangiaceae,<br>Nocardiopcaceae, Thermomonosporaceae |
|                | Streptomycetales    |   |
|                | Streptosporangiales | Actinomicrobiaceae<br>Rubrobacteraceae                        |
| Acidimicrobiia | Acidimicrobiales    |   |
| Rubrobacteria  | Rubrobacterales     |   |

## 4. Les critères d'identification des actinomycètes

La systématique bactérienne a subi plusieurs modifications durant les trois dernières décennies dues à l'application de nouvelles techniques biochimiques, chimiques, génétiques, morphologiques et moléculaires (Abbas, 2006), cette classification des espèces et des genres reste un sujet difficile et controversé car différents critères sont utilisés au début, la première période (la période classique) qui s'est étendue jusqu'au début des années 1960, seuls les critères morphologiques qui sont disponibles dans une large gamme qui peuvent être utilisés pour la classification fine.

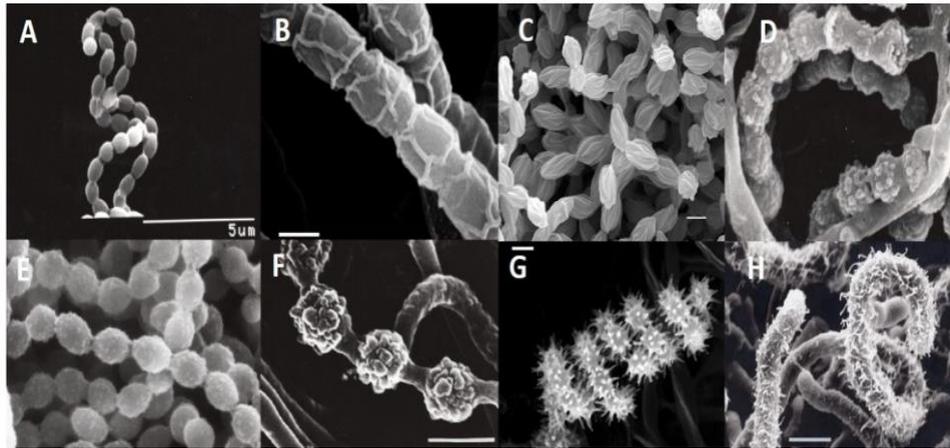
### 4.1 Caractères morphologiques

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des champignons (Prescott et al., 1995). Le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 µm (Eunice, 1983), les actinomycètes sont caractérisés par une grande diversité morphologique qui varie du simple bacille, et aussi des bâtonnets comme *Rhodococcus* et les *Mycobacterium* (Avril & al, 1992) et cocci comme les *Micrococcus*. On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire, d'autres au mycélium fugace, qui se fragmentent en éléments coccoides et en formes de bâtonnets cellulaires chez les *Nocardia* (Wink et al., 2017), et d'autres espèces au mycélium développé.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses minces et ramifiées, septées dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. (Rastogi et Kishore., 1997)

Le mycélium peut être stable (permanent) ou fragmentaire, le mycélium stable peut être organisé en mycélium végétatif ou en mycélium aérien. Trois cas sont envisageables selon Djaballah (2010) :

- Soit il y a formation du mycélium végétatif seulement (mycélium de substrat). La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique, donc dépourvu de septum.
- Soit il y a formation du mycélium végétatif et aérien mûri en conidies. Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.
- Soit il y a formation du mycélium aérien seulement, comme le genre *Sporichthya*.



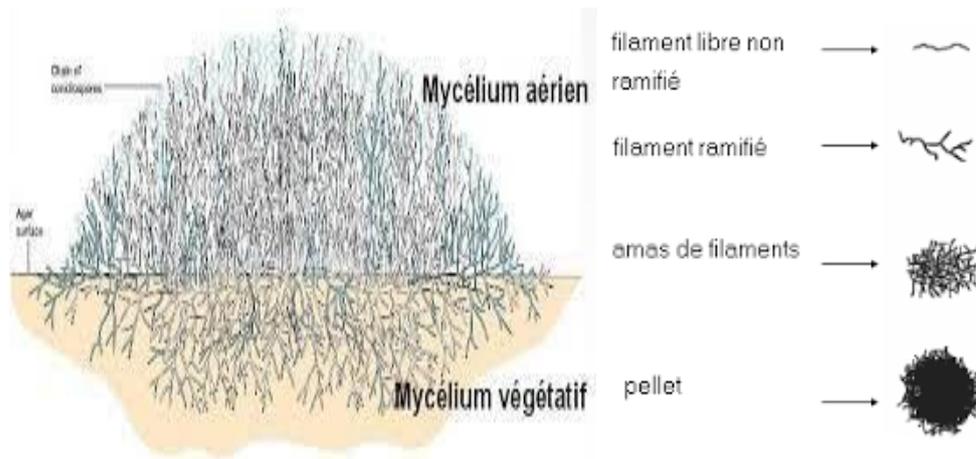
**Figure 02 : Diversité des types de surface de spores(Kageyama et al., 2004 )**

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Il peut y avoir aussi une production de spores par les filaments. Les spores produites sont soit isolées soit groupées ou même enfermées dans un sporange ou conidie qui libère des spores de formes variées, d'aspect lisse ou ridé, soit isolées ou groupées en chaîne.

Les colonies des actinomycètes formées sur milieu solide sont très particulières. Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés. L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisse ou échancrés. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm. Les colonies sont souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc... (Perry et al., 2004)

En milieu liquide (sans agitation) les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Keulen et al., 2003), en milieu liquide (avec agitation), il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores.

Il existe d'autres structures morphologiques: les sclérotes et les synnemas (corémies) qui sont présentes, respectivement, chez les *Chainia* et les *Actinosynnema*.

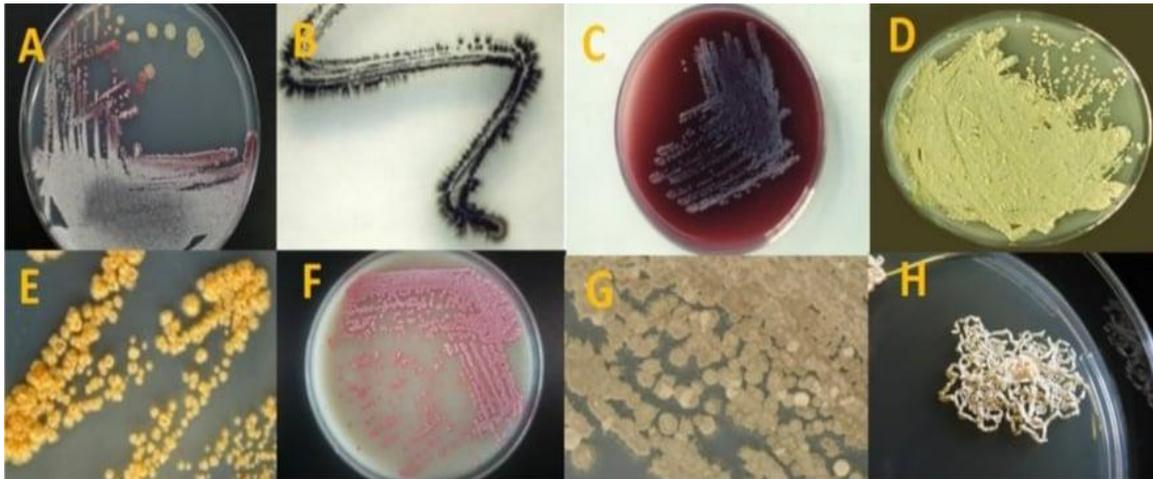


**Figure 03 : colonie d'actinomycètes montrant mycélium de substrat et le mycélium aérien au cours de cultures liquides avec des chaînes de conidiospores (Almaris, 2007) (Dvorak, 1999)**

## 4.2 Caractères cultureux

Les caractéristiques culturelles des actinobactéries font référence aux caractéristiques de croissance et à la morphologie de divers types de milieux de culture. Elle est généralement déterminée après une incubation de 14 jours à 28 ° C strictement selon les méthodes utilisées dans l'International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling et al., 1966). Les couleurs du substrat et des mycéliums aériens et des pigments solubles produits ont été déterminées par comparaison avec les puces des nuanciers ISCC-NBS (Kelly, 1964). La taxonomie classique attache une grande importance au rôle des caractéristiques de culture dans l'identification de la classification, générale avec les spores, les hyphes aériens, avec ou sans couleur et pigment soluble, conditions de croissance différentes sur différents supports comme principales caractéristiques (Figure 05). Les couleurs du mycélium aérien sporulant mature sont enregistrées de manière simple (blanc, gris, rouge, vert, bleu et violet). Les milieux utilisés sont la gélose à l'extrait de levure-extrait de malt et la gélose à l'amidon de sel inorganique.

Les groupements sont faits sur la production de pigments mélanoïdes (c'est-à-dire, brun verdâtre, noir brunâtre ou brun distinct, pigment modifié par d'autres couleurs) sur le support. Les souches sont regroupées en pigment mélanoïde produit (+) et non produit (-). Dans quelques cas, les productions de pigments mélanoïdes sont retardées ou faibles, et par conséquent, elles ne se distinguent pas. Ceci est indiqué comme variable. Ce test a été réalisé sur les milieux ISP-1 et ISP-7, comme recommandé par International *Streptomyces* Project.



**Figure 05 : Caractéristiques culturelles de certaines souches d'actinobactéries( Digital Atlas of Actinomycetes)**

### 4.3 Caractères physiologique :

Il a été suggéré que les facteurs importants contrôlant l'abondance des actinomycètes dans le sol sont la nature et l'abondance de la matière organique, la teneur relative en humidité, la température et l'oxygène

#### 4.3.1 Activité de l'eau ( AW)

Les spores d'actinomycètes peuvent germer à  $aw(0,50)$ , tandis que  $aw(0,98)$  est l'humidité optimale pour le développement de tous les actinomycètes. Ce n'est qu'à un  $aw(0,98)$  que tous les actinomycètes ont terminé leur cycle de développement (était la plus favorable pour la germination des spores et le développement du mycélium dans toutes les cultures d'actinomycètes étudiées. la capacité des spores d'actinomycètes à germer à faible humidité a favorisé leur appartenance aux premiers organismes émergeant sur terre et impliqués dans la formation primaire du sol(Zvyagintsev & al, 2005).

#### 4.3.2 La température

Les Actinomycètes sont des microorganismes mésophiles, La température optimale de croissance est entre 25 à 30 C°, La plupart des actinomycètes thermophiles se développent bien à 50 ° C et sur une plage de températures de 25 a 55 ° C.

Et il existe certain genre thermotolérants tels que *Microbispora*, *Micropolyspora* et *Pseudonocadia*, ce sont des souches plus thermotolérantes que thermophiles (Leveau et Bouix, 1993 ; Djaballah ,2010).

### 4.3.3 pH

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles, croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin, les actinomycètes acidophiles aux propriétés de type streptomycète sont courants dans les habitats terrestres à faible pH, notamment dans les sols forestiers **acides (Williams et al., 1971; Goodfellow & Dawson, 1978; Seong et al., 1993)**. Les souches acidophiles se développent à des valeurs de pH comprises entre environ 3,5 et 6,5, avec un pH optimal d'environ 4,5 (**Kahn et Williams 1975; Hagedorn 1976**) sont largement répandus dans les sols acides. En général, les actinomycètes se trouvent dans les sols à faible teneur en humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas fortement influencés par des conditions semi-sèches.

### 4.3.4 L'oxygène

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies telles que les *Streptomyces* il y'a aussi certains genres fermentatives anaérobies qui sont des commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme telles que les *Actinomyces* (**Avril et al. , 1992**)

### 4.3.5 La matière organique

Il a souvent été démontré que les actinomycètes poussent largement dans les sols riches en matière organique. le nombre d'actinomycètes dans le sol est positivement corrélé avec le niveau de matière organique. De grandes populations d'actinomycètes coïncidaient avec des niveaux relativement élevés de matière organique, quel que soit le degré de salinité du sol. (**Zahran et al. 1992**)

### 4.3.6 Tolérance en NaCl

Les Actinomycètes peuvent vivre dans des environnements à salinité déférente et qui peuvent être divisées en quatre groupes selon leurs exigences en NaCl : Ces microorganismes peuvent être halophiles ; qui ont besoin de sel (NaCl) pour leur croissance, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les Actinomycètes halophiles extrêmes, ou sont des halotolérants ; elle tolèrent des concentrations de NaCl mais non obligatoires pour leur croissance, et présentent aussi quelques espèces légèrement tolérantes (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) ; et dernièrement les extrêmement tolérants (se développent de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (**Messaoudi , 2011 ; Merizig et Naami, 2015**)

## 4.4 Caractères chimio-taxonomiques

Qui a débuté en partir des années 60 a vu le développement de la chimiotaxonomie est basé sur l'analyse des constituants cellulaires de la paroi et les constituants pariétaux, elle est combinée aux critères morphologiques fut d'un apport essentiel dans la différenciation de nouveaux genres

### 4.4.1 La composition de paroi cellulaire :

La composition de la paroi cellulaire montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (forme fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (forme oxydative), cette rigidité empêche l'éclatement de la cellule en raison de la pression osmotique élevée, Elle est variée largement entre diverses collections des actinomycètes.

#### 4.4.1.1 Les acides aminés :

La muréine ou peptidoglycane est un composant majeur de la paroi des bactéries à gram positive, deux acides aminés sont taxonomiquement très importants pour les actinomycètes mycéliennes, l'alternance des acides aminés de la forme L et D dans la séquence tétrapeptidique du peptidoglycane renforce la paroi, l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut-être sous deux formes LL ou DL(méso) selon les genres et la glycine qui peut-être présente ou absente, cette dernière forme des liaisons « ponts » entre les sous unités peptidiques de la muréine

Chez certaines actinomycètes non mycéliennes, le DAP est remplacé par la lysine ou bien par l'ornithine ou encore par l'acide diamino-butérique (Becker et al., 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970), selon la composition en acides aminés

#### 4.4.1.2 Composition en sucre :

Ce sont des marqueurs taxonomiques utiles. Sur la base de la distribution discontinue des principaux sucres diagnostiques, les glucides de la paroi ou de l'hydrolysate cellulaire permettent une séparation en 04 groupes majeurs, sont principalement les couples :

- Le spectre de sucre A (arabinose-galactose) est caractéristique de la grande majorité des nocardioformes (*nocardia*, saccharopolyspores).
- Le spectre glucidique B (madurose 3-o-méthyl-D galactose) est présent chez les maduramycètes *actinomadura*, *streptosporangium*). Les *streptomyces* est apparenté ne

synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique, il en est de même chez les thermomonospore et les thermoactinomyces.

- Le spectre D (xylose-arabinose) est caractéristique du type principale des actinoplantes et caractéristique du type d'acide aminé du glucide permet un classement en groupes principales des actinoplantes (actinoplant, *micromonospora*)

En dehors de ces sucres, d'autres considérés comme non caractéristiques peuvent-être retrouvés=type C, ce sont en générale le ribose, le mannose et le galactose quand il n'est pas couplé à l'arabinose, la combinaison du type d'acide aminé du péptidoglycane et du spectre du glucide permet un classement en groupes principaux.

**Tableau 02 : détermination de différentes genres d'actinomycètes basée sur la composition chimique de la paroi ( Lechevalier et Lechvalier, 1980)**

| Type de paroi | Constituants majeurs              | Genres               |
|---------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1             | LL- D.A.P et glycine              | <i>Streptomyces</i>  |
| 2             | Méso-D.A.P                        | <i>Actinomadura</i>  |
| 3             | Méso-D.A.P arabinose et galactose | <i>Nocardia</i>      |
| 4             | Lysine et ornithine               | <i>Actinimycetes</i> |

#### **4.4.2 Compositions membranaire et pariétale en lipides :**

Chez certains genres d'actinobactéries, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. Les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis en trois groupes: les lipides contenant une partie polaire (phospholipides), les ménaquinones, les acides gras et parfois les acides mycoliques (**Lechevalier et Lechevalier, 1980; Collin et al., 1977**).

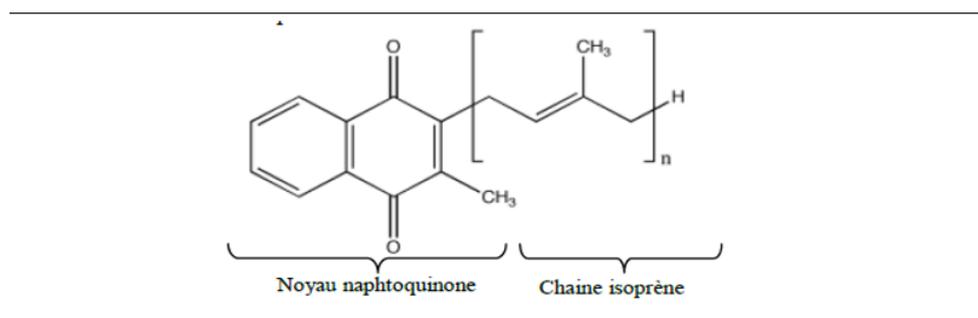
##### **4.4.2.1 les acides gras :**

Qui constituent la paroi des actinomycètes sont des chaînes qui peuvent-être droites ou ramifiée des molécules saturées ou insaturées avec la présence éventuelle de groupes, cyclopropane les plus communs chez les actinomycètes appartiennent soit un groupe de molécules comportant de

12-20 atomes de carbone est caractéristique du genre *nocardia* , La composition des membranes cellulaires en acides gras permet également de distinguer entre certains genres (**Minnikin et al., 1980 et 1984**). Elle est utilisée en combinaison avec d'autres

#### 4.4.2.2 les ménaquinones :

Sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthyle et d'une chaîne aliphatique contenant des unités isoprènes, Elle sont classées en fonction du nombre d'unités et du nombre de double liaisons ( degré d'hydrogénation), la variation dans la longueur et le degré de saturation de la chaîne latérale des ménaquinones leur a donné une importance dans la chimiotaxonomié, dans le groupe des genres dont les paroi contiennent du LL-DAP , le genre *nocardiodes* caractérise par du MK-8(H<sub>4</sub>) alors que *streptomyces* sunéthétise principalement du MK-9(H<sub>6</sub>), le genre thermoactinomyces est caractérisé par la présence du MK-7.



**Figure 06 : structure générales des ménaquinones**

#### 4.4.2.3 Les acides mycoliques :

Les acides mycoliques sont des lipides pariétaux complexes et insaturés contenant 20 à 90 atomes de carbone. Ils sont importants uniquement pour différencier certaines actinobactéries ayant le chimiotype IVA (**Mordarska et al., 1972**), comme par exemple le genre *Nocardia* (46-64 atomes de carbone) et *Williamsia* (50-56 atomes de carbone) (**Goodfellow et al., 2012**). Leur structure générale est la suivante:



## Figure 07 : structure générale de l'acide mycoliques

### 4.4.2.4 Les phospholipides :

Sont distribués de façon discontinue dans les membranes cytoplasmiques des actinomycètes, fournissant des informations utiles pour la classification et l'identification des genres d'actinomycètes, sont des lipides polaires et leur analyse a permis à de distinguer cinq profil phospholipides

## 4.5 Caractères moléculaires

La troisième période, qui a débuté dans les années 70 avec une apogée entre 1980-1990, basée sur la taxinomie numérique combine l'outil informatique et des test physiologiques, leur principe consiste à traiter par des logiciels les pourcentages des similitude des caractères entre les espèces dont la position taxonomique a ainsi été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (**Athalye et al.,1985 ;Baldacii,1962**)

Pour la caractérisation des bactéries, différentes méthodes de biologie moléculaire ont été développées et utilisées. L'application de ces techniques moléculaires pour l'analyse du génome bactérien a une contribution considérable pour élargir les connaissances sur la taxonomie bactérienne, Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citons 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%).

### 4.5.1 ARN 16S ribosomiques

Il s'agit du séquençage de gène codant pour l'ARN ribosomique de la sous unité 16S (désigné par le terme "ADNr 16S"). L'intérêt pour ce gène chromosomique, d'environ 1500 paires de base, présent chez toutes les bactéries. est séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique16S (d'une taille de l'ordre de 1500 paires de bases) commence par l'extraction de l'ADNgénomique puis une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de ce gèeen utilisant des amorces spécifiques. Par la suite, le produit de la PCR est utilisé pour séquencer la partie propre au gène codant pour l'ARNr 16S. Les séquences obtenues après amplification sont soumisesà des études de comparaison (ou encore phylogénie) entre ellesou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques, telle par exemple, la GenBank. . Cette analyse de l'ADNr 16S a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe).( **Kitouni M, 2007** )

Ainsi, le séquençage de l'ADNr 16S constitue un outil trèsrapide 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*. Le recours à l'hybridation ADN-ADN, ou bienle séquençage de génome totals'avère donc nécessaire pour statuer définitivement sur des cas pareils

Cependant, récemment, une proposition a été faite pour éleverce seuil d'abord à 98,2% par Meier-Kolthoff et al. (2013), puis,par la suite, à 98,65% par Kim et al. Ces derniers auteurs ont pu montrer, suite à une analyse statistique très fine, que les séquences qui partagent moins de 98,65% de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S correspondent à des espèces différentes. En effet, la corrélationdes pourcentages d'homologie entre les séquences de ce gène et les pourcentages de réassociation ADN-ADNa montré que les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S ayant des similaritésinférieures à 98,65% ne correspondaient pas à des pourcentages de réassociation ADN-ADNégauxou supérieurs à 70%. Si le pourcentage d'homologie est supérieur à 98,65%, leplacement ou pas de deux souches dans une même espèce dépend des résultatsde l'hybridation ADN-ADN.

#### 4.5.2 Hybridation ADN/ADN

Les hybridations ADN/ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. En utilisant les ADN des souches de référence, le taux de réassociation ADN-ADN permet de déterminer si la souche analysée représente une nouvelle espèce ou non.Les souches appartenant à la même espèce aurontplus de 70% d'homologie ADN-ADN (**Wayne et al., 1987; Stackebrandt et Goebel,1994**).Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le fait que deux renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes.**(Marmun et Doty , 1962)**

Cette technique présente plusieurs avantages :

Elle est applicable à toutes les espèces cultivables.

Les résultats ne sont pas ou peu affectés par les mutations ou par la présence de plasmides, Elle porte sur l'ensemble du génome.

#### 4.5.3 Composition de en GC %

En 1949, Chargaff et al. ont montré que le contenu en bases puriques et bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce, le contenu en base d'un ADN est exprimé par le G+C%

Chez les bactéries cette valeur est dispersée et varie de 25-75%.actuellement, on admet que des microorganismes dont les G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce et que des microorganismes dont le G+C% diffèrent plus de 10% ne peuvent appartenir au même genre des valeurs identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent-être distribuées de manière très différent sur l'ADN( **Kirk et al ., 2004**)

**Tableaux 03 : G+C% de quelque genre d'actinomycètes( Larpent et Sanglier, 1989)**

| Genre                | G+C % |
|----------------------|-------|
| <i>Actinomadura</i>  | 64-69 |
| <i>Nocardia</i>      | 64-72 |
| <i>Streptomyces</i>  | 67-78 |
| <i>Mycobactéries</i> | 64-70 |

#### **4.5.4 Digestion de l'ADN par les 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**).

## **5. Ecologie**

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires. saprophytes dont l'habitat naturel est le sol.Ces microorganismes sont particulièrement abondants dans les sols légèrement alcalins riches en matière organique.(**Lacy, j., 1973**).

Bien que la disponibilité des éléments nutritifs soit un facteur majeur contrôlant l'activité de l'*actinomyce* du sol, divers autres facteurs environnementaux exercent également une influence., le pH est clairement un facteur majeur déterminant leur distribution et leur activité, La grande majorité des actinomycètes sont cultivées sur des milieux avec une réaction autour de la neutralité,, (**Waksman, S. A. 1959**) mais des isolats acidophiles et acidoduriques, la plupart des actinomycètes se comportent comme des mésophiles en laboratoire.( **orchad, v ., 1981**).la grande capacité d'adaptation des actinomycètes aux différentes condition environnementales ainsi que leur grande variabilité métabolique leur permet d'être répandue dans tous les écosystèmes.

Le sol est le réservoir principal,les actinomycètes constituent 15-60% de parfois même jusqu'à 85% de microflore totale. Ils sont présents dans la rhizosphère c'est-à-dire (dans la couche comprise entre la surface du sol (les horizons) et jusqu'à 2m de profondeur)le nombre des actinomycètes diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente exemple : des *streptomyces* en tant que composante majeure de leur population( **Sabaou et al ., 1998**)

Elle sont présentes dans les sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs hautement contaminés avec les métaux lourds.

Des actinomycètes sont isolés des composts, il s'agit de genres actinomycètes thermophiles d'une importance écologique considérable, tels que Les espèces *Thermoactinomyces* et *Saccharomonospora* sont des thermophiles obligatoires(**Lacey, 1973; Lacey, 1978 ;Lacey, 1981**)

Les actinomycètes sont largement répandus dans les habitats aquatiques, mais cela ne prouve pas qu'ils font partie de la microflore indigène, car la possibilité de s'infiltrer dans les habitats terrestres environnants doit toujours être prise en compte, Ils peuvent être isolés à partir des eaux de mer, des sédiments marins, (**Cross, T., Attwell, R. W. 1974**)les eaux douces (sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où il jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux tels que *micromonospora*), et les marines (situées à plus de 400m de profondeur tel que les actinobactéries du genre *Nocardioformes* isolées à plus de 2000m de profondeur se développe sous les pression,hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°c )( **Boucheffa, 2011 Dommergurs et manganot, 1970**). les streptomycètes et autres actinomycètes ont été soupçonnés d'être les principaux agents(le géosmine et 2-méthyl isobornéol) responsables des goûts et des odeurs terreux et du sol qui se produisent parfois dans l'eau potable.

