

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

**UNIVERSITÉ « DR. MOULAY TAHAR » DE SAÏDA**

**FACULTE DES SCIENCES**



**Université « Dr. Moulay Tahar » de Saïda  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie**



**Mémoire préparé en vue de l'obtention du**

**diplôme de Master**

**Spécialité : Biologie**

**Option : Microbiologie appliquée**

**Présenté par**

*Mohamed Mahmoud Abdou*

--- ○○○○ ---

Sur le thème

**Contribution à la production, l'extraction et la caractérisation  
partielle des métabolites secondaires à effet antibactérien produits  
par des actinomycètes**

--- ○○○○ ---

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Mr. Halimi.	M.A.A.	Université de Saïda	Président
Mr. Benreguieg	M.C.B.	Université de Saïda	Promoteur
Mr. Gacemi	M. A.A.	Université de Saïda	Examinateur

Année universitaire 2015/ 2016

## Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur *Mr BENREGUIEG MOKHTAR* d'avoir accepté de diriger ce travail, et pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit. Ses compétences techniques, son efficacité et surtout sa rigueur ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je suis très honoré d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos conseils précieux tout au long de ces années, quoique je dise, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi, Qu'Allah vous bénisse.

Je remercie également mon professeur *Mr HALIMI* d'avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens surtout à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à mon professeur *Mr. GACEMI* d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je tiens également à remercier mon professeur *Mr. Adli* pour son aide précieuse qu'il m'a apporté.

Des remerciements particuliers s'adressent à tous mes professeurs, sans aucune exception, qui m'ont prodigué le savoir, tout au long de mon cursus universitaire : *Mr Halla, Mr Ziani, Mr Sitayeb, Mr Ammam, Mr Loth, Mlle Amara, Mm Aloui, Mm Fares*, vous êtes un symbole de gentillesse et de bonté, toute ma gratitude.

J'adresse mes vives reconnaissances à toutes les laborantines et surtout à *Mm Mme Belghali*.

Mes sincères remerciements vont aussi à *Halima Itt, Rekia, Cherine et Fatima Z* pour leur soutien innombrable.

Une pensée amicale à mes collègues de la promotion et à mes amis pour leur aide, leur patience, leur compréhension et leur encouragement surtout : *Cheikhbouye, MedAli, Ahmedine, Dah, Bouhe, Abdoullah, Ely, Ahmed, Abdeldjalil, Cheikh...*

Je ne saurais oublier de remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien moral et physique, je vous aime.

## Dédicace

« Gloire à Allah le meilleur des créateurs » Quran (Sourat 23, verset 15)

*Je dédie ce mémoire à ...*

*A la mémoire de ma mère Khadíja, à qui je dois ce que suis devenue aujourd'hui,  
Qu'Allah l'accueille dans son paradis.*

*A mon très cher père Mohamed, pour son soutien de tous les instants.*

*A ma tante Leyla, mes adorables sœurs, Mouemina, Zeineb, Leyla, à tous les  
membres de ma famille, Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le  
symbole d'affection par excellence, la source de tendresse et l'exemple du  
dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A Mr Benrequieg Mokhtar, un remerciement particulier et sincère pour tous  
vos efforts fournis. Vous avez toujours été présent. Que ce travail soit un témoignage  
de ma gratitude et mon profond respect.*

*A Halima, Fatima, Rekia et à tous mes collègues de la promotion sans  
exception, 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.*

*Abdou*

## Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
1	Répartition des actinomycètes dans la nature.	9
2	Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes.	11
3	Classification des peptidoglycanes des actinomycètes.	11
4	Classification hiérarchique de la classe actinobactérien basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr/ARNr 16S.	12 et 13
5	Les principaux genres d'actinomycètes.	14
6	Nombre approximatif de métabolites secondaire produits par différents groupes d'organismes.	22
7	Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique.	25
8	Les différentes familles d'antibiotique.	26
9	Résumé des mécanismes d'action des antibiotiques.	28
10	Le nombre de colonies apparues sur différents milieux en fonction de la durée d'incubation.	43
11	Aspect macroscopique et microscopique des bactéries cibles utilisées.	46
12	Résultats de l'activité antibactérienne (mm) des isolats d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminés par la méthode des cylindres d'Agar.	47
13	Résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des isolats actifs.	48
14	Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats actifs.	50
15	Résultats d'activité antibactérienne (mm) de la technique de disque.	55
16	Résultats de la CMI de l'extrait A4 contre <i>S.aureus</i> .	56
17	Représente les Rf caractéristiques des composés.	58

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différentes sporanges.	4
2	La micromorphologie des genres <i>Nocardia</i> , <i>Actinomadura</i> et <i>Streptomyces</i> .	8
3	Différentes chaînes de spores chez les actinomycètes, spore endogène A et spore exogène B	15
4	Une colonie de genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	17
5	Cycle de vie de <i>streptomyces</i> .	17
6	Quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries.	29
7	Les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries.	32
8	Ensemencement de la microplaque	41
9	Aspect des isolats d'actinomycètes après revivification et purification.	44
10	Résultats de l'observation à fort grossissement (coloration de Gram X100).	44
11	Résultats de conservation des isolats A2, A18 et A30 sur ISP2 incliné.	45
12	Résultats du test d'antagonisme des isolats d'actinomycètes (Cylindres d'agar)	47
13	Aspect du mycélium de substrats et du mycélium aérien sur le milieu AF des isolats sélectionnés.	49
14	Observation de l'isolat A18 après coloration de Gram (x100).	49
15	L'Utilisation de Citrate comme seule source de carbone par l'isolat A18	50
16	Résultats de l'hydrolyse de l'amidon par A18.	51
17	Résultats du test de catalase des isolats A18 et A4.	51
18	Résultats du test d'uréase	52
19	Fermentation de l'isolat A18 sur le milieu AF	52
20	Résultats de la fermentation d'A4 en phase aqueuse	53
21	Résultats de l'activité antibactérienne par la technique des disques.	54
22	Histogramme représentant l'activité (mm) des extraits contre les souches cibles.	55
23	Résultats de révélation du chromatogramme à l'iode	57
24	Résultat de la CCM de l'extrait méthanolique de l'isolat A4 observés sous lumière UV ( $\lambda = 365$ nm).	57

Notre travail a pour but la mise en évidence de la production de molécules antibactériennes par des isolats d'Actinomycètes isolées à partir des écosystèmes extrêmes d'El Bayadh (Ouest Algérien).

Parmi six isolats qui ont subi un screening pour leur pouvoir inhibiteur, deux seulement (A4 et A18) sont sélectionnés pour leur remarquable activité antibactérienne.

Les tests d'antagonismes sont réalisés envers 4 bactéries connues par leur importance dans les pathologies infectieuses humaines dont deux sont à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et deux autres à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313). La technique des cylindres d'Agar s'avère la plus performante et le milieu de culture ISP2 est le meilleur milieu de production.

La mise en fermentation sur milieu solide et en milieu liquide a permis de constater que le premier type de production de métabolite est plus rentable quantitativement et qualitativement.

Le résultat de calcul de la CMI vis-à-vis de *S.aureus* montre que l'extrait A18 est actif à faible dose (6,25 mg/ml).

Les résultats de tests physiologiques et biochimiques peuvent rapprocher l'isolat A18 du genre *Streptomyces* connu comme agent prometteur de production de molécules bioactives (antibactériennes).

Selon les résultats de CCM l'isolat A4 produits 4 types de molécules à polarité différentes.

## ABSTRACT

Our work consisted in making conspicuous and bringing more to light the antibacterial molecules production, by actinomycetes strains isolated from extreme ecosystems of Bayadh (west of Algeria).

Among the six isolates, which are screening in order to know their ability of inhibition, only two (A4 and A18) were selected as potential producers of antibacterial agents.

The tests of antagonism was accomplished against four bacteria known for their importance in human infectious diseases, two of which are negative Gram (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and the other two are positive Gram (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313). The technique of Agar cylinders shows high performance and ISP2 culture media as the best media of antibacterial production. Setting fermentation on solid medium and in liquid medium revealed that the first type of metabolite production is more profitable quantitatively and qualitatively. The calculation result of the MIC against *S.aureus* shows that A18 extract is active at low dose (6.25 mg / ml).

The results of physiological and biochemical tests can reproach the A18 isolate *Streptomyces* genus known as a promising agent for producing bioactive molecules (antibacterial).

According to the results of the TLC (Thin Layer Chromatography), the isolate A4 produces four types of molecules which have different polarity.

**Keys words:** Actinomycètes, Streptomyces, Antibacterial, Fermentation, MIC, TLC

## ملخص

الهدف من عملنا هذا هو دراسة وتسليط الضوء على إنتاج جزيئات مضادة للبكتيريا من الاكتينومييسات المعزولة من مناطق بيئية ذات مناخ جاف وقاسي من ولاية البيض (الغرب الجزائري). بعد دراسة نشاط الستة اكتينومييسات المضاد للبكتيريا ،تم اختيار اثنين فقط من بينها و هي (A18 وA4) و ذلك لقدرتها التثبيطية العالية ضد البكتيريا الممرضة .

النشاط المضاد للبكتيريا كان بين الاكتينومييسات وأربعة من البكتيريا المعروفة بقدرتها الممرضة و التي تسبب أمراض معدية للإنسان منها اثنتان سلبية الغرام و هما (*Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853 و اثنتان ايجابية الغرام و هما *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). و قد تم تحقيق هذا النشاط عن طريق تقنية أسطوانات الأجار والتي تعتبر التقنية الأكثر كفاءة و الأكثر استعمالا. وأظهرت النتائج أن ISP2 هو أفضل وسط انتقائي .

بعد عملية التخمر في وسط صلب وفي وسط سائل استنتجنا أن إنتاج المركبات الأيضية في الوسط الصلب كان الأفضل من الناحيتين الكمية والنوعية.

أظهرت نتائج حساب التركيز الأقل القادر علي التثبيط (CMI) ضد *S. aureus* أن مستخلص A18 كان نشط في تركيز ضعيف يساوي 6,25 مل/مغ.

بعد دراسة الخصائص الفيزيولوجية و البيوكيميائية أظهرت النتائج أن سلالة A18 قريبة و مشابهة لنوع *Streptomyces* .

وفق للنتائج CCM فإن سلالة A4 أنتجت أربعة أنواع من الجزيئات ذات خصائص كيميائية مختلفة. الكلمات المفتاحية :

الاكتينومييسات , النشاط المضاد للبكتيريا, التخمر , التركيز الأقل تثبيط (CMI) , CCM, *Streptomyces* ,



## Liste des abréviations

**Gram+**: Gram positive.

**Gram -** : Gram négative.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**ATB** : Antibiotique.

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

**Nacl** : Chlorure de sodium.

**ADN**: Acide désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**°C** : Degré.

**%** : Pourcentage.

**S/cl** : Sous classe.

**S/O** : Sous ordre.

**SCP** : *Streptomyces coelicolor* Plasmide

**ml** : Millilitre.

**µl** : Microlitre.

**g** : Gramme.

**h** : heure.

**S**: Seconde.

**nm** : Nanomètre.

**GN** : Gélose Nutritif.

**BN** : Bouillon Nutritif

**UFC** : unité formant colonie.

**TSE** : Tryptone, sel, eau.

**V** : Volume.

**V/V**: Volume sur volume

**P/V**: Poids sur volume

**G**: Grossissement.

**µg** : Microgramme.

**G**: Grossissement.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**O<sub>2</sub>**: Oxygène.

**G/C** : Guanine et cytosine.

**min** : minute.

**GLM** : Glucose-Extrait de levure-Malt.

**ISP2** : International *Streptomyces* Project.

**H2S** : Sulfure d'hydrogène

**ATP**: Adénine triphosphates

**AF**: Actinomycète fermentation

**MA**: Mycélium aérien,

**MS** : Mycélium de substrat

**S/C** : sous-classe

**S/O** : sous-ordre

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**EUCAST** : Comité Européen pour les Tests de Susceptibilité Antimicrobien

**NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standards

**MHB**: Bouillon Muller Hinton

## Table de matières

AVANT-PROPOS

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Listes abrégées

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION .....1

...1

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

**I. LES ACTINOMYCETES**

<b>I. 1 Définition des Actinomycètes.....</b>	<b>2</b>
<b>I. 2. Caractéristique des actinomycètes .....</b>	<b>3</b>
<b>I. 2.1 Morphologie .....</b>	<b>3</b>
<b>I. 2.2 Physiologie.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2.2.1 Le taux d'humidité .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2.2.2 La température .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2.2.3 Le pH .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2.2.4 Rapport en oxygène .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.3 Caractères chimiques .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.3.1 La paroi cellulaire .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.3.2 La structure de l'ADN.....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.4 Ecologie.....</b>	<b>7</b>
<b>I. 3. Taxonomie des Actinomycètes.....</b>	<b>9</b>
<b>I. 3.1 Taxonomie phénétique .....</b>	<b>10</b>
<b>I. 3.2 Chimiotaxonomie .....</b>	<b>10</b>
<b>I. 3.2.1 La classe "Actinobacteria" .....</b>	<b>12</b>
<b>I. 4. Mode de reproduction : cycle biologique .....</b>	<b>14</b>
<b>I. 4.1 Germination des spores .....</b>	<b>15</b>
<b>I. 4.1.1 Mycélium primaire .....</b>	<b>16</b>
<b>I. 4.1.2 Mycélium secondaire .....</b>	<b>16</b>
<b>I. 4.2 Formation des spores.....</b>	<b>16</b>
<b>I. 4.2.1 Les endospores .....</b>	<b>16</b>
<b>I. 4.2.2 Les exospores .....</b>	<b>16</b>

<b>I.</b>	<b>5. Le matériel génétique .....</b>	<b>18</b>
<b>I.</b>	5.1 ADN chromosomique .....	18
<b>I.</b>	5.2 ADN plasmique et ADN phagique .....	19
<b>I.</b>	<b>6. Les Actinomycète en tant que microorganismes utiles .....</b>	<b>19</b>
<b>I.</b>	6.1 Importance dans le domaine industriel .....	19
<b>I.</b>	6.2 Importance dans le domaine agronomique .....	20
<b>II.</b>	<b>LE METABOLISME DES ACTINOMYCETES</b>	
<b>II.</b>	<b>1. Le métabolisme primaire.....</b>	<b>21</b>
<b>II.</b>	<b>2. Le métabolisme secondaire .....</b>	<b>21</b>
<b>II.</b>	2.1 Les enzymes .....	22
<b>II.</b>	2.2 Les antifongiques .....	23
<b>II.</b>	2.3 Les antibiotiques .....	23
<b>II.</b>	2.3.1 Généralité .....	23
<b>II.</b>	2.3.2 Classification des antibiotiques .....	24
<b>II.</b>	2.3.3 Les mécanismes envisageables pour mener une action antibactérienne .....	26
<b>II.</b>	2.3.3.1 Perturbation du métabolisme cellulaire (antimétabolites) .....	26
<b>II.</b>	2.3.3.2 Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes.....	27
<b>II.</b>	2.3.3.3 Interaction avec la membrane plasmique .....	27
<b>II.</b>	2.3.3.4 Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.....	27
<b>II.</b>	2.3.4 Résistances bactériennes aux antibiotiques .....	29
<b>II.</b>	2.3.4.1 Origine du phénotype de résistance aux antibiotiques chez les bactéries .....	29
<b>II.</b>	2.3.4.1.1 Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'une mutation .....	30
<b>II.</b>	2.3.4.1.2 Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'un transfert de gène de résistance entres bactéries.....	30
<b>II.</b>	2.3.4.1.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries .....	30
<b>II.</b>	2.3.5 Facteurs favorisant l'apparition des phénotypes de résistance chez les bactéries .....	31

II.	Mode de transfert de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries .....	31
II.	2.3.7 Le rôle des éléments transposables dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques .....	32

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **III. MATERIELS ET METHODES**

III.	<b>1. Objectif .....</b>	<b>34</b>
III.	<b>2. Revivification des souches d'actinomycètes.....</b>	<b>34</b>
III.	<b>3. Vérification de la pureté des souches .....</b>	<b>34</b>
III.	3.1 Macromorphologie et caractères cultureux .....	35
III.	3.2 Micromorphologie .....	35
III.	3.3 Etude physiologique et biochimique .....	36
III.	3.3.1 Etude physiologique .....	36
III.	3.3.1.1 Hydrolyse de l'amidon .....	36
III.	3.3.1.2 Hydrolyse de la gélatine .....	36
III.	3.3.2 Etude biochimique .....	36
III.	3.3.2.1 Utilisation des différents substrats carbonés et production de l'H <sub>2</sub> S .....	36
III.	3.3.2.2 Utilisation du citrate comme source de carbone .....	36
III.	3.3.2.3 La recherche de catalase.....	37
III.	3.3.2.4 La recherche de l'Uréase .....	37
III.	3.3.2.5 La recherche de la production d'indole .....	37
III.	<b>4. Conservation des souches d'actinomycète .....</b>	<b>37</b>
III.	<b>5. Recherche de l'activité antibactérienne .....</b>	<b>38</b>
III.	5.1 Revivification et des bactéries testes .....	38
III.	5.1.1 Tests de confirmation de l'identité et de la pureté des bactéries indicatrices .....	38
III.	5.1.2 Préparation des inocula de bactéries-tests .....	38
III.	5.2 Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives : test des cylindres d'agar .....	39
III.	<b>6. Production et extraction de métabolites secondaires.....</b>	<b>39</b>
III.	6.1 Production et extraction de métabolites sur milieu solide.....	39