L'air n'est pas un habitat pour les Actinomycètes mais c'est un moyen de transport ils sont trouvé sous forme de spores (**Chelli, 2010**).

Les actinobactéries jouent également un rôle majeur au sein de la communauté microbienne de la rhizosphère, dans le renouvellement de la matière organique végétale et par conséquent, la zone rhizosphérique est considérée comme l'une des meilleurs habitats pour l'isolement de ces microorganismes.

Certains actinomycètes sont des symbiotes de plantes. mais quelque formes sont pathogène pour l'homme, les plantes ou les animaux et peuvent vivre à l'état libre ou en association. Depuis longtemps reconnu que les endophytes de type actinomycète dans les nodules racinaires de certains arbustes et arbres pourraient fixer l'azote in situ (**Bond, G., 1976 ; Becking, J. H., 1977**). Avant leur isolement réussi, ils étaient considérés comme des actinomycètes principalement sur la base de leur morphologie et de leur ultrastructure dans le tissu nodulaire (par exemple 28) et ont été placés dans le genre *Frankia* (**Becking, J. H., 1970**).

**Tableau 4 : Habitats de certains actinobactéries (Williams, S.T ., Goodfellow, M., 1984)**

| Genres              | Habitats                                 |
|---------------------|--|
| <i>Frankia</i>      | Les nodules racinaires.                  |
| <i>Streptomyces</i> | Le sol, la litière végétale, l'eau.      |
| <i>Nacrodia</i>     | Le sol                                   |
| <i>Actinoplanes</i> | L'eau douce, la litière végétale, le sol |

## 6. cycle de développement

Les actinomycètes se sont comme tous les autres eucaryotes, possèdent un cycle de vie commence par la germination des spores ils sont caractérisés par une croissance plus lente que celles des bactéries avec une temps de génération moyen de 2 à 3 heures (**Ottow et Glathe,1968 ;Larpen et sanglier,1989**).processus qui nécessite la présence des ions de calcium.) le développement des actinobactéries est le résultat de trois processus physiologiques majeurs :

La croissance végétative,la différenciation cellulaires puis la mort (**Tighidet,2010 ;Danilenko et al.,2005**)

Mycélium primaire : (mycélium végétatif ou mycélium de substrat )Le tube de germination donner des hyphes qui se ramifient, ce développant sur la surface et dans le substrat. Il est visible à l'œil nu au bout de 2 à 3 jours, il a différent tailles former et épaisseurs mycélium végétatif ou mycélium de substrat. dont la fonction principale est l'absorption des nutriments pour la croissance des actinobactériesqui'est hydrophobe et aérobie facultatif (**Merizig et Naami, 2005**) .Il peut être pigmenté et forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées.

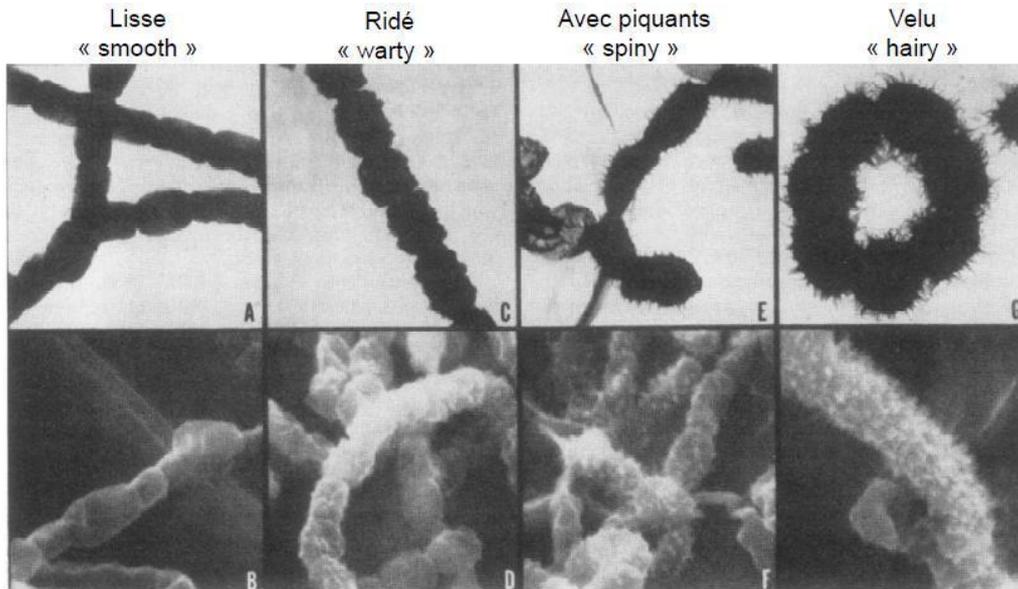
Mycélium aérien : (appelé aussi mycélium secondaire) Ce mycélium secondaire aérien va se développer sur le mycélium primaire, il est aérobie strict et habituellement de couleur foncée.Ces hyphes sont peu ramifiées et pourvues d'une enveloppe externe hydrophobe. Elles sont plus épaisses que les hyphes primaires, ou se forment des spores. La production de mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs.(**Pine, 1970**).

Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvu de ce type de croissance (mycélium aérien)(**Moore et al,1999**)

### Formation des spores :

Plusieurs groupes d'actinomycètes sporulent, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (**choulet,2006**)

la sporulation contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propre ,c'est une processus hautement régulé(Mecormick et Flaedh,2012),les chaines des spores présentent des formes variables (randes,ovales ou en batonnets avec une surface de différents aspect ,soit lisse (type smooth),rugueuses (type warty) ,épineuse (type spiny) ou chevelue (type hairy)



**Figure 08 : les différentes formes des spores** (Lyons et Pridham, 1971)

Les spores des Actinomycètes peuvent être classé en deux groupes : exospores et endospores, selon leur mode de formation.

Les Endospores : Les Actinomycètes thermophiles développent des endospores, à l'inverse des exospores. Les endospores sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi épaisse multicouche dans l'hyphe existant.les spores des Thermoactinomyces contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6.5 à 7%. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur, ce genre associe de grandes quantités d'ion de calcium et magnésium (Sykes et Skinner, 1973)..Elles sont caractéristiques du genre Thermoactinomyces.

Les exospores : les actinomycètes forment des hyphes, produisent des exospores par séparation et fragmentation des hyphes. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative.ces spores

permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables. (Prescott et al., 2007)

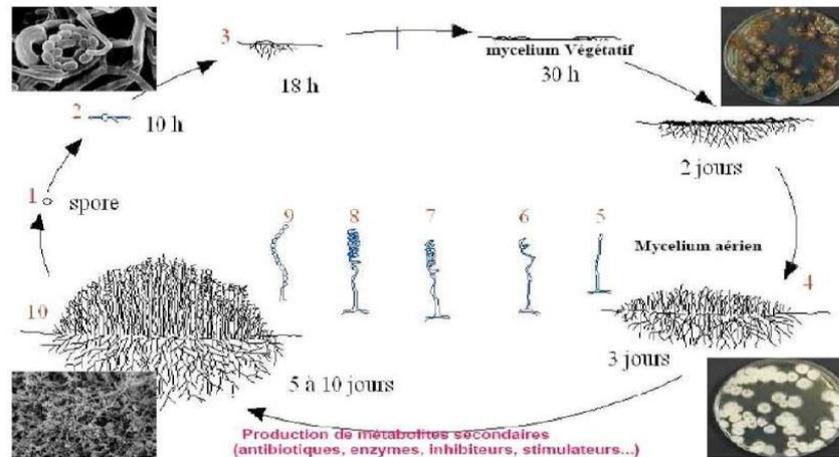


Figure 09 : cycle de développement des actinomycètes (Jakimowicz, 2007)

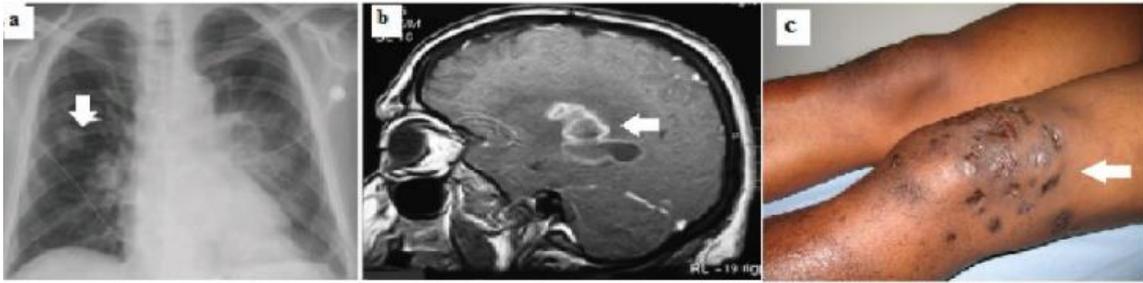
## 7. Phytopathogénicité :

Les bactéries phytopathogènes sont généralement à Gram négatif, mais un certain nombre de maladies végétales importantes sont causées par les actinomycètes. Ceux-ci sont principalement classés comme *Actinobacteria* ou *Streptomyces*. d'autres genres sont parfois impliqués comme agents pathogènes (Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983)

### Les maladies provoqués par certain actinomycètes

#### 7.1 Nocardiose

La moitié des espèces connues de *Nocardia* sont des pathogènes de l'homme et des animaux (Leger et al., 2009; Bawa et al., 2010) Chez l'homme les espèces de *Nocardia* peuvent causées des infections appelées « nocardiose » et l'infection peut être pulmonaire, cérébrale, cutanée ou disséminée qui peuvent être considérées comme des infections opportunistes (observé chez les immunodéprimés), mais qui peuvent être invasives dans les unités de transplantations et oncologiques. (Holtz et al, 1985 ; Lerner, 1996)



**Figure 10 : a: nocardiose pulmonaire (Schlaberg et al., 2008), b: nocardiose cérébrale (Rakotoarivelo et al., 2011), c: nocardiose cutanée (Epelboin et al., 2013)**

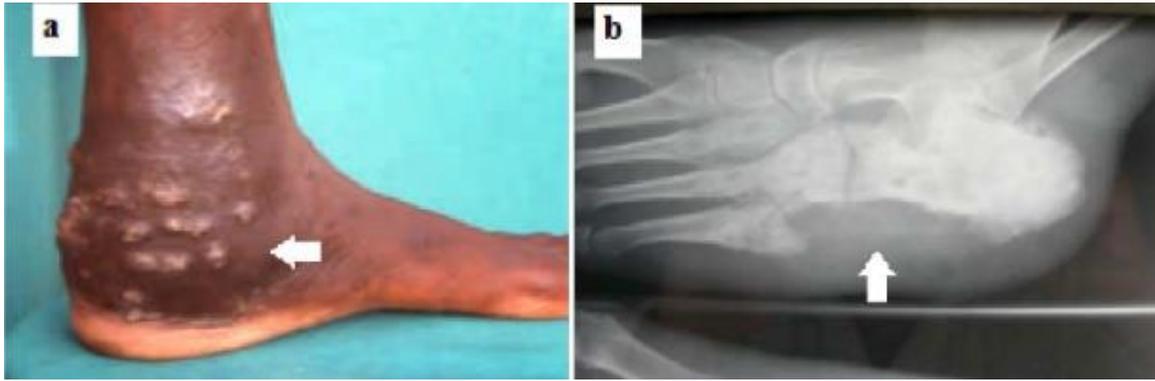
Traitement :

La majorité des souches est résistante à la vancomycine, au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la clindamycine. La plupart des souches de *Nocardia* sont résistantes aux pénicillines par production d'une  $\beta$ -lactamase inhibée par l'acide clavulanique (Kitzis et al., 1985; Ambaye et al., 1997). Cependant, la grande majorité des souches est sensible aux sulfamides, surtout le sulfaméthoxazole dont l'action peut être renforcée par le triméthoprime (Collins, 1988). La durée de l'antibiothérapie, de six à douze mois, est conditionnée par la localisation, la sévérité de l'infection et le statut immunitaire du malade (Collins, 1988; Lerner, 1996).

## 7.2 Actinomycétomes

Les *Actinomyces* sp. sont les mieux connues comme agents causant des infections appelées « actinomycétomes » (Yassin et al., 2010). Ce sont des infections granulomateuses cutanées et sous-cutanées, chroniques et destructives, réalisant des pseudotumeurs inflammatoires, souvent polyfistulisées déchargeant à l'extérieur des grains cystiques (formés par l'agrégation de l'organisme causatif). Ces infections sont déformantes à évolution rapide et parfois mortelles. L'homme s'infecte par inoculation directe des microorganismes sous la peau au cours d'un traumatisme cutané ou après piqûre par des épines souillées. Son évolution est lente et progressive (Sy et al., 2003).

Les actinomycétomes touchent essentiellement les sujets d'origine rurale, elle provoque dans ce cas ce qu'on appelle "le pied de Madura", en particulier les agriculteurs, et surtout dans les régions arides et chaudes (Abd El Bagui et al., 2003 ; Lum et Vandmal, 2003)



**Figure 11 : infections par *Actinomadurasp.* a: mycétome de la cheville par *A. pelletieri* (Develoux et al., 2001), b: lyse osseuse du tarse par *A.madura* (Trabelsi et al., 2009)**

Traitement :

Le traitement de l'actinomycétome est avant tout chirurgical avec drainage et nettoyage des lésions infectieuses. Parfois, une amputation peut être nécessaire en cas de lésions très évoluées.

Une antibiothérapie prolongée, à base de sulfamides, consistant en une prescription orale de sulfaméthoxazole-triméthoprime à la dose de 1600 mg/320 mg par jour pendant 12 mois. Le traitement sera poursuivi plus longtemps en cas de réponse incomplète (Develoux et al., 2003). est généralement établie en complément au traitement chirurgical (Simonet, 1991 ; Carey et al., 2001 ; McNeil et al., 1990).

### 7.3 Streptomyces :

La gale des pommes de terre et de la betterave à sucre est la seule maladie majeure causée par les streptomycètes. La maladie, qui sévit dans de nombreuses régions productrices de pommes de terre du monde, est généralement associée à la gale *Streptomyces* et a fait l'objet d'un examen approfondi. La gale commune cause la défiguration des tubercules de pomme de terre (Serrano et al., 1998; Kapadia et al., 2007; Rose et al., 2008).

La gravité de la maladie soit influencée par des facteurs tels que le moment de l'infection, le taux de croissance de la pomme de terre, la variété de l'hôte et la virulence de l'agent pathogène

### 7.4 corynobactérium

Les actinomycètes actuellement attribués au genre *Corynebacterium* (Skerman, et al, 1980) provoquent diverses maladies. On en sait peu sur leur écologie générale et des milieux sélectifs sont nécessaires pour déterminer leur nombre; distribution et existence en dehors de l'hôte (Vruggink, H. 1976).

**Tableau 05 : Quelques actinomycètes phytopathogènes(Goodfellow, M., & Williams, S.T. (1983)**

| <b>Agent causal</b>                                       | <b>Maladie</b>  | <b>Ref</b>                        |
|---|---|-----------------------------------|
| <i>Arthrobacterilicis</i><br><i>Corynebacterium betae</i> | Brûlure du houx (flexopaca)<br>Flétrissement et tache foliaire de la betterave rouge (Beta vulgaris)                    | <b>(Mandel et al., 1961)</b>      |
| <i>C. flaccumfaciens</i><br><i>C. insidiosum</i>          | Flétrissement du haricot (Phaseolus vulgaris)<br>Flétrissement et retard de croissance de la luzerne (Medicago sativum) | <b>(Hedges., 1922)</b>            |
| <i>C. rathayi</i><br><i>C. sepedonicum</i>                | Gommage des céréales<br>Flétrissement et pourriture des tubercules de la pomme de terre (Solanum tuberosum)             | <b>( Skaptason, et al., 1942)</b> |

Les actinomycètes se sont avérés être les agents responsables de nombreuses infections humaines et animales. Celles-ci comprennent un certain nombre de maladies courantes et étudiées de manière intensive, telles que la diphtérie, la tuberculose et la lèpre. Il existe également un large éventail d'infections moins connues; certains, comme l'actinomycose et la nocardiose.

**Tableau 06 : Certaines maladies causées par des actinomycètes pathogènes Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983)**

| <b>Maladie</b> | <b>Agent causal</b> | <b>Sites corporels principalement concernés</b> |
|----------------|---------------------|---|
|                |                     |   |

|                       |   |  |
|-----------------------|---|--|
| Nocardiose systémique | <i>Nocardia asteroides</i> ,<br><i>rarely N. brasiliensis</i>   | Poumon, système nerveux central, rein, muscle et autres tissus |
| Actinomycétomes       | <i>Actinomadura madurae</i> ,<br><i>A. pellerieri</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. brasiliensis</i> | Pieds, jambes, haut, extrémités et autres sites.               |
| Actinomycose          | <i>Actinomyces bovis</i> , <i>A. israelii</i> , <i>Arachniopropionica</i>                                   | Régions cervico-faciales, thoraciques, abdominales et utérines |
| Diphthérie            | <i>Corynebacterium diphthérie</i>   | Gorge, blessures occasionnelles                                |
| Tuberculose           | <i>Mycobactérium tuberculosis</i>   | Poumon   |

## II. Production des métabolites bioactifs par des actinomycètes

### 1. L'importance des actinomycètes

Les actinomycètes, l'un des groupes les plus divers de bactéries filamenteuses (NeeluNawami et al.,2013), si quelques espèces d'actinomycètes sont pathogènes, la majorité sont très utiles (Sangelier et al.,1993) qui occupent une place de choix en raison de leurs nombreuses activités (Ames et al.,1987 ;Jarak et al.,2006 ;Nonmura,1989) grâce à leur polyvalence métabolique (NeeluNawami et al.,2013), et leur diversité dans l'écosystème par la production potentiels de nombre considérable de composés bioactifs a propriétés de haute valeur commercial et dans le but de découvrir de nouvelles substance (Vijayakumar et al.,2007) contre les microorganismes a été réalisé et ouvre dans des pistes intéressantes (Mukesh,2014) dans le domaine médicale, vétérinaire, agronomique et industriel (Sangelier et al.,1993)

Dans le domaine de la thérapie humaine et vétérinaire et biotechnologie, l'utilisation des actinomycètes en ces domaines relève du fait de leur capacité de synthétiser ces différents métabolites secondaires biologiquement actifs (Mincer et al.,2002 ;Behal,2003 ;Overbye et Barrett,2005 ;Baltz,2008), Ce sont des microorganismes d'intérêt industriel par excellence (Yala, 2001) de nombreux composés intéressants sont produits industriellement, comme les antibiotiques, les antifongiques systémiques ou topiques, les vitamines, les enzymes, l'antihistaminiques, les vasodilatateurs et les immuno-stimulants (Rattanaporn et al.,2004; Oskay et al.,2004)

souvent utilisés contre l'herbésé et l'hépatite et de large gamme des enzymes qui sont les plus importants produit à l'échelle industrielle (industrie alimentaire, la fermentation, l'industrie textile et du papier), (Lachevalier,1981 ;Goodfellow et Williams.,1981). Pharmaceutique, en pharmacie malgré les progrès de synthèses chimiques, en effets 45% des isolats produisent des molécules sont naturellement issus des actinomycètes en particulier le genre *streptomyces* (Sibanda et al.,2010) ont un rôle primordial dans le secteur pharmaceutique de lutte contre certaines maladies majeures : le cancer, HIV, l'infection du protozoaire et d'inflammations sévères (Hossam et al.,2017).

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du Sol. En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent

parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine, polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses (Zaitlin et Watson, 2006; Pizzul, 2006). ils participent donc activement à la fertilisation des sols et bioconversion des déchets agricoles et urbain à haut teneur en produit chimiques (Goodfellow et Williams, 1983) et aussi capable de dégrader ou transformer des toxines.



Figure 12 : Application biotechnologiques des actinobactéries (Anandan, 2016)

## 2. Métabolisme des Actinomycètes

### 2.1 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 (Theilleux, 1993), il implique les réactions cataboliques et anaboliques qui entraînent une augmentation de la biomasse ; c'est-à-dire les réactions qui conduisent à l'exploitation de l'énergie et de la puissance réductrice qui à leur tour sont utilisées pour synthétiser les éléments constitutifs des protéines (des monomères en macromolécules), des acides nucléiques, des lipides et des matériaux de structure et de stockage polysaccharidiques, métabolites produites durant la phase de croissance (phase exponentiel) d'un microorganisme, Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés (Delaunay et al., 2003).

## 2.2 Métabolites 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. De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas de fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire. Les métabolites secondaires peuvent évoluer dans la nature comme une sorte de réponse aux effets de l'environnement, y compris les environnements physiques et de vie.

Les métabolites secondaires microbiens sont la source de composés aux structures chimiques uniques. Une grande variété de composés structurellement originaux sont produits au cours des processus de fermentation microbienne. Ils sont connus pour montrer des activités diverses, non seulement antibactériennes et antitumorales, mais aussi antifongiques, antivirales, antiparasitaires, immunosuppressives, inhibitrices d'enzymes, voire neuroprotectrices (**Solecka et al., 2012**)

Les actinomycètes et particulièrement le genre *Streptomyces* représentent la principale source de métabolites secondaires à activité antimicrobienne. Les métabolites secondaires des streptomycètes peuvent être largement séparés en quatre classes selon leur activité biologique : les agents antagonistes, y compris les antibactériens, les antifongiques, les antiprotozoaires ainsi que les antiviraux.

- les agents pharmacologiques, y compris les antitumoraux, les immunomodulateurs, les agents neurologiques. et les inhibiteurs d'enzymes.
- les produits agrobiologiques, y compris les insecticides, les pesticides et les herbicides, et (4) les composés ayant des activités régulatrices, tels que les facteurs de croissance, les sidérophores ou les agents morphogènes (**Sanglier et al. 1996; Berdy 1995, 2005**)

**Tableau07 : Métabolites secondaires produits par les actinomycètes( Solanki R, et al., 2008)**

| Composé             | La source  | Activité  |
|---------------------|--|---|
| Érythromycine       | <i>Saccharopoly sporaerythrae</i>                              | Antibactérien   |
| Rapamycine          | <i>Streptomyces hygroscopicus</i>                              | Antifongique  |
| FK520 Ascomycine    | <i>Streptomyces hygroscopicus</i><br><i>var. ascomyceticus</i> | immunosuppresseur,<br>neutrophique  |
| Shurimycines A et B | <i>Streptomyces hygroscopicus</i>                              | Antibactérien, Antifongique   |
| Chloramphénicol     | <i>Streptomyces venezuelae</i>                                 | Antibactérien   |
| Streptomycine       | <i>Streptomyces griseus</i>                                    | Antibactérien   |
| Actinomycine C      | <i>Streptomyces chrysomallu</i>                                | Antitumoral   |
| Resormycine         | <i>Streptomyces platensis</i>                                  | Herbicide, antifongique   |
| Rhamnose            | <i>Saccharopoly sporaspinoza</i>                               | Composant essentiel du<br>composé d'agent de lutte<br>contre les insectes |
| Rimocidine          | <i>Streptomyces diastaticus</i>                                | Antifongique  |

### 3. Substances bioactives produites par les actinomycètes

Les actinobactéries sont considérées comme étant les microorganismes les plus grands producteurs de composés bioactifs tels que les antibiotiques, les antiphongiques, les immunostimulants, les immunosuppresseurs, les enzymes, les vitamines, etc. )

#### 3.1 Les antibiotiques

##### 3.1.1 Historique

L'histoire de la recherche sur les antibiotiques peut être divisée en trois périodes. La première période, jusqu'au début des années 40, est caractérisée par un développement lent et

une accumulation d'observations de base ainsi que par quelques découvertes fondamentales. L'utilisation thérapeutique de la pénicilline et le début du dépistage systématique des actinomycètes constituent une étape importante dans « l'âge d'or » de la recherche sur les antibiotiques. La seconde période est caractérisée par les découvertes fondamentales faites à la suite d'une recherche frénétique au cours des 15 à 20 prochaines années. Et la dernière période est caractérisé par, émergence des antibiotiques semi-synthétiques, importance croissante des applications antibiotiques non thérapeutiques, Recherche intensifiée de nouvelles sources d'antibiotiques....

Les antibiotiques ont joué un rôle important dans le développement des sciences fondamentales, principalement en biochimie et en microbiologie et dans une moindre mesure également en chimie organique et en pharmacologie, et ont eu une influence décisive sur la biologie moléculaire. Le rôle des antibiotiques dans la préparation de milieux de culture adaptés à l'isolement sélectif de différents micro-organismes est connu depuis longtemps. En tant qu'inhibiteurs spécifiques, les antibiotiques sont de plus en plus utilisés dans la recherche biochimique. Ces traitements ont permis de sauver plusieurs millions de personnes. Les laboratoires de recherche industriels et académiques ont alors engagé un processus à grande échelle pour découvrir de nouveaux principes actifs afin d'enrayer les autres infections bactériennes connues **(Béahdy, J. 1974)**

Aujourd'hui, les traitements antibactériens à base d'antibiotiques, appelés «antibiothérapies», sont largement prescrits. En 1997, la commercialisation des antibiotiques représentait un marché mondial de 16 milliards d'euros. Les antibiotiques qui sont utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action Pour qu'ils soient toxiques pour les bactéries.

Leur action peut être bactériostatique c'est à dire lutter contre la multiplication des bactéries et permettre aux défenses de l'homme de prendre le relais, ou bactéricide : dans ce cas elle détruit la bactérie. Chaque antibiotique a des actions spécifiques sur des bactéries ; plus il agit sur un nombre important de bactéries plus on dit que son spectre d'activité est large. Un antibiotique à large spectre est donc un antibiotique agissant sur plusieurs familles de bactéries

Les antibiotiques ont pour cibles principales classes de ces médicaments antibactériens, il existe trois cibles éprouvées pour les principaux médicaments antibactériens : (1) la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne ;(2) synthèse de protéines bactériennes;et (3) la réplication et la réparation de l'ADN bactérien. **(Walsh C., 2000)**

1- La biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne : il existe 3 classes les transpeptidase et transglycosylase sont les sites cibles pour la destruction des bactéries : il existe 3 classes :

a- les bêta-lactamines : ce sont des bactéricides et agit sur les bactéries à gram – et +

- pénicillines ( pénèmes) :
  - ✓ pénicilline G actif sur les cocci G+ et G-, les bacilles G+ exp : Benzylpénicilline
  - ✓ Pénicilline A exp : Ampicilline, Amoxicilline
  - ✓ Pénicilline M se sont des antistaphylococciques exp : oxacilline
  - ✓ Acylureido pénicillines actif sur pseudomonas aeruginosa exp : ureido pénicillines : pipéracilline

Carboxypénicillines : ticarcilline

- ✓ Inhibiteurs des bêta-lactamases : active sur les entérobactérie, hémophilus.  
Exp :

Oxapénème : acide clavulanique

Pénicillines sulfones (**Rolinson, 1986**)

- Les carbapénèmes( pénèmes)
  - Les céphalosporines ( céphéms) :
    - ✓ Céphalosporines 1 ère génération : inactive sur pseudomonas, sensible aux céphalosporinases résistance a celle du staphylococcus exp : céfazoline, céfalexine
    - ✓ Céphalosporine 2<sup>ème</sup> génération : inactive sur pseudomonas , relative résistance aux céphalosporinases, résistance aux staphylococcus exp : céfoxitine
    - ✓ Céphalosporine 3<sup>ème</sup> génération : diminution de l'activité sur les gram+, certain sont actives contre les pseudomonas, résistance aux céphalosporinases exp : céfotaxime
    - ✓ Céphalosporines 4<sup>ème</sup> génération : inactive sur les pseudomonas, résistance aux céphalosporinases exp :céfquinome (**Cavallo, et al.,2004**)
  - Les monobactames : actif sur les BGN
- b- Les fosfomycine : utiliser toujours en association pour éviter l'apparition de mutants résistants exp : fosfocine
- c- Glycopeptides : actif principalement sur les staphylococcus et les entérocoque ( **spratt et al .,1988**)

- 2- Synthèse des protéines bactériennes : il existe de nombreux inhibiteurs de la synthèse des protéines, ciblant différentes étapes de l'action des ribosomes, avec une action antibactérienne sélective. Ceux-ci comprennent des antibiotiques aussi importants en médecine sont les :
- a- aminosides : ce sont des bactéricides, actif sur les cocci et bacilles gram + et – sauf les staphylococcus exp : gentamycine, streptomycine, tobramycine
  - b- Tétracycline : ce sont des bactériostatique, actif sur les germes a développement intracellulaire expmynocycline, doxycycline.
  - c- Macrolides : ce sont des bactériostatique, actif sur les bactéries a gram+ exp : azithromycine, erythromycine, clarythromycine
- Cette multiplicité indique également que la synthèse des protéines fournira une cible à multiples facettes pour de nouveaux antibiotiques et c'est le mécanisme d'action deoxazolidinones dont l'une a été approuvée aux États-Unis au premier trimestre 2000. (Brisson-Noel, et al. 1988; Chopra, I.1985; klossp , et al . 1999)
- 3- la réplication et la réparation de l'ADN bactérien :
- a- Les fluoroquinolones, ce sont des bactéricides, actif sur les bactéries gram+ telles que la ciprofloxacine, sont des structures antibiotiques synthétiques qui tuent les bactéries en ciblant l'enzyme ADN gyrase, Les antibiotiques quinolones tels que la ciprofloxacine sont des inhibiteurs de l'ADN gyrase.( shen, L ., 1993)

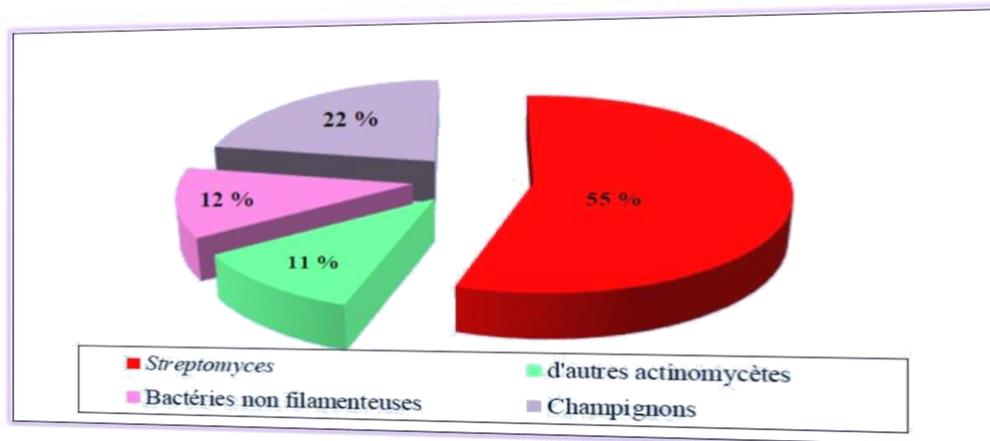
### 3.1.2 Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Les principales sources d'antibiotiques microbiens sont les groupes de micro-organismes suivants : (a) les actinomycétales, (b) les bactéries et (c) les champignons microscopiques.

Entre 1955 et 1962, cependant, environ 80% des antibiotiques trouvés provenaient des espèces Actinomycetales. Au cours des 10 dernières années, le rapport des antibiotiques isolés des Actinomycetales a diminué de manière décisive et le rapport des nouveaux antibiotiques, en particulier ceux trouvés dans les champignons, montre une tendance à augmenter. Les antibiotiques occupent la part la plus importante des métabolites produits par les actinomycètes, le rapport des espèces de Streptomyces dans les Actinomycetales isolés à partir d'échantillons de sol s'élève à environ 90-95%. Par conséquent, environ 92,5% des antibiotiques d'origine Actinomycetales, décrits jusqu'à présent, ont été isolés de l'espèce Streptomyces.. Cependant, les Streptomyces sp. sont toujours les producteurs de la majorité des antibiotiques

utilisés en thérapeutique( ep :production de La majorité des antibiotiques glycopeptidiques) .La gentamicine, la rifamycine et la ristocétine tirent leur origine des espèces Micromonospora et Nocardia. Parmi les antibiotiques synthétisés par les Streptomyces:(streptomycine, kanamycine, chloramphénicol.(Thiemann et al., 1969).

Ce sont les Actinomycétales qui ont fourni la plus grande partie des antibiotiques d'usage commercial, Malgré leur ratio en baisse, les Actinomycétales promettent toujours de rester les sources les plus riches d'antibiotiques utiles à l'avenir.Au cours des 10 dernières années, tous les nouveaux antibiotiques introduits dans la pratique, au total 25, ont été fournis exclusivement par Actinomycetales. Des exemples avec une activité antimicrobienne comprennent les  $\beta$ -lactames, les tétracyclines, les aminosides, les glycopeptides, les macrolides, les aminocyclitoles..



**Figure 13: Répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005)**

### 3.1.3 Développement de nouvelles classes d'antibiotiques

Outre la définition de nouvelles cibles chez les bactéries pour de nouveaux antibiotiques (voir ci-dessous), des progrès ont été réalisés dans le développement d'une nouvelle classe structurale de molécules synthétiques à large spectre et à puissance acceptable : les oxazolidinones. Les oxazolidinones inhibent également la biosynthèse des protéines, notamment par interaction avec l'ARN ribosomique 23S au niveau ou à proximité du centre peptidyl transférase du ribosome (klossp , et al ., 1999) .L'une de ces oxazolidinones, le linézolide, a maintenant progressé dans les essais cliniques( chien et al ., 2000) jusqu'à l'approbation aux États-Unis. Le linézolide a été décrit comme la première nouvelle classe structurale d'antibiotiques introduite en trois décennies et rejoindra les quinolones comme

preuve que des composés synthétiques peuvent être élaborés qui correspondent à la puissance antibiotique et à la sélectivité des produits naturels. Un glycolipodepsipeptide (17 acides aminés cyclisés en macrolactone) est également en cours de développement, appelé ramoplanine (**Kurz et al., 1996**). Cela agit contre l'ERV en formant un complexe avec les intermédiaires lipidiques pentapeptide dans la biosynthèse de la paroi cellulaire, agissant d'une manière quelque peu analogue à la vancomycine en ciblant un substrat plutôt qu'une enzyme dans la voie d'assemblage du peptidoglycane.

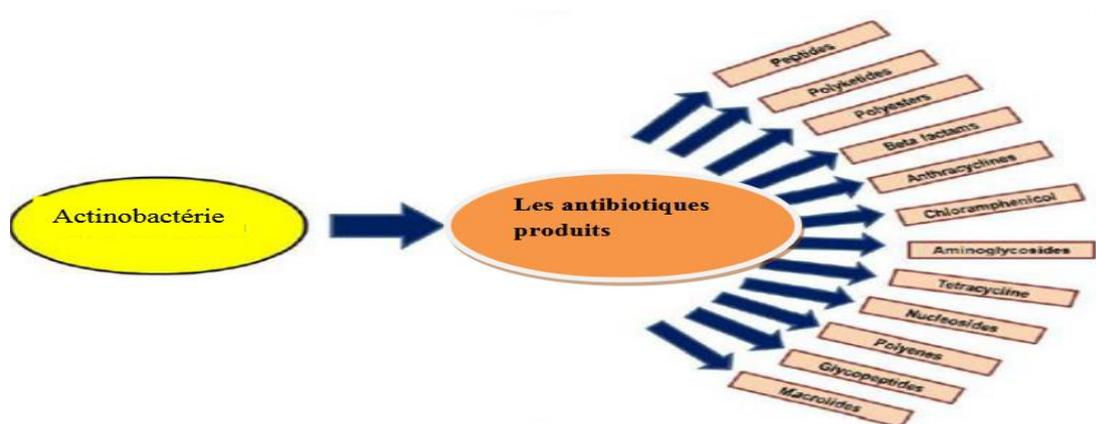


Figure 14: antibiotique produit par les actinomycètes( Anandan , 2016)

### 3.2 Les antifongiques :

#### 3.2.1 Généralité :

Le mot antifongique se réfère à un composé capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'un champignon (**Fjaervik et Zotchev, 2005**). Les champignons sont responsables de nombreuses maladies ciblant les végétaux, l'homme et l'animal. On estime que les 4/5 des maladies des végétaux sont dues à ces microorganismes (**Lanier et al., 1976**).

L'utilisation des antifongiques sont largement importante pour la lutte contre champignons phytopathogènes du sol(**Schottel et al, 2001 ; Raaijmakers et al , 2002 ; El-Tarabilya et Sivasithamparam, 2006**). les 4/5 des maladies des végétaux sont dues à ces microorganismes (**Lanier et al., 1976**). Cette production permet aux agents antagonistes d'inhiber les agents phytopathogènes et de coloniser l'espace rhizosphérique(**Peter et al , 2003**),aussi ces substances l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux (**Bastide et al., 1986**), autre domaine principale en thérapeutique humaine Les infections fongiques invasives sont de plus en plus fréquentes et sont associées à

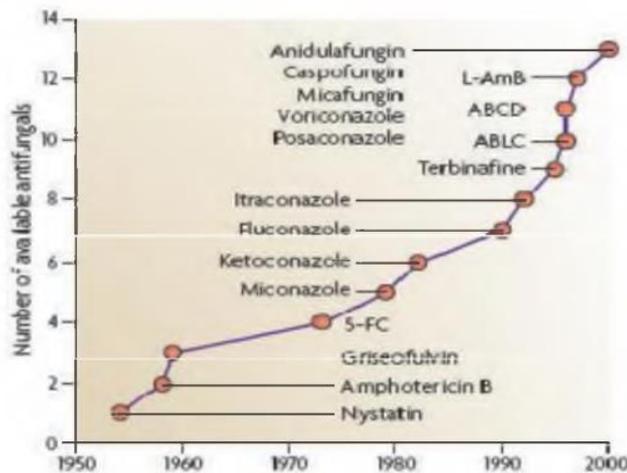
Mortalité importante. L'amélioration des diagnostics et la disponibilité de nouveaux antifongiques ont révolutionné le domaine de la mycologie médicale au cours des dernières décennies, qui sont Les infections fongiques vont de condipeau (par exemple la teigne et le pied d'athlète) et les ongles (onychomycoses) à la vie disséminée-maladies menaçantes. Champignon invasif grave infections causées par *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Pneumocystiscarinii* et *Histoplasma capsulatum*, représentent une augmentation menace pour la santé humaine. La prévalence de ces infections fongiques systémiques a augmenté considérablement au cours de la dernière décennie. Les principaux facteurs responsables de cette dramatique augmentation comprennent une plus grande utilisation des antibiotiques, une augmentation marquée du nombre de personnes immunodéprimées (SIDA, cancer et patients transplantés), l'utilisation d'un cathéter et une population de patients vieillissante (**Beck-sagu et al., 1980 ;Diamond.,1991**), Le grand nombre et la variété des agents chimiothérapeutiques isolés à partir de substances naturelles microbiennes et utilisés pour traiter les infections bactériennes ont grandement contribué à l'amélioration de la santé humaine au cours du siècle dernier (**Hassan.,2017**). Les infections fongiques étaient considérées étaient en grande partie traitables et la demande de nouveaux médicaments pour les traiter était très faible. Seul un nombre limité des agents antifongiques, Au total 5600 composés (34%) montre une activité antifongique; dont 21 % (3 500) sont actif contre les levures, 11% (1800) contre les phytopathogènes champignons et 24% (4000) sont actifs contre d'autres espèces des champignons. Environ 2000 composés, parexemple le polyène(**J. Bérdy.,2005**), On distingue 5 classes d'antifongiques : les polyènes, les echinocandines, les azolés, les fluoro-pyrimidines, les allylamines. Les deux premières sont issues de produits naturels tandis que les trois autres sont synthétiques(**Camille.,2013**)

L'histoire de ces molécules débute en France en 1939 avec la découverte de la griséofulvine (application thérapeutique en 1958). Puis a été introduit dans les années 50, la classe des polyènes avec la nystatine et, plus tard, l'amphotéricineB, Il faudra attendre 1957 pour que la flucytosine, de la classe des fluoro-pyrimidines fasse son entrée sur le marché des antifongiques, Issues de longues années de recherche, une nouvelle classe apparaît à la fin des années 50 : les azolés. Dans l'ordre : le miconazole, le clotrimazole et l'éconazole, tous trois étant des imidazolés. Cependant, leur utilisation se limite à un usage externe en raison de leur forte toxicité lors d'une administration orale.

En 1983 le premier triazolé fait son apparition : le kétoconazole, suivi de près par la terbinafine, représentant de la classe des allylamines, Plusieurs triazolés vont ensuite être

introduits successivement sur le marché : le fluconazole (en 1990), l'itraconazole (1993), le voriconazole (2002) et le posaconazole (2006).

Parallèlement, la classe des échinocandines, novatrice sur le plan pharmacologique car possédant une faible toxicité et présentant peu d'interactions médicamenteuses, fait son apparition avec la caspofungine en 2002, l'anidulafungine en 2007 et la micafungine en 2008(Hincky.,2011)



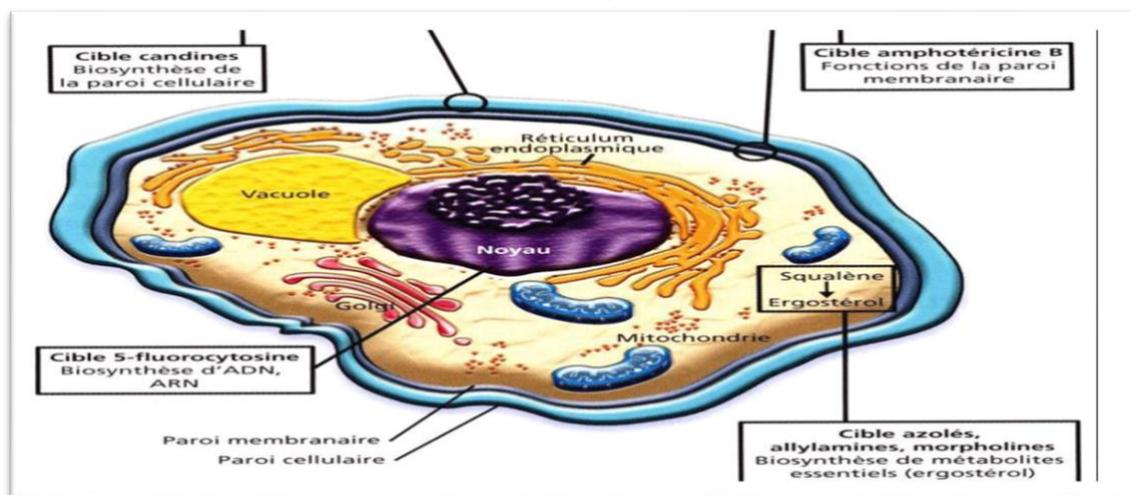
**Figure 15: chronologie de la découverte des différents agents antifongiques (Ostroskyzeichner.,2010)**

Montrer certaines limites, telles que l'importance néphrotoxicité de l'amphotéricine B(Georgopapaadakou et al.,1994) et émergente résistance aux azoles(Carledge et al.,1957) malgré plusieurs améliorations, telles que les formulations lipidiques de polyènes avec une toxicité plus faible et de nouveaux triazoles (voriconazole, rovuconazole et pasaconazole) avec un spectre d'action plus large, y compris l'activité contre certains isolats résistants aux azoles(Garnier.,2000), Le développement mise au point de nouveaux agents antifongiques, de préférence naturelles se rallie avec de nouveaux mécanismes d'action, est un besoin médical urgent, les antifongiques polyéniques ont un spectre d'action sur les champignons filamenteux et unicellulaires et sur certains protozoaires et algues. A part quelques rares exceptions, ils sont inactifs sur les bactéries et les virus. Vu leur instabilité, leur toxicité et les problèmes liés à leur absorption(Boudjelal., 2012), ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse

Les antifongiques systémiques utilisés pour traiter les infections fongiques disséminées ou profondes se répartissent en quatre familles chimiques et ont réussi à comprendre trois cibles cellulaires chez le champignon : les pyrimidines fluorées agissant sur la réplication de l'acide

désoxyribonucléique (ADN) et la synthèse des protéines ; les polyènes et les azolés ont pour cible l'ergostérol et sa voie de biosynthèse ; les lipopeptides inhibent la biosynthèse de glucanes pariétaux. Les mécanismes de résistance mis en place par certaines souches de champignons sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes sont représentés sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour les transporteurs membranaires arrivent dans un rejet actif de l'antifongique (Isabelle et al.,2006), Les composés sont classés selon leurs mécanismes d'action, couvrant les inhibiteurs de la synthèse des composants de la paroi cellulaire (glucane, chitine et mannoprotéines), de synthèse des sphingolipides (sérine palmitoyltransférase, céramide synthase, inositolphos-phocéramidesynthase et allongement des acides gras) et de la synthèse des protéines (sordarines). Dans De plus, quelques considérations liées à la chimiotaxonomie des organismes producteur et certaines questions relatives à la découverte de médicaments antifongiques sont également discutées(vicent et al.,2003).

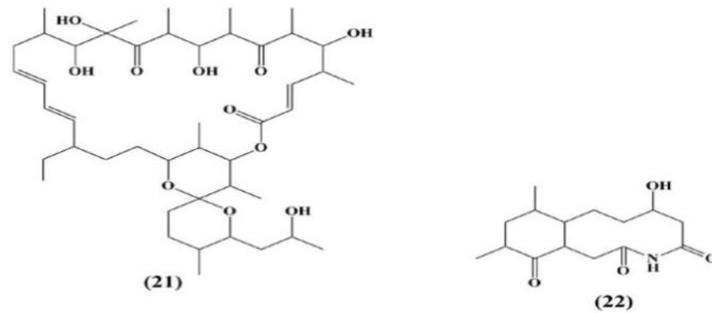
**Figure16 : cible d'action des différents classe d'antifongiques sur la cellule eucaryote (Halin et al.,2009)**



### 3.2.2 Activités antifongiques des actinomycètes :

Les chercheurs se sont tournés vers la recherche de nouveaux antifongiques plus performants et moins agressifs pour l'organisme. La grande majorité des antifongiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisée par les actinomycètes (Eckwall et al.,1997),Amphotéricine B, l'un des actinomycètes les plus connus métabolites, est un antibiotique polyénique macrolide qui a été isolé en 1955 à partir de bouillon de *S.*

*nodosus* (Trejo et al.,1983). C'est un antibiotique antifongique à large spectre d'activité, Brasilinolide A, un nouvel antibiotique macrolide de *Nocardia brasiliensis* IFM0406 s'est avéré actif contre *Aspergillus niger* avec une valeur MIC de 64 g/ml et un haut niveau de cytotoxicité, contre les cellules HepG2, A549, HCT-116 et COC1 ( Gao et al., 2012 ;Tanaka et al.,1997) Deux classes de nucléosides antifongiques en compétition inhiber la chitine synthase fongique : polyoxines et nikkomyces (Kimura et al.,2003 ; Hector .,1993). Les polyoxines sont des métabolites secondaires de *S. cacaoi* var. *asoensis* qui présentent une activité antifongique. Isolé dans les années 1960, il a été démontré qu'ils avaient une activité contre champignons phytopathogènes en particulier contre *Botrytis cinerea* (Cidaria et al.,1993), par exemple *Alternaria kikuchiana*, *Pricularia oryzae* ) (Kimura et al.,2003). Les nikkomyces (nikkomycine Z) sont plus puissantes contre *Candida albicans* que les polyoxines. Nikkomycines sont produites par *S. tendae* et *S. ansochromogenes* .Les nikkomyces ont été isolées dans les années 1970 à partir de *S. tendae* et se sont avérés actifs contre *Rhizopus carcinans* et *Botrytis cinerea* (Kimura et al.,2003). Les Nikkomycines agissent comme des inhibiteurs de chitine synthase chez les champignons et les insectes (Hector .,1993). Nikkomycine Z et X sont structurellement très similaires ; pourtant, le premier est plus prometteur comme agent antifongique que la nikkomyce X. Par conséquent, une production sélective élevée de nikkomyce Z a été obtenu par Liao et al. par des manipulations génétiques et alimentation précurseur (Liao et al.,2009) l'oligomycine A, iso-provenant de *Streptomyces libani* a montré un niveau élevé d'inhibition activité contre les champignons pathogènes (Kim et al.,1999), Les oligomycines sont des produits de *S. diastaticus* fermentation, mais sont également produits par *S. diastatochromogenes* (oligomycine A (21) en premier décrit pour cette espèce en 1954) , *S. libani* et *S. avermitilis* ,Les oligomycines A et C sont antibiotiques macrolides qui démontrent un puissant antifongique activité contre *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* et *Photophthoracapsici* ,Plusieurs métabolites bioactifs secondaires (23) ont été obtenus à partir de *Streptomyces* TK-VL\_333 Parmi eux, l'acide 1H-indole-3-carboxylique (T1) a montré une activité antifongique contre *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*. Il présentait également une activité antimicrobienne



**Figure 17 : la structure chimique d'oligomycine À (21) et 210–A (22)**

La rapamycine a été isolée pour la première fois à partir de souches d'actinomycètes dérivées du sol sur l'île de Pâques (**Sehgal et al.,1975**). Il présente une activité antifongique contre *Candida* spp Il montre des propriétés antifongiques plus puissantes dans la candidose systémique murine par rapport à amphotéricine B (**Park et al.,2010**).D'autres cibles fongiques potentielles sont les enzymes impliquées dans la synthèse des mannanes et des glucanes(**Goodfellow et al.,1988**),En utilisant un certain nombre d'organismes d'essai différents et en établissant des réponses standard à des agents connus, appliquée au criblage de 2000 isolats du sol (principalement des streptomycètes), un antibiotique isolé d'*Actinomadura*sp. Chandrananimycine Une puissante activité antifongique contre *Mucor miehei*. Ça aussi a montré une activité anticancéreuse, antibactérienne et antialgue contre *S.aureus*, *Bacillus subtilis* et la microalgue *Chlorellavulgaris* et *Chlorellasorokiniana*(**Maskey et al., 2003**)b.Saadamycine( **23** ), Activité antagoniste contre les agents pathogènes fongiques est généralement lié à diverses substances antifongiques polykétide produit par *Streptomyces* spp(**Sanglier et Trujillo, 1997**).ainsi qu'aux extracellulaires enzymes hydrolytiques (chitinase,-1,3-glucanase) a été isolé d'une éponge égyptienne *Aplysine fistulaire*. Le composé possède une puissante activité antifongique.,*Streptomyces shalstedii* K122 pro-composés antifongiques dus bafilomycine B1 et C1 qui ont été trouvés agir contre les champignons cibles (**Frandberg et al.,2000**),La chitinase et la -1,3-glucanase sont impliquées dans la lyse de la paroi cellulaire fongique (par exemple *Fusarium oxysporum*,*Sclérotinie mineure* ),Les propriétés biodégradables et antifongiques dechitinase sont également utiles pour des utilisations environnementales et agricoles,technologie alimentaire et cosmétique (**Rabéa et al. 2003 ; Lin et Lin 2005** ),Les ramicidines sont par exemple des antifongiques produits par une souche d'*Actinomadura bibisca*(**Tomita et al., 1990**)

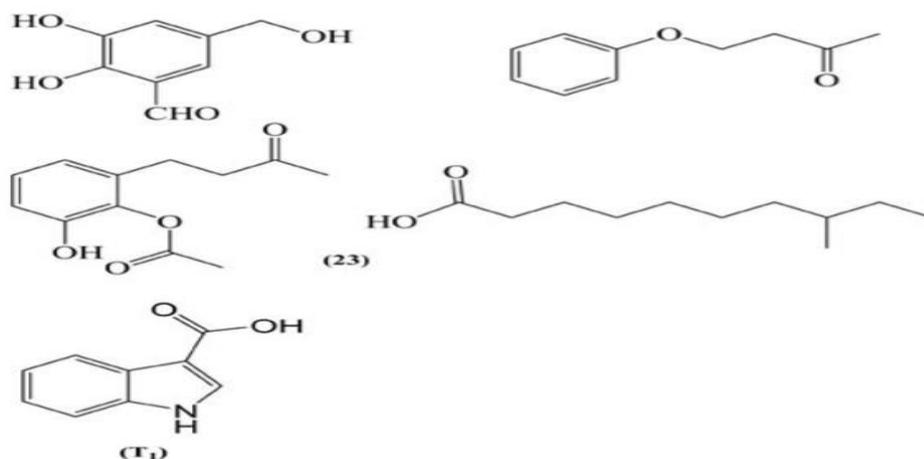


Figure 18 :la structure chimique de streptomycine.