III.	6.2 Production et extraction de métabolites en milieu liquide.....	39
III.	6.3 Technique des disques .....	40
III.	6.4 Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	40
III.	<b>7. Caractérisation de la molécule bioactive .....</b>	<b>42</b>
III.	7.1 Chromatographie sur Couche mince (CCM).....	42
III.	7.2 Bioautographie des molécules bioactives .....	43
IV.	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
IV.	<b>1. Revivification et purification des isolats d'actinomycètes.....</b>	<b>44</b>
IV.	<b>2. Recherche de l'activité antibactérienne .....</b>	<b>46</b>
IV.	2.1 Purification et confirmation de l'identité des bactéries-tests.....	46
IV.	2.2 Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives : Test des cylindres d'agar .....	47
IV.	<b>3. Identification des souches d'actinomycètes actives.....</b>	<b>49</b>
IV.	3.1 Résultat de l'étude morphologique .....	49
IV.	3.1.2 Aspect microscopique .....	50
IV.	3.2 Résultat de l'étude physiologique et biochimique .....	50
IV.	<b>4. Production et extraction de métabolites secondaires.....</b>	<b>53</b>
IV.	4.1 Production de métabolites par fermentation sur milieu solide .....	53
IV.	4.2 Production de métabolites par fermentation en milieu liquide .....	54
IV.	4.3 Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique (technique des disques).....	55
IV.	4.4 Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	57
IV.	<b>5. Caractérisation préliminaire de la substance antibactérienne sécrétée par la souche A4.....</b>	<b>57</b>
IV.	5.1 Résultat de la Chromatographie sur couche mince (CCM) (révélation chimique).....	57
IV.	5.2 Résultats de la Bioautographie des molécules bioactives.....	59
V.	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>61</b>

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....62**

**ANNEXES**

# *Introduction*



**Abraham et Chain** décrivent en **1945**, une substance produite par un colibacille, qui inhibait complètement la pénicilline et la dénommèrent pénicillinase. **En 1945, Fleming** mit en garde la population, dans un article du New York Times daté du 26 Juin 1945, contre une utilisation abusive de la pénicilline pouvant conduire à l'apparition et à la propagation des bactéries résistantes. Cinq ans plus tard, à Paris et à Londres, la moitié des souches de Staphylocoque était résistante à la pénicilline (**In Briand, 2009**). A partir de cette époque, le problème de la résistance des antibiotiques s'est propagé dans le monde et devient un problème mondial.

En effet, l'OMS a déclaré par le biais de sa directrice générale «Margaret Chan » lors de la journée mondiale de la santé organisée le 7 Avril 2011: « ...Si nous ne prenons pas d'urgence des mesures pour corriger cette situation et en protéger les acquis, nous allons vers une ère post-antibiotiques, dans laquelle de nombreuses infections courantes ne pourront plus être soignées et recommenceront à tuer" .

Vu ses considérations ci- dessus, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par la synthèse de nouvelles molécules et/ou héli- synthèse à partir de structures connues, soit par l'exploitation des populations microbiennes non cultivables par le concept de métagénomique (**Peric et al., 2003**), qui consiste à l'extraction de l'ADN d'un échantillon de l'environnement, le métagénome, qui sera cloné dans des vecteurs artificiels qui sont transformés dans des hôtes de substitution. Ces banques d'ADN environnemental sont ensuite screenées pour leurs activités biologiques (**Zhang, 2005**), ou soit par l'isolement de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés, et l'analyse de leurs produits de fermentation.

Notre travail s'inscrit dans la dernière voie à savoir la recherche des actinomycètes qui sont les acteurs les plus prometteurs pour la production des métabolites à activité antibactérienne.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons sélectionné des souches d'actinomycètes à activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes types parmi les plus répandues dans les pathologies infectieuses et la caractérisation partielle de ces molécules bioactives produites par fermentation solide et liquide.

# *Synthèse bibliographique*

## I. LES ACTINOMYCETES

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (Williams et al., 1984). Et c'est en 1943 que Waksman a pu isoler un genre d'actinomycète à partir du sol.

### I. .1. Définition des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires, constituées de filaments qui irradient par croissance et centrifugent tout autour du germe qui leur a donné naissance (Eunice et Prosser, 1983). Cela explique leur dénomination «Actinomycètes», du grec aktino : rayons et mycetes : champignons, ou champignons rayonnant (Kitouni 2007).

Les bactériologistes considèrent les Actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes, les considèrent comme des champignons (Shirling et Gottlieb 1969.). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries.

Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent parmi les procaryotes, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant la lysine ou de l'acide diaminopimélique et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères confirment leur classification parmi les bactéries. Il s'agit d'un groupe supragénérique, rassemblant des bactéries très diverses dispersées dans la systématique, où les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Actinomadura* et *Bifidobacterium* ont des caractéristiques très rapprochées. Les Actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive dont le coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 à 75%. Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0.5 à 1 µm de diamètre). Sur des milieux solides, les Actinomycètes forment, en une semaine environ, des colonies souvent pigmentées provenant de l'accumulation des filaments ramifiés à contour lisse ou échancré à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur.

En général, les Actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables d'être chimio-autotrophes. Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent

fréquemment les substrats insolubles tels que le charbon par pénétration mécanique de la matrice et peuvent dégrader les protéines insolubles comme les kératines et les hémicelluloses, comme la cellulose et le xylène (Taibi et al., 2012).

Les Actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, elles sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Theillieux, 1997).

## I. 2. Caractéristique des actinomycètes

### I. .2.1.Morphologie

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier : se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium). Le second : comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier, 1985).

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu
- des colonies pâteuses rugueuses ou lisses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides
- des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*) hautement résistantes à la chaleur et autres adversités. Ces endospores sont semblables à celles des *Bacillus*. D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges qui peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* (Kalakoutskii et Agre, 1976).

- Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de

spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores.

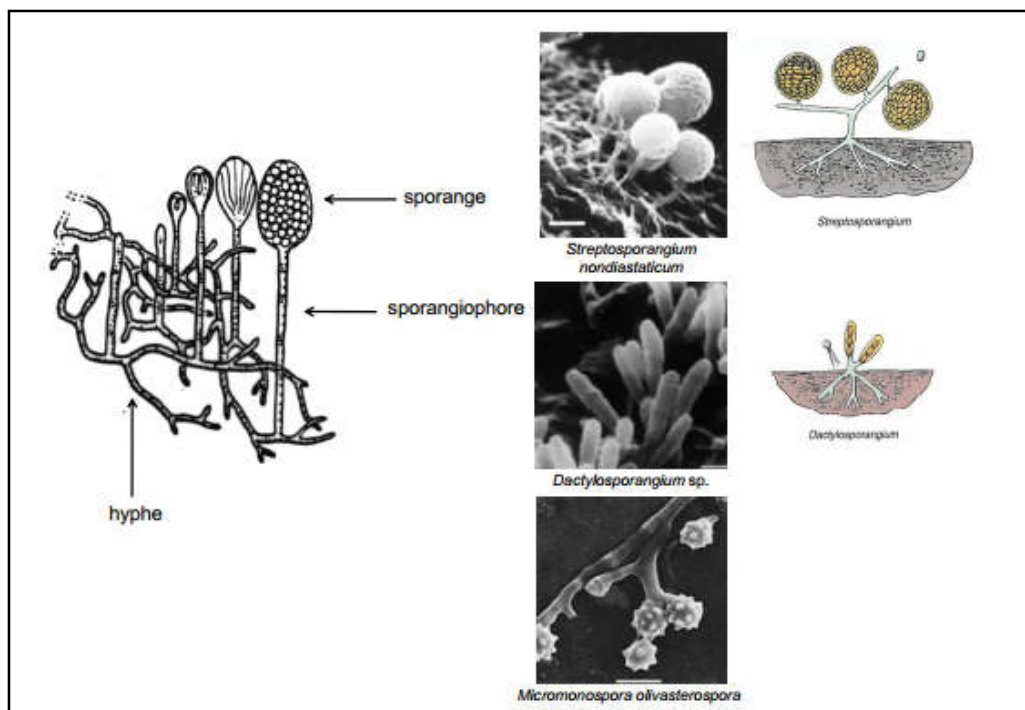
Il existe d'autres structures morphologiques: les sclérotés et les synnemas (corémies) qui sont présentes, respectivement, chez les *Chainia* et les *Actinosynnema*.

✓ **Simples**

- Droites (R)
- Flexibles (F)
- Spires compactes (S)
- Spires ouvertes (S)
- Boucles ouvertes, ou spires étendues Rectinaculum- Apertum(RA)

✓ **Verticillés**

- Monoverticille sans spires
- Monoverticille avec spires
- Biverticille sans spires
- Biverticille avec spires



**Figure 1** : Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes **Kalakoutsii et Agre, 1976**

### I. 1.2.2. Physiologie

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (Loec, 1976 ; Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujilo, 1997), généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif . Organismes hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (Ensign et al., 1993). Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acidesaminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (Crawford, 1993) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine et les résidus des plantes dans le sol (Lacey, 1997).

#### 2.2.1 Le taux d'humidité

En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Oskay et al., 2004 ; Prescott et al., 2007).

#### 2.2.2 La température

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est entre 50 et 60°C. Ces organismes avaient été distingués de leurs homologues thermophiles appartenant au genre *Thermomonospora* grâce à leurs spores qui résistent à une température de 90°C pendant 30 minutes et par la résistance à la novobiocine (25 µg/ml). De plus, l'activité cellulolytique est absente pour le genre *Thermoactinomyces* et commune pour *Thermomonospora* (Holt et al., 1994).

Le genre *Streptomyces* comporte aussi des espèces thermophiles comme *Streptomyces thermocoprophilus* (Kim et al, 2000) et même psychrophiles (Holt et al., 1994).

#### 2.2.3 Le pH

La plupart des actinomycètes du sol sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (Lee et Hwang, 2002). Les procédures d'isolement ont été traditionnellement

basées sur ce caractère de neutralité.

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces neutrophiles (**Basilio, 2003**). Les souches acidophiles croissent à des valeurs de pH comprises entre 3.5 et 6.5 avec un pH optimal de croissance compris entre 4.5 et 5.5 tel que : *Streptacidiphilus jiangxiensis* (**Huang et al., 2004**) et *Streptacidiphilus oryzae* (**Wang et al., 2006**).

#### **2.2.4 Rapports avec l'oxygène**

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies stricts comme est le cas du genre *Actinomyces*.

### **I .2.3. Caractères chimiques**

#### **I .2.3.1. La paroi cellulaire**

Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (**Mariat et Sebald, 1990**). Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leur hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**).

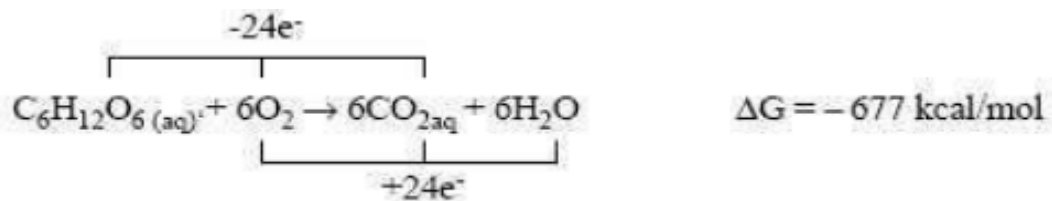
#### **I .2.3.2. La structure de l'ADN**

La composition de l'ADN nucléaire permet de définir les familles d'actinomycètes, pour cela on étudie le coefficient de Chargaff ou GC% qui présente le nombre de paires de bases guanine cytosine pour 100 paires de bases dans l'ADN (**Larpen et Sanglier, 1989**). Les actinomycètes dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est généralement compris entre 60 et 75% (**Ensign, 1978 ; Larpen et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**).

## I. 2.4. Ecologie

Les Actinomycètes sont très répandus dans la nature. Ils constituent une part de la microflore tellurique. On les trouve dans l'air, les débris végétaux, les litières, les sols, et les régions industrielles polluées par du pétrole ou des métaux lourds. Leur proportion par rapport aux autres micro-organismes oscille entre 10 et 50%, les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents mais le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95% des souches d'Actinomycètes isolées.

Les Actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques, dans les lacs, les rivières et les ruisseaux, dans les mers et les océans et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000m de profondeur. Dans les sols sahariens, les Actinomycètes constituent 15 à 60% de la microflore totale et parfois même jusqu'à 85%. Ces pourcentage augmente jusqu'à 91% dans les parties situées entre 1 et 2 m de profondeur avec une prédominance des *Streptomyces*. D'une autre part le compost est considéré comme un réservoir très important d'Actinomycètes. En raison de sa composition riche en substrats organiques et surtout les composants carboniques, les microorganismes mésophiles entre autre les Actinomycètes produit de la chaleur selon la réaction suivante:



Ce qui confère un milieu idéal pour une croissance rapide des Actinomycètes thermophiles, dont la température de culture varie entre 45°C et 70°C. Le pourcentage du carbone au niveau du compost est de 10% à 35% selon les conditions environnementales.

### ➤ Actinomycètes pathogènes

Ils peuvent provoquer deux maladies importantes chez l'homme: l'actinomycétome et la nocardiose. Tandis que l'actinomycétome est le plus souvent provoqué par *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*,



*Actinomadura pelletieri* et *Streptomyces somaliensis*. Dans la nocardiose, l'agent impliqué est surtout, *Nocardia asteroides* (Pirouzet *al.*, 1999). L'évolution des deux maladies est lente et insidieuse, et peut aboutir à des lésions spectaculaires des tissus mous et des os. Dans la nocardiose, les filaments bactériens se rencontrent sous forme libre. Cependant dans l'actinomycétome, on trouve des grains constitués de filaments agrégés. La couleur et la taille des grains peuvent orienter le diagnostic histologique (Beaman et Beaman, 1994). *Nocardia asteroides* et *Nocardia brasiliensis* sont les deux espèces d'actinomycètes les plus fréquemment isolées dans un laboratoire clinique (Wallace et *al.*, 1995). La virulence des souches de *Nocardia sp.* est liée à:

- L'adhésion, la pénétration et la croissance à l'intérieure des cellules hôtes (Ogata and Beaman, 1992)
- La neutralisation de l'acidification phagosomale et l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome
- La croissance à l'intérieure des cellules phagocytaires (Beaman et Beaman, 1994)



- a- le mycélium fragmenté de *Nocardia*
- b- les courtes chaînes du genre *Actinomadura*
- c- les longues chaînes du genre *Streptomyces*

**Figure 02:** La micromorphologie des genres *Nocardia*, *Actinomadura* et *Streptomyces* (Mansour, 2003)

**Tableau 1** : Répartition des Actinomycètes dans la nature

<b>Genre</b>	<b>Habitats</b>
<i>Actinomadura</i>	Sol, compost
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière, compost
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

### **I. 3. Taxonomie des Actinomycètes**

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, des nomenclatures et l'identification.

La classification établie des groupes taxonomiques (taxon). ceux-ci sont établis selon des critères phénotypiques et moléculaires à défaut de bases phylogéniques.

La nomenclature affecte un nom à ces groupes selon un système binomial découlant des lois de Linné dans lequel un nom latin de genre précède le nom de l'espèce, la taxonomie bactérienne, suivant les règles

L'identification assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits.

A ses débuts, la taxonomie bactérienne, suivant les règles édictées pour la classification des organismes supérieurs (végétaux, animaux) s'est appuyée sur l'étude du phénotype exprimé et sur les variations morphologiques existantes entre les bactéries. Cependant, s'il est facile pour les organismes supérieurs de délimiter une espèce par les barrières. En effet, se sont des organismes très peu différenciés et ne présente pas de phénomènes sexés faisant intervenir un échange complet de matériels génétique. De ce fait une espèce en microbiologie est constituée par sa souche type pour être incluse au sein de la même espèce. Les critères permettant d'apprécier la

parenté de différentes souches ont variés dans le temps et il est possible de destiner plusieurs périodes au cours desquelles ont été utilisées une taxonomie phénétique, une taxonomie numérique, une chimiotaxonomie, une taxonomie phylogénétique et une taxonomie polyphasique encore qualifiée de mixte et consensuelle (polyphasique similitudes des souches ce qui a conduit à constituer des comités internationaux chargés de définir les critères et de proposer une définition de l'espèce (**Stackebrandt et al., 2002 ; Wayne et al., 1987**).