### 3.3 Production des enzymes

#### 3.3.1 Généralités :

Les enzymes produites par les micro-organismes sont des biocatalyseurs de nature protéique potentiels pour un grand nombre de réactions. Les enzymes dérivées d'une source microbienne sont généralement considérées comme sûres et elles sont fonctionnelles dans une large gamme de températures, de pH, de salinité ou d'autres conditions extrêmes (Dhanasekaran D, et al .,2016 ; Priyadharsini P, et al . 2015). Les enzymes microbiennes jouent un rôle clé en tant que catalyseurs métaboliques, ce qui conduit à leurs diverses applications et utilisations dans diverses industries. La recherche constante de nouvelles enzymes microbiennes a conduit à des improvisations dans les processus industriels qui sont la clé de la croissance des bénéfiques (Salma. M et al., 2017).

#### 3.3.2 Les principaux enzymes synthétisées par les actinomycètes

Les actinomycètes sont l'un des groupes de micro-organismes les plus divers, bien caractérisés et reconnus pour leur polyvalence métabolique. Les actinomycètes sont d'une grande importance car ils ont la capacité de produire et de sécréter une variété d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui sont sans danger pour l'environnement. Les actinomycètes forment un groupe important de populations microbiennes dans le sol, les tissus végétaux et les environnements marins. Les actinomycètes produisent de nombreuses enzymes extracellulaires précieuses qui peuvent décomposer une variété de matières organiques. Les enzymes produites par les Actinomycètes et appliquées dans différentes industries sont les cellulases, les protéases, les amylases, les lipases xylanases, les chitinases, les cutinases et les pectinases (Salma. M et al., 2017) . Il a été rapporté que divers genres d'actinomycètes produisent un large éventail

d'enzymes industrielles potentielles qui peuvent être utilisées dans des applications biotechnologiques et des domaines biomédicaux en particulier (**Nawani. N et al., 2013**).

### **Les cellulase**

Les cellulases sont des enzymes industrielles importantes pour la production durable de biocarburants car elles convertissent la cellulose en sucres fermentescibles. Les cellulases de *Streptomyces spp.* comme *S. ruber*, *S. lividans* et *S. rutgersensis* sont hautement thermostables (**Kar.S et al., 2008**). Ces enzymes sont principalement utilisées comme complément dans les détergents, les textiles (**Jang.H et al., 2005 ; Azzeddine .B, et al., 2013**). Certains membres des genres *Thermobifida* et *Micromonospora* produisent également des cellulases qui présentent un potentiel industriel pour une utilisation commerciale (**Yang .et al., 2004**) sont utilisées pour la dégradation du coton et de l'avicel (**Shweta A ., 2012**)

### **Les Kératinases**

Ce sont des enzymes principalement utilisées pour l'hydrolyse de la kératine, produites par un certain nombre de souches d'actinomycètes comme *Streptomyces spp.* et *Actinomadura* (**Habbeche A, et al., 2014**). Il existe une forte demande pour le développement d'alternatives biotechnologiques pour le recyclage des déchets kératiques, la conversion des plumes, des poils, des ongles et de la laine de poulet inutilisés en produits utiles à l'aide des kératinases d'Actinomycètes (**Dastager S, et al., 2008**)

### **Protéases**

Ce groupe d'enzymes hydrolyse les liaisons peptidiques entre deux acides aminés des peptides et des protéines en libérant des acides aminés ou des petits peptides. La production de protéases à partir d'Actinomycètes comme les membres des genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Nocardiopsis* (**Wietzorrek. et al., 1997**). Les protéases de *Streptomyces spp.* peuvent être utilisées dans le traitement de différents déchets agro-industriels comme, les ongles, les cheveux. Les protéases produites par *Nocardiopsis spp.* sont connues comme des enzymes industrielles importantes et ont le potentiel d'être largement utilisées dans l'industrie du cuir.

### **Xylénases**

Les xylanases sans cellulases et thermostables sont produites par les genres *Actinobacterial*, *Actinomadura* et *Thermoactinomyces* avec une température optimale de 70°C (**Brzezinski R, et al., 1999**). Les membres du genre *Streptomyces* sont les principaux

producteurs de xylanases parmi les Actinomycètes. Certaines espèces de *Streptomyces* sont capables d'hydrolyser divers résidus agricoles comme les déchets de paille et les tourteaux (Chakraborty, et al., 2012)

### Amylases :

Les amylases sont considérées comme un groupe important d'enzymes qui hydrolysent l'amidon en sirops à haute teneur en fructose, glucose et maltose et peuvent être classées en endoamylases et exoamylases. Les souches d'actinomycètes, par ex. *Streptomyces rumpens* et *Thermobifida fusca* ont la capacité de sécréter des amylases à l'extérieur des cellules pour effectuer la digestion extracellulaire (Zhang F, et al., 2011). Ces enzymes thermostables peuvent être utilisées dans l'industrie de la boulangerie. Il existe différents type d'amylases, on distingue les alpha-amylases produit par les *Nocardiosis sp*, les bêta-amylases secréter par les *Streptomyces sp*.

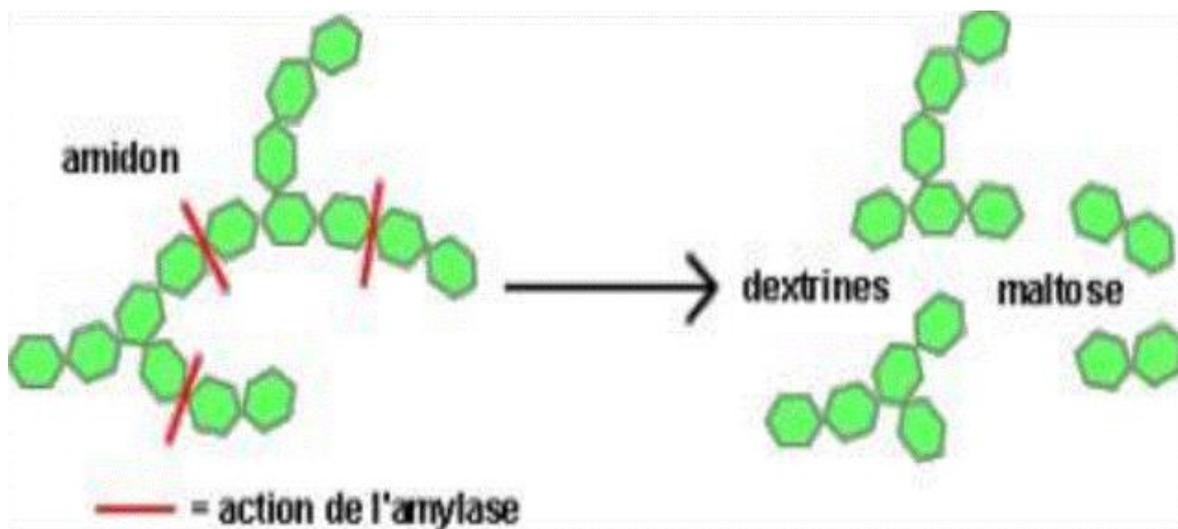


Figure 19 : Mode d'action de l'alpha-amylase ( Meziani et Mahcene, 2017)

### Les lipases

Il existe certain souche d'actinomycètes ont la capacité d'hydrolyser les huiles et les graisses. Les lipases et les estérases forment divers groupes d'enzymes hydrolytiques qui catalysent les lipides comme les triglycérides (Aly. Et al., 2012). Les membres des Actinomycètes, par ex. *Streptomyces exfolie* et *Nocardiosis alba* produit des lipases qui

hydrolysent les liaisons ester des triglycérides en glycérol et en acides gras (**Gandhimathi R. et al.,2009**)

### **Les pectinases**

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui contribuent à la dégradation de la pectine par divers mécanismes. Les pectinases sont produites par plusieurs espèces de Streptomyces telles que *S. lydicus* (**Jacob N. et al., 2008**). Ces enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'extraction et la clarification des vins, des jus, des huiles, la polygalacturonase est l'une des pectinases les plus importantes qui est largement utilisée dans différentes industries.

**Tableau 08 : Enzymes commercialement importantes produites par les actinomycètes, leurs caractéristiques et leurs utilisations potentielles**

### 3.4 . Les anticancéreux

| enzyme     | Souche productrice                  | pH et T° optimum | App industrielle | References                   |
|------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| cellulase  | <i>Streptomyces ruber</i>           | 6 /37°C          | Détergent        | ( Kar.S et al., 2008)        |
|            | <i>Hermobifida halotolerans</i>     | 7 /45°C          | Papier           | (Yang .et al.,2004)          |
| protéase   | <i>Streptomyces pactum</i>          | 7.5 /40°C        | Cuire            | (Wietzorrek. et al.,1997).   |
|            | <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> | 6.5 /65°C        | brassage         | ( banetly. et al.,2002)      |
| kératinase | <i>Actinomadura keratinilytica</i>  | 10 /70°C         | cuire            | (Habbeche A, et al., 2014)   |
| Amylase    | <i>Streptomyces erumpens</i>        | 9 /45°C          | Pâtisserie       | (El sary.Na, et al ., 2010)  |
|            | <i>Thermobifida fusca</i>           | 6 /60°C          | Textile          | (Zhang F, et al.,2011)       |
| Lipase     | <i>Streptomyces exfoliates</i>      | 6 /37°C          | papier           | (Aly. Et al., 2012)          |
|            | <i>Nocardiosis alba</i>             | 7 /30°C          | Cosmétique       | (Gandhimathi R. et al.,2009) |

L'actinomycine D a été l'un des premiers métabolites naturels à être utilisé dans le traitement des tumeurs. Il a été isolé à partir de *S. antibiotique*, L'actinomycine D agit en liant l'ADN au complexe d'initiation de la transcription et en empêchant l'allongement du transcrit par l'ARN polymérase. L'actinomycine D est encore utilisée dans le traitement des tumeurs de Wilms chez les enfants (Waksman S, et al., 1999 ; Demain , et al.,2009). D'autres groupes d'antibiotiques anticancéreux comprennent les anthracyclines, la daunorubicine (daunomycine), la doxorubicine (adriamycine), L'épirubicine est l'un des composés du groupe des anthracyclines les plus récemment identifiés; il a été approuvé par la FDA en 1999 et a un meilleur profil thérapeutique que la doxorubicine en raison de ses effets moins indésirables. Il est utilisé dans le traitement du cancer du sein, du cancer de l'ovaire, du cancer du poumon et de la leucémie (Arcamone, et al ., 1969). La bléomycine est un autre composé antitumoral, Les mitomycines produites par *S. caespitosus* présentent une activité antitumorale élevée, La

streptozotocine, produite par *S. achromogenes*, présente une toxicité sélective contre les cellules  $\beta$  pancréatiques c'est une médicament antitumoral des cellules des îlots pancréatiques(**Wang Z.,1998 ; Demain , et al.,2009**). Les calicheamycines sont des composés antitumoraux isolés de *Micromonosporae chinospora*. Ils agissent en clivant l'ADN dans son état double brin(**Walker S., 1992**)

Il existe aussi des antitumoraux qui ont été obtenus à partir des actinomycètes trouvées dans les sédiments marins qui sont : La marinomycine A, le daryamide C, les lucentamycines (A,B), les mansouramycines(13) et les tatrolons(**Bhatnagar I., 2010**) . Ils montrent une activité antitumorale contre le cancer du poumon, le cancer du sein, le mélanome et les cellules cancéreuses de la prostate.

La carboxamycine (15) a été isolée de *Streptomyces sp* à partir de sédiments du bassin des Canaries .Il montre une activité antitumorale contre les lignées cellulaires d'adénocarcinome gastrique (AGS), le carcinome hépatocellulaire (HepG2) et le carcinome du sein(**Waksman S, et al., 1999 ; Arcamone, et al ., 1969**)

Les dermacozines (16)) qui possèdent une activité antitumorale contre la lignée cellulaire leucémique (**Abdel-Mageed W, et al.,2010**).JBIR-69 a été isolé de *Streptomyces sp* possède de faibles propriétés anticancéreuses contre les cellules HL-60 de la leucémie myéloïde aiguë humaine(**Fujiwara T, at al.,2010**).

De nouvelles anthracyclines, la tétracénoquinocine (20) et la 5-iminoaranciamycine, ont été isolées de *Streptomyces sp*.Les deux composés ont montré une activité anticancéreuse contre deux lignées cellulaires cancéreuses (**Motohashi K, et al., 2010**).

### **3.5 les antioxydants :**

#### **3.5.1. Généralité :**

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses .Il modifie le goût et la couleur des aliments. L'organisme subit également le phénomène d'oxydation, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations : un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes de régénération de complexes mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion. Mais ce système de défense est parfois débordé. Surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil, d'un effort physique intense, etc. Plusieurs cas peuvent engendrer des dés équilibres

- soit dans des conditions de stress et alors l'oxydation augment eau point de ne pas pouvoir être régulée ;
- soit dans des conditions de mauvaise alimentation et alors les quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre. est avant tout un phénomène chimique(**Rolland.,2004**)

L'oxydation est générée par des radicaux libres,. Les espèces moléculaires cibles de l'oxydation sont avant tous les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires, mais aussi les protéines. Dans le cas des enzymes, l'oxydation entraîne une modification ou perte de l'activité biologique de la molécule(**Rolland.,2004**)

### **3.5.1 Les radicaux libres :**

Au milieu des années 50, parmi les premiers, L'oxygène apparu voici trois milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est une molécule indispensable à la vie. Comme source d'énergie, les organismes dits aérobies utilisent des réactions d'oxydoréduction (chimiotrophes) reposant sur des interactions entre donneurs d'électrons (réducteurs) et des accepteurs d'électrons (oxydants) (**Gerschman et al.,1954**). L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée avec la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique (contre 2 seulement dans un processus anaérobie). Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toute fois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) neutres ou chargées instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur environnement pour retrouver un état plus stable, en contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale)(**Halliwell et al., 1994**). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte, l'oxygène comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, est très instable avec une très forte tendance à «oxyder» les composés qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires, En effet, ce radical libre aura toujours tendance remplir son orbitale, La matière vivante est composée d'atomes qui comprennent respectivement des éléments appartenant au noyau et d'autres, les électrons, qui forment un nuage orbital autour de celui-ci. Ces électrons sont animés d'un mouvement de rotation à la fois autour du noyau et sur eux-mêmes. On appelle ce

dernier le spin. Ces mouvements correspondent à une énergie importante qui rend ces composés instables, c'est-à-dire très réactifs avec les éléments voisins (**X. Lerverve.,2009**). Dans la matière, ces électrons sont le plus souvent stabilisés grâce à la formation de couples ou paires d'électrons: il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox) (**X. Lerverve.,2009**), La réactivité chimique des radicaux libres de Oxygène est variable selon la molécule considère, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxydes et hydroxyles, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite. C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène est préféré celui de radicaux libres puisque le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre (**Puppo et al.,1998**), De part leur nature instable, les ERO sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule

### **3.5.2 Le stress oxydatives :**

Le stress oxydatif intervient sur tous les métabolismes de l'organisme en raison des cibles multiples des radicaux libres (**Joelle Goudable et al.,1997**), qui représente un d'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des radicaux oxygénés et la biocapacité des systèmes logiques à inhiber l'intermédiaire d'oxygène réactif (ROI) ou précurseurs de ceux-ci, pour atténuer le dommages (**Baynes 1991**). Il joue un rôle important dans le développement de nombreuses maladies, comme la maladie d'Alzheimer, Parkinson, polyarthrite rhumatoïde, cancer et troubles cardiovasculaires assouplit (**Halliwell 1996 , 2006**) et sont impliqués dans une variété de multiplications pathologiques, car il peut être préjudiciable à tout type de macromolécules, y compris l'ADN, les protéines et les lipides (**Halliwell,1991** ).

Les antioxydants alimentaires tels que les flavonoïdes et les alcaloïdes jouent également un rôle important dans l'augmentation la résistance naturelle du corps au stress oxydatif (**Arulpriya et al.,2010**),,Sont très instable et endommagent les cellules radicalaires. Niveaux élevés de radicaux impliqués dans les mécanismes de signalisation(**Mallikarjuna et al.,2012**),C'est pourquoi il existe un grand nombre de marqueurs biochimiques dont, aucun ne fait actuellement l'un antimitose C'est en choisissant un ensemble de marqueurs en fonction de la pathologie étudiée

que l'on pourra estimer l'importance d'un stress oxydatif ou l'augmentation d'un risque chez un patient donné

#### **3.5.4. Les antioxydants :**

Ces antécédents pathologiques et cliniques ont incité pour étudier des composés antioxydants nouveaux et puissants de microorganismes qui sont finalement d'usage thérapeutique (**T.R. Prashith et al., 2010**) Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle, l'industrie s'est intéressé de près aux antioxydants ou «antioxygène», molécules capables par exemple de réduire les effets de l'oxygène sur la corrosion des métaux. En biologie, les toutes premières recherches sur les antioxydants ont montré leur capacité à réduire l'oxydation des acides gras insaturés et donc, leur rancissement. Cependant, c'est plus tard avec l'identification durant l'entre-deux-guerres des vitamines C (**Szent et Gyorgyi, 1928**) et E (**Evans et Bishop, 1922**) qu'est apparue l'importance des antioxydants en biochimie, D'autre part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN. S'y ajoutent quelques oligoéléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont les cofacteurs de plongeuses enzymes à activité antioxydant, Les antioxydants de faible poids moléculaire ont un mode ou une synergie d'action complexes

En effet, des antioxydants comme la vitamine C ou E se transforment eux-mêmes en libres lors de la neutralisation de certains dérivés toxiques de l'oxygène (**Defraigne., 2008**), Les actinobactéries, comme les autres organismes aérobies, génèrent des ROS de manière endogène comme sous produits des processus métaboliques. Ces formes d'oxygène sont hautement endommager les constituants cellulaires, y compris l'ADN, les lipides et les protéines (**Imlay 2003**). Les ROS peuvent également être formés par l'exposition de cellules soit à rayonnements ionisants, produits chimiques à cycle redox présents dans l'environnement ou par exposition aux métaux lourds. Grâce à ces mécanismes, tout les organismes aérobie en croissance sont continuellement exposés à des oxydants réactifs, sous conditions physiologiques donc, le défense cellulaire antioxydante endogène des systèmes sont nécessaires pour maintenir les ROS à un niveau basal et inoffensif et les réparer dégâts (**Lushchak and Gospodaryov 2005**)

#### **3.5.3 L'activité antioxydants des actinomycètes :**

Antioxydant signifie "contre l'oxydant". Un antioxydant est toute substance qui retarde ou empêche la détérioration, les dommages ou destruction par oxydation (**Dekkers et al. 1996**).

Dans le enquête sur les antioxydants naturels, un certain nombre de composés ont été obtenus à partir de différentes sources, principalement à partir de plantes, comme les polyphénols et les phytostérols (Lu et Foo 2001 ; Tan et Shahidi 2012). Cependant, la plus grande diversité structurelle de composés appartient à des molécules dérivées de micro-organismes. Parmi les composés bactériens biologiquement actifs, près de 45% sont produits par des bactéries Gram-positives, souvent des Actinobactéries, appelées producteurs remarquables de métabolites secondaires.

C'est un classement de plusieurs substances organiques, dont les vitamines C et E, la vitamine A, le sélénium et un groupe connu sous le nom de caroténoïdes (Dekkers et al. 1996 ; Kaczmariski et al. 1999 ). Dermacozines SA (57) sont nouveaux, les oxydés et pigments réduits de type phénazine de *Dermacoccus* isolés de les sédiments du Challenger Deep (10898 m) de la Mariana Tranchée ( Pathom et Aree et al. 2006 ) , Les filtrats naturels de ces isolats ont montré un modèle intéressant de métabolites secondaires, un groupe de composés de la phénazine. Haute la spectrométrie de masse à résolution et l'élucidation structurale de ces ont abouti à l'identification de 14 nouvelles phénazine-métabolites de type qui ont été nommés dermacozines. Structures de sept de ces composés, montrant un piégeage des radicaux libres activités et les activités antitumorales et antiprotozoaires ont été déterminé. Les dermacozines F et G présentaient une cytotoxicité modérée activité contre la lignée cellulaire leucémique K562 avec des valeurs IC 50 de 9 et 7 M, respectivement tandis que l'activité de piégeage radicalaire la plus élevée était observé dans la dermacozine C avec une valeur IC 50 de 8,4 M ( Abdel-Maged et al. ,2010 ). Une famille de nouveaux métabolites secondaires avec une fraction carbazole et une chaîne latérale alkyle ont été détectés par analyse HPLC-DAD dans les extraits cellulaires de la souche Acta 1857 de *Tsukamurellapseudospumae*. Les métabolites, qui ont été nommés lipocarbazoles , conformément à leur structure chimique, présentaient une forte liberté activité de piégeage des radicaux ( Schneider et al. 2009 ), Deux composés 2,6 acide diméthoxy téréphtalique et Yangjinhualine isolés de la culture filtrat de *Streptomyces* sp. YIM66017, d' *Alpiniaoxyphylla* présentait un antioxydant significatif activité dans le dosage anti-radicalaire avec des valeurs IC 50 de 4,61 et 57,12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivement (Zhou et al. 2014), Les extraits à l'acétate d'éthyle de 135 isolats d'actinomycètes provenant de quatre plantes médicinales ont été testés pour l'activité antioxydant (Akshatha et al. 2016). *Streptomyces globosus* et *Arthrobactersp.* Présentaient une valeur IC 50 de 88,2 et 97,6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  dans le test anti-radicalaire. Les actinomycètes sont sans aucun doute les plus grands producteurs de substances bioactives et

sont un défi pour les microbiologistes et les chimistes pour examiner la potentialité des produits pour des applications thérapeutiques ,la carbazomycine B, a l'activité antioxydante. Composés à savoir la carazostatine et la carbazomycine B ont montré des activité antioxydante *in vitro* et *ex vivo* que l'alpha-tocophérol. Celles-cil es résultats suggèrent que les nouveaux antioxydants isolés peuvent être utiles commeune nouvelle classe d' agents thérapeutiques (**Kato.,1994**) . Dans un programme de dépistage pourantioxydants de *Streptomyces prunicolor* en utilisant du foie de ratmicrosomes comme système de dosage, nouveaux métabolites, benthocyanines A,B et C, et la bentophénine ont été isolés . Carquinostatine A de*Streptomyces exfoliatus* possède des propriétés protectrices du cerveau. Il a montré une activité antioxydante dans les microsomes du foie de rat qui'était comparable à celle de la vitamine E. Dans la hanche principalement cultivéesystème neuronal pocampal, il a également supprimé la toxicité du glutamate(**Shin-ya et al.,1989**),Trois isoflavonoïdes antioxydants ont été isolés de la culture bouillon de *Streptomyces* sp. OH-1049(**Funayana et al.,1989**) . Dans une étude, 10,7 % d'un total de 150 endophytiquesdes actinomycètes isolés de trois plantes pharmaceutiques,*Annonaceaesquamosal* , *Camptotheca acuminé* et *Taxuschinensis*, a montré une activité antioxydante (**Wu et al.,2009**) .

**Tableau 09 :Exemples de molécules antioxydants produites par des quelques espèces d'actinobactéries**

| Molécules  | Espèces                  | Référence          |
|--|--------------------------|--------------------|
| (2)-I-(I-hydroxypenta-2-4 dien-<br>I-YI)oxy)<br><br>Anthrancene 9,10-dione | <i>Nocardiopsis alba</i> | Avilalaer al.,2014 |

|                      |                                  |                         |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Pc 766 B             | <i>Nocardia brasiliensis</i>     | Kumagai et al.,1993     |
| Dihydroherbimycin    | <i>Streptomyces sp</i>           | Cheng et al.,2016       |
| Protocatechualdehyde | <i>Streptomyces lincolnensis</i> | Jakim et al .,2008      |
| JBIR-94 et JBIR-125  | <i>Streptomyces sp</i>           | Kawahara et al.,2012    |
| 2-allyoxyphenol      | <i>Streptomyces sp</i>           | Arumugam et al.,2010    |
| Dizeepinomidine      | <i>Micromonospora sp</i>         | Abdelmohsen et al.,2012 |

### 3.6 Les vitamines

La vitamine B12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des actinobactéries. L'isolement de la vitamine B12 à partir des fermentations d'actinobactéries a suscité un intérêt considérable pour la production possible de vitamines par des fermentation microbiennes (**Rickes et al., 1948 ; Lichtman et al., 1949**). L'addition de sels de cobalt aux milieux semble être un précurseur pour toute les actinobactéries pour produire de la vitamine. Comme le cobalt est un agent bactéricide assez efficace, ce précurseur doit être ajouté avec précaution. Il a été également démontré que les actinobactéries produisaient d'autres vitamines hydrosolubles, telles que, la thiamine et le dérivé d'acide ptéroyl glutamique qui favorise la croissance de certaines souches de *Leuconostocicrovorum* et de la coenzyme A (**Anandan, 2016**).

### 3.7 Antivirale

Les tunicamycines sont des produits nucléosidiques d'acyle gras qui contiennent de l'uracyleDes coma été isolée de *S. lyososuperficus* nov. sp. bouillon de fermentation par Takatsuki et Tamura et al.posés similaires à la TM, la streptovirudine et la corynetoxine, ont été isolés plus tard également à partir de souches d'actinomycètes.La streptovirudine a été isolée de *S. griseoflavussubsp.thuringiensis*.Les deux composés possèdent des activités similaires contre les virus enveloppés, et la streptovirudine est également un puissant inhibiteur du genre *Bacillus*.Des corynetoxines ont été isolées en 1982 à partir de *Corynebacterium rathayi*(**Kimura et al .,2003**).Un composé anti-virus de la grippe, JBIR-68 (25), avec un squelette unique (5'-O-Géranyl-5,6-dihydrouridine) a été isolé de *Streptomycessp.R118*, récemment.Il inhibe sensiblement la croissance du virus de la grippe, mais le mécanisme de l'activité antivirale n'est pas clair (**Takagi M, et al.,2010**)

Un antiphage antibiotique, Tomaymycin, de *Streptomyces achromogenes* a montré forte activité inhibitrice contre les phages *E. coli* de la série T et  $\lambda$  phages (**Arima et al,1951**), Benzastatine C (25) un alcaloïde 3-chloro-tétrahydroquinolone isolé de *Streptomyces nitrosporeus*, a montré son action antivirale potentiel contre le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), avec une valeur EC 50 de 1,99 g/ml et le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). Un nouvel antibiotique SF2487 isolé d' *Actinomadura* sp. SF2487 s'est avéré faiblement actif contre les bactéries Gram positives et présente une activité antivirale contre le virus de la grippe *in vitro* (**Hatzu et al.,1990**)

isolé d'un sol de forêt tropicale brésilienne activité antivirale inhibant la propagation d'un virus résistant à l'acyclovir Souche HSV type 1 sur cellules HEp-2 à concentration non cytotoxique. Un nouvel antibiotique AM-2604 A, *Streptomyces* sp. isolé . AM-2604, s'est avéré posséder de faibles activité contre les champignons et les trichomonas et puissante activité inhibitrice contre divers virus à ARN et à ADN *in vitro* (**Omura et al.,1982**)

L'Antimycine A1 a montré une remarquable efficacité antivirale capable contre le virus de l'encéphalite équine occidentale.



# **Techniques d'étude**

### **III. Matériels et méthodes**

#### **Objectif**

Exceptionnellement, et en l'absence d'un travail expérimental, l'objectif de notre étude est consacré à l'établissement d'un protocole expérimental qui regroupe les principales techniques d'étude des actinomycètes.

# 1. Prélèvement des échantillons

## 1.1 Sol :

Pour l'échantillonnage, il existe plusieurs sols : arides, semi arides, agricole. Donc Les échantillons de sol sont prélevés selon la technique de Pochon et Tardieux (1962). A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur). Les sols sont placés dans un flacon stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.). les échantillons de sol sont conservés à 4°C et transportés le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse (Pochon et Tardieux, 1962)

## 1.2 Eau :

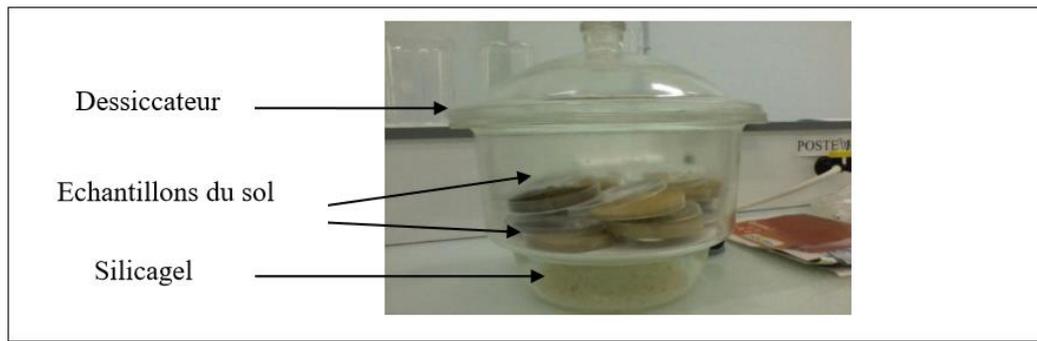
Les actinomycètes font partie intégrante de la microflore de l'eau douce sont isolés des lacs, des rivières et des réserves d'eau où ils sont impliqués dans la production de saveurs, d'odeurs et de couleurs désagréables (SaiTerman et Morris., 1962). Les échantillons d'eaux, selon la technique de Rodier (1984), sont prélevés à l'aide d'un plongeur lesté auquel est fixé un flacon en polyéthylène stérile. L'eau recueillie est introduite dans des flacons stériles en verre de 250 ml et transportée dans une glacière au laboratoire. Les analyses sont effectuées au plus tard dans les 24 heures qui suivent les prélèvements (Rodier, 1984).

# 2. Traitement des échantillons

Le sol peut être prétraité de diverses manières pour augmenter le nombre et/ou la proportion d'actinomycètes avant la préparation des dilutions. Les échantillons des sols peuvent avoir un prétraitement afin d'éliminer certaines bactéries indésirables et favoriser la croissance des actinobactéries.

## 2.1 Séchage

Un simple séchage à l'air de l'échantillon réduira le nombre de cellules bactériennes végétatives tout en permettant à de nombreuses spores d'actinomycètes de survivre. Parfois les échantillons de sols sont séchés dans un dessiccateur sous vide (figure 20) (Tsao et al., 1960).



**Figure 20: séchage des échantillons de sol dans un dessiccateur sous vide**

Un gramme de sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO<sub>3</sub>, incubé pendant 7 jours à 28°C (Tsao et al., 1960). Ce prétraitement a pour avantage, la réduction de la flore fongique ainsi que l'augmentation de nombre d'actinobactéries (Arshad et al., 2012).

### **3. Dénombrement et isolement des colonies d'Actinomycètes**

#### **3.1 Isolement :**

##### **3.1.1 Milieux de cultures pour l'isolement des actinomycètes :**

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinobactéries sont :

Milieu GLM (Gélose à l'extrait de levure-Extrait de Malt (voir annexe) (Kitouni et al., 2005)

Milieu ISP (International Streptomyces Project) (voir annexe) (Ara et al., 2012)

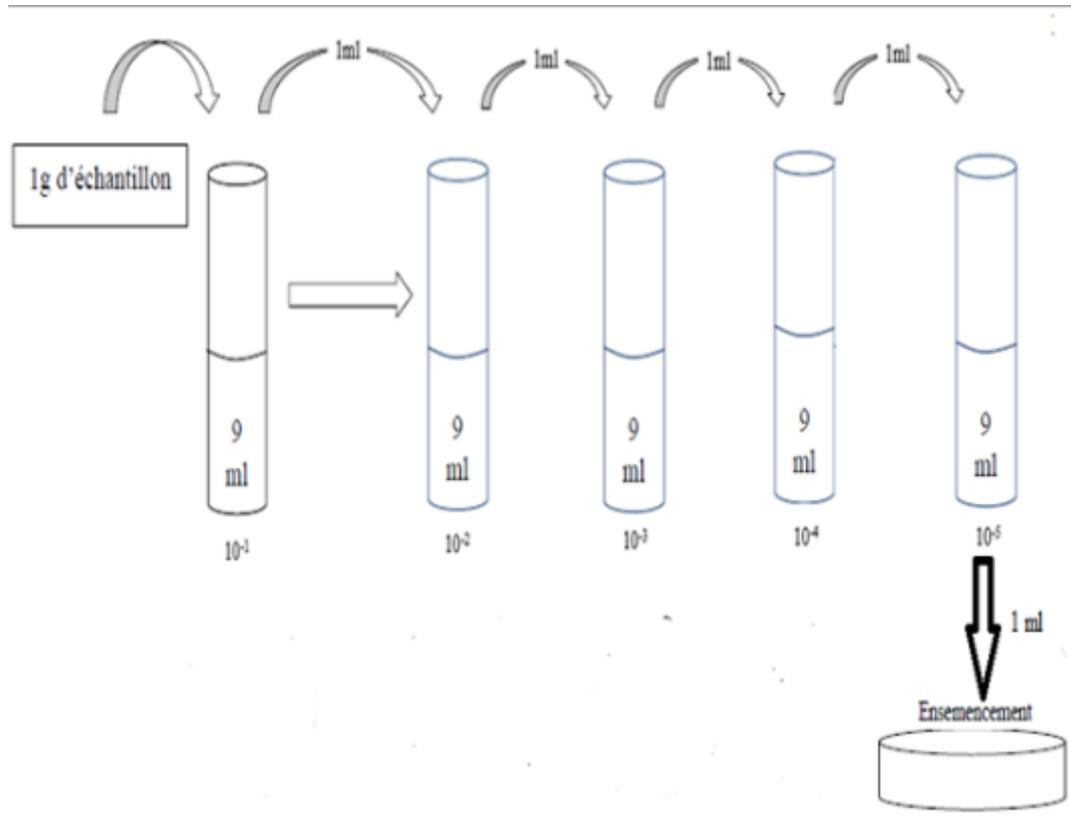
Milieu de Bennett (contenant de la novobiocine) (voir annexe) (Wakisaka et al. 1982)

Après autoclavage et refroidissement des milieux à une température d'environ 45°C, 5 µg/ml d'actidione et 5 µg/ml de rifampicine sont aseptiquement supplémentés au milieu de culture.

##### **3.1.2 Préparations des dilutions décimales**

Des échantillons (1g) de sol séché à l'air ont été mélangés avec de l'eau distillée stérile (9ml). Les mélanges ont été agités vigoureusement à l'aide d'un vortex pendant 1 h puis laissés reposer pendant 1 h. Des portions (1 ml) de suspensions de sol (diluées à 10<sup>-1</sup>) ont été transférées dans 9 ml d'eau distillée stérile et ensuite diluées à 10<sup>-3</sup> et 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup> (figure 21) (Williams, et al., 1971).

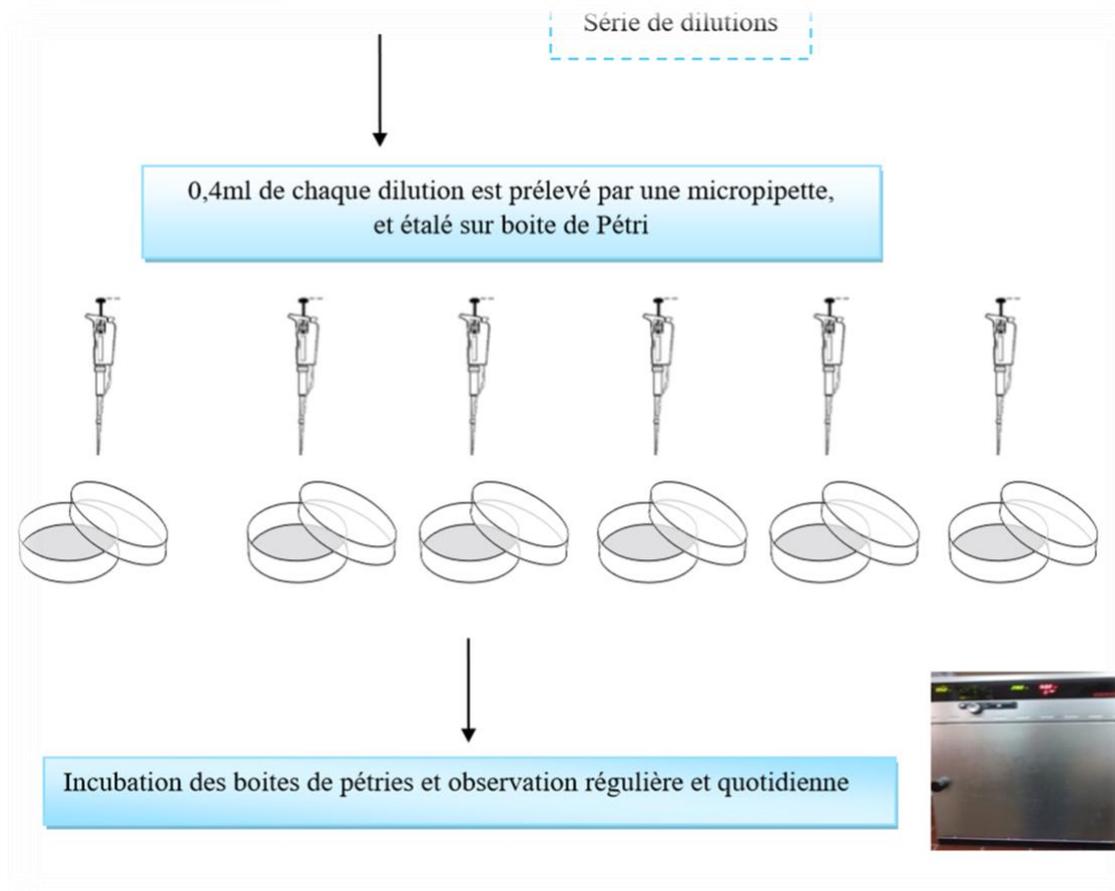
L'utilisation de la technique de dilution par plaque est courante, les échantillons d'eau étant soit dilués soit directement incorporés dans un milieu approprié( **SaiTerman et Morris** ,1962)



**Figure 21 : Préparation des dilutions de sol (Delarras, 2014)**

### **3.1.3 Ensemencement et incubation**

Les solutions diluées ont été retenues pour l'ensemencement, on ensemence 0.1 ml (en double) de chacune des dilutions sur les milieux correspondant. Les boîtes ainsi ensemencées sont ensuite mises à incuber dans une étuve à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 7-21 jours (Figure 22) (**Rahman et al, 2011**)



**Figure 22 : Les étapes suivies pour l'isolement des actinomycètes à partir d'échantillons de sol .**

### **3.1.3.1 *Ensemencement en masse***

Cette méthode consiste à déposer tout d'abord 01 ml de la dilution  $10^{-4}$  ou bien  $10^{-5}$  dans une boîte de Pétri, puis coulé le milieu de culture en surfusion. Les boîtes sont agitées par un mouvement circulaire lent afin d'homogénéiser le contenu des boîtes, ensuite incubées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 07 -21 jours.

### **3.1.3.2 *Ensemencement en surface***

Cette méthode consiste à déposer 01 mL de dilution  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  de chaque échantillon à la surface du milieu de culture, puis étalé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les boîtes sont incubées pendant 7-21 jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Dénombrements :

Pour le dénombrement, seules les boîtes de Pétri qui contiennent un nombre de colonies comprises entre 30 et 300 sont prises en compte

$$Ufc = \frac{\sum \text{colonies}}{Vml(n1+0.1n2) \times d1}$$

UFC: Unité formant colonies

$\sum$  Colonies: Somme des colonies des boîtes interprétables

Vml: Volume de solution du produit déposé dans les boîtes

n1: nombre de boîtes considérées à la 1<sup>ère</sup> dilution retenue

n2: nombre de boîtes considérées à la 2<sup>ème</sup> dilution retenue

d1: Facteur de dilution de la première dilution retenue

## 4. purification et Conservation des souches d'actinomycètes

Les colonies présentant les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur le milieu de culture, cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures.

Une nouvelle conservation des isolats d'actinomycètes de courte durée a été effectuée à 4 °C sur gélose inclinée en tubes à essai ou sur milieu de culture à raison d'un repiquage toutes les 4 semaines. Pour la conservation de longue durée, les cultures d'actinomycètes de deux semaines en milieu liquide sont additionnées de glycérol stérile d'une concentration de 15% (v/v) et sont immédiatement congelées.

## 5. Identification des actinomycètes :

### 5.1 Caractérisations macroscopiques :

Cette étude consiste à noter aux 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30°C, la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycéliums aérien et du substrat, qui varie d'une souche à une autre et d'un milieu à un autre sont définis à l'aide de la charte de couleurs (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC -NBS) de Kelly et Judd (1976) ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans les milieux (s'ils sont sécrétés).

Les colonies d'actinomycètes qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement ont été examinées à l'œil nu et à l'aide d'une loupe optique binoculaire. aussi, Ce test permet d'évaluer

l'importance de la croissance (très importante, importante, moyenne, faible ou absente)(**Shirling et Gottlieb, 1966**)

## **5.2 Caractérisations microscopiques**

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, qui a été mise au point en 1884 par un bactériologiste Danois Hans Christian Gram.

Cette étude est essentielle pour la reconnaissance des genres. Elle est réalisée à l'aide d'un microscope optique pour toutes les souches. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri (aux grossissements x10 et x40) et ce, pour étudier les structures en place sans les altérer (mycélia et fructification). Elles consistent à observer la sporulation du mycélium aérien, la fragmentation ou non du mycélium du substrat, etc.

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat(**William et al, 2010**)

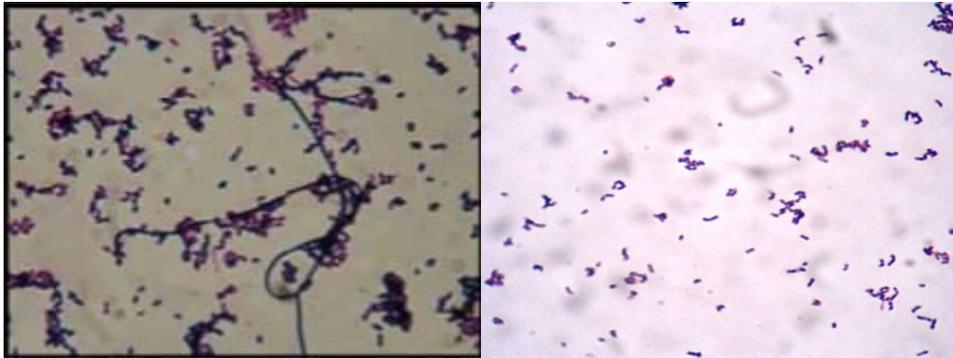
Les principales étapes de cette coloration sont les suivantes :

- Des frottis sont réalisés à partir des colonies des actinomycètes bien isolés à l'aide d'une anse de platine dans des conditions aseptiques.
- Les bactéries sont émulsionnées dans une gouttelette d'eau distillée.
- Les frottis sont fixés par une flamme à l'aide d'un bec bunsen.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane 1 minute, puis laver à l'eau distillée.
- Ensuite, recouvrir du lugol 1 minute, puis laver à l'eau distillée.
- Décolorer bien à l'alcool pendant 30 secondes, puis rincer à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée 1 minute, puis laver à l'eau.
- sécher entre deux feuilles de papier buvard

Observation sous un objectif à immersion (X10, X40, X100) d'un microscope optique (**Prescott et al., 2010**). L'examen, nous permet de déterminer quelques caractères morphologiques des Actinomycètes, concernant le type de Gram+ et des indications sur leurs formes des filaments et présence ou absence de spores isolées (**William et al., 2010**)

Cette coloration permet de remarquer les formes morphologiques des différentes bactéries et indique le Gram + et Gram-.

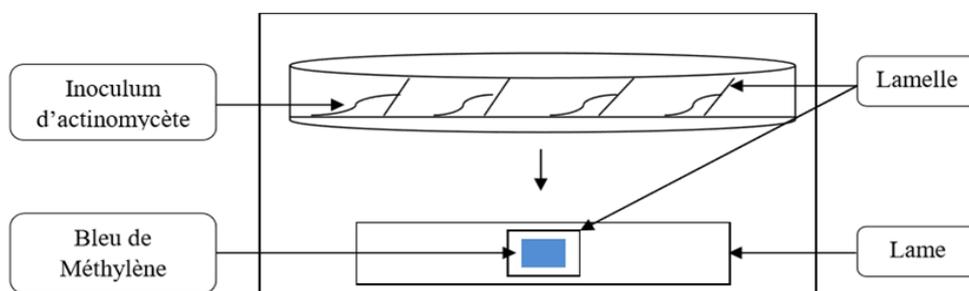
- ❖ Les bactéries « Gram positif» gardent leur coloration violette après décoloration par l'alcool( figure 23)
- ❖ Les bactéries « Gram négatif» décolorées par alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses



**Figure 23 : observation microscopique des souches d'actinomycètes après coloration de gram**

### 5.3 Culture sur lamelle (Cross 1989)

L'observation in situ de la morphologie des chaînes de spores et l'étude du mycélium aérien et du mycélium de substrat ont été effectuées selon la technique décrite par Cross (1989). Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélose ISP3 de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec celui-ci (Figure 24). Une goutte de chaque inoculum des souches est déposée sur la lamelle en contact avec le milieu gélosé. Après 21 jours d'incubation à 30 °C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose entraînant quelques fragments du mycélium, elle est ensuite déposée sur la lame avec une goutte de bleu de méthyle et examinée au microscope optique à grossissement (Gx100) .



**Figure 24: présentation schématique de la technique de culture sur lamelle**

## 6. La mise en évidence des activités :

### 6.1 Recherche de l'Activité antifongiques -:

L'activité antifongique des souches d'actinomycètes est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux et/ou des levures. Ces microorganismes indicateurs sont choisis sur la base de leur intérêt dans les infections humaines ou animales ainsi que pour leur manifestation dans les problèmes technologiques ou encore leur pouvoir mycotoxinogènes. On peut citer quelques espèces les plus utilisées dans des travaux réalisés à l'échelle nationale ou internationale à savoir *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus Flavus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces boulardii*.

#### 6.1.1 Préparation des suspensions fongiques :

Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu PDA et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une suspension sporale des souches cibles est préparée en grattant la surface de la culture à l'aide d'une spatule stérile afin de récupérer les spores et les mélanger par vortex à 10 ml d'eau physiologique stérile.

#### 6.1.2 Technique en double couche

La méthode en double couche consiste à ensemercer ponctuellement le milieu de culture coulé en boîtes de Petri (de 90 mm de diamètre) avec les souches d'actinomycètes isolées et purifiées.

Après incubation des boîtes à 28°C de 7 à 12 jours, on coule à la surface 2.5 ml de milieu semi-solide de Sabouraud préalablement ensemençé avec l'une des isolats tests (1ml) d'incubation : 9 ml de milieu, réincubées à 37°C pendant 24-48h. On obtient ainsi une concentration finale, à la surface de chaque boîte (Peterson, 1954).

#### 6.1.3 Technique des cylindres d'agar

Dans cette méthode les souches d'actinomycètes sont ensemençées en stries serrées à la surface de différents milieux gélosés.

Après incubation à 28°C pendant 7 à 12 jours, on prélève à l'aide d'un emporte-pièce, pour chaque souche sur les milieux utilisés, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre. Ces cylindres sont déposés à la surface d'un milieu Sabouraud en double couche ensemençé selon la technique décrite précédemment (Shomura et al. 1979)

Les isolats d'actinobactéries libèrent leurs métabolites secondaires dans le milieu au cours de leur croissance. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4 °C pendant 2h avant d'être incubées à 25°C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 37°C.

## 6.2 Recherche de l'activité antibactérienne

Les souches d'actinomycètes obtenues en cultures pures sont testées pour la production de substances à activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries-tests référencées auprès de l'American Type culture collection (ATCC) tels que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*. Elles sont constituées de bactéries à coloration de Gram positive, et Gram négative.

Pour chaque bactérie-test, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 18-24 heures. L'inoculum standard des bactéries-test est préparé comme suit : mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile. Le tout est homogénéisé et l'opacité de la suspension bactérienne ainsi obtenue doit être équivalente à une densité optique de 0,1-0,2 à une longueur d'onde de 600 nm. L'activité antibactérienne est testée par la technique des cylindres d'agar.

### 6.2.1 Technique des cylindres d'agar :

Cette technique consiste à ensemencer en stries serrées les souches d'actinomycètes sur deux milieux gélosés : le milieu M1 et le milieu M2. Les souches d'actinomycètes sont incubées à 28 °C pendant 12 jours. À l'aide d'une emporte-pièce stérile, des cylindres de gélose de 6 mm qui sont déposés sur milieu Mueller-Hinton ensemencé en sur-couche.

La couche supérieure faiblement gélosée est ensemencée en masse avec l'inoculum de bactéries-tests.

Toutes les géloses ensemencées, portant des cylindres sont laissées 2 heures à 4 °C pour permettre une diffusion des molécules actives. Elles sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibitions apparues sont mesurés en mm (**Reghioua, et al ., 2006**), ce diamètres des zones d'inhibition apparus autour des cylindres d'actinomycètes sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (**Boughachiche, 2005**).