### **I 3.1 Taxonomie phénétique**

De nombreux auteurs se sont intéressés à la classification des actinomycètes et plus particulièrement à celle du genre *Streptomyces*, premier genre isolé à partir du sol et présentant des particularités intéressantes du point de vue thérapeutique.

(**Pridham et al., 1956**) divisent les *streptomyces* en sept groupes, en fonction de la sporulation et de la pigmentation du mycélium aérien. D'autres auteurs répartissent ce genre en nombre de séries ; basées sur la pigmentation du mycélium primaire et de la sporulation. (**Pridham et Lyon, 1976**), classent les streptomycètes selon la morphologie des sporophores et la couleur du mycélium. **Waksman** utilise un plus grand nombre de critères qui sont la morphologie des spores, la couleur du mycélium aérien et végétatif, la formation de pigments chromophores et les propriétés biochimiques (**Delhomme, 1974**). Ces critères sont également ceux de **Sherling et Gottlieb (1966)** mais pris dans un ordre différent, à savoir la couleur des mycéliums, la présence de sporophores et la forme des spores.

### **I 3.2 Chimiotaxonomie**

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes.

Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. L'examen des acides aminés de la paroi cellulaire, des glucides des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (**O'dnnell, 1982, O'dnnell et al., 1985**). Cette approche taxonomique a permis une grande avancée dans la classification des actinomycètes.

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée soit d'une :

- Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitant naturels des cavités de l'Homme et des

animaux, illustrés par le genre *Actinomyces* (**Le chevalier et Le chevalier, 1985**).

**Tableau 2 :** Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes

Types d'acétyle	Taxon
Acide N-Glycolylmuramique	<i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> , <i>Actinoplanes</i> <i>Amorphosporangium</i> , <i>Ampullariella</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Corynebacterium</i>
Acide N-Acétylmuramique	<i>Actinomadura</i> , <i>Oerskovia</i> <i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i>

**Tableau 3 :** Classification des peptidoglycanes des actinomycètes d'après (**Rogers et Becker, 1890**)

Position de la liaison inter peptidique	Pont peptidique	Aminoacide en position 3
<b>Peptidoglycane A</b> <b>Liaison interpeptidique en position 3 et 4</b>	<b>1- Liaison simple</b> <b>2- Polymère aminé</b> <b>3- L'acide aminé monocarboxylique ou glycine ou oligopeptides</b> <b>4- Contient un acide aminé dicarboxylique</b>	<b><math>\alpha</math> L-lysine</b> <b><math>\beta</math> L-homoserine</b> <b><math>\gamma</math> Acide L-glutamique</b> <b><math>\delta</math> L-alanine</b> <b><math>\alpha</math> L –ORNITHINE</b> <b>L- Homoserine</b> <b>Acide L-diaminobutyrique</b>
<b>Peptidoglycane B liaison inter peptidique en position 2 et 4.</b>	<b>1-contient un L-amino acide</b> <b>2-contient un D-aminonacide</b>	

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (**Garrity et al., 2004**), Le Phylum *Actinobacteria* ( bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est

constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Celle-ci a été décrite par **Stackebrandt et al., (1997)**.

### I. 3.2.1 La classe "*Actinobacteria*"

En 1997, Stackebrandt et al. proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui repose uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80 % de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955). Cette proposition ne change pas les descriptions courantes des espèces et des genres. En effet, leur classification est basée sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, a été vérifiée pendant ces 20 dernières années, et il s'est avéré qu'elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ ARNr 16S (**Stackebrandt et al., 1997**).

**Tableau 04:** La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (**Garrity et al., 2004**)

Classe <i>Actinobacteria</i>					
S/C	<i>Acidimicrobida</i>	<i>Rubrobacterida</i>	<i>Coriobacterida</i>	<i>Sphaerobacterida</i>	<i>Actinobacterida</i>
I	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>

S/CI	<i>Actinobacteridae</i>
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i> <i>Actinomycetales</i>

Ordre <i>Actinomycetales</i>				
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionibacterinea</i>
<b>Famille</b>	<b>Familles</b>	<b>Familles</b>	<b>Famille</b>	<b>Familles</b>
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i>	<i>Micromonosporiaceae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>

	<i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>		<i>Nocardioideaceae</i>
S/O <i>Psuedonocardineae</i>	S/O <i>Streptomycineae</i>	S/O <i>Streptosporangineae</i>	S/O <i>Frankinea</i>	S/O <i>Glycomycineae</i>
<b>Familles</b> <i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<b>Famille</b> <i>Streptomycetaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Ahycidotherrmaceae</i> <i>Kineosporiaceae</i>	<b>Famille</b> <i>Glycomycetaceae</i>

S/Cl: sous classe, S/O: sous ordre

La classe des Actinobacteria est divisée en 5 sous-classes (**tableau 04**) *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankinea* et *Glycomycineae* (**Stackebrandt et al., 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2000**).

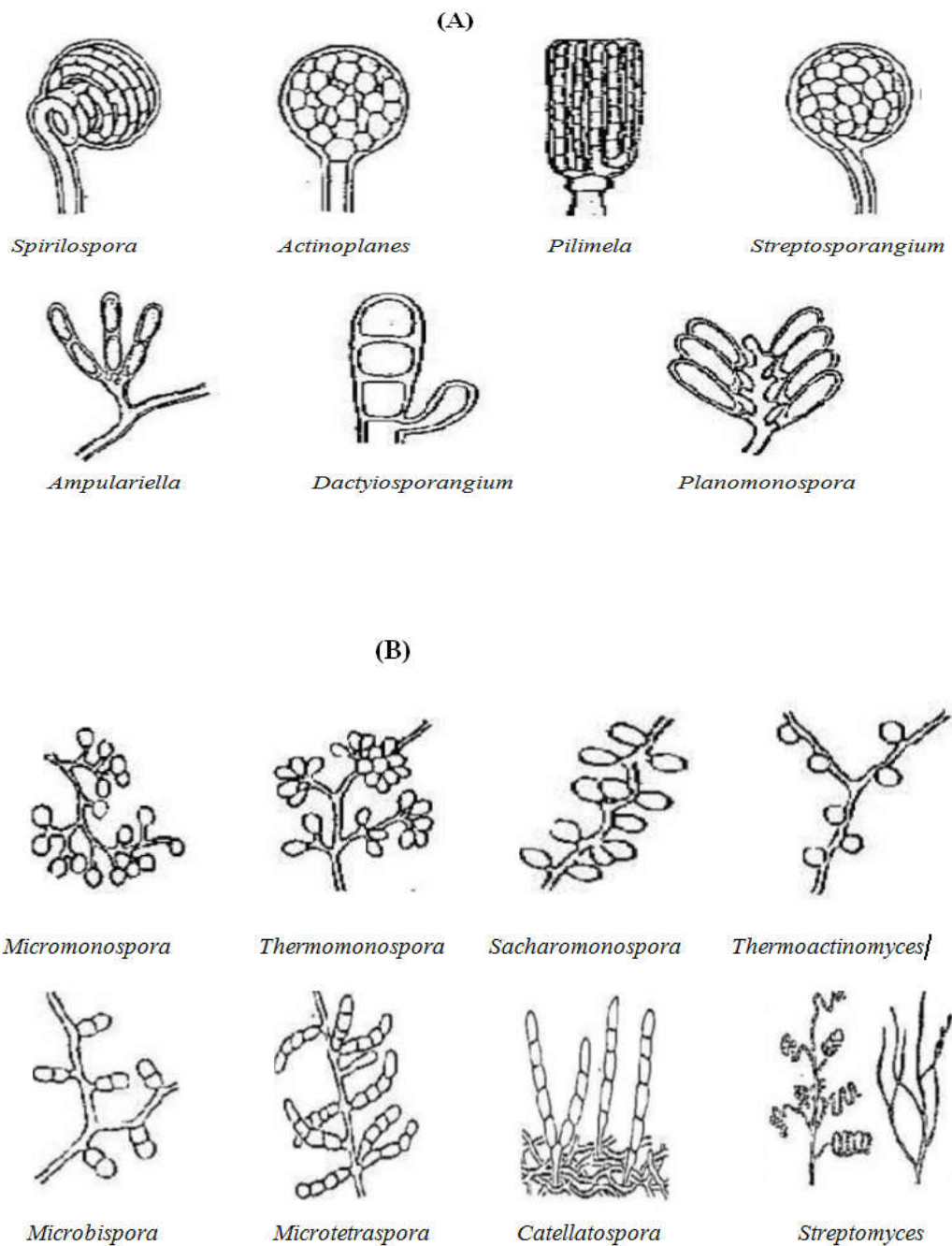
Le **tableau 5** récapitule les différentes familles et genres d'Actinomycètes.

**Tableau 5:** Les principaux genres d'Actinomycètes

FAMILLE	Développement Mycélien	Mode de reproduction	Acido résistance	Autres caractères	Genres
MYCOBACTERIACEES	Transitoire limité	Scission binaire	+		<i>Mycobacterium</i>
ACTINOMYCETACEES	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	-	Aérobie	<i>Nocardia</i>
	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	-	Anaérobie	<i>Actinomyces</i>
STREPTOMYCETACEES	Extensif	Conidies	-	Conidies en chaînette	<i>Streptomyces</i>
	Extensif	Conidies	-	Conidies isolées ou en groupe	<i>Micromonospora</i>
ACTINOLPANACEES	Extensif	Sporangispore mobile	-	Formation de sporange	<i>Actinoplanes</i>

#### I. 4. Mode de reproduction : cycle biologique

La structure d'une colonie de streptomycètes (**Figure 3 et 4**) démontre le degré de différenciation d'un tel organisme. Le cycle biologique est comparable à celui de nombreux Micromycètes eucaryotiques. Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes mais un cycle biologique semblable à certains champignons (**Floyd et al., 1987 ; Sanglier et Trujillo, 1997**).



**Figure 3:** Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton *et al.*, 1989).



## **I. 4.1. Germination des spores**

Quatre étapes peuvent être distinguées ; l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important.

### **I. 4.1.1. Mycélium primaire**

Le tube de germination va croître et donner des hyphes qui se ramifient intensément. Ce mycélium se développe sur et dans le substrat. Il est dénommé mycélium primaire, mycélium végétatif ou mycélium de substrat. Eventuellement pigmenté, il forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. Il peut se fragmenter chez les bactéries du genre *Nocardioformes*.

### **I. 4.1.2 Mycélium secondaire**

Sur ce mycélium primaire va se développer un mycélium secondaire aérien. Ces hyphes sont peu ramifiés et pourvues d'une enveloppe hydrophobe, elles sont plus épaisses que les hyphes primaires. Ce mycélium est généralement pigmenté (gris, vert, rouge...) sur ce mycélium aérien se forment des spores.

## **I. 4.2 Formation des spores**

Les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistants à la chaleur et d'autre adversité.

### **I 4.2.1 Les endospores**

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

### **I 4.2.2 Les exospores**

Elles naissent de la formation de parois transversales pour délimiter les spores. Les parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée. Des ornements externes peuvent se former, le contenu en tréhalose, relativement abondant aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores. Par

ailleurs, celles-ci ont fondamentalement la même structure qu'une cellule végétative et ne contient qu'un seul génome haploïde.

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (Beppu, 1992 ; Grafe et al., 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitaliset al., 1986).

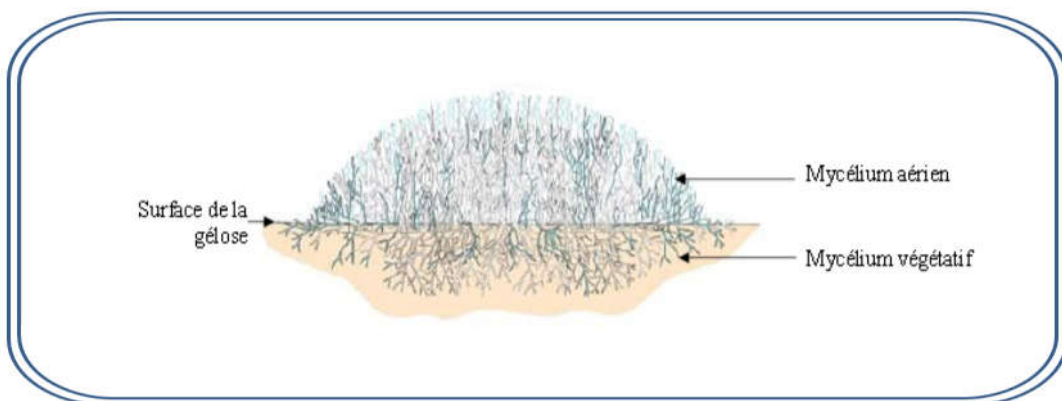


Figure 4 : Une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Dvorak, 1999)

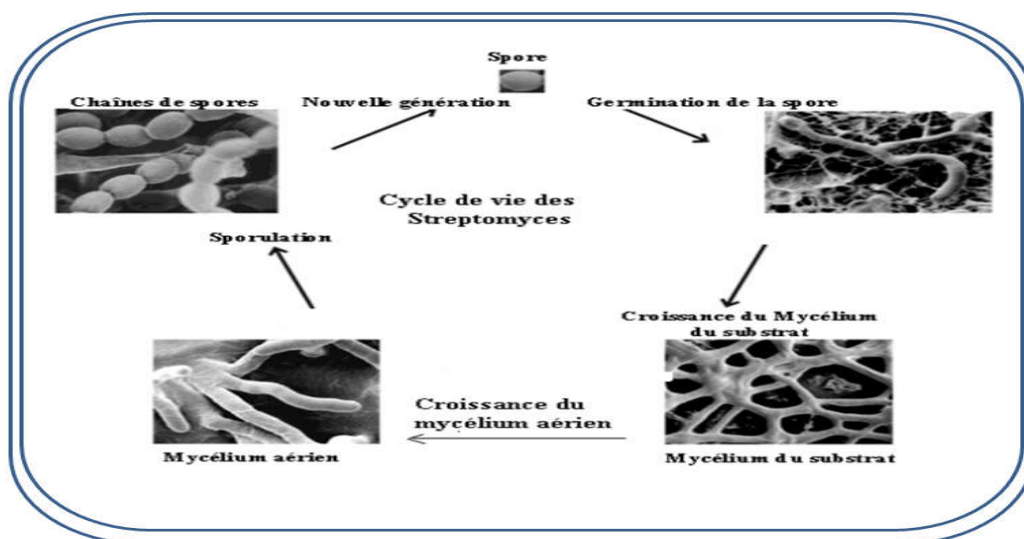


Figure 5: Cycle de vie des *Streptomyces*.

## I. 5. Le matériel génétique

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

### I 5.1. ADN chromosomique :

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

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

A chaque nucléotide correspondrait une molécule d'ADN continue et circulaire. Chez *Streptomyces*, ce chromosome circulaire contient environ trois fois plus d'ADN que chez

*Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. Des séquences répétitives – environ quatre copies par génome haploïde – constituent 5% du génome (**Antonov et al. 1977**).

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

Par ailleurs, les cartes génétiques de différentes espèces de *Streptomyces* montrent une similitude considérable.

Enfin, l'instabilité génétique et l'amplification de séquences génomiques, sur lesquelles nous reviendrons dans le cadre des mutations, sont deux caractéristiques importantes des *Streptomyces* (Theilleux, 1993).

#### **I. 5.2. ADN plasmique et ADN phagique :**

Des plasmides de tailles très diverses – de 2 Kb – et en nombre très variable de copies de 1 à plusieurs centaines – ont été mise en évidence chez les *Streptomyces*. Ces plasmides généralement circulaires, dans quelques cas linéaires, sont impliqués dans le contrôle de caractères phénotypiques touchant notamment la différenciation, la fertilité, la production d'antibiotiques et la résistance à ceux-ci.

Ainsi, certains de ces plasmides sont des plasmides de fertilité capables de s'intégrer de façon réversible au chromosome hôte. C'est le cas des facteurs sexuels SCP1 et SCP2 de *S.coelicolor* A. Le plasmide SCP1 comprend d'autre part des gènes codant pour la biosynthèse de la méthylénomycine et la résistance à celle-ci.

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

#### **I. 6. Les Actinomycète en tant que microorganismes utiles :**

##### **I. 6.1 Importance dans le domaine industriel :**

Les actinomycètes ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique.

De nombreux isolats produisent des substances intéressantes, telles que les antibiotiques les vitamines, des substances antihistaminiques, vasodilatatrices ou immunostimulante et des enzymes utilisées dans les industries; certaines souches interviennent même dans la transformation des stéroïdes en dérivés plus intéressants (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Asselineau et Alta, 1973 ; Agman et weinstein, 1980 ; Stanier et al., 1982 ; Tyrabi et Estienne, 1983)

Parmi ces substances, les antibiotiques sont ceux qui ont suscité le plus grand intérêt. (tirapy et estienne1983), rapportant les valeurs établies à partir des données du «

**Hand Book of Antibiotic Compounds, 1980** », signalent qu'environ 65 % des antibiotiques produits par des microorganismes, le sont par des actinomycètes. Un nombre appréciable d'antibiotiques antibactériens, antifongiques et anticancéreux, a trouvé une application dans le domaine thérapeutique.

Le plus grand nombre d'antibiotiques est produit par le genre *Streptomyces* (Streptomycine, Tétracycline, Kanamycine); 50 à 70 % des souches telluriques de *Streptomyces*. Sont capables de sécréter des antibiotiques (**Tyrabi et Tstienne, 1983**)

### 1. 6.2 Importance dans le domaine agronomique :

Les actinomycètes constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol; on a suggéré plusieurs explications à cette large distribution, telles que leur grande capacité d'utilisation des substrats et leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes de même habitat. (**Kuster, 1976 ; Ishizawa et Araragi, 1976 ; Alexander, 1977**). (**Aommergues et Mancenot, 1970**) rapportent que les actinomycètes sont aptes à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries. Ces microorganismes contribuent énormément à la dégradation et au recyclage de polymères complexes tels que les polysaccharides et même les lignocelluloses des plantes (**Lechevalier 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**); ils jouent, par conséquent, un rôle dans la fertilité des sols.

Les actinomycètes du genre *Frankia* sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique, formant des nodules chez de nombreuses plantes dicotylédones arbustives, autres que les légumineuses (**Beicking, 1974**). Ces plantes peuvent être trouvées dans toutes les parties du monde, y compris les régions tropicales et arctiques; elles sont des « pionniers » extrêmement importants dans les régions où les conditions nutritionnelles limitent la croissance des autres espèces végétales (**Lechevalier, 1981**).

Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinomycètes sont également utilisés pour le contrôle biologique des maladies de certaines plantes; (**Goodfellow et Williams 1983**) ont signalé quelques succès dans la réduction de maladies fongiques.

## II. Le métabolisme des actinomycètes

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (**Choulet, 2006**).

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (**Theilleux, 1993**). En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces*.

D'après (**Tarkka et Hampp 2008**), les métabolites secondaires des Streptomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique:

- ✓ Agents antagonistes, comportant des antibiotiques, des antifongiques, des anti protozoaires et même des antiviraux.
- ✓ Agents pharmacologiques tels que des antitumoraux et des inhibiteurs d'enzymes.
- ✓ Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides.
- ✓ Composés à activité régulatrice, tels que des facteurs de croissance.

Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (**Theilleux, 1993**).

La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (**Singh et al, 2006**).

### II.1. Le métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (**Theilleux, 1993**).

### II.2. Le métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (**Theilleux, 1993**). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (**Colombié, 2005**).

**Tableau 6.** Nombre approximatif de métabolites secondaires produits par différents groupes d'organismes (**Kieser et al, 2000**).

Source	Métabolites bioactifs			Métabolites inactifs
	Antibiotiques	Autres	Total	
Non actinomycètes	1400 (12%)	240 (9%)	1640 (11%)	2000-5000
Actinomycètes	7900* (66%)	1220* (40%)	9120* (61%)	8000-10000
Champignons	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)	15000-25000
Total (microorganismes)	11900 (100%)	3000 (100%)	14900 (100%)	25000-40000
Lichen	150	200-500		1000
Algue	700	800-900		1000-2000
Plantes supérieures	5000	25000-35000		500000-800000
Animaux terrestres	500	10000- 15000		200000-300000
Animaux marins	1200	1500-2000		2000-3000
Total (organismes supérieurs)	7500	35000-50000		>1000000

### II.2.1. Les enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**Theilleux, 1993**). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (**Vonothini et al. 2008**), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**Park et al. 2002**).

Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (ex : pronase de *Streptomyces.griseus*) (**Theilleux, 1993**).

Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de  $\beta$ -1-3-glucanase et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des germes pathogènes (**Conn, 2005**).

### II.2.2. Les antifongiques

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou

topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux.

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

### II.2.3. Les antibiotiques

**Définition :** Les antibiotiques sont des métabolites secondaires. Dans la majorité des cas, leur synthèse débute à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et le début de la phase stationnaire (idiophase) (**Bu'Lock, 1965**). Cette phase de synthèse démarre lorsqu'un ensemble de condition est rempli : précurseurs disponibles, non inhibition des enzymes impliqués dans ce métabolisme, résistance à l'antibiotique, carence en certain composant du milieu, sources de carbone, d'azote et d'éléments minéraux adéquats, ainsi que l'oxygénation, le pH (**Dumenil et Sanglier, 1989**).

#### II.2.3.1. Généralités

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (**Marinelli, 2009**). Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont médicalement utiles. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structuralement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

L'histoire des antibiotiques a débuté avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 40, depuis, les activités antimicrobiennes des antibiotiques produits par les microorganismes ont été considérablement étudiées, les recherches entreprises ont permis de compléter l'arsenal antibactérien mis à la disposition des médecins et du grand public. Des microorganismes producteurs de chloramphénicol, de néomycine, de tétracycline et de terramycine furent isolés dès 1953. La découverte des agents chimio thérapeutiques et le développement de nouveaux médicaments plus puissants ont révolutionné la médecine moderne et ont fortement diminué la souffrance humaine (**Prescott et al.,2007**).

Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. Près de 50% des espèces de *Streptomyces* isolées sont reconnues comme productrices d'antibiotiques (**Madigan et Martinko, 2007**). Il apparait clairement dans le tableau 1 que les actinomycètes synthétisent les deux tiers des antibiotiques microbiens dont environ 80% sont isolés du genre *Streptomyces*. Même si on inclut les autres métabolites secondaires, les actinomycètes restent les plus grands fournisseurs avec environ 60% (les *Streptomyces* ont toujours la plus grande partie avec 80%). Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (**Madigan et Martinko, 2007**). L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu



suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (**Bentley *et al*, 2002 ; Ikeda *et al*, 2003**).

### II.2.3.2 Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés d'après plusieurs critères : spectre d'action, type d'action, origine, mode d'action ou structure chimique (**Asselineau et Zalta, 1973**). Ils peuvent être bactéricides, sur les bactéries en voie de croissance uniquement (pénicillines, céphalosporines) ou en phases exponentielle et stationnaire (polymyxines, streptomycine), ou encore bactériostatiques (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine). Ils peuvent être d'origine fongique (pénicillines, céphalosporines, griseofulvine), bactérienne (bacitracine, polymyxines) ou actinomycétale, surtout *Streptomyces* (la majorité des antibiotiques). D'après leur charge électrique, les antibiotiques peuvent être à caractère acide (pénicilline, cephalosporine, novobiocines) ou neutre.

Leur mode d'action est diversifié: sur la paroi bactérienne (pénicilline, cyclosérine, novobiocine), la membrane plasmique (polymyxines, tyrothricine, polyènes), les acides nucléiques (mitomycine, actinomycine), la synthèse protéique (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine).

Cependant, il apparaît plus logique de classer les antibiotiques d'après leur structure chimique, cette classification est représentée dans **le tableau 7**. Près de 7000 molécules actives ont ainsi été classées par (**Berdy *et al*, 1987**) dans 9 familles et plusieurs sous-familles. Les antibiotiques actuels peuvent être groupés en plusieurs familles possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique, origine apparentée, spectre d'action similaire, mécanisme d'action identique. Les familles d'antibiotiques sont représentées dans le tableau7 (**Berdy *et al*, 1987**).

**Tableau 7:** Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique

FAMILLES	PRINCIPAUX FAMILLES	EXEMPLES
1-Antibiotique contenant des glucides	Aminoglycosides	streptomycine, gentamycine, kanamycine
	Glucides purs	Nojirimycine
	Glycopeptides	vancomycine, ristocétine
	Sucres lipidiques	Moenomycine
2-lactones macrocycliques	Macrolides	érythromycine, spiramycine
	Polyènes	nystatine, amphotéricine
	Macrolactames	riphampicine, maytancine
3-quinones et antibiotiques similaires	Tétracyclines, anthracyclines et anthranquinones	tétracycline, adriamycine, hedamycine
	Naphtoquinones	rubromycine
	Benzoquinones	mitomycine
4-acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés	pénicilline, cyclosérine
	Homopeptides	bacitracine
	Peptides	valinomycine
	Lipopeptides	Polymexines
5- antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	Hétérocycles non accolés	mildiomycine
	Hétérocycles accolés	phénazine
6- antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	Dérivés du furane	aflatoxine
	Polyéthers	monensine, nigérocine
7- antibiotiques alicycliques	Dérivés du cyclo-alcanes	cycloeximide
	Téropènes	acide marasmique
	Oligoterpènes	aside fusidique
8-antibiotiques aromatiques	Dérivés du benzène	Chloramphenicol
	Composés aromatiques à cycles accolés	Griséofulvine
	Aromatique éthers	Zinninol
	Aromatiques glycosylés	hygromycine A, novobiocine
9- antibiotiques alipahtiques	Dérivés d'alcanes	Elaiomycine
	Dérivés des acides carboxyliques alipahtiques	Cerulenine
	Composés contenant du phosphore	Fosfomycine

**Tableau 8:** les différentes familles d'antibiotiques. (Canu et Peter, 2001)

Famille	Dénomination commune	Nom de spécialité
<b>B-lactamines</b> <b>Pénicillines</b> <b>Pénicilline G, V</b> <b>Pénicilline A</b> <b>Carboxypénicilline</b>	Pénicilline V Ampicilline, Amoxicilline Ticarcilline	Oracilline Totapen, Clamoxyl Ticarpen
<b>Céphalosporines</b> De 1 <sup>er</sup> génération De 2 <sup>ème</sup> génération De 3 <sup>ème</sup> génération De 4 <sup>ème</sup> génération De 6 <sup>ème</sup> génération	Céfalotine, céfalexine Céfoxitine, Céfuroxime Céfotaxime, Céftriaxone Céfpime, Céfepime Cefsulodine	Keflin, keforal Mefoxine, Zinnat Claforan, Rocéfine Céfrom, Axepim Pyocéfal
<b>Car+</b> <b>Bépénèmes</b>	Imipénème-cilastatine	Tiénam
B-lactamines Monocycliques	Aztréonam	Azctam
<b>Peptides</b> <b>Glycopeptides</b>	Vancomycine, Teicoplanine	Vancocine vancomycine, targocid
<b>Polypeptides</b>	Polymyxine B	Colistine
<b>Aminoglycosides</b>	Streptomycine, kanamycine, néomycine gentamycine, amikacin	Streptomycine, Kamycine, Amiklin Néomycine, Gentalline
Groupes des M.L.S <b>Macrolides</b> <b>Lincosamides</b> <b>Synergistines</b> (streptogamines A et B)	Erythromycine, spiramycine Lincomycine, clindamycine  pristinamycine M et S	Erythrocline, Rodogyl Lincocine, Dalacine  Quinupristine+dalfopristine synercid
<b>Quinolones</b>  <b>Fluoroquinolones</b>	Acide nalidixique, oxonilique  Péfloxacine, lévofloxacine	Negram, Urotrate,  Péflacine, Tavinic
<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol	Tifomycine
<b>Tétracyclines</b>	Doxycycline, chortéacycline	Vibramiycine, Tetramig
<b>Sulfamides</b>	Sulfaméthisol	Rufol
<b>Rifamycines</b>	Rifampicines	Rifadine

### II.2.3.3 Les mécanismes envisageables pour mener une action antibactérienne (Graham et *all.*, 2001)

#### II 2.3.3.1 Perturbation du métabolisme cellulaire (antimétabolites)

Ces composés inhibent le métabolisme du microorganisme ciblé mais pas celui de l'hôte, pour ce faire il bloque une réaction enzymatique catalysée qui doit se

réaliser dans la cellule bactérienne mais non dans la cellule animale, exemple : les Sulfamides.

### **II 2.3.3.2 Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes**

Cette action aboutit finalement à la lyse (éclatement) de ces cellules exemple: Les Pénicilline, les Céphalosporines. Comme les cellules animales ne possèdent pas de paroi ces substances n'exercent aucune action sur elles.

### **II 2.3.3.3 Interaction avec la membrane plasmique**

Ces substances interagissent avec la membrane plasmique des cellules bactériennes en modifiant leur perméabilité, ceci entraîne des conséquences fatales pour ces cellules exemple de ces substances : les Polymexines, Tyrothricines.

### **II 2.3.3.4 Perturbation de la synthèse protéique**

Le fait d'entraver la synthèse protéique dans une bactérie signifie que les enzymes indispensables à la survie de cette cellule ne peuvent plus être fabriqués, exemple de ces substances ayant ce type d'action antibactérienne : Rifampicine, Tétracycline, Chloramphénicol.

### **II 2.3.3.5 Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN**

Le dérèglement du fonctionnement de l'ADN empêche la cellule de se diviser Et/ou la synthèse des indispensables enzymes, exemple de ces substances : Acide nalidixique, Proflavine. Les différents mécanismes d'action des antibiotiques sont résumés dans le tableau 9. **(Le Minor et Veron 1989)**

**Tableau 9 : Résumé des mécanismes d'action des antibiotiques**

Antibiotiques	Mécanismes	Bacteriostase	Bacteriocidie
$\beta$ -lactamines	<b>Inhibition de la synthèse du péptidoglycane</b>		
Glycopeptides	Inhibition des PLP (activité transpeptidase), par analogie structurale du cycle $\beta$ -lactame avec le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du précurseur disaccharide-pentapeptide.		+
	Fixation sur le dipeptide terminal D-AlaD-Ala du disaccharide pentapeptide empêchant, par encombrement stérique, l'action des transglycosylases.	+	
Fosfomycines	Inhibition de la pyruvyl-trasférase cytoplasmique, qui permet la formation d'acides N-acétyl Muramique.		+
Aminoacides	<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>		
	Fixation sur la sous-unité 30S et/ou 50S du ribosome ; inhibition de la translocation du peptide en formation.		+
Tétracyclines	Fixation de la sous-unité 30S du ribosome ; inhibition de la fixation de l'aminocycle -tARN sur son site ribosomal.	+	
phénicolés	Fixation sur la sous-unité 50S ; inhibition de la liaison peptidique.	+	
Macrolides	Fixation sur la sous-unité 50S ; inhibition de la fixation de l'aminocyltARN, de la liaison peptidique, ou de la translocation.	+	+
Lincosamides		+	-
Streptogramines		+	
	<b>Altération des membranes</b>		
Polymyxines	Désorganisation membranaire par fixation sur les phospholipides des membranes externes et cytoplasmiques.		+
	<b>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</b>		
Quinolones	Formation d'un complexe ADN-Gyrase Quinolone ; arrêt de la synthèse de l'ADN		+
Rifamycines	Inhibition de la synthèse des ARN messagers par fixation sur l'ARN polymérase		+
			-
Nitroimidazolés	Fixation sur l'ADN et fragmentation.		+
			-

## II 2.3.4 Résistances bactériennes aux antibiotiques (Le Minor et Veron 1989)

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un phénomène dont l'étude peut être effectuée sur différents plans.

La capacité pour une souche de se multiplier dans une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la majorité de souches appartenant à la même espèce, est la définition bactériologique de la résistance, Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques des bactéries.

Le support génétique de la résistance caractérise en quelque sorte la souche :

- résistance naturelle caractéristique de l'espèce.
- résistance acquise définissant des populations variées au sein d'une espèce.
- Enfin, le dernier aspect de la résistance est son éventuelle expression clinique

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un caractère qui confère à cette souche la capacité de cultiver en présence d'une concentration « élevée » (ou inhabituelle) d'antibiotique.

### II 2.3.4.1 Origine du phénotype de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Le Minor et Veron 1989)

La figure 6 montre quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries. On connaît actuellement deux mécanismes génétiques pour qu'une bactérie devienne résistante vis-à-vis d'un antibiotique. (Le Minor et Veron 1989)

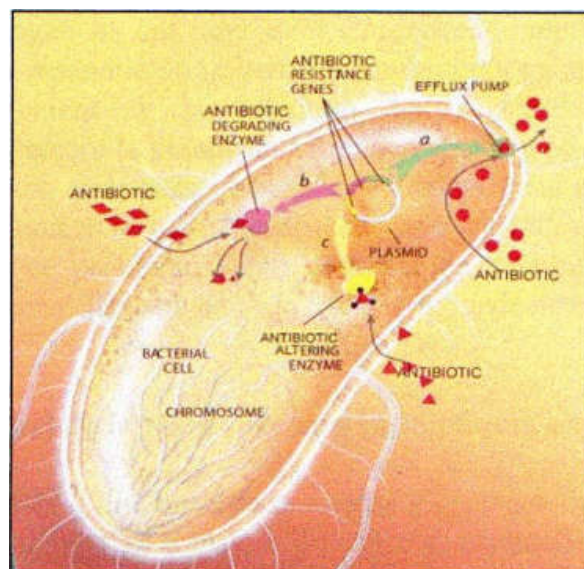


Figure 6: Quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries.