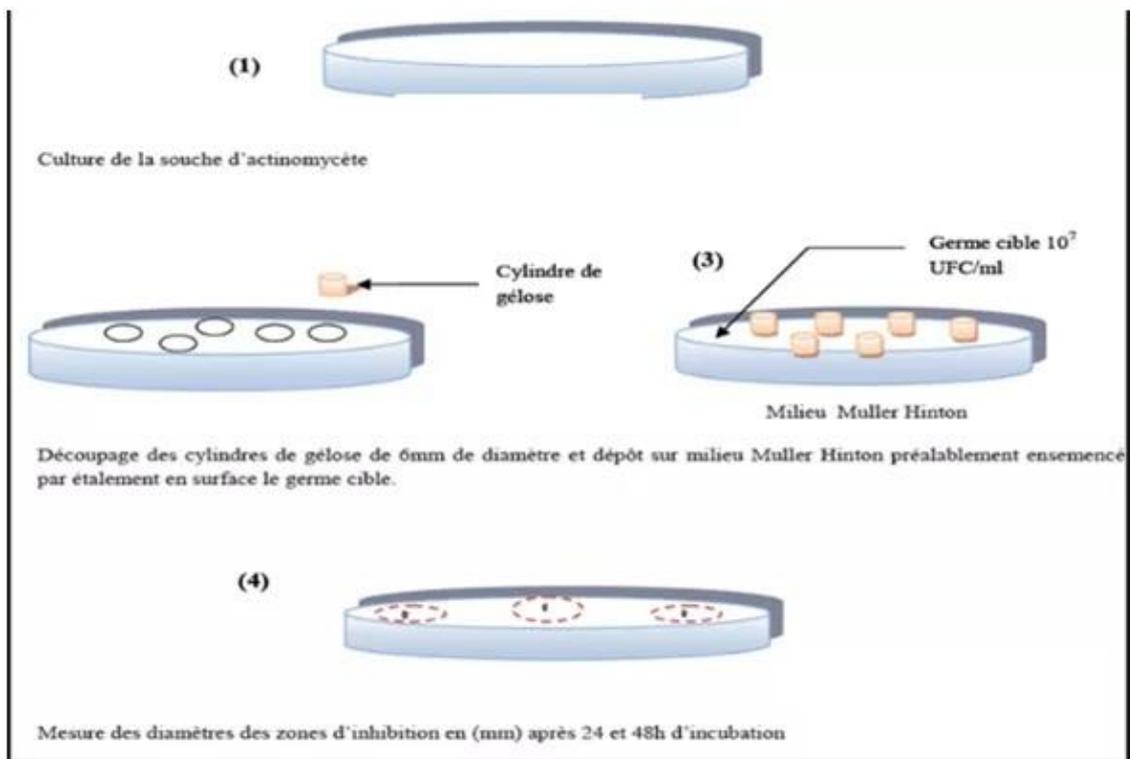


Figure 25 : technique de cylindre d'agar

### 6.3 Recherche del'activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro de nos extraits a été réalisée par des techniques différentes à savoir: le piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur

#### 6.3.1 Le piégeage du radical du DPPH

Le test de DPPH basé sur la mesure de la capacité antioxydante des extraits des actinomycètes à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ( $\text{DPPH}^\bullet$ ) et le réduire en ( $\text{DPPH-H}$ ) avec changement de couleur du violet au jaune (Majhenic, et al. 2007).

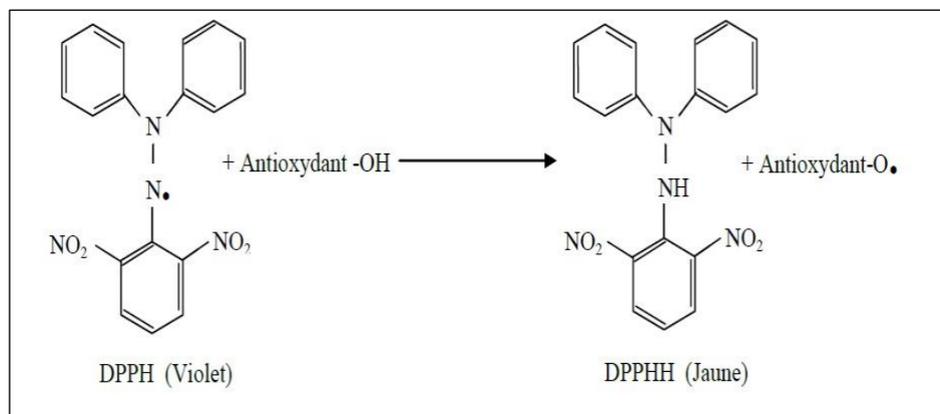


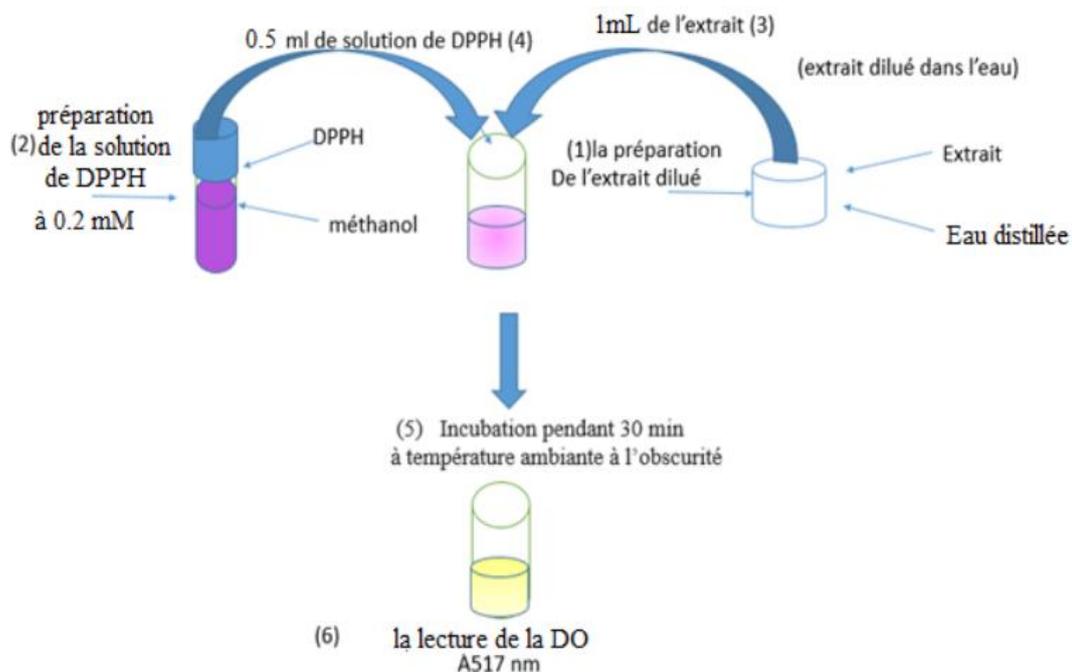
Figure 26 : Réaction de test DPPH (2,2Diphényl1 picrylhydrazyl) (Congo, 2012).

Un aliquote de 1 ml de solution de DPPH 0,1 mM dans de l'éthanol et 0,5 ml des différentes concentrations des extraits est mélangée. Le mélange est homogénéisé et on l'a laissé atteindre un état d'équilibre à la température ambiante pendant 30 min dans l'obscurité. en mesurant l'absorbance à 517 nm et le piégeage de radical de DPPH est calculé selon l'équation suivante (Zhao et al., 2006):

$$\% \text{ inhibition du DPPH} = [(Ac - Ae) / Ac] \times 100$$

**Ac:** Absorbance du control.

**Ae:** Absorbance de l'échantillon



**Figure 27 : Protocole expérimentale pour la mesure du piégeage du radical DPPH° (Congo, 2012)**

### 6.3.2 Etude du pouvoir réducteur

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de (Fe<sup>3+</sup>) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) dans un milieu acidifié par l'acide trichloracétique (TCA). Cette réaction se traduit par le virage de la couleur jaune du Ferricyanure de potassium vers la couleur bleu verte, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur (Li et al. 2009).

Selon la technique d'Oyaizu (1986) on a mélangé 0,5 ml de l'extrait et tout d'abord mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH 6,6 et 2,5 ml de ferricyanure de potassium

(K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) à 1%. Après incubation pendant 20 minutes à 50°C, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% ont été ajoutés au mélange, puis une centrifugation est effectuée à 3000 tr / min pendant 10 minutes.

Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions avec FeCl<sub>3</sub> (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm (Zeng et al., 2011)

### **6.3.3 Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) :**

Le principe de ce test est basé sur la conversion de NO en acide nitrique et le produit final réagit avec le réactif de Griess pour former un colorant azoïque violet. La production d'oxyde nitrique à partir de nitroprusside de sodium était mesurée selon Kang et al., On mélange (1ml) de solution nitroprussiate de sodium avec (1ml) d'extrait à différentes concentrations puis on incube le mélange à 25°C pendant 180 min.

Après l'incubation, on prend 0.5 ml du mélange et on l'ajoute 0.5 ml de réactif de Griess (On a commencé ce travail par la préparation de toutes les solutions, dont en on a besoin. Qui sont : la solution de nitroprusside de sodium (5m M), le réactif Griess dont leur composant sont : 1% de sulfanilamide, 2% d'acide phosphorique et 0.1% de naphthylène diamine dichlorohydrate. ) et l'absorbance a été prise à 546 nm. La solution étalon est le nitrite de sodium traité de la même manière avec le réactif de Griess

## **7. Extraction des métabolites**

Pour la récupération des métabolites un solvant organique a été utilisé. Un volume de ce dernier équivalent à celui du milieu de culture est rajouté puis le tout est bien mélangé. Les extraits ont été récupérés, à l'aide de seringue stérile, après 2 heures d'incubation à température ambiante. La solution a été ensuite filtrée à travers un papier filtre pour l'élimination des cellules et autres débris (Sanglier et al., 1997)

### **7.1 Méthode d'extraction liquide-liquide**

Le filtrat liquide ainsi obtenu est extrait au solvant actif de l'acétate d'éthyle. Le culot et le surnageant ont été récupérés séparément dans un bécher. Après, le surnageant a été récupéré en utilisant du papier filtre filtré par Whatman n°1. Après filtration, le volume égal d'acétate d'éthyle a été mélangé avec le filtrat et secoué vigoureusement à 2 h pour une extraction liquide-liquide complète. A partir de l'extraction, la couche organique de l'extrait a été collectée et séparée de la couche aqueuse à l'aide d'une ampoule à décanter. La couche organique collectée

a été incubée à 30–45 °C avec évaporation pour recevoir des métabolites actifs (Ramachandran, et al.,2019). l'extrait dit « brut » est alors dissous dans 2ml du méthanol (Badji et al.,2005 ;Zitouni et al .,2005),pour être testées par la méthode de diffusion des puits contre les germes cibles le méthanol est utilisé comme témoin (-)

## **8. purification et caractérisation des souches**

L'extrait brut séché mélangé au DMSO de l'actinomycètes train actif a été partiellement purifié par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant du gel de silice pour plaque de CCM (Kumar et al., 2018) en utilisant du gel de silice pour plaque de CCM.

### **8.1 Mode opératoire de la CCM :**

Nous avons utilisé des plaques de gel de silice et des cuves de chromatographie ascendante. A l'aide d'une micropipette,des volumes de chaque extrait bruts sont déposés sur une plaque sous forme de spots. Les plaques sont séchées à froid à l'aide d'un séchoir ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec du solvant.

Les systèmes de solvants utilisés:

-Acétate d'éthyle-méthano

- acide acétique

L'atmosphère des cuves de chromatographie contient 100 mLde système de solvants.Après développement et lorsque le front du solvant aura parcouru une distance d'environ17 cm à partir du dépôt de l'échantillon, les plaques sont retirées des cuves puis séchées à température ambiante.Les chromatogrammes sont ensuite observés à l'œil nu et sous lumière ultraviolette pour localiser les taches présentant une absorbance

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme moyen de purification finale des antibiotiques obtenus.

### **8.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Pour évaluer qualitativement les molécules bioactives produites, un appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC Shimadzu) a été utilisé. L'HPLC est une technique qui permet de séparer les mélanges liquides en fonction de leur différence de solubilité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

-La colonne d'analyse est une colonne C18 (NUCLEOSIL 100-5)

-L'éluant est un mélange d'eau et de méthanol. Les extraits sont dissous dans 1 mL de méthanol ultrafiltré à l'aide d'un filtre en PTFE.

-une pompe avec une soupape de dosage et d'éluion en gradient à basse pression

-La détection a été réalisée au moyen d'un spectrophotomètre ultraviolet et à longueur d'onde variable « SPDM 10AVP »

- La longueur d'onde de détection a été fixée à 220 nm

- Le traitement des données se fait par un ordinateur couplé à l'HPLC à l'aide du logiciel

un logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données:« LabSolutions ». Le débit d'éluion utilisé est fixé à 1.2mL/min, avec détection à 220nm(longueur d'onde permettant de détecter l'ensemble des composés)

Les différentes fractions obtenues (matérialisées sous forme de pics sur les chromatogrammes) sont récupérées séparément par évaporation du solvant sous vide à 40°C puis testées par antibiographie afin de localiser celles qui sont actives.

### 8.3 Spectre UV-visible

Spectre UV-visible L'absorbance UV-visible est une méthode très largement utilisée pour l'analyse des composés chimiques. Cette technique est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. La région de l'UV s'étend de 10 nm à 400 nm mais les spectromètres UV usuels ne permettent le tracé des spectres que pour les longueurs d'onde comprises entre 200nm et 400nm (proche UV). Dans les régions UV et visible, les longueurs d'onde correspondant à des différences d'énergies  $DE = E_2 - E_1$  ( $DE = hc/\lambda$  avec  $\lambda$ : longueur d'onde de la radiation) qui affectent le domaine des transitions électroniques: passage d'une orbitale d'énergie  $E_1$  à une orbitale d'énergie  $E_2$  plus élevée. Le retour de l'état excité à l'état fondamental se fait par restitution sous forme de lumière de l'énergie absorbée. Le principe de dosage par spectrophotométrie UV-visible consiste à chercher l'absorbance à chaque valeur de la présence dans une même molécule de plusieurs de ces chromophores peut se traduire soit par une simple additivité si ces chromophores sont indépendants, soit par des effets bathochromes (déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde en UV ou vers le visible) et hyperchromes (augmentation du coefficient d'absorption moléculaire) lorsque ces chromophores sont conjugués. C'est le cas des systèmes polyénique ou aromatiques (Lindenmeyer et al. 1964)

## **8.4 Etude moléculaire :**

### **8.4.1 Extraction de l'ADN :**

L'ADN est extrait selon la technique de Provost et al., (1997). Dans un microtube contenant 500  $\mu$  L d'eau distillée qualité biologie moléculaire stérile est introduite des colonies à laquelle sont ajoutés 150  $\mu$  L de suspension d'extraction. Le mélange est agité en continu au vortex puis chauffé à 100°C dans un bain marie à sec pendant 30 minutes, puis centrifugé à 10 000 g pendant 8 minutes. Les surnageants contenant les ADN sont alors récupérés dans des microtubes stériles.

L'ADN extrait est amplifié, selon la méthode de Lascolat et Raoult (1998), par l'utilisation des amorces universelles (Eurogentec, Seraing, Belgium) suivantes:

-fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'),

-rP2 (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3')

L'amplification par PCR est réalisée dans un volume total de 50  $\mu$ l (45  $\mu$ l du mélange réactionnel et 5  $\mu$ l de l'ADN). Le mélange réactionnel contient: les dNTP (A, T, C et G) , Mg Cl<sub>2</sub> , « hot start polymerase », tampon, amorce fD1, amorce rP2 , eau pure, et l'ADN .

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur avec les étapes suivantes : dénaturation initial 15 mn à 95 °C, suivi par 35 cycles d'une dénaturation 1 mn à 95 °C, un alignement 30 s à 62 °C et une extension 1 mn à 72 °C, une étape d'extension supplémentaire 5 mn à 72 °C.

### **8.4.2 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Après amplification, les échantillons sont analysés par électrophorèse pendant 2 heures à 90 volts dans un gel d'agarose à 1.5% (Ultra pure, Bio-Rad Laboratories) en tampon TAE additionné de 0,5  $\mu$ g/mL de bromure d'éthidium (BETest un marqueur d'acides nucléiques), et en présence d'un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega). Après migration le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées.

### **8.4.3 Séquencage**

la séquence nucléotidique des produits PCR a été obtenue par la méthode de séquençage de Sanger (**Sanger, 1977**) adaptée par le kit de séquençage. Le mélange réactionnel contient: l'ADNr 16S, les amorces, les dNTP, la Taq polymérase et les ddNTP fluorescents. Les amorces utilisées pour déterminer la séquence nucléotidique étaient les mêmes que celles utilisées pour l'amplification PCR et pour l'analyse des produits séquencés.

Les séquences des fragments obtenus par les huit amorces utilisées ont été analysées et corrigées par le logiciel Chromas Pro (version 1.5.0). Les séquences de l'ADNr 16S des isolats d'actinomyces sont comparées avec les séquences de l'ADNr 16S des bactéries disponibles sur la base de données "GenBank" par l'utilisation du programme de comparaison des multi-séquences de nucléotides "BLAST". qui est un outil de recherche de régions de ressemblances



## **Résultats et discussion**

## 9. Résultats et discussion

Cette étude a été menée dans le but de mettre une comparaison de travaux (les articles) regroupent l'isolement des actinomycètes isolées de différentes régions.

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

### 1. Isolement

L'isolement des actinomycètes peut se faire à partir de différents sources naturels. Le sol représente le biotope le plus riche en ces microorganismes. Plusieurs travaux sont réalisés dans ce contexte. **Kitouni, et al., (2007)** ont réalisé un isolement à partir d'un sol salin de Sebkhah de Ain Melila. Un ensemble de 8 isolats est obtenu sur le milieu GLM (gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt). A partir du sol, toujours et en utilisant le milieu, **Harir et al., (2018)** ont obtenus 5 isolats seulement à partir d'un sol de la région aride de Okhdirà Béchar (tableau 9).

**Tableau 10 : Isolement d'actinobactéries par différents chercheurs :**

| Souche        | Région   | Méthode d'isolement   | Nombre d'isolat | Références              |
|---------------|--|---|-----------------|-------------------------|
| Actinomycètes | Sol des zones semi arides région de La Sebka de Ain M'lila                 | Supension-dilution et étalement sur milieu de la gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt (GLM ) | 12              | (Kitouni, et al., 2007) |
|               | Sol des zones aride région de m'sila (Msife)                               | Supension-dilution et étalement sur milieu de la gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt (GLM ) | 03              | (Harir et al., 2018)    |
|               | Sédiment de l'eau de mer région les zones de côtière d'égypte              | Supension-dilution et étalement sur milieu gélose à la caséine et l'amidon                                | 15              | Feriel, et al., 2015    |
|               | Sol d'écosystèmes forestiers (parc national ) région du nord-est de l'inde | Supension-dilution et étalement sur milieu gélose à la caséine et l'amidon                                | 35              | ( Thakur, et al.,2007)  |

**Feriel, et al., 2015, Thakur, et al.,2007** ont travaillé sur la même méthode des suspensions-dilutions en utilisant le milieu (GYM) (gélose à la caséine et l'amidon). L'isolement est réalisé, respectivement, à partir de sédiment de l'eau de mer des zones

côtières de l'Egypte et du sol d'écosystèmes forestiers dans la région du nord-est de l'Inde. Le nombre des isolats obtenus est de l'ordre de 15 à partir des sédiments et 35 à partir du sol forestier.

Les isolats d'actinomycètes utilisés dans cette étude sont choisis pour leur pouvoir antimicrobien remarquable par rapport aux autres. En effet Kitouni (2007) a utilisé GLM pour un isolement sélectif de 45 souches d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés.

D'après les résultats précédents, il semble être que le nombre des isolats trouvés se diffère d'un travail à l'autre, cela est dû principalement à la situation géographique si on parle du sol d'isolement des actinomycètes.

En Algérie, plusieurs études portant sur l'isolement des actinomycètes ont montré que les sols arides et semi arides, qui représentent un écosystème particulier, renferment un potentiel assez riche en actinomycètes tant du point de vue quantitatif de biodiversité et qualitative.

## 2. Identification des isolats

L'identification des souches, est une étape importante, qui a pour objectif de savoir l'espèce avec laquelle l'étude va être continue. L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques (figure 29), des souches d'actinomycètes est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

**Kitouni, et al., (2007)** ont rattaché la souche ES4, qui partage un pourcentage d'identité égale à 98 %, avec l'espèce *Streptomyces viridobrunneus*. Les espèces *Streptomyces caviscabies* et *Streptomyces setonii*, montrent une forte similarité avec la souche SS4 (99 %). Alors que l'espèce *Actinadura meyerii* présente le plus grand pourcentage de parenté avec l'isolat SS5 (98 %). **Harir et al., (2018)** ont identifié les souches isolées comme étant des *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces cyaneofuscatus*. **Feriel, et al., (2015)** ont rattaché les souches à montré la plus grande similitude avec *Streptomyces spp.* (100%). **Thakur, et al., (2007)** ont identifié les souches isolées comme des *Streptomyces spp.* (tableau 10).

La majorité des souches actives développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. Le mécanisme de la morphogenèse à fait l'objet d'une étude réalisée par **Kim et al. (2005)** sur *Streptomyces coelicolor*, il s'est qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium du substrat, la libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes démontré par l'apparition d'un mycélium aérien.

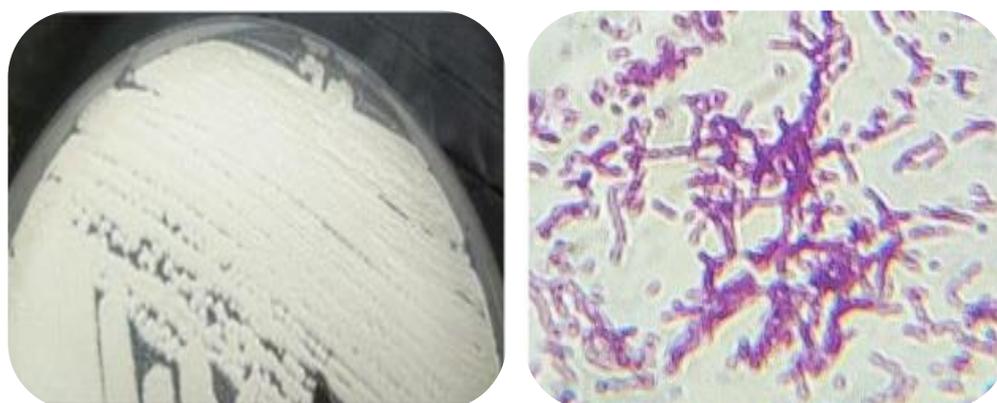
Selon **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent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

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

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

**Tableau11. Identification des isolats.**

| Genre                        | Méthode utilisé   | Résultats trouvées   | Références                  |
|------------------------------|---|--|-----------------------------|
| Streptomyces<br>Actinomadura | Morphologique,<br>chimiotaxonomique,<br>physiologique et<br>moléculaire | <i>S. viridobrunneus</i><br><i>S. caviscabies</i> ,<br><i>S.setonii</i><br><i>Actimadura meyerii</i> | <b>Kitouni, et al.,2007</b> |
| Streptomyces                 | Morphologique,<br>physiologique et<br>moléculaire                       | <i>Streptomyces ambofaciens</i> ,<br><i>S. cyaneofuscatus</i>  | <b>Harir et al., 2018</b>   |
| Streptomyces                 | Morphologique,<br>physiologie et<br>moléculaire                         | <i>Streptomyces spp</i>  | <b>Feriel, et al., 2015</b> |
| Streptomyces                 | Morphologique et<br>physiologique                                       | Streptomyces   | <b>Thakur, et al.,2007</b>  |



**Figure 28 : Observation microscopique d'actinobactérie (Gr. x1000) après coloration de Gram (Harir et al., 2018)**

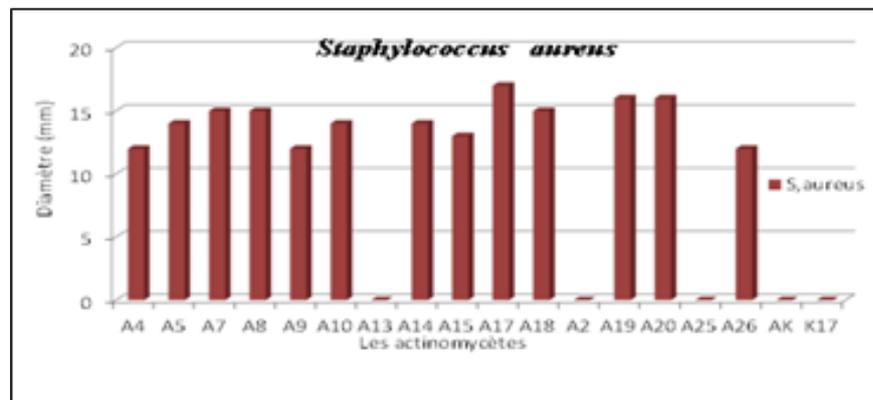
### 3. Activité antimicrobienne

Tableau12. Activités antimicrobiennes

| Genre                     | Méthode  | Souche testé                 | Activité         | Références                  |
|---------------------------|--|------------------------------|------------------|-----------------------------|
| Streptomyces actinomadura | Technique des cylindres d'agar                   | E. coli ATCC                 | 04               | <b>Kitouni, et al.,2007</b> |
|                           |  | <i>s.aureus</i>              | 08               |                             |
|                           |  | <i>Candida albicans</i>      | 02               |                             |
|                           |  | <i>Fusarium osysporum</i>    | 01               |                             |
| Streptomyces              | Technique des cylindres d'agarde stries croisées | <i>Staphylococcus aureus</i> | Activité positif | <b>Harir et al., 2018</b>   |
|                           |  | <i>Candida albicans</i>      |                  |                             |
|                           |  | <i>Fusarium osysporum</i>    |                  |                             |
| Streptomyces              |  | <i>Bacillus subtilis</i>     | 11               | <b>Feriel, et al., 2015</b> |
|                           |  | <i>Candida albicans</i>      | 02               |                             |
|                           |  | <i>Aspergillus niger</i>     | 02               |                             |
| streptomyces              | Techniques des puit                              | <i>Staphylococcus auerus</i> | 12               | <b>Thakur, et al.,2007</b>  |
|                           |  | <i>Candida albicans</i>      | 11               |                             |
|                           |  | <i>Fusariumosysporum</i>     | 06               |                             |

Pour déterminer les spectres antimicrobiens des actinomycètes isolés, les chercheurs ont utilisées des microorganismes cibles catalogués dans des collections mondiales telles que l'American Type Culture Collection (ATCC) et autres, pour faire un screening antimicrobien de l'ensemble des souches isolées.