#### II 2.3.4.1.1 Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'une mutation

Les bactéries se multiplient à une cadence tellement rapide qu'il y a toujours une chance d'assister à une mutation qui peut rendre les bactéries résistantes à tel médicament. De nombreux mutants sont probablement détruits par les mécanismes naturels de résistances de l'hôte, mais lorsqu'un patient est traité massivement par des antibiotiques, quelques mutants résistants peuvent survivre et se multiplier en raison de leur avantage compétitif sur les souches sensibles, car l'antibiotique détruit les

bactéries sensibles qui pourraient habituellement concurrencer les souches résistantes. La conséquence peut en être l'émergence de germes pathogènes résistants.

Le taux de mutation vers la résistance varie selon les antibiotiques et du type d'infection.

#### **II 2.3.4.1.2 Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'un transfert de gène de résistance entre bactéries**

Dans ce cas la résistance est due à un phénomène d'addition d'information génétique permettant à la bactérie d'acquérir de nouveaux caractères : cette information est portée par des plasmides (plasmides R) mais aussi par des gènes mobiles: les transposons.

#### **II 2.3.4.1.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Nicklin et *all.*, 2000)**

Il existe 3 principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

##### **a- Inactivation de l'antibiotique (détoxification enzymatique de l'antibiotique) :**

- Enzyme modifiant l'antibiotique. Exemple : chez les bactéries à Gram positif, comme chez les bactéries à Gram négatif, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est souvent due à la production d'enzymes inactivant ces antibiotiques ( $\beta$ -lactamase). Ces enzymes hydrolysent les  $\beta$ -lactamines avec ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, et produisent de dérivés inactifs (**Flandrois et *all.*, 2000**).

##### **b- Réduction de la perméabilité de l'antibiotique:**

- Diminution de l'absorption de l'antibiotique.  
- Rejet de l'antibiotique. Exemple : la modification de la perméabilité de la bactérie aux sulfamides (**Flandrois et *all.*, 2000**).

##### **c- Modification de la cible de l'antibiotique:**

- Changement de la sensibilité de la cible vis à vis de l'antibiotique.  
- Nouvelle cible produite non sensible à l'antibiotique.  
- Superproduction de la cible. Exemple : la résistance à la rifampicine est déterminée par une mutation chromosomique, responsable d'une altération de la cible de l'antibiotique (**Flandrois et *all.*, 2000**).

##### **d- Développement d'une autre voie métabolique :**

- une autre voie métabolique suppléant la voie métabolique inhibée par l'antibiotique.

#### **II 2.3.5 Facteurs favorisant l'apparition des phénotypes de résistance chez les bactéries (Flandrois et *al.*, 2000).**

Une utilisation inadéquate des antibiotiques lors du traitement a un impact sur le phénomène de résistance aux antibiotiques. (Selon les données rapportées par le Conseil canadien sur la résistance aux antibiotiques par exemple, 51 % des 66 419 ordonnances rédigées pour les enfants canadiens d'âge préscolaire n'étaient pas nécessaires!). Cette situation alarmante pourrait s'expliquer en partie par le fait que:

- Certains médecins cèdent à la pression du patient qui désire un traitement pharmaceutique immédiat
- La prescription ; Prescrire un antibiotique pour une infection virale ou prescrire inutilement un antibiotique à large spectre d'action sont aussi des situations illustrant un usage inadéquat d'antibiotiques.
- L'arrêt d'un traitement antibiotique a comme conséquence de favoriser la prolifération des bactéries plus fortes qui n'ont pas été éliminées dans l'organisme. Certaines bactéries qui développent une résistance à un antibiotique ont la capacité de résister à un autre antibiotique. C'est ce qu'on appelle la résistance méritée.
- Le recours intensif à des antibiotiques dans l'élevage animal industriel contribue également au phénomène de résistance. Ajoutés dans l'alimentation animale, ils ont pour effet d'accroître le rendement en viande. Cette pratique très répandue de traitements antibiotiques sur une longue durée conduit inévitablement à la sélection de bactéries multirésistantes. Contaminant directement la viande au cours de l'abattage ou éliminées du tube digestif des animaux, elles passent dans les effluents, l'eau et l'alimentation et viennent ainsi coloniser le tube digestif des hommes (flore intestinale). Un moyen de pallier ce problème serait d'utiliser des antibiotiques ayant des mécanismes d'action différents de ceux utilisés en médecine humaine.

### **II 2.3.6 Mode de transfert de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries**

La figure 7 montre les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries. Le passage de l'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire de trois manières :

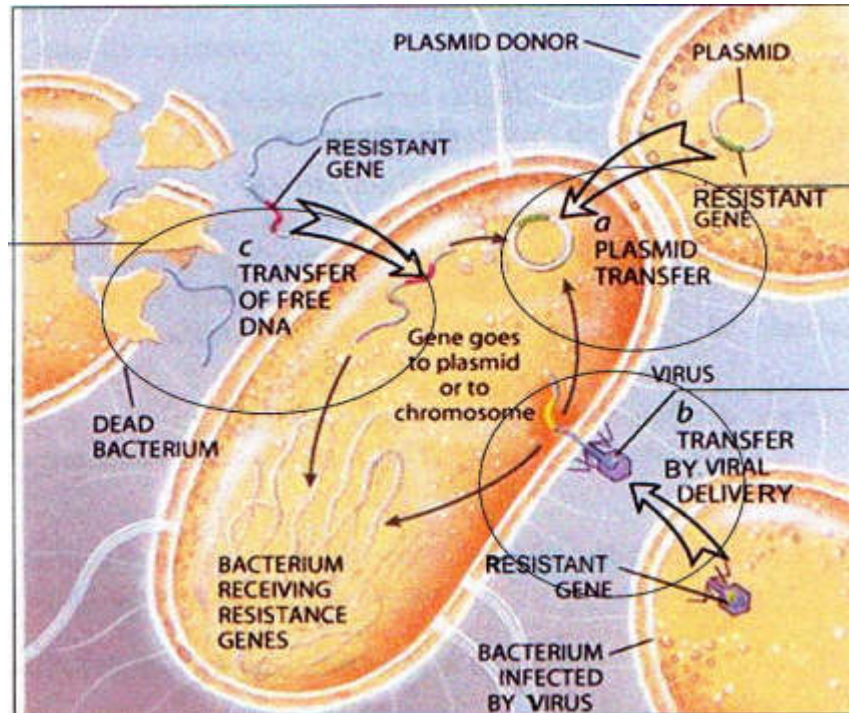
-Le transfert dit entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique (conjugaison).

- le transfert d'ADN nu (la transformation) et le transport d'ADN bactérien par des bactériophages (transduction) (**Prescott., Harley & Klein., 1995**).

-Le transfert de gènes par le processus de transformation a lieu dans le sol et dans des environnements marins, il représente une voie importante d'échanges génétiques dans la nature (**Prescott., Harley & Klein., 1995**).

La transduction peut s'observer chez un grand nombre de bactéries et de phages et on pense qu'elle joue un rôle significatif dans le transfert de matériel génétique dans la nature. (**Nicklin et *all.*, 2000**)





**Figure 7 :** les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries : a) conjugaison, b) la transduction, c) la transformation.

### II .2.3.7 Le rôle des éléments transposables dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (Prescott., Harley & Klein., 1995).

Les éléments transposables peuvent contenir des gènes autres que ceux de la transposition ; Par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de toxines. Les plasmides jouent le rôle de source et de cible pour les transposons porteurs de gènes de résistance.

Souvent les gènes de résistance sont contenus dans un transposon et il est donc possible d'acquérir rapidement des plasmides de résistance multiple. En fait, il semble que les plasmides à résistances multiples sont souvent produits par accumulation de transposons dans un plasmide unique. Les transposons se déplacent également entre les plasmides et le chromosome, donc les gènes de résistance sont aussi échangés entre plasmides et chromosomes ce qui entraîne une dissémination encore plus grande de la résistance aux antibiotiques.

Le fait que certains de ces plasmides soient transférés aisément entre espèces, favorise encore davantage la propagation de la résistance.

En conséquence, l'existence de ces éléments cause de graves problèmes dans le traitement lent des maladies infectieuses.

### **III. MATERIELS ET METHODES**

#### **1. Objectif**

L'objectif de cette étude est de contribuer à la caractérisation préliminaire des molécules bioactives (vis-à-vis des bactéries pathogènes) produites par des actinomycètes isolées antérieurement à partir des sols arides de la Wilaya d'ElBayadh (Ouest Algérien).

L'objectif principal de notre travail consiste en :

- Le choix du meilleur milieu pour la revivification des souches d'actinomycètes parmi les trois milieux ISP2, Bennett et GLM.
- La production des métabolites secondaires par fermentation sur milieu solide et en milieu liquide afin de comparer les rendements des deux méthodes qualitativement et quantitativement.
- Recherche de l'activité antibactérienne contre les souches les plus répandues dans les problèmes sanitaires et technologiques.
- Pré-identification des isolats actifs en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.
- La caractérisation partielle de la molécule bioactive impliquée dans le processus d'inhibition en utilisant les techniques physicochimiques disponibles au niveau de notre laboratoire.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires de bio-toxicologie pharmacologie et valorisation des plantes médicinales de l'université Dr. MOULAY TAHAR –Saida, Faculté des sciences Département de biologie, pendant la période allant de février à Mai 2016.

#### **III.2. Revivification des souches d'actinomycètes**

Les souches d'actinomycètes (**A4, A6, A7, A10, A18 et A19**), conservées sur gélose inclinée GLM et Bennett, sontensemencées dans les mêmes milieux (ISP2, GLM et Bennett) (annexe). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 21 jours.

#### **III.3 Vérification de la pureté des souches**

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect **macroscopique** caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis

par leur aspect **microscopique** (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique ( $G \times 10$ ).

### **III. 3.1 Macromorphologie et caractères cultureux**

Ces caractères sont déterminés sur les milieux, Bennett et GLM. Les milieux sont stérilisés et répartis en boîtes de Pétri qui sont incubées 24 h à 28° C avant leur utilisation. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation, l'importance de la croissance de chaque souche, le développement et la pigmentation du mycélium aérien et de substrat (dos de la colonie) sont déterminés.

S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brun-noir caractéristique des pigments mélanoides, la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

### **III.3.2 Micromorphologie**

#### **a). Observation au faible grossissement**

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

#### **b). Observation au fort grossissement**

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

#### **La procédure de cette coloration**

- ✓ Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen ;
- ✓ Coloration par violet de gentiane ou cristal violet .Laissez agir de 30 secondes à 1 min.  
Rincez à l'eau distillée ;
- ✓ Mordançage au lugol (solution d'iode iode-iodurée ) pendant 1 min. puis rinçage à l'eau distillé .
- ✓ Décoloration par l'alcool pendant 30 s, rincé à l'eau ;
- ✓ Recoloration à la fuchsine pendant 1 min, rinçage à l'eau puis séchage ;
- ✓ Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 ( $G \times 100$ )

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram -, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui

Décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram +, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (**Camille, 2007**).

### **III.3.3 Etude physiologique et biochimique**

#### **III.3.3.1. Etude physiologique**

##### **III.3.3.1.1.Hydrolyse de l'amidon**

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% (P/V) d'amidon soluble. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte par une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Geraldine et al, 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

##### **III.3.3.1.2.Hydrolyse de la gélatine**

Les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 0,4% (P/V) de gélatine, puis incubées 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Williams et Cross (1971)**).

#### **III.3.3.2 Etude biochimique**

##### **III.3.3.2.1 Utilisation des différents substrats carbonés et production de l'H<sub>2</sub>S**

Des tubes contenant le milieu TSI (Three Sugar Iron) sont ensemencés par piqûre centrale et en surface puis incubés pendant 7 à 14 jours à 30°C (**Marchal et al, 1991**)

. Les résultats se manifestent comme suit :

- Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune.
- Glucose positif : Culot jaune.
- La production de H<sub>2</sub>S est appréciée par l'apparition d'une coloration noire dans le milieu.

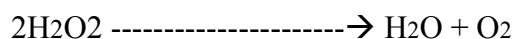
##### **III.3.3.2.2 Utilisation du citrate comme source de carbone**

Des tubes contenant le milieu citrate de Simmons sont ensemencés en strie longitudinale. L'incubation s'effectue à 30°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (**Marchal et al, 1991**).

### III.3.3.2.3 La recherche de catalase.

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante : **(Zermane , 2008)**

Catalase



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes: une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulle: catalase négatif **(Camille, 2007)**.

### III.3.3.2.4 La recherche de l'Uréase

Uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée, en dioxyde de carbone et ammoniac. Cette réaction consiste à versé 4 goutte d'urée-indole dans 4.5ml d'eau physiologique et par la suit ensemencées par la suspension bactérienne. la lecture est effectuée après 48h d'incubation à 30°C. **(Marchal et al., 1991)**.

- ❖ Si la couleur vire vers le rouge : uréase positif.
- ❖ Si la couleur reste inchangée : uréase négatif.

### III.3.3.2.5 La recherche de la production d'indole

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu urée-indole sont ensemencés. La lecture est effectuée après 24h d'incubation à 30°C. 2 à 3 gouttes de réactif de Kovac sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface **(Kitouni , 2007)**.

## III.4. Conservation des souches d'actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes sur les deux milieux Bennett et ISP2, pures, numérotées, sont conservées selon déférentes méthodes :

-Conservation en gélose inclinée à 4 °C après incubation de 21jours à 28°C un repiquage est effectué tous les deux mois **(Hilali et al., 2002)**.

- A la congélation à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

- Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu GLM sont remplis de l'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation **(Boudemagh, 2007)**.

## III.5. Recherche de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes est recherchée contre des bactéries tindicatrices qui ont été fournies gracieusement par Melle Itt HALIMA. Elles sont constituées de bactéries à Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313). Et aussi des bactéries à Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC 25922, *p. aeruginosa* ATCC 27853).

Les isolats d'actinomycètes ré-isolées sur milieu (ISP2, Bennett et GELM) ; ont fait l'objet d'une sélection pour leur activité antibactérienne. Le test d'antagonisme (cylindres d'agar) vis-à-vis des germes cibles utilisés a permis de mettre en évidence l'activité de ces isolats contre ces bactéries. Les isolats qui ont montré le plus large spectre d'activité vis-à-vis des germes cibles testés ont donc été retenus (**A2, A4 et A18**).

### **III.5.1. Revivification et des bactéries testes**

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

A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture est ensemencée en stries sur une boîte de Pétri contenant du milieu gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées (**Andriambololona, 2010**).

#### **III.5.1.1. Tests de confirmation de l'identité et de la pureté des bactéries indicatrices :**

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

Nous avons vérifié la pureté des souches de référence cibles par observation microscopique qui nous a permis de mettre en évidence la forme, l'arrangement cellulaire, la taille et le Gram (**Joffin et Leyral, 1988**)

Par faute de moyen, d'autres testes biochimique n'ont pas pu être effectués à savoir, le test de catalase de *S.aureus* (différencie les coques positifs) API 20E pour *E.coli* (**Marchal et al., 1882**), oxydase et API 20NE pour le diagnostic des bacilles Gram- (*P.aeruginosa*) (**Joffin et Leyral, 1988**).

#### **III.5.1.2 Préparation des inocula de bactéries-tests**

A partir d'une culture de 18h sur gélose nutritif (GN) une suspension de chaque bactéries-testes en eau physiologie (0.9% NaCl) est préparée.

La densité cellulaire de chaque suspension par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 650nm) de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$  UFC/ ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (**Cavalla et Eberlin, 1994**).

### **III.5.2. Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives : test des cylindres d'agar**

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées à la surface des milieux Bennett, GLM. Après 14 jours incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont prélevés, déposés à la surface du milieu Mueller Hinton (Annexe) préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries tests. Les

boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant 4 heures pour permettre un pré diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres sont alors mesurés (**Petrosyan et al., 2003**).

### **III.6. Production et extraction de métabolites secondaires**

#### **III.6.1. Production et extraction de métabolites sur milieu solide**

Les souches étudiées sont ensemencées en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 8 à 14 jours, la gélose est fragmentée puis repartie dans des flacons stériles contenant 25 ml du solvant méthanol, Les flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures. Avec agitation vigoureuse. Les extraits sont filtrés en éliminant les cellules vivantes et récupérés par centrifugation à 11000 g pendant 10 mn puis testés par la technique des disques (**Boughachiche, 2012**).

#### **III.6.2 Production et extraction de métabolites en milieu liquide :**

Des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de production des substances antimicrobiennes sont inoculés par les spores de l'isolat actif. Les Erlenmeyer sont incubés sous agitation, à 250 rpm, dans un Bains-Marie (Wise Buth) réglé à la température de 28°C. Après 14 jours d'incubation, la culture subit une centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes, afin d'éliminer le mycélium (**Ilić & al., 2005 ; Kamat & Kerkar, 2011 ; Pandey & al., 2011**).