Trois méthodes différentes sont utilisées pour étudier l'effet antagoniste des actinobactéries. La technique des cylindres d'agar est généralement employée pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien. C'est le cas pour **Kitouni, et al. (2007)** et **Harir et al., (2018)**. La méthode des stries croisées et celle des puits sont aussi utilisées vis à vis de différentes souches pathogènes (bactéries et champignons). Les résultats obtenus sont variables, ils montrent un effet inhibiteur important contre les bactéries par rapport aux champignons, ainsi vis à vis des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négative. La méthode de cylindre d'agar se prête mieux à la détermination de la sensibilité des souches aux molécules bioactives produits par des actinomycètes.



**Figure 29 : activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes contre *Staphylococcus aureus* (Belgacem, 2018)**

**Tighridet (2011)** et **Boucheffa (2011)** ont obtenu une activité importante de leurs isolats actinomycétales contre le genre *Aspergillus*. **Morakhchi (2011)** qui a travaillé sur l'activité antagoniste des souches *streptomyces* isolées à partir du lac Oubeira a pu obtenir des résultats satisfaisants contre l'espèce *Aspergillus niger*.

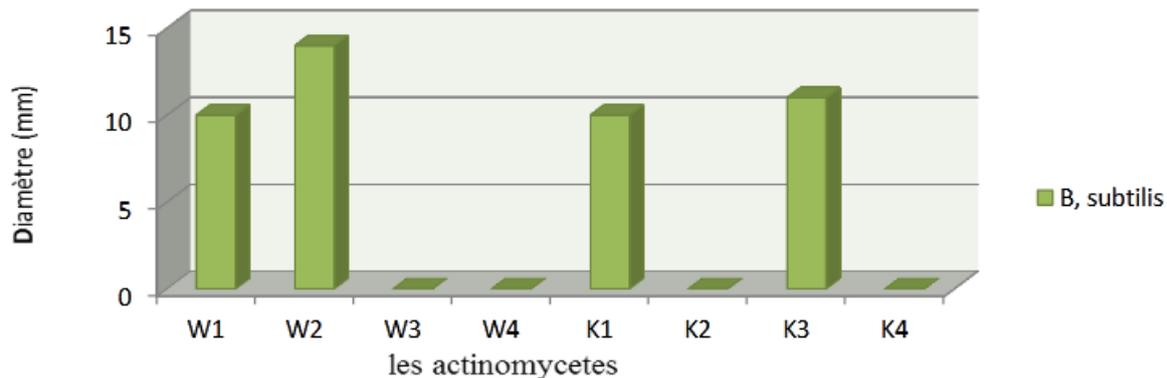
**(Augustine et al., 2005)** montre que les souches filamenteuse du genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives produites par les actinomycètes.

**Zerizer et al. (2005)** ont mentionnée que parmi 10 isolats de sols arides de la région de Biskra seule 2 souches actinomycétales sont actives contre *E. coli* avec des zones d'inhibition de 12 et 18 mm de diamètres. Les résultats obtenus par **Oskay et al., (2004)** ont montrés que sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie,

seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm.

**Messaoudi (2013)** qui cite que 8 parmi 18 de ses isolats actinomycètes ont été active contre cette bactérie avec un diamètre de variant entre 07 à 12 mm maximum.

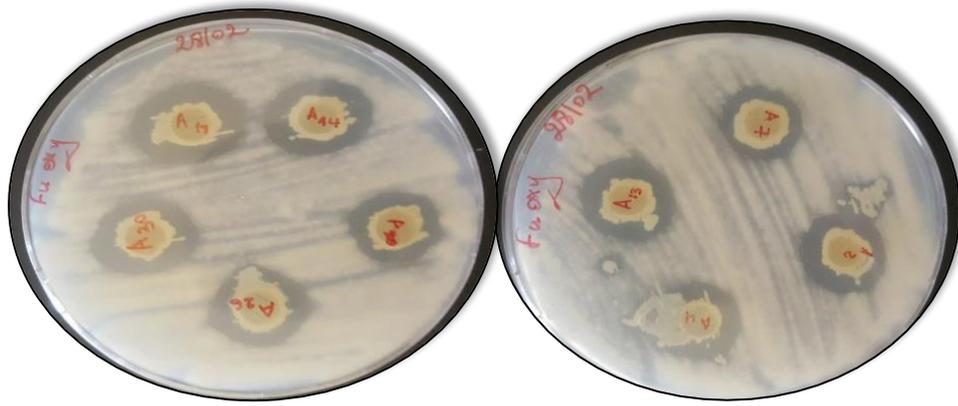
**Figure 30 : activité inhibitrice de nos actinomycètes contre B.subtilis( Boutouta, B, subtilis**



**2019)**

L'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à une autre. D'autre part pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une souche bactérienne à une autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (**Boughachiche et al., 2005**).

En effet, **Kitouni, et al.,(2007)**ont trouvé une activité de 04 isolats contre *E. coli*, 08 contre *Staphylococcus aureus*, 02 contre *Candida albicans* et 01 contre *Fusarium osysporum*. **Thakur, et al., (2007)** ont trouvé une activité antifongique de l'ordre de 11 contre *Candida albicans*, 12 isolats ont montrés une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* et 06 contre *Fusarium osysporum*. Ces variations de nombre d'activités sont dues au fait qu'une souche d'actinomycètes peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes avec différents modes d'action selon la composition du milieu de culture.



**Figure 31 : Illustration du test des cylindres d'agar de souches d'actinomycètes vis-à-vis des champignons cible *Fusarium oxysporum*(kitouni, et al., 2007)**

#### **4. Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction**

Les molécules bioactives sont des métabolites secondaires non essentiels pour la croissance et la reproduction de certains microorganismes mais sont une forme de défense. Ces molécules actives sont généralement extracellulaires et leur purification à partir de surnageant de culture complexe a besoin de l'application de divers techniques de séparation telles que d'extraction par Solvant, la précipitation chimique, HPLC, les études spectroscopiques... etc. Le nombre de techniques à utiliser dépend de la nature de la molécule.

L'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**)



**Figure 32 :étapes d'extraction des métabolites d'actinomycètes après fermentation sur milieu solide(Belgacem, 2018)**

La majorité des auteurs ont utilisé pour l'extraction des antibiotiques, la technique d'extraction liquide-liquide, par lessolvants organiques.Des cultures liquides sont réalisées dans des Erlenmeyers pour chaque souche. Le filtrat de culture subira une extraction par des solvants organiques de différentes polarités tels que: l'hexane, la dichlorométhane, n-butanol et l'acétate d'éthyle et cela pour choisir le meilleur solvant d'extraction de point de vu qualitative (la molécule qui représente la plus important activité), et quantitative.

**Tableau 13 :Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction**

| Genre                        | Méthode utilisé            | Solvants utilisé                                       | Références                  |
|------------------------------|----------------------------|--|-----------------------------|
| Streptomyces<br>Actinomadura | Extraction liquide-liquide | le chloroforme, l'hexane et l'isoamyl acétate)         | <b>Kitouni, et al.,2007</b> |
| Streptomyces                 | Extraction liquide-liquide | hexane, dichlorométhane, N-butanol et acétate d'éthyle | <b>Harir et al., 2018</b>   |
| Streptomyces                 | Extraction liquide-liquide | acétate d'éthyle                                       | <b>Thakur, et al.,2007</b>  |

**Harir et al., (2018)** ont trouvé que l'extrait brut issu par l'extraction d'éthyle acétate montre une meilleure activité antimicrobienne par rapport aux autres solvants organiques testés. **Kitouni, et al., (2007)** ont choisi l'hexane et l'isoamyl acétate comme les meilleurs solvants pour l'extraction des molécules bioactives, **Thakur, et al., (2007)** ont montré que l'acétate d'éthyle présente des meilleurs résultats comme solvant d'extraction.

## **5. Caractérisation et purification des principes actifs**

Les molécules bioactives présentes dans les extraits testés, sont analysés et purifiés par différentes techniques de caractérisation à savoir les techniques chromatographiques (figure 33), l'HPLC...etc.

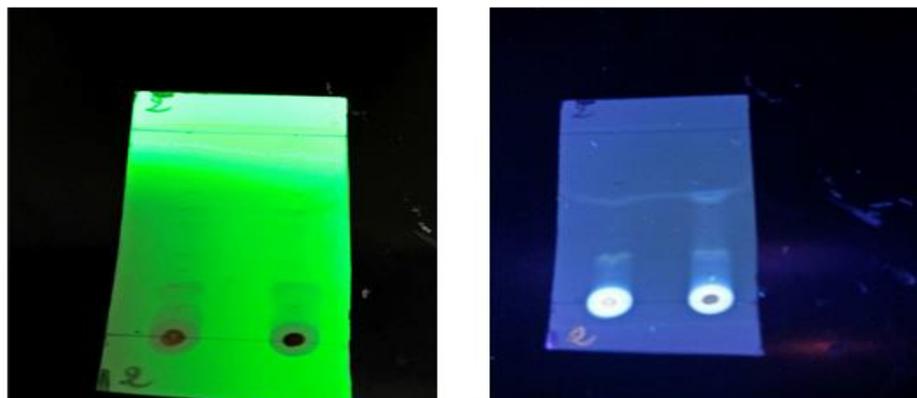
**Kitouni, et al., (2007)** ont utilisés la chromatographie sur papier, spectres UV-Visible et HPLC. L'absence de caractéristiques des polyènes pour tous les extraits actifs a permis de montrer que les molécules bioactives produits par les souches isolées sont de structure non polyénique. **Harir et al., (2018)** ont utilisés pour la purification de molécules

actifs différentes techniques : spectrométrie de masse, spectre UV et infra rouge et RMN ils ont abouti que les antibiotiques purifiés sont hydrophobe de nature non polyénique.

**Thakur, et al., (2007)** ont utilisés pour la caractérisation partielle de molécules actifs, deux techniques spectrométrie de masse et spectre UV, ils ont abouti que il ya une présence d'antibiotique de type ergostérol- polyène , et des composés actif non polynique.

**Tableau 14: Caractérisation et purification des principes actifs**

| Genre                        | Méthode utilisé  | Résultat obtenus  | Références                   |
|------------------------------|--|---|------------------------------|
| Streptomyces<br>Actinomadura | chromatographie sur papier, spectres UV-Visible et HPLC  | Les molécules produits sont de structure non polyénique.                          | <b>Kitouni, et al., 2007</b> |
| Streptomyces                 | spectrométrie de masse, spectre UV et infra rouge et RMN | antibiotique purifier sont hydrophobe de nature non polyénique                    | <b>Harir et al., 2018</b>    |
| Streptomyces                 | spectrométrie de masse spectre UV                        | L'antibiotique extrait est de nature polyénique, des composés actif non polynique | <b>Thakur, et al., 2007</b>  |



**Figure 33 :Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts sous UV à 254 et 365 nm.avec système Toluène - acide acétique(Belgacem, 2018)**

## **6. Les actinomycètes isolées de différents biotopes de l'Algérie**

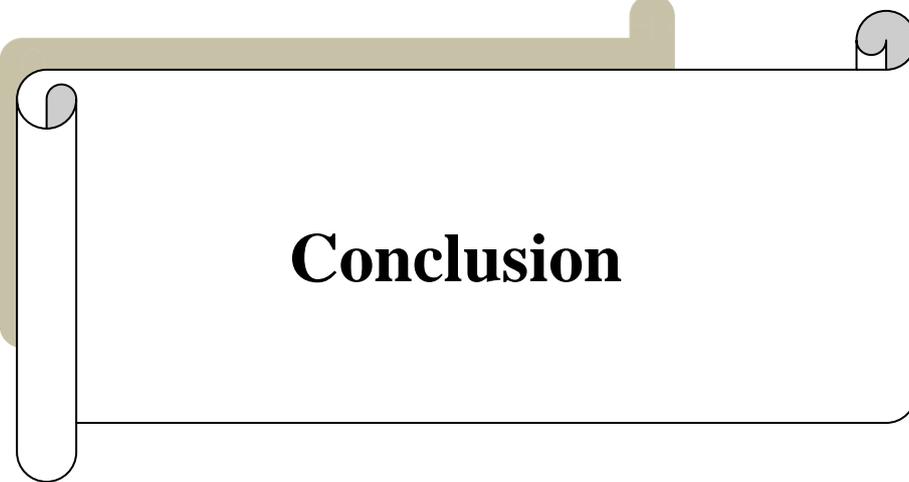
Les actinomycètes dans les sols du Sahara algérien, de part leur appartenance à des écosystèmes variés et particuliers, constituent un potentiel riche en actinomycètes. En effet, les sols des palmeraies ont montré une diversité plus importante que ceux par exemple des sols nus.

Une nouvelle souche d'actinomycètes, désignée *Saccharothrix algeriensis* a été isolée à partir d'un échantillon de sol collecté dans la palmeraie d'Adrar (Sud de l'Algérie). L'isolement a été réalisé suivant la méthode des dilutions sur milieu vitamine B – humique - agar complété avec du sulfate de streptomycine (10 µg mL<sup>-1</sup>) et de l'actidione (50 µg mL<sup>-1</sup>). En premier lieu, une analyse chimiotaxonomique et morphologique de la souche isolée a permis de la classer au sein du genre *Saccharothrix*. Une analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARN 16S et sur le taux d'hybridation ADN-ADN a ensuite indiqué que la souche appartenait à une nouvelle espèce nommée *Sa. algeriensis* dont elle est la souche type (Lamari et al. 2002a, b, Zitouni et al. 2004). *Saccharothrix algeriensis* a présenté une forte activité contre les champignons

phytopathogènes et mycotoxinogènes y compris *Aspergillus flavus* et contre les souches de la levure pathogène *candida albicans*.

Cette souche a produit plusieurs antibiotique à activité fortement antifongique et antibactérienne c'est le dichlorométhane du filtrat de culture de *Saccharothrix algeriensis* donnait, par chromatographie sur couche mince, deux taches jaune vif, actives contre les bactéries et les champignons. Ces antibiotiques font partie du groupe des dithiopyrrolones.

Aussi les sols de la Mitidja (**Badis, 1992**). Les travaux de **Boudjella** en 1994 ont montré que les sols sahariens renferment un nombre appréciable d'actinomycètes rares, tels que *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Oerskovia*, *Planobispora*. La capacité des actinomycètes sahariens à produire de nombreuses substances antibiotiques a été déjà soulignée (*Hacène et al., 1994; Sabaou et al., 1998*) et de nouvelles molécules ont ainsi été découvertes. Dans le laboratoire de microbiologie de l'ENS de Kouba, Alger.



## **Conclusion**

## Conclusion

L'importance des actinobactéries a été soulignée dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agroalimentaire. Les actinobactéries sont des microorganismes d'intérêts industriels par excellence. Ces microorganismes sont les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites secondaires.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en premier lieu, à la description de données bibliographiques concernant les actinomycètes, métabolites secondaires, deuxièmement notre travail est basé sur la synthèse des articles; étude comparative des résultats des études précédentes sur les isolats d'actinobactéries. Les souches isolées à partir du sol et marins de différentes régions de l'Algérie et du monde, où tous les auteurs ont isolé les actinobactéries en utilisant la même méthode, celle des suspensions-dilutions est la meilleure de point de vue isolation, dont 100 % des références choisies ont l'utilisée et d'autre part aux utilisations ou non des prétraitements de sol avant l'isolement ce qui a permis de donner un nombre plus important d'isolats.

Pour déterminer les activités antimicrobiennes des actinobactéries isolées, les auteurs ont utilisé trois méthodes, celle des stries croisées, la méthode des puits et méthode des cylindres d'agar, vis à vis différentes souches pathogènes, bactéries et champignons. Les résultats obtenus sont variables, ils montrent un large spectre vis à vis les bactéries que les champignons, dont le nombre d'activités obtenus sont variables.

L'identification des isolats actifs se fait par des tests morphologiques, chimiotaxonomiques, physiologiques et moléculaires où la dernière donne une connaissance plus précise des espèces étudiées. La majorité des auteurs ont rattaché leurs isolats au genre *Streptomyces*. Les actinobactéries sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque milliers d'antibiotiques isolés sont produits par les actinobactéries. Ceux-ci ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes.

La majorité des auteurs ont utilisé pour l'extraction de leurs antibiotiques, la technique d'extraction liquide-liquide, par des solvants organiques de différentes polarités. Ainsi que différentes techniques de caractérisation et de purification de molécules actifs. Les résultats ont montré que les antibiotiques extraits ont une nature différente: nature polyénique et non polyénique...etc.

Nous concluons alors que le Sol d'écosystèmes forestiers (parc national) région du nord-est de l'Inde est le milieu le plus riche en actinomycètes.

## Références bibliographiques



- Abbas I. H. (2006). Biological and biochemical studies of actinomycètes isolated from Kuwait saline soil-kuwait. *Journal of applied science research*, 2(10), 809-815.
- Abd Bagi M.E., Fahal A.H., Sheik H.E., Abdul Wahab O., Taifoor M.K. and Osmanr E.M. (2003). Pathological fractures in mycetoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97 (5), 582-584
- Abdel-Mageed, W. M., Milne, B. F., Wagner, M., Schumacher, M., Sandor, P., Pathom-aree, W., ...& Jaspars, M. (2010). Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Organic & biomolecular chemistry*, 8(10), 2352-2362
- Accoceberry, I., & Noël, T. (2006). Antifongiques: Cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Therapies*, 61(3), 195-199
- Ahlem, M. B. (2019). Isolement de quelques souches des actinomycètes productrices des amylases et évaluation de leurs paramètres cinétiques (Doctoral dissertation, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem).
- Akshatha, J. V., Prakash, H. S., & Nalini, M. S. (2016). Actinomycete endophytes from the ethno medicinal plants of Southern India: Antioxidant activity and characterization studies. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6(2), 166-172
- Aly, M. M., Tork, S., Al-Garni, S. M., & Nawar, L. (2012). Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. *African journal of microbiology research*, 6(6), 1125-1137
- Ambaye, A., Kohner, P. C., Wollan, P. C., Roberts, K. L., Roberts, G. D., & Cockerill 3rd, F. R. (1997). Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), 847-852.
- Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P.(2016).An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D., Jiang Y.(eds) Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications. Intech, Rijeka,Pp. 3-37

- Anderson, A. S., & Wellington, E. M. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 797-814
- Ara, I., Bukhari, N. A., Wijayanti, D. R., & Bakir, M. A. (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African journal of biotechnology*, 11(16), 3849-3857
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering*, 11(6), 1101-1110.
- Arima, K., KOHSAKA, M., TAMURA, G., IMANAKA, H., & SAKAI, H. (1972). Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I isolation and properties of tomaymyin. *The Journal of antibiotics*, 25(8), 437-444
- Arulpriya, P., Lalitha, P., & Hemalatha, S. (2010). Antimicrobial testing of the extracts of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Der pharma chemica*, 2(6), 78-83.
- Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., & White, R. P. (1985). Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(1), 86-98
- Avril, J, L., & al. 1992. Bactériologie clinique. 2 éd. Paris:ellipses. Pp. 511
- Azzeddine, B., Abdelaziz, M., Estelle, C., Mouloud, K., Nawel, B., Nabila, B., ... & Said, B. (2013). Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by *Streptomyces* sp. B-PNG23. *Archives of Biological Sciences*, 65(2), 549-558.

## B

- Baldacci, E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop*, 4, 633-646.
- Bastide, A., Manning, F., Harman, C., Lange, I., & Morrison, I. (1986). Évaluation échographique du liquide amniotique : issue des grossesses avec oligohydramnios sévère. *Journal américain d'obstétrique et de gynécologie*, 154 (4), 895-900
- Bawa, B., Bai, J., Whitehair, M., Purvis, T., & DeBey, B. M. (2010). Bovine abortion associated with *Nocardia farcinica*. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22(1), 108-111.
- Baynes, JW (1991). Rôle du stress oxydatif dans le développement des complications du diabète. *Diabète*, 40(4), 405-412

- Beaman, B. L., & Beaman, L. (1994). Nocardia species: host-parasite relationships. *Clinical microbiology reviews*, 7(2), 213-264.
- Béahdy, J. (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Advances in applied microbiology*, 18, 309-406.
- Becker, B., Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, 13(2), 236-243.
- Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E., & Lechevalier, H. A. (1964). Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Applied microbiology*, 12(5), 421-423.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885), 141-147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5, Whitman W B, Goodfellow M, Kampfer P, Busse H J, Trujillo M E, Ludwig W, and Suzuki K I, (Eds) (2012). Springer, 2<sup>nd</sup>
- Bhatnagar, I., & Kim, S. K. (2010). Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Marine drugs*, 8(10), 2673-2701
- Boukahili, A. B., Chachoua, H., & Hamames, M. (2020). Caractéristiques des actinomycètes et de certains de leurs métabolites bioactifs (antibiotiques et enzymes).
- Boucheffa, K (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polygéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire de Magister. En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira Bejaia. P : 3-15\*
- Brisson-Noël, A., Trieu-Cuot, P., & Courvalin, P. (1988). Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(Supplement\_B), 13-23.
- Brzezinski, R., Dery, C. V., & Beaulieu, C. (1999). *U.S. Patent No. 5,871,730*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office

## C

- Carey, J., Motyl, M., & Perlman, D. C. (2001). Catheter-related bacteremia due to *Streptomyces* in a patient receiving holistic infusions. *Emerging infectious diseases*, 7(6), 1043.
- Carey J., Motyl M. and Perlman D.C. (2001). Catheter-Related Bacteremia due to *Streptomyces* in a Patient Receiving Holistic Infusions. *Emerg. Infec. Dis.* 7 (6), 1043-1045.
- Cavallo, J. D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., & Garrabé, E. (2004). Bêtalactamines. *EMC-Maladies infectieuses*, 1(3), 129-202.
- Chakraborty, S., Raut, G., Khopade, A., Mahadik, K., & Kokare, C. (2012). Study on calcium ion independent  $\alpha$ -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3.
- Chelli, R. (2010). Etude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes autres que *Streptomyces*. Thèse de Magistère en Biologie. Université Mentouri Constantine. Algérie. 93 p.
- Chien, J. W., Kucia, M. L., & Salata, R. A. (2000). Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), 146-151.
- Chopra, I. Hlavaka, J. J. & Boothe, J. H. (1985). in *The Tetracyclines, Handbook of Experimental Pharmacology* Vol 78. Springer, Berlin 317–392.
- Choulet, F. (2006). *Evolution du génome des Streptomyces: transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- Chun, J., Blackall, L. L., Kang, S. O., Hah, Y. C., & Goodfellow, M. (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 127-131.
- Cidaria D, Borgonovi G, Pirali G. 1993. AB023, novel polyene antibiotics. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antifungal activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 46:251–254
- Collins, M.D., Pirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1977). Distribution of enaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol*, 100(2): 221–230

- Collins C.H., Yates M.D. and Uttley H.C. (1988). Presumptive identification of nocardiosis in a clinical laboratory. *J. App. Bacteriol.* 65, 55-59
- Conn V.M., (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.
- Conville, P. S., Brown, J. M., Steigerwalt, A. G., Lee, J. W., Anderson, V. L., Fishbain, J. T., ... & Witebsky, F. G. (2004). *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the “N. nova complex”. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 5139-5145.
- . Cross, T. (1982). Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Dev Ind Microbiol*, 23: 1–18.

## D

- Dastager, S. G., Dayanand, A., Li, W. J., Kim, C. J., Lee, J. C., Park, D. J., ... & Raziuddin, Q. S. (2008). Proteolytic Activity from an Alkali-Thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Current microbiology*, 57(6), 638-642.
- Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.
- Dekkers, JC, van Doornen, LJP et Kemper, HCG (1996). *Le rôle des vitamines et enzymes antioxydantes dans la prévention des dommages musculaires induits par l'exercice. Médecine du sport*, 21(3), 213-238. doi:10.2165/00007256-199621030-00005
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Djaballah, C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p.
- Duménil, G., & Sanglier, J. J. (1989). Physiologie de la production des antibiotiques. *Larpen JP et Sanglier JJ Biotechnologie des antibiotiques. Masson Edition Paris*, 195-217.

## E

- El-Sersy NA, Abd-Elnaby H, Abou-Elela GM, Ibrahim HAH, El-Toukhy NMK, et al. (2010) Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr J Biotechnol* 9: 6355-6364
- El-Tarabilya KA, Sivasithamparam K (2006) Actinomycètes non streptomycètes en tant qu'agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes fongiques du sol et en tant que promoteurs de croissance des plantes. *Sol Biol Biochem* 38:1505-1520
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology*, 32(1), 185-219
- Ettliger L., Corbaz R., and Httter R. (1958). - Zur Systematik der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, 31, 326-358
- Euzéby JP. (2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Evans, H. M., & Bishop, K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56(1458), 650-651.