Un volume de 20 ml de surnageant est mélangé avec le même volume des solvants organiques de polarités croissantes: chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. L'extraction des antibiotiques est effectuée sous agitation (250 rpm) à la température de 30 °C pendant une nuit (**Badji & al., 2011**). L'extrait organique obtenu est évaporé sous vide à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Bucki, R11**). Le résidu sec obtenu est repris dans 2 ml du même solvant d'extraction (**Naorungrote & al., 2011**).

#### **III.6.3. Technique des disques**

L'activité antibactérienne est évaluée en utilisant des disques de papiers filtres stériles de 6 mm de diamètres imprégnés par 20µl de chaque extrait, ainsi que l'extrait brut. Des disques contiennent les solvants purs sont utilisés comme témoins (**Raja & Prabakaran, 2011**). Après séchage, les disques sont déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par les souches testées cibles (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Escherichia coli* ATCC 25922, *p.aeruginosa* ATCC 27853) selon la technique NCCLS (**Vimal, 2009**). Les boîtes sont placées à 4 °C pour permettre une diffusion des substances, puis elles sont incubées à 37 °C; les zones d'inhibitions sont mesurés après 24 heures d'incubation (**Ayari & al., 2012**).

### III.6.4. Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

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

- En milieu solide, la CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait qui provoque l'apparition d'un spectre d'inhibition ou une zone d'inhibition (**Sinot, 1985; Couvarlin et coll, 1985**).

La CMI recherche contre les 4 bactéries testées précédemment. Une série de 7 dilutions dans le méthanol (coefficient de dilution égal à 0,5) est réalisée à partir de l'extrait actif 50mg/ml des 2 isolats. Les concentrations sont donc de 25mg/ml, 12.5mg/ml, 6.25mg/ml, 3,12mg/ml, 1,56mg/ml, 0,78mg/ml, 0,39mg/ml. Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imprégnés de 25µl de chacun des extraits de différentes concentrations préparées précédemment. Ils sont ensuite séchés pendant 15min dans une étuve, et déposés sur la culture dans la boîte de Pétri. Après 24h d'incubation à 37°C, la lecture des résultats se fait par observation de la présence d'halo d'inhibition (**Sinot, 1985 ; Couvarlin et coll, 1985**).

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

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

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

Nous avons effectué ensuite une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  pour avoir un inoculum final de  $10^6$  cellules/ ml.

- Préparation de la microplaque :

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



Après avoir bien mélangé le contenu du troisième puit, nous avons prélevé 100µL que nous avons mis dans le quatrième puit, puis du quatrième au cinquième et ainsi de suite jusqu'au dernier puit de façon à obtenir des dilutions successives de demi en demi. Les 100µL du dernier puit qui restent doivent être éliminés (Figure 8).

Enfin, nous avons introduit 100µL de l'inoculum dans chaque puits.

Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

Après une incubation de 24h à 37°C, nous avons ajouté l'indicateur de croissance ou de viabilité des bactéries qui est l'iodonitrotétrazolium (INT). Ce colorant est présent sous forme de sel violet. Lorsqu'il est dissout dans l'eau, il devient incolore.

Cet indicateur coloré est préparé en extemporané à 0,4 mg/ml dans l'eau distillée. 40µl de la solution de INT sont rajoutés dans chaque puit. La microplaque est incubée à nouveau à 37°C pendant 30 minutes.

Le tétrazolium sert comme un accepteur d'électrons, sous sa forme réduite il prend une couleur rouge. Lorsqu'il est ajouté aux puits où il y a une croissance microbienne avec libération d'électrons, il se transforme sous une forme réduite et le contenu de puit devient rouge. Quand les bactéries sont inhibées, le contenu des puits reste clair après l'incubation en présence de tétrazolium (**Al-Bayati, 2008**).

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

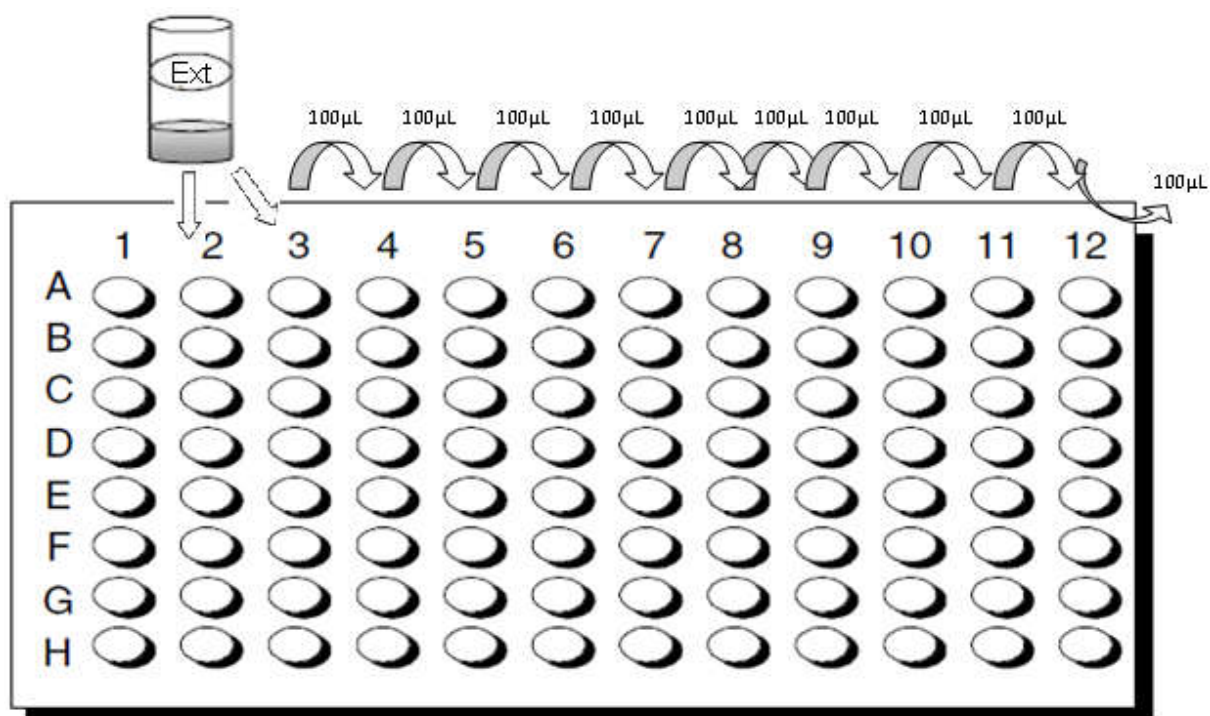


Figure 8 : Ensemencement de la microplaque.

### III.7 Caractérisation de la molécule bioactive

#### III.7.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'absorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille en plastique ou en aluminium. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Chaque tache détectée ou révélée est caractérisée par sa référence frontale donnée par la relation suivante (Randerath, 1971 ; Vernin, 1970). (Andriambololona, 2010).

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Rf: Référence frontale.

X : Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

#### Mode opératoire

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

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

➤ Déchlorométhane–méthanol (8,2)) **Andriambololona, 2010**).

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

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

### **III.7.2 Bioautographie des molécules bioactives**

L'activité de chaque spot obtenu après migration est appréciée par un test antibactérien des portions de plaque de CCM. Le mode opératoire est le même que celui de la technique de diffusion sur gélose mais au lieu d'employer des disques de 6mm imprégnés de l'extrait, on utilise directement les portions de plaque de CCM (**Andriambololona, 2010**).

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

## IV. RESULTATS ET DISCUSSION

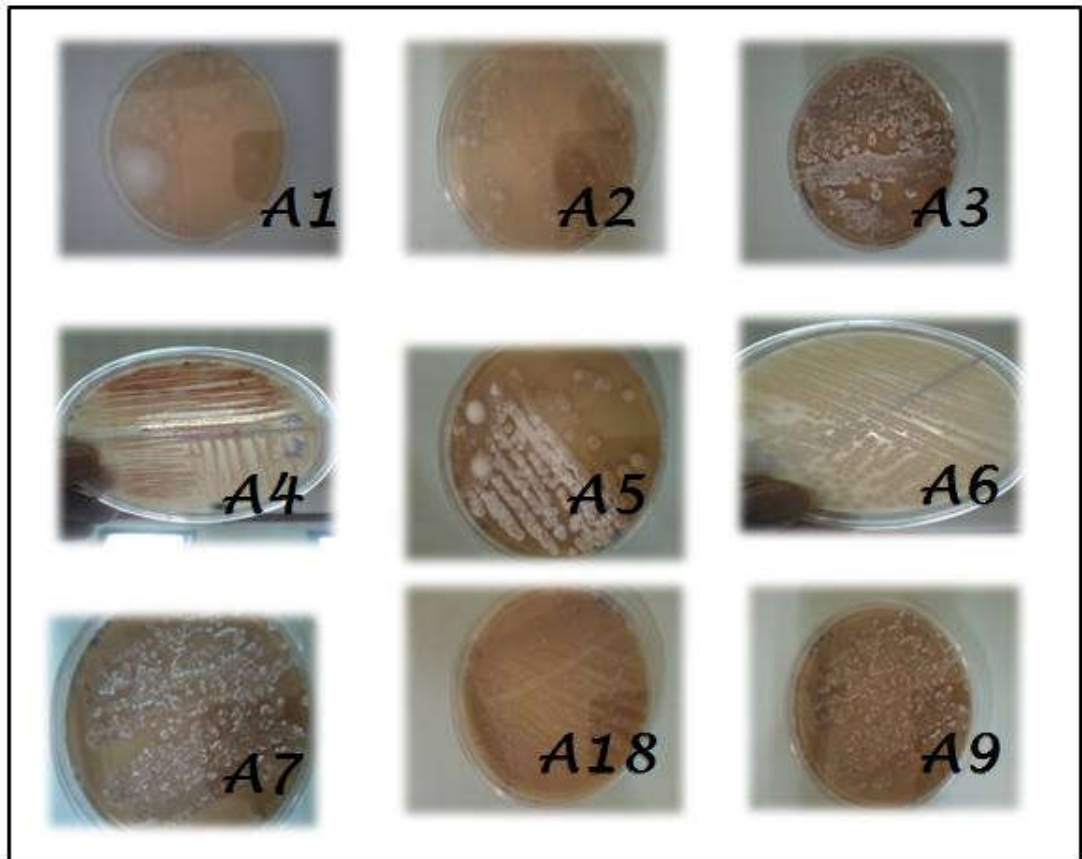
### IV. 1. Revivification et purification des isolats d'actinomycètes

Après 24 heures d'incubation à 28°C les actinomycètes apparaissent sur milieu ISP2, tandis que sur les autres milieux (GLM et Bennett) les colonies d'actinomycètes commencent à apparaître après 48 heures d'incubation et se développent lentement (tableau 9).

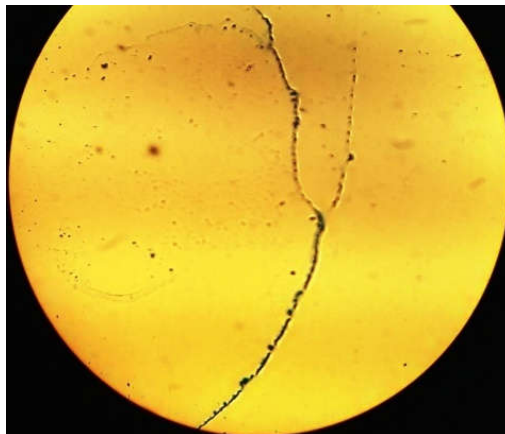
**Tableau 9** : Le nombre de colonie apparue sur chaque milieu en fonction de la durée d'incubation.

Milieu de culture	Nombre de colonies	La période
ISP2	3 à 4 colonies	24h
	10 à 15 colonies	48h
	30 à 33	72h
GLM	0 colonie	Les premières 24h
	3 à 5 colonies	A partir de 48 h
	30 à 33 colonies	7 jours
Bennet	0 colonie	Les premières 24h
	3 à 6 colonies	A partir de 48h
	30 à 33 colonies	7 jours

Après l'incubation à 28°C de deux à trois semaines, les colonies se rapprochent par leur aspect macroscopique aux actinomycètes (**Hilali, 2006**) elles sont observées au microscope (grossissement X 100) à l'état frais. Après coloration de Gram, seules les isolats à coloration positive et d'aspects filamenteux durs, incrustées dans la gélose sont dénombrées, puis, repiquées par les méthodes des stries sur les mêmes milieux de cultures utilisés pour la revivification (Bennet, GLM, ISP2) (**Bastide et al., 1986**). Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention de souches pures (**Cheraiti et al., 2012**) puis conservées, d'une part, à 4°C sur des géloses inclinées (**Hilali et al., 2002**) et, d'autre part, à -20°C en suspension en présence de glycérol à 20% (V/V) (**Kitouni, 2007**) en plusieurs exemplaire pour des travaux ultérieurs.

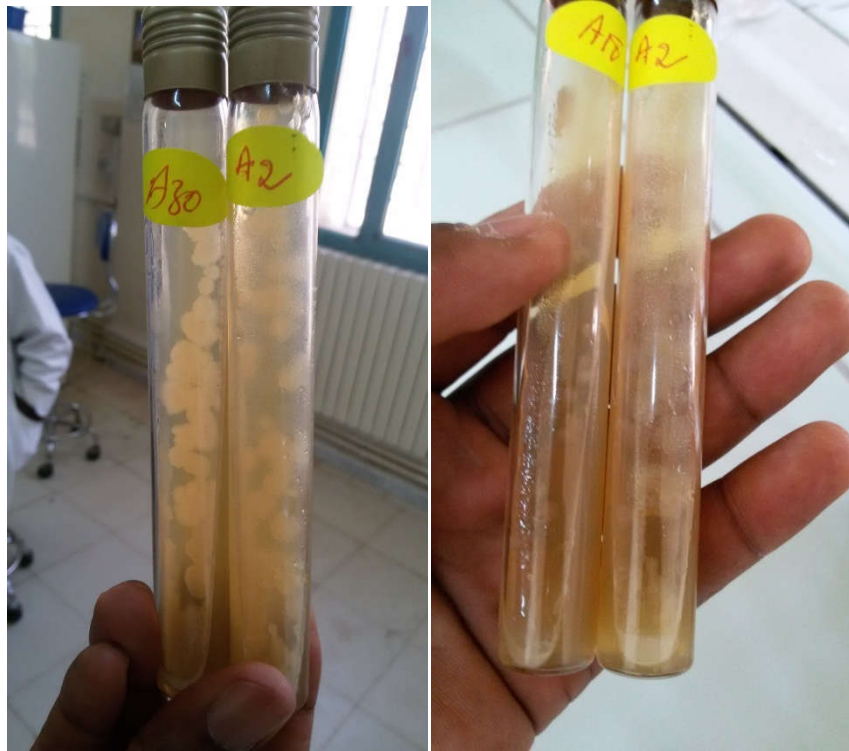


**Figure 9** : Aspect des souches d'actinomycètes après revivification et purification



**Figure 10** : Résultats de l'observation au fort grossissement (coloration de Gram) (x100)

L'observation microscopique, montre une coloration violette ; ce sont des bactéries à Gram positif, elle indique également la présence d'un aspect filamenteux ramifié segmenté ou non, parfois il est fragmenté, ce qui les rapproche aux actinomycètes.






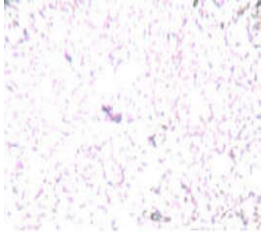

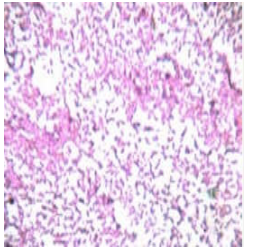


**Figure 11** : Résultats de conservation des isolats A2, A18 et A30 sur ISP2 incliné.

#### **IV. 2. Recherche de l'activité antibactérienne**

##### **2.1 Purification et confirmation de l'identité des bactéries-tests**

Le tableau 10 regroupe les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des bactéries indicatrices utilisées dans notre étude.