## F

- Ferial, M. Rashad, F. M., Fathy, H. M., El-Zayat, A. S., & Elghonaimy, A. M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological research*, 175, 34-47
- Fjærvik, E., & Zotchev, S. B. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(4), 436-443.
- Flårdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 6(6): 564-71.
- Frändberg, E., Petersson, C., Lundgren, LN et Schnürer, J. (2000). *Streptomyces halstedii* K122 produit les composés antifongiques bafilomycine B1 et C1. *Journal canadien de microbiologie*, 46(8), 753-758.
- Fujiwara, T., Nagai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2010). JBIR-69, a new metabolite from *Streptomyces* sp. OG05. *The Journal of antibiotics*, 63(2), 95-96.
- FUNAYAMA, S., ANRAKU, Y., MITA, A., KOMIYAMA, K., & OMURA, S. (1989). *Etude structurale d'isoflavonoïdes possédant une activité antioxydante isolés du*

*bouillon de fermentation de Streptomyces sp. Le Journal des antibiotiques, 42(9), 1350-1355*

- Frändberg, E., Petersson, C., Lundgren, LN et Schnürer, J. (2000). *Streptomyces halstedii K122 produit les composés antifongiques bafilomycine B1 et C1. Journal canadien de microbiologie, 46(8), 753-758.*

## G

- Gandhimathi, R., Kiran, G. S., Hema, T. A., Selvin, J., Raviji, T. R., & Shanmughapriya, S. (2009). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiosis alba* MSA10. *Bioprocess and biosystems engineering, 32(6), 825-835*
- GAO. X; CASSIDY. A; SCHWARZSCHILD. M.A; RIMM. E.B; ASCHIRIO. A., 2012. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Journal of neurology, 78, 1138-1145, ISSN: 0028-3878.*
- GERSCHMAN, R. (1954). *Empoisonnement à l'oxygène et irradiation X : un mécanisme en commun. Glutathion, 288-291. doi:10.1016/b978-1-4832-2900-3.50030-4*
- Gilbert, C., & Boivin, G. (2005). *Résistance du cytomégalo virus humain aux médicaments antiviraux. Agents antimicrobiens et chimiothérapie, 49 (3), 873-883.*
- Goodfellow, M., Lacey, J. & Todd, C. (1987). Numerical classification of thermophilic streptomycetes. *J Gen Microbiol 133, 3135-3149*
- Goodfellow, M., & Dawson, D. (1978). Qualitative and quantitative studies of bacteria colonizing *Picea sitchensis* litter. *Soil Biology and Biochemistry, 10(4), 303-307.*
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology, 37(1), 189-216*
- Goodfellow, M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 33-2028). Springer New York
- Groupé, V., Frankel, J. W., Lechevalier, M. P., & Waksman, S. A. (1951). Antiviral properties of ehrlichin, an antibiotic produced by *Streptomyces lavendulae*. *The Journal of Immunology, 67(6), 471-482.*

## H

- Halliwell, B. (1994). *Radicaux libres et antioxydants : un point de vue personnel. Revues nutritionnelles, 52(8), 253-265.*

- Halliwell, B. (2006). *Stress oxydatif et neurodégénérescence : où en sommes-nous maintenant ? Journal de neurochimie*, 97 (6), 1634-1658
- Hardy, R. W., & Silver, W. S. (1977). A treatise on dinitrogen fixation. Section III, Biology. *A treatise on dinitrogen fixation. Section III, Biology*.
- Habbeche A, Saoudi B, Jaouadi B, Haberra S, Kerouaz B, et al. (2014) Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J Biosci Bioeng* 117: 413-421
- Hagedorn, C. 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:368–375
- Hassan U S S, Anjum K, Abbas S Q, Akhter N, Shagufta B I, Shah S A A, and Tasneem U. (2017). Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Journal: Environmental Toxicology and pharmacology. Elsevier B.V.* 49:34-47. Vol 49. Pp:3447.
- HATSU, M., SASAKI, T., MIYADOH, S., WATABE, H. O., TAKEUCHI, Y., KODAMA, Y., ...& KONDO, S. (1990). SF2487, a new polyether antibiotic produced by *Actinomadura*. *The Journal of antibiotics*, 43(3), 259-266
- Hodgson D A. (2000). Primary metabolism its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advanced. Microbiol physiology*. 42, 47-238.
- Holtz H.A., Lavery D.P., Kapila R. (1985). Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 102 (2), 203-205
- Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of Chitinase exhibiting antifungal activity against Phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66:434–442.
- Hulin, A., Deguillaume, A. M., Bretagne, S., & Bézie, Y. (2005). Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *Journal de Pharmacie Clinique*, 24(3), 125-138.

## J

- Jacob N, Poorna CA, Prema P (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Biores Technol* 99: 6697-6701.
- Jakimowicz D. (2007). Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Hig-Med. Dosw*-61:565-575

- Johnston, D. W., & Cross, T. (1976). Actinomycetes in lake muds: dormant spores or metabolically active mycelium?. *Freshwater Biology*, 6(5), 465-470.

## K

- Kapadia, M., Rolston, K. V., & Han, X. Y. (2007). Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *American journal of clinical pathology*, 127(4), 619-624.
- Kar S, Ray RC (2008) Statistical optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Pol J Microbiol* 57: 49-57
- Kato T (1994) Pigment bleu de Spiruline. *Nouvelle industrie alimentaire* 29 : 17-21.
- Keulen, G. V., Jonkers, H. M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., Wösten, H. A., & Wo, H. A. B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1455-1458
- Kelly, K. L. (1964). Color-name charts illustrated with centroid colors. *Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards, Chicago*
- Khan, M. R., & Williams, S. T. (1975). Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VIII: Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil biology and Biochemistry*, 7(6), 345-348.
- Kimura, K. I., & Bugg, T. D. (2003). Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. *Natural product reports*, 20(2), 252-273.
- Kim, S. B., Seong, C. N., Jeon, S. J., Bae, K. S., & Goodfellow, M. (2004). Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(1), 211-214.
- Kim, BS, Moon, SS et Hwang, BK (1999). *Isolement, identification et activité antifongique d'un antibiotique macrolide, l'oligomycine A, produit par Streptomyces libani*. *Revue canadienne de botanique*, 77(6), 850-858.
- Kirk P M., Cannon P F., Minter D W and Stalpers J A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. Edition 10. CAB International, Wallingford, UK
- Kitouni M., (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine (Algérie).pp 205.

- Kltzis, M. D., Gutmann, L., & Acar, J. F. (1985). In-vitro susceptibility of *Nocardia asteroides* to 21  $\beta$ -lactam antibiotics, in combination with three  $\beta$ -lactamase inhibitors, and its relationship to the  $\beta$ -lactamase content. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 15(1), 23-30.
- Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D. L., & Mankin, A. S. (1999). Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *Journal of molecular biology*, 294(1), 93-101.
- Kurz, M., & Guba, W. (1996). 3D structure of ramoplanin: a potent inhibitor of bacterial cell wall synthesis. *Biochemistry*, 35(38), 12570-12575.
- Kumar, A., Zhang, J. et Yu, F.-SX (2006). Réponse antivirale induite par le poly(I:C) agoniste du récepteur 3 Toll-like dans les cellules épithéliales cornéennes humaines. *Immunologie*, 117 (1), 11-21.

## L

- Lacey, J. (1973, January). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In *Society for Applied Bacteriology symposium series* (Vol. 2, pp. 231-251).
- LANIER, VC, PICKRELL, KL, & GEORGIADÉ, NG (1976). NEVI GÉANT CONGENITAL. *Chirurgie plastique et reconstructive*, 58 (1), 48-54
- Larpent, J. P., & Sanglier, J. J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol*, 66(9): 4084–4090.
- Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1967). Biology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1), 71-100.
- Lechevalier, M. P. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. *Actinomycete taxonomy*, 227-291.
- Lee, D. R., Lee, S. K., Choi, B. K., Cheng, J., Lee, Y. S., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2014). Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(12), 962-967.
- Le Minor, L., & Véron, M. (1989). *Bactériologie médicale*. Flammarion médecine-sciences.

- Leger, J. S., Begeman, L., Fleetwood, M., Frasca Jr, S., Garner, M. M., Lair, S., ...& Terio, K. A. (2009). Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. *Veterinary pathology*, 46(2), 299-308.
- Lerner, P. I. (1996). Nocardiosis. *Clinical infectious diseases*, 891-903.
- Leverage, X. (2009). *Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- Lichtman, H., Watson, J., Ginsberg, V., Pierce, JV, Stokstad, ELR et Jukes, TH (1949). *Vitamine B12b : quelques propriétés et son utilisation thérapeutique. Biologie expérimentale et médecine*, 72(3), 643-645. doi:10.3181/00379727-72-17528
- Lou, Z., Sun, Y. et Rao, Z. (2014). *Progrès actuels des stratégies antivirales. Tendances des sciences pharmacologiques*, 35 (2), 86-102
- Loucif, K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes.
- Lu, Y., & Yeap Foo, L. (2001). *Activités antioxydantes des polyphénols de la sauge (Salvia officinalis). Chimie alimentaire*, 75 (2), 197-202.
- Lum C. A. and Vadmal M. S. (2003). *Nocardia asteroides mycetoma. Ann. Clin. Labo. Sci.* 33, 329-333.
- LUSHCHAK, V., & GOSPODARYOV, D. (2005). *Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in. Cell Biology International*, 29(3), 187–192
- Lyons ,A. J.,Pridham ,T. G.(1971). *Streptomyces torulosus* sp. n., an unusual knobby-spored taxon. *Appl Microbiol*, 22(2): 190–3.

## M

- Mallikarjuna, K., Shanmugam, K. R., Nishanth, K., Wu, M. C., Hou, C. W., Kuo, C. H., & Reddy, K. S. (2010). Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol*, 44(6), 523-529.
- Mariat F. et Sebald M. (1990). Actinomycètes In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949
- Marmur J, Doty P (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol* 3:585– 594
- Maskey, R. P., Helmke, E., & Laatsch, H. (2003). Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine Streptomyces isolate. *The Journal of antibiotics*, 56(11), 942-949.

- Mehnaz, D., Abdulla, K., Aiysha, D., Zaheer, A., & Mukhtar, S. (2017). Actinomycetes: a source of industrially important enzymes.
- McNeil, M. M., Brown, J. M., Jarvis, W. R., & Ajello, L. (1990). Comparison of Species Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Aerobic Actinomycetes from Clinical Specimens. *Reviews of infectious diseases*, 12(5), 778-783.
- Melouah R. (2015) .Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des Actinomycètes UKM Ouargla. Mémoire de master académique. Microbiologie appliquée. Université kasdi Mesbah Ouargla. Pp.12-13.
- Merizig.H. NAAMI, F. (2015). Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région de Ouargla. Mémoire Master Académique. Microbiologie fondamentale et appliquée. Université Kasdi Merbah Ourgla, 65p.
- Messaoudi. O .2013 . contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (becher), Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée, Université Abou BakrBelkaid de Tlemcen .p 03.
- Meziani.A., Mahcene.H., (2017). Activités hydrolases des souches fongiques : Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium*. sp sur substrat solide. Thèse de Master Biotechnologie des Mycètes. Université de Mentouri Constantine
- Moore B. S., Trischman J. A., Seng D., Kho D., Jensen P. R., Fenical W. S., (1999). Antiinflammatory depsipeptides from a marine streptomycetes. *J. Org. Chem.* 64. 1145-1150
- Motohashi, K., Takagi, M., & Shin-Ya, K. (2010). Tetrapeptides possessing a unique skeleton, JBIR-34 and JBIR-35, isolated from a sponge-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. *Journal of natural products*, 73(2), 226-228.
- Mukesh S. Actinomyetes: Source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbio Appl Sci*, 2014; 3(2):801-832

## N

- NAKAGAWA, M., NAKAMURA, A., KUBOTA, R., KAKAZU, T., KUBA, M., NAKASONE, K., & IWAMASA, T. (1991). Necrotizing myelopathy associated with malignancy caused by herpes simplex virus type 2: clinical report of two cases and literature review. *Japanese journal of medicine*, 30(2), 182-188.

- Nawani, N., Aigle, B., Mandal, A., Bodas, M., Ghorbel, S., & Prakash, D. (2013). Actinomycetes: Role in biotechnology and medicine.

## O

- O'Donnel A. G., Minnikin D. E. and Goodfellow M., (1988). Integrated lipid and wall analysis of actinomycete. In "chemical methods in bacterial systematics" (Goodfellow M. and Minnikin D.E., coord) PP131-143, Academic Press, London
- OMURA, S., SHIMIZU, H., IWAI, Y., HINOTOZAWA, K., OTOGURO, K., HASHIMOTO, H., & NAKAGAWA, A. (1982). AM-2604 A, a new antiviral antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*, 35(12), 1632–1637
- Ottow J. C.G., Glathe H. (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and Actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol*, 16, 170-171

## P

- Pathom-aree, W., Stach, JEM, Ward, AC, Horikoshi, K., Bull, AT et Goodfellow, M. (2006). *Diversité des actinomycètes isolés des sédiments Challenger Deep (10 898 m) de la fosse des Mariannes. Extrémophiles*, 10(3), 181-189.
- Peterson, E. A. (1954). A study of cross antagonisms among some actinomycetes active against *Streptomyces scabies* and *Helminthosporium sativum*. *Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 4(2), 145-149.
- Peter, R., 2003. "Inhibition of peroxynitrite-mediated cellular toxicity, tyrosine nitration, and  $\alpha$ 1-antitrypsinase inactivation by 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol, a novel compound isolated from *Allium cepa*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302: 397–402
- Pine, L. (1970). Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4), 445-474.
- Pochon J., Tardieux P. (1962). *Technique d'analyse en microbiologie du sol*. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé
- Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A. (1995). *Microbiologie tome II*. De Boeck, Bruxelles. pp 506–517.
- Prescott, L. (2010). *Microbiologie*. 3<sup>ème</sup> édition. Paris. P : 589-603
- Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A. (2007). *Microbiologie*. Edition De Boeck

- Priyadharsini, P., & Dhanasekaran, D. (2015). Diversity of soil allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(1), 54-60.
- Puppo, A., Dimitrigevic, L., and Rigaud, G. 1989. Superoxide dismutase and catalase in purified Frankia vesicles. *Physiol. Plant*, 77: 308–311

## R

- RABEA EI, STEVENS C, SMAGGHE G. and STEURBAUT W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 6, 1457-1465
- Rahman, M., Islam, M. Z., Islam, M., & Ul, A. (2011). Antibacterial activities of Actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnology research international*, 2011
- Ramachandran, G., Rajivgandhi, G., Maruthupandy, M., & Manoharan, N. (2019). Extraction and partial purification of secondary metabolites from endophytic actinomycetes of marine green algae *Caulerpa racemosa* against multi drug resistant uropathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 750-757.
- Rastogi, V. B., & Kishore, B. (1997). *A complete course in ISC biology*. Pitambar Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., & Folkers, K. (1948). Comparative data on vitamin B12 from liver and from a new source, *Streptomyces griseus*. *Science (Washington)*, 108, 634-635. Publishing.
- Riedlinger, J., S. D. Schrey, M. T. Tarkka, R. Hampp, M. Kapur et H.P. Fiedler. 2006. Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Strain AcH 505. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (5): 3550-3557.
- Rose III, C. E., Brown, J. M., & Fisher, J. F. (2008). Brain abscess caused by *Streptomyces* infection following penetration trauma: case report and results of susceptibility analysis of 92 isolates of *Streptomyces* species submitted to the CDC from 2000 to 2004. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 821-823.
- Rolinson N.b-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:5–36
- Rodier J., (1984). L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux industrielles, eaux de mer. 7<sup>ème</sup> édition. Dunod

- Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Oulmi, L., Kitouni, M., Boudemagh, A., & Boulahrouf, A. (2006). *Activité antibactérienne d'actinomycètes rares isolés d'échantillons de sol aride du Sud-est Algérien. Antibiotiques, 8(3), 147–152*
- Rolland, Y. (2004). *Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 11(6), 419-424*

## S

- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., Lefebvre, G. & Germain, P. (1998) Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse, 9, 147-153.*
- Saker .R.(2015) .Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de doctorat en microbiologie Université Ferhat Abbas Sétif.
- Sanglier, J. J., & Trujill, M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycètes, stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol, 12, 269-276.*
- Schottel, J. L., Shimizu, K., & Kinkel, L. L. (2001). Relationships of in vitro pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biological control, 20(2), 102-112.*
- Schneider, C. (2009). *Une mise à jour sur les produits et les mécanismes de la peroxydation lipidique. Nutrition moléculaire et recherche alimentaire, 53 (3), 315-321*
- Seong C. N., Goodfellow M., Ward A. C., Hah Y. C. 1993; Numerical classification of acidiphilic actinomycetes isolated from acid soil in Korea. *Kor J Microbiol 31:355–363*
- Serrano, J. A., Mejía, M. A., García, E., Zamora, R., & Boiron, P. (1998). *Streptomyces somaliensis* as an etiologic agent of actinomycetoma in Lara state, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. *Journal de mycologie médicale (Paris), 8(2), 97-104*
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 16(3), 313-340.*
- SHOMURA, T., YOSHIDA, J., AMANO, S., KOJIMA, M., INOUE, S. & NHDA, T. 1979 Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *Journal of Antibiotics 32, 427-435*
- Shweta A (2012) Cellulases of bacterial origin and their applications: A review. *Inter J Sci and Res 3: 1652-1655*

- Sibanda, T., Mabinya, LV, Mazomba, N., Akinpelu, DA, Bernard, K., Olaniran, AO et Okoh, AI (2010). *Potentiels de production d'antibiotiques de trois actinomycètes d'eau douce isolés de la province du Cap oriental en Afrique du Sud. Journal international des sciences moléculaires, 11 (7), 2612-2623.*
- Simonet M. (1991). Nocardia In : Bactériologie. Berche P., Gaillard J. L. and Simonet M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 338-343.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. 1980. Int. J. Syst. Bacteriol. 30:225-420
- Smaoui S. (2010). Génie de Procédés et Environnement : Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse. 182p
- Solanki, R., Khanna, M., & Lal, R. (2008). *Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian Journal of Microbiology, 48(4), 410–431.*
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. Cent Eur J B Shirling. E.B., Gottlieb. D., (1966). Methods for characterization of Streptomyces species. Int. J. Syst. Bacteriol., 16 (3): 313-340
- Spratt, B. G. (1994). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 27, pp. 517-534). Elsevier
- Srinivasulu, B., Prakasham, R. S., Jetty, A., Srinivas, S., Ellaiah, P., & Ramakrishna, S. V. (2002). Neomycin production with free and immobilized cells of Streptomyces marinensis in an airlift reactor. *Process Biochemistry, 38(4), 593-598.*
- Stackebrandt E., Goebel BM. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol., 44:846–849.
- Sykes G. and Skinner F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.
- Sy, M. H., Diouf, A. G., Diakhate, I., Dangou, J. M., Dieng, M. T., & Barberet, G. (2003). Ostéites mycétomiques et mycétomes osseux. *E-mémoires de l'Académie nationale de chirurgie, 2, 11-17.*
- Sukul, P., & Spittler, M. (2007). Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology, 131-162.*
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences, 7(3), 373-390*

- Szent-Györgyi, A. (1928). Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: Description of a new carbohydrate derivative. *Biochemical Journal*, 22(6), 1387-1409.

## T

- Takagi M., Motohashi K., Nagai A., Izumikawa M., Tanaka M., Fuse S., et al., Anti-influenza virus compound from *Streptomyces* sp. RI18, *Org. Lett.*, 2010, 12, 4664-46
- Tan, Z., & Shahidi, F. (2012). *Une nouvelle synthèse chimioenzymatique de caféates de phytostéryl et évaluation de leur activité antioxydante. Chimie alimentaire*, 133(4), 1427-1434
- Tanaka, Y., Komaki, H., Yazawa, K., and Mikami, Y. 1997. Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: production strain, isolation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 50: 1036–1041
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., and Bora T.C., (2007) Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites, *J. Mycol. Méd.*, 17: 242-249
- Theilleux J. 1993. In Levreau J. Y., Bouix M. O. *Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch 6 : 425-481*
- Tsao, P. H., Leben, C., and Keitt, G. W. (1960). *Phytopathology*, 50, 88-89
- Thiemann, J. T., Zucco, G., and Pelizza, G. (1969). *Comb. Nou. Arch. Microbiol.* 67, 147-155
- Tighidet S. 2011. Caractérisation d'antifongiques non polyéniques produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production. *Mémoire de Magister, Université Abderrahmane Mira Bejaia*, Pp. 3-7.
- Tomita, K., M. Nishito, K. Sitoh, H. Yamamoto, Y. Hashino, H. Okhuma, M. Konishi, T. Miyaki et T. Oki. 1990. Pramycinolins A, B and C: new antifungal antibiotics. I. Taxonomy, production and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* 43: 755-762.

## V

- Vijayakumar, R., C. Muthukumar, N. Thajuddin, A. Panneerselvam et R. Saravanamutn. 2007. Studies in the diversity of actinomycetes in Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetol.* 21: 59- 65.
- Vrugink, H. (1976). Influence of agricultural crops on the actinomycetes flora in soil. *Plant and Soil*, 44(3), 639-654.

## W

- Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1941). Actinomyces antibioticus, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of bacteriology*, 42(2), 231-249.
- Waksman, S. A. (1959). The actinomycetes; Vol. 1. Nature, occurrence and activities. *The actinomycetes; Vol. 1. Nature, occurrence and activities.*
- Walsh, C. (2000). *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance.* *Nature*, 406(6797), 775–781.
- Wang, Z., & Gleichmann, H. (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 47(1), 50-56
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., ... & Truper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Williams, S. T., Davies, F. L., Mayfield, C. I., & Khan, M. R. (1971). Studies on the ecology of actinomycetes in soil II. The pH requirements of streptomycetes from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 3(3), 187-195.
- Williams, D. H. (1996). The glycopeptide story—how to kill the deadly ‘superbugs’. *Natural product reports*, 13(6), 469-477.
- Wu, N., Fu, K., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Chang, F.-R., Chen, Y.-H., ... Gu, C.-B. (2009). *Activités antioxydantes des extraits et composants principaux des feuilles de pois d'Angole [Cajanus cajan (L.) Millsp.].* *Molécules*, 14(3), 1032-1043

## Y

- Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° 91.
- Yang, C. H., & Liu, W. H. (2004). Purification and properties of a maltotriose-producing  $\alpha$ -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 254-260.
- Yassin, A. F., Spröer, C., Siering, C., & Klenk, H. P. (2010). *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 149-153.

- Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° 91.

## Z

- Zahir, T., Arshad, K., Nakata, A., & Moessner, K. (2012). Interference management in femtocells. *IEEE communications surveys & tutorials*, 15(1), 293-311.
- Zahran, H. H., Moharram, A. M., & Mohammad, H. A. (1992). Some ecological and physiological studies on bacteria isolated from salt-affected soils of Egypt. *Journal of basic microbiology*, 32(6), 405-413.
- Zeng, P. Y., Wu, J. G., Liao, L. M., Chen, T. Q., Wu, J. Z., & Wong, K. H. (2011). In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 3169-3179.
- Zerizer H. (2014). Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat en Sciences en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1.p 11
- Zhang, F., Chen, J. J., Ren, W. Z., Nie, G. X., Ming, H., Tang, S. K., & Li, W. J. (2011). Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. *Bioresource technology*, 102(21), 10143-10146
- Zhao, G. R., Xiang, Z. J., Ye, T. X., Yuan, Y. J., & Guo, Z. X. (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food chemistry*, 99(4), 767-774.
- Zhou, X.-J., Yan, L.-L., Yin, P.-P., Shi, L.-L., Zhang, J.-H., Liu, Y.-J., & Ma, C. (2014). *Caractérisation structurale et évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques de Perilla frutescens var. farine de graines d'arguta*. *Chimie alimentaire*, 164, 150-157.
- Zvyagintsev, D. G., Zenova, G. M., Sudnizin, I. I., & Doroshenko, E. A. (2005, November). The ability of soil Actinomycetes to develop at an extremely low humidity. In *Doklady Biological Sciences* (Vol. 405, No. 1, pp. 461-463). Nauka/Interperiodica.

## **Annexe**

### **Annexe I: Composition de milieu de culture par (Kitouni, et al.,2007)**

#### **Milieu Amidon-caséine-agar**

Amidon soluble : 10 g ; Caséine : 1 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,5 g ; Agar : 15 g ; Eau distillée : 1000 ml ;pH = 7-7,5.

#### **Milieu ISP 2**

Extrait de levure :4g ; Extrait de malt :10g ; D-Glucose :4g ; Agar : 20g ; Eau distillée qsp  
1000 ml ; pH = 7,3.

### **Milieu de Bennett**

D-Glucose anhydre :10 g ; Casaminoacides :2 g ; Extrait de levure : 1 g ; Extrait de viande : 1  
g ; Agar : 15 g ; Eau distillée :qsp 1000 ml ; PH = 7,3

### **Milieu Mueller-Hinton**

Infusion de viande : 300 g ; Hydrolysate de caséine :17,5 g ; Amidon : 1,5 g ; Agar : 17 g  
pH = 7,4

### **Gélose à l'extrait de levure-Extrait de Malt (GLM)**

Extrait de levure : 3 g ; Extrait de Malt : 3 g ; Peptone : 5 g ; Glucose : 10 g ;Agar : 20 g  
Eau distillée :1000 ml ; pH = 7,2