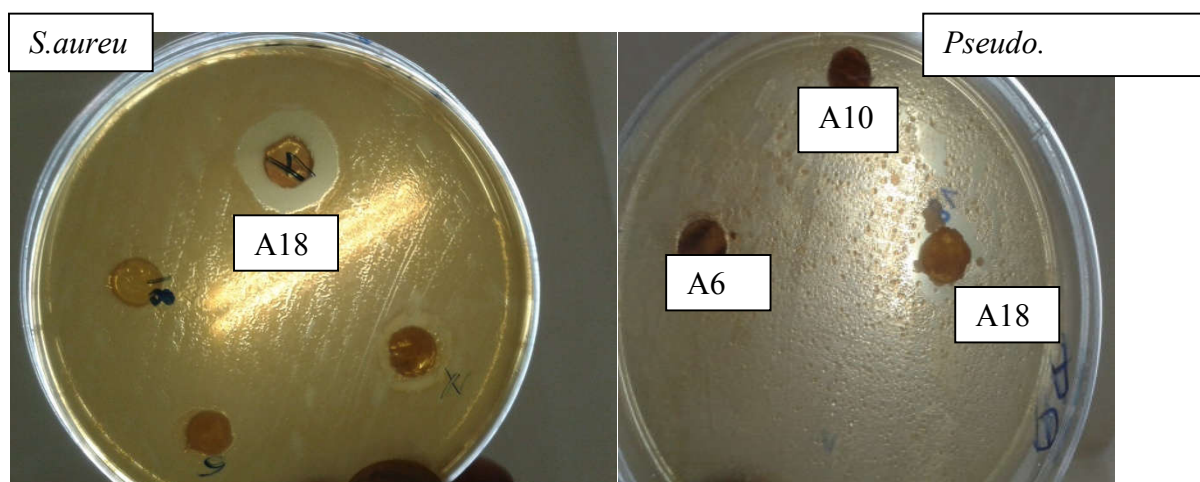
**Tableau 11:** Aspect macroscopique et microscopique des souches cible utilisées.

Souches de Références	Observation macroscopique	Notes	Observation microscopique (G×100)	Notes
<i>Staphylococcus Aureus</i>		Colonies de taille moyenne		Cocci Gram positif regroupés en grappes de raisins
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>		colonies de taille moyenne bombées muqueuses, contour régulier		Des bâtonnets très fins Gram négatif
<i>Escherichia coli</i>		Colonies de taille moyenne, contour régulier, lisse, bombées de couleur beige		Des bâtonnets Gram négatif de longueur et diamètre moyen
<i>Listeria monocytogenes</i>				bacille de petite taille, Gram positif non sporulé,



## 2.2 Confirmation de l'activité antibactérienne et sélection des souches actives : Test des cylindres d'agar

Nous avons testé l'activité antibactérienne des souches revivifiées et purifiées d'actinomycètes par la technique de cylindres d'agar (**Figure 12**), afin de sélectionner les souches les plus productrices de substances antibactériennes. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 12**.



**Figure 12** : Résultats du test d'antagonisme des isolats d'actinomycètes (cylindre d'agar)

**Tableau 12** : Résultat de l'activité antibactérienne (mm) des isolats d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar.

Activité antibactérienne (mm)				
Code	Gram+		Gram-	
	<i>S.aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
A2	15	0	0	17
A4	14	0	18	14
A6	10	0	0	16
A7	15	0	0	0
A18	19	0	15	0



Le test d'antagonisme montre que tous les souches d'actinomycètes sont actives contre au moins une bactéries-tests avec une différence de niveau d'activité ; A18 est la plus active (19mm contre *S.aureus*) tandis que A6 est la moins active (10mm contre *S.aureus*)

Alors qu'aucune des souches n'est active vis-à-vis de *Listeria monocytogenese*.

Ceux-ci est en contradiction avec les résultats obtenu par (Naimi,2015) qui ont montrés que ces même isolats sont bien actives contre *L.monocytogene*, cela peut être dû à l'acquisition de cette bactérie d'une résistance.

Les souches A4 et A18 sont actives contre *P.aerugenosa* avec des zones d'inhibitions de 18mm et 15mm respectivement, tandis que les souches A2, A6 et A7 ne présentent aucune activité contre la même bactérie-test.

Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que la plupart des souches sont actifs sur les bactéries à Gram positifs (à l'exception de *L.monocytogene*) que sur les bactéries à Gram négatifs (*E. coli*, *P.aerugenosa*). Cela, peut-être attribué à la différence morphologique qui existe entre les deux types bactériens. En effet les bactéries de coloration de Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de natures lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (Sateesh & al., 2011).

Plusieurs chercheurs ont observé la résistance remarquable des bactéries à Gram négatifs par rapport à leurs homologues bactéries Gram positif (Ullah & al., 2012).

Les isolats A2, et A18 ont été sélectionné pour leur pourvoir antibactérien remarquable.

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

#### 3.1. Résultat de l'étude morphologique

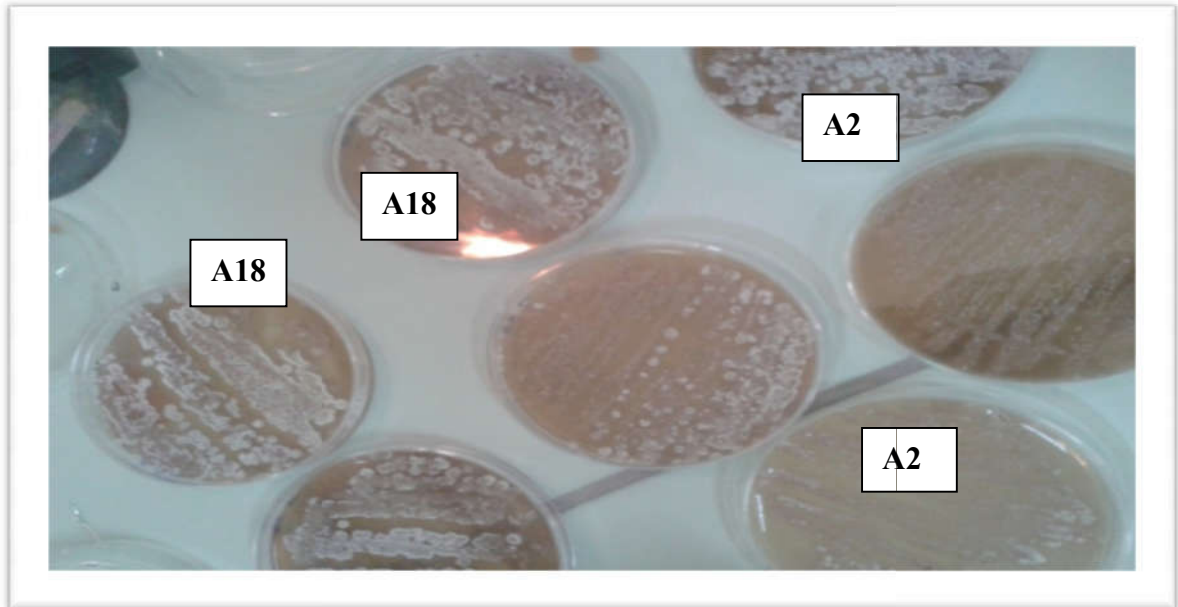
Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des isolats actifs sont résumés dans le (Tableau 13) (Figure 13).

**Tableau 13** : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des isolats actifs.

Code des souches	Milieu de culture	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Pigments diffusibles
A2	ISP2	Blanc, Marron	Beige, Marron	Gris
A18	GELM	Beige, Gris	Marron	Beige, Jaune

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

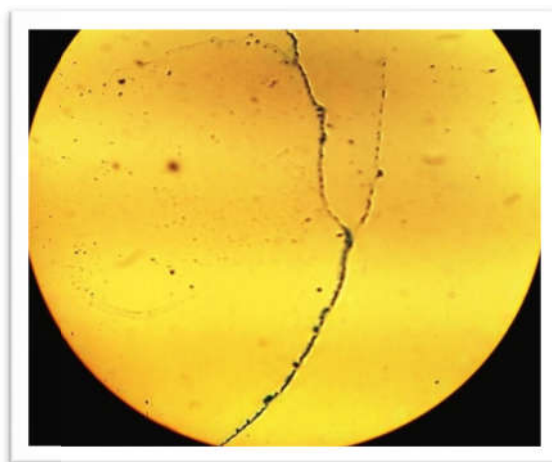
Après ensemencement sur les trois milieux GLM, ISP2 et Bennett, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. Au 14ème jour la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes tailles et de couleurs de mycélium aérien (blanc, beige, marron, gris ou Jaune).



**Figure 13** : Aspect du mycélium de substrat et du mycélium aérien sur le milieu AF des souches sélectionnées.

### 3.1.2. Aspect microscopique

Après 7 jours d'incubation, déposées des lamelles sur une lame, Il apparaît que les deux isolats développent un mycélium de substrat, de taille moyenne, ramifié et fragmenté.



**Figure 14** : Observation de l'isolat A18 après coloration de Gram (GX100)

### 3.2. Résultat de l'étude physiologique et biochimique

Le tableau 14 résume les résultats de l'étude physiologique et biochimique des isolats sélectionnés

**Tableau 14** : Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats actifs

Isolats \ Tests	Recherche de catalase	Hydrolyse de l'amidon	Hydrolyse de la gélatine	Dégradation de l'urée	Citrate	Production d'H <sub>2</sub> S	Glucose
A2	+	-	-	+	+	-	+
A18	+	+	+	+	+	-	+

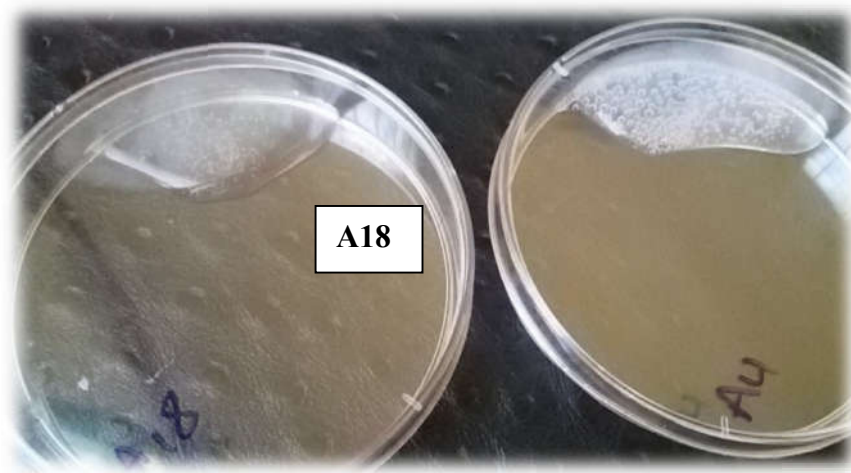
(-) : test négatif, (+) : test positif,



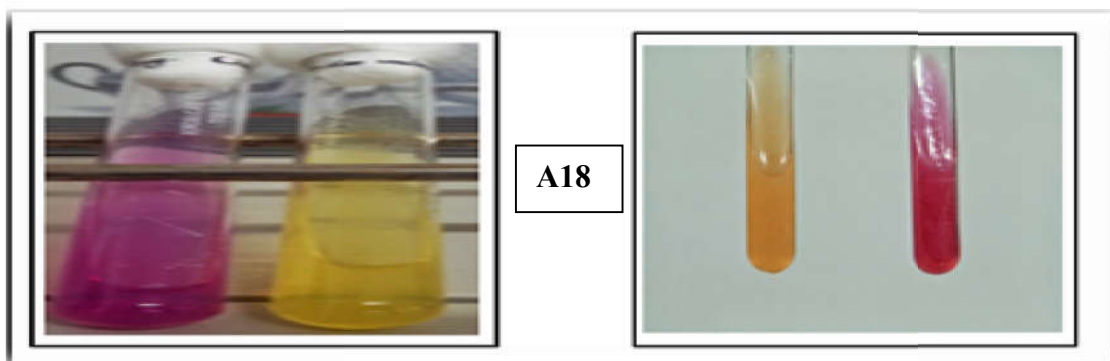
**Figure 15** : L'utilisation de citrate comme source de carbonnes par l'isolat **A18**.



**Figure 16 :** Résultat de l'hydrolyse de l'amidon par 18.



**Figure 17 :** Résultat du test de catalase pour A18



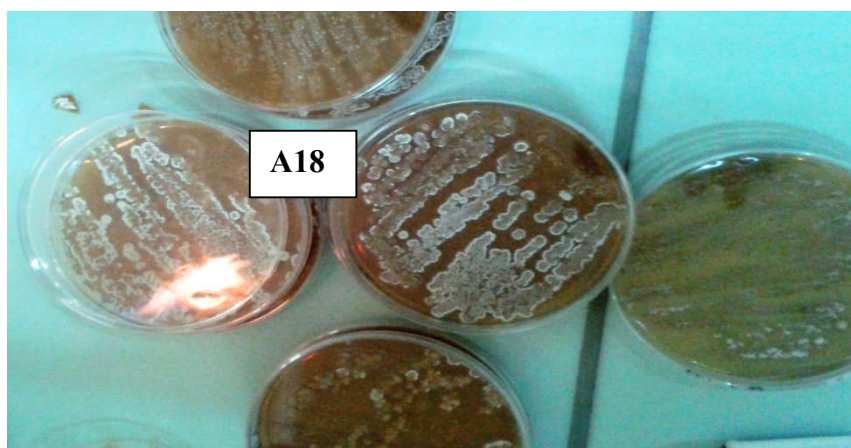
**Figure 18 :** résultat de test de l'uréase.

Ces résultats montrent que les deux isolats se développent sur les différentes sources de Carbone, ils montrent également qu'elles sont à catalase positive, alors qu'elles ne produisent pas de H<sub>2</sub>S.

#### 4. Production et extraction de métabolites secondaires

##### 4.1. Production de métabolites par fermentation sur milieu solide

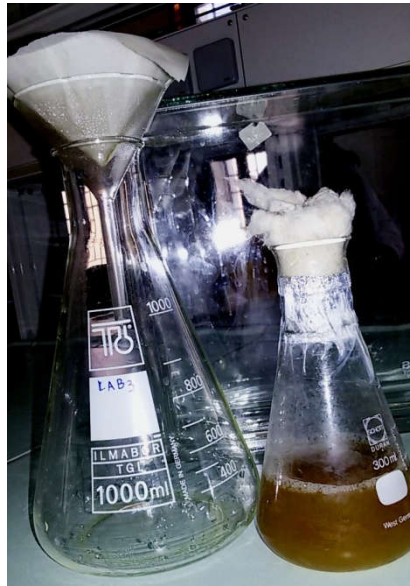
Les 2 souches d'Actinomycètes sont cultivées par fermentation sur le milieu AF solide (voir annexe) pour la production de métabolites secondaires pendant une période d'incubation de 7 à 14 jours à 28°C (**Figure 19**).



**Figure 19** : Fermentation de l'isolat A18 sur le milieu AF

Les métabolites secondaires produits par les souches d'Actinomycètes, lors de la fermentation pendant une incubation de 7 à 14 jours sur milieu AF solide, ont été récupérés avec le solvant organique. Nous avons utilisé comme solvant d'extraction le méthanol afin d'extraire la quasi-totalité des métabolites secondaires contenus dans le milieu de culture. Pour chaque culture, en utilisant 25ml méthanol, après filtration, centrifugation et évaporation à 40°C, on a obtenu 134mg et 183mg d'extraits respectivement d'**A2** et **A18**.

## 4.2. Production de métabolites par fermentation sur milieu liquide



**Figure 20** : Résultat de fermentation d'A4 en milieu liquide

Après 14 jours d'incubation dans un Bain-marie à 28°C sous agitation permanente, des troubles sont repérés dans l'Erlenmeyer, ce qui est dû à la fermentation, le contenu devient de plus en plus jaunâtre.

Un volume de 20 ml de surnageant est mélangé avec le même volume des solvants organiques de polarités croissantes: chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol par exemple (**Messoudi, 2012**). L'extraction des antibiotiques est effectuée sous agitation (250 rpm) à la température de 30 °C pendant une nuit (**Badji & al., 2011**). L'extrait organique obtenu est évaporé sous vide à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Bucki, R11**). Le résidu sec obtenu est repris dans 2 ml du même solvant d'extraction (**Naorungrote & al., 2011**).

Il est important de signaler ici que le test de l'extraction en milieu liquide montre un effet antibactérien négligeable par rapport à celui de la production en milieu solide.

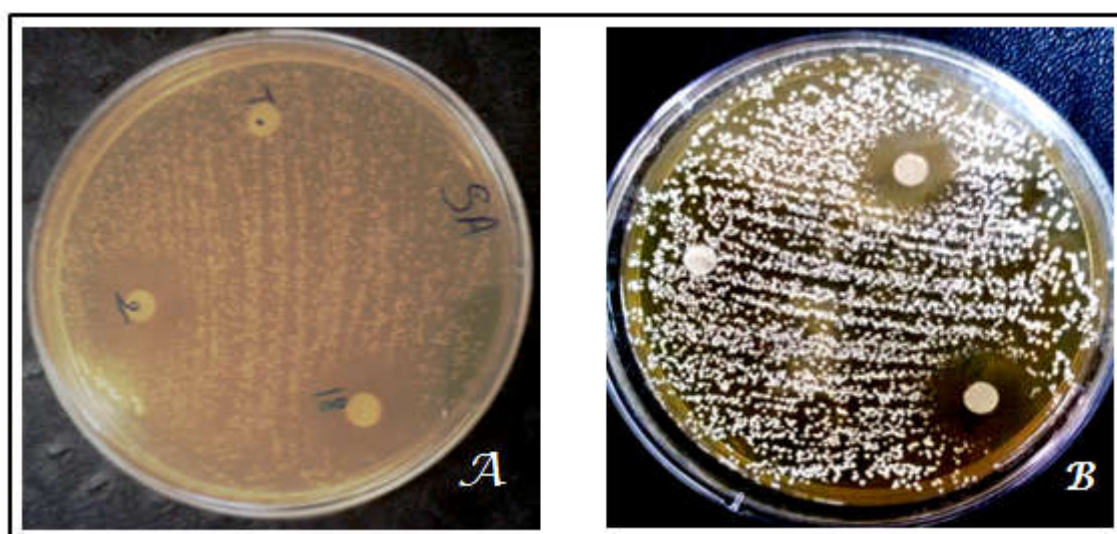
Par conséquent les extraits organiques étudiés des deux isolats **A2** et **A18** présentent des activités antibactériennes (**Figures 20**), ce qui montre que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle en milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**). Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des actinomycètes fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide.



Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les actinomycètes comme **Bussari et al., (2008)**.

#### 4.3 Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique (technique des disques) :

Après 24 heures d'incubation, nous avons observés que les deux extraits sont actifs sur les 4 germes testés. Cette activité est mise en évidence par la présence d'une zone d'inhibition autour des disques imbibés d'extrait avec 25 µl à une concentration de 60mg/ml. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 15.



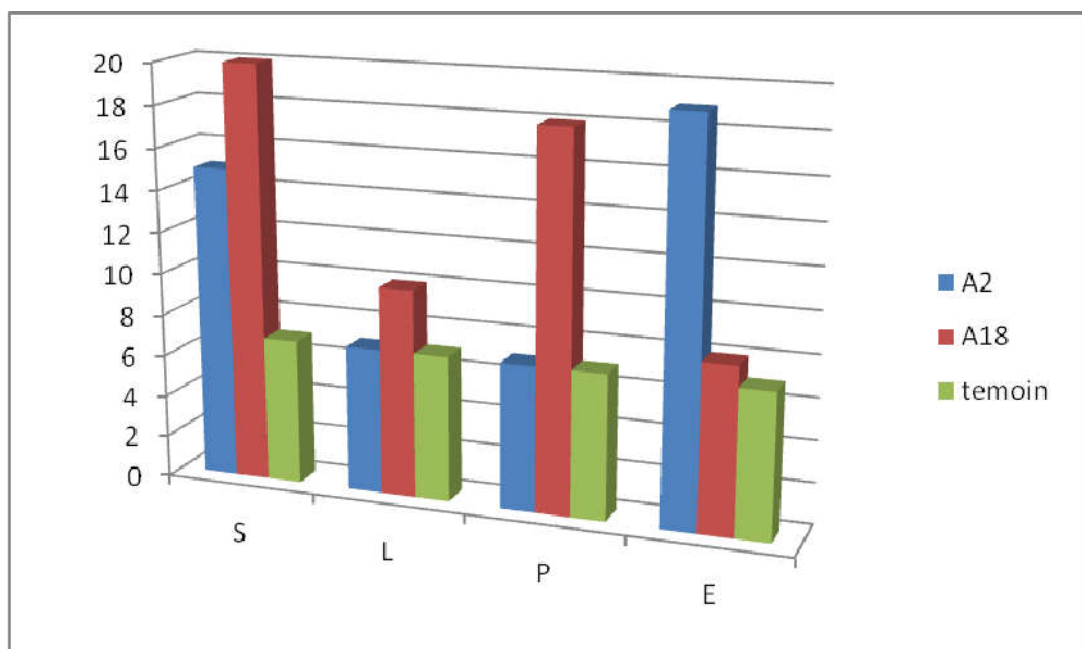
**Figure 21** : Résultats de l'activité antibactérienne par la technique des disques.

A= *Staphylococcus aureus*    B= *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau 15 :** Résultats de l'activité antibactérienne (mm) (technique de disques)

Code	Activité antibactérienne (mm)			
	Gram+		Gram-	
	<i>S.aureus</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
<b>A2</b>	15	7	7	19
<b>A18</b>	20	10	18	8
<b>Temoin</b>	7	7	7	7

A cette étape des travaux et à la suite d'une erreur technique, on a perdu nos deux extraits (A2 et A18), alors nous poursuivrons avec l'extrait brut d'A4



S= *S.aureus* ; L=*L.monocytogenese* ; P= *P.aeruginosa* et E=*E.coli*.

**Figure 22 :** Histogramme représentant l'activité (mm) des extraits contre les souches cibles.



#### 4.4 Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Sur milieu solide (Muller Hinton), des disques imbibés de différentes concentrations de l'extrait sont déposés sur la culture de *S. aureus*. Les résultats de l'effet des différentes doses de l'extrait 4 sur *S. aureus* après 24 heures d'incubation à 37°C sont regroupés dans le **tableau 16** :

**Tableau 16** : Résultats de la CMI de l'extrait **A4** contre *S.aureus*

Disques	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
Extrait						
<b>A4</b>	17	14	12	<b>7</b>	0	0

D'après ces résultats la valeur de la CMI de cet extrait est estimée à : **6,25(mg/ml)**.

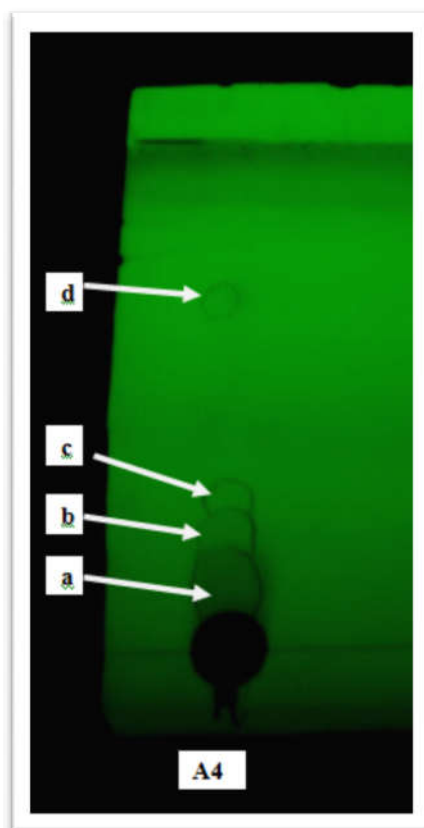
### 5. Caractérisation préliminaire de la substance antibactérienne sécrétée par la souche A4

#### 4.4.1 Résultat de la Chromatographie sur couche mince (CCM) (révélation chimique)

La caractérisation chimique des molécules bioactives sécrétées est faite par chromatographie sur couche mince en utilisant différent système de solvant, Notons que le système de solvants (Toluène-acide acétique (8 :2) a permis une séparation remarquable des composants de l'extrait (**Figure 21**), le **tableau 16** regroupe les résultats de séparation :



**Figure 23** : Résultats de révélation du chromatogramme à l'iode



**Figure 24** : Résultat de la CCM de l'extrait méthanolique de l'isolat A4 observés sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm).

**Tableau 17:** représente les Rf caractéristique des composés

Composé	A	B	C	D
Rf	0,06	0,17	0,28	0,66

La révélation à l'iode a donné une coloration brune dans les zones d'absorption (**Boughachiche, 2012**), les résultats de la CCM montrent que la séparation n'a eu lieu qu'avec le système de solvant (Toluène- acide acétique (8 :2)) qui est le mélange de solvants apolaire-polaire respectivement ; ce qui implique que notre extrait est soit formé d'une ou plusieurs molécules qui migrent avec différent solvant soit il s'agit de plusieurs molécules à polarité différentes à savoir les molécules dont les Rf caractéristiques sont regroupées dans le **tableau 16**.

La première hypothèse est la plus probable puisque selon **Guernet et Hamon (1981)**, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers. Généralement les actinomycètes ont la capacité de produire plusieurs antibiotiques sur le même milieu ou sur des milieux différents (**Davelos et al., 2004**).

## 5.2 Résultats de la Bioautographie des molécules bioactives

Les résultats du test de Bioautographie ont montré l'absence totale de zone claire autour des portions de plaque de CCM.

Cette révélation microbiologique montre une absence totale d'activité antibactérienne des taches de chromatogramme ; ceci peut être expliqué par une diminution de la concentration des molécules bioactives sur le chromatogramme après migration et séparation.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par (**Boughachiche, 2012**) qui ont montré que l'activité antibactérienne des chromatogrammes diminue ou disparaît, ce qui est expliqué par la diffusion des molécules bioactives dans le gel de silice ce qui diminue leur concentration (dilution).

En somme, Vu l'importance innombrable de ses molécules bioactives, cette caractérisation partielle n'est pas suffisante, il est nécessaire d'apporter des études plus avancées qui auront pour but de finaliser cette caractérisation est de trancher si ces substances pourront être utilisées dans la thérapeutique.

## Conclusion

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

Sur les 6 isolats d'actinomycètes testés, 3 isolats (**A4**, **A2** et **A18**) sont actifs envers au moins une bactérie-test, aucun isolat n'a donné d'activité vis-à-vis de la bactérie indicatrice (*Listeria monocytogenese*) des 3 isolats actinomycétaux. Les deux isolats **A18** et **A2** sont sélectionnés comme les isolats les plus actifs et le milieu de culture **ISP2** comme **meilleur milieu** de croissance.

La pré-identification de ces isolats a été réalisée en se basant sur les caractères physiologiques et biochimiques. La culture des isolats (**A2** et **A18**) sur le milieu **ISP2** donne des colonies poudreuses dont l'envers est de couleur grise à brune, un pigment brun est diffusible est sécrété par l'isolat sur le milieu, ce qui la rapproche du genre *Streptomyces*.

En termes de production de molécules bioactives (antibactériennes), la production de ces substances s'avère plus **rentable qualitativement** et **quantitativement** sur milieu solide que sur milieu liquide.

Pour leur importance dans la **pathologie infectieuse** humaine, les bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus subtilis* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont sélectionnées comme des souches types.

Afin de sélectionner les isolats à pouvoir de production d'antibactérien élevé, différents milieux de culture ont été utilisés (**AF**, **GLM** et **Bennett**) et différentes techniques à savoir la technique des cylindres d'agar qui s'avère la plus performante pour confirmer l'activité antibactérienne.

Selon les résultats de la **chromatographie sur couche mince**, les molécules bioactives de l'isolat **A4** présentent deux types de molécules, l'une polaire et l'autre est apolaire, ce qui reste à confirmer soit par HPLC.

La **CCM** a permis de séparer les produits de l'extrait méthanolique qui sont au nombre de 4 et de connaître leur polarité et leur rapport frontal, ceci en utilisant le système de solvant acétone-acide acétique (8-2).

Suite à l'obtention des 4 produits nous avons procédé à la **Bioautographie** qui n'a montré aucune activité pour tous les produits de CCM.

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

- L'identification moléculaire des isolats producteurs de ces métabolites.

- Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Etude de la solubilité et de la thermostabilité de ces molécules antibactériennes.
- La réalisation de la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 et l'analyse élémentaire, afin de déterminer la structure chimique de cette molécule antibactérienne.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE**

- **Alexander M. (1977)** Introduction to soil Microbiology. Krieger Publishing Company, Malabar: 467-468.
- **Andriambololona T. (2010)** antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and Dup 721. *Antimicrob Agents Chemother.* **31** (11): 1791-7.
- **Andriambololona T. (2010).** Etudes biologiques et chimiques des métabolismes secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe . Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies de biochimie en Biotechnologie et Microbiologie. Université d'Antananarivo . p 23.
- **Ayari. A, Morakchi. H & Gacemi.K. D. 2012.** Identification and antifungal activity of Streptomyces sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology* Vol: 11. N°: 2. Pp 305-311.
- **Badji. B, Mostefaoui. A, Sabaou. N & Mathieu. F. Lebrihi. A. 2011.** Identification of a new strain of Actinomadura isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. *African Journal of Biotechnology.* Vol 10. N° 63. Pp: 13878-13886.
- **Bastide. A, de Méo. M, Andriantsoa. M, Laget. M, Duménil. G. 1986.** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology.* Vol 2, N° 4. Pp: 453-466.
- **Beaman B.I. and Beaman L. (1994).** Nocardia species: host parasit relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 (2), 13-264.
- **Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.I., Thomson N.R., James K.d., Harris D.E. et al. (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-7.
- **Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 :1-26.
- **Berdy J., (1974).** Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.,* 18, 309-406.
- **Boudemagh. A. 2007.** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse doc en microbiologie appliqué: Université Mentouri Constantine. Pp : 144.
- **Boudemagh. A; Kitouni. M; Boughachiche. F; Hamdiken. H; Oulmi. L; Reghioua. S; Zerizer. H; Couble. A; Mouniee. D ; Boulahrouf.D ; Boiron. P. 2005.** Isolation and

molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*. Vol : 15. Pp: 39–44.

- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. et Vobis G.**, Organismes producteurs : biologie,taxonomie et écologie. In *Biotechnologie des antibiotiques*. **Larpent J. P. et Sanglier J.J., (1989)**, pp 32-61 ; Masson. Paris.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. 1989.** Organismes producteurs: biologie,Ctaxonomie et écologie. In “*Biotechnologie des Antibiotiques*”. Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson : Paris. Pp: 33-70.
- **Briand. Y. M. 2009.** Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. L'Harmattan : Paris. Pp : 360.
- **Camille D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.
- **Canu A. and Leclercq R., (2001).** Overcoming bacterial resistance by dual targetinhibition: the case of streptogramins. *Curr. Drug Targets. Infect.*
- **Cavala M. and Eberlin T.(1994).** Isolement des Streptomycetes du sol L'operon, XIX, 4,13-17.
- **Conn H. J., (1917).** Soil flora studies. V. Actinomycetes in soil. N. Y. Agr. Exp. Sta.,Tech. Bul. 60, 25 pp. Abstract in *Jour. Bact.*, 2, 149-154, 1917. In *The nomenclature ofthe Actinomycetaceae*. Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Crawford D. I., Lynch J. M., Whipps J. M. and Ousley M. A., (1993).** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ.Microbiol.* 59, 3899-3905.
- **Delhomme C., (1974).** Production d'un nouvel antibiotique par une souche deStreptomycetes. Thèse de doctorat 3ème cycle, Clermont-ferand . p. 90.
- **Dumenil D., Sanglier J. J. 1989.** Physiologie de la production des antibiotiques dans «*Biotechnologie des antibiotiques*».Masson (Ed). **195-217** pp.
- **Ensign J. C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C. A., (1993).** Physiology of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.*129, 2029-2036.
- **Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of streptomycetes coelicolor. A3 (2) on solid medium. *J. Gen. Microbial.* 129, 2029-2036.
- **Flandrois J.P., 2000.** Bactériologie médicale .collection Azay., p301.
- **Floyd M. H., Pieper R. L. and Mertz F. P., (1987).** Sporulation of *Streptomycesroseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* 2, 235 – 241.
- **Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Springer-Verlag. New York.

- **Goodfellow M. and Williams S. T., (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37,189 –216.
- **Gottlieb D., (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. In :Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A.Skinner. Academic Press, London, New York.
- **Graham L. P., 2001.** Chimie pharmaceutique. 2e édition De Boeck., 629p.
- **Hilali L., Khattabi A., Nssrlah N., Malki A., FinanceC. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.* 2 :49-53.
- **Hopwood D.A. (1999)** Forty years of genetic with Streptomyces: from in vivo through in vitro to in silico (review article). *Microbiology.* 145: 2183-2202.
- **Hwang B. K., Lim S. W., Kim B. S., Lee J. Y. and Moon S.S., (2001).** Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,3730-3745.
- **Hwang B. K., Lim S. W., Kim B. S., Lee J. Y. and Moon S.S., (2001).** Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,3730-3745.
- **Ilić. S. B, Konstantinović. S. S, Todorović. Z. B. 2005.** UV/VIS analysis and antimicrobial activity of streptomyces isolates. *Facta universitatis, Series: Medicine and Biology* Vol: 12. N°: 1. Pp. 44 – 46.
- **Joffin J. N., Leyral G., 1988.** Microbiologie technique. Tome1., p278.
- **Joffin J. N., Leyral G., 1988.** Microbiologie technique. Tome1., p278.
- **Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK : 613.
- **Kitouni. M. 2007.** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse doc: université MentouriConstantine. Pp : 176.
- **Lacey J., (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4, 113-121.
- **LE minor L. et Veron L., 1989.** Bactériologie médicale. Bd. Flammarion., p794.
- **Lechevalier & Lechevalier, 1970(a).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Vol : 20. N°: 4. Pp. 435-443.
- **Lechevalier & Lechevalier, 1970(b).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In : the actinomycetes. Prauser H.Fisher Verlag, Jena. Pp : 393-405.
- **Lee. E. J, Hwang. K. Y, Lee. H. S & Chung. N. 2011.** Characterization of a New *Streptomyces* sp. A1022 as a Potential Biocontrol Agent. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* Vol: 54. N°: 3. Pp:488-493.



- **Madigan M. T et Martinko J.M. (2007)** Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e édition : 331-423, 686-718.
- **Marchal N., Bourdon J. L., Richard C., 1882.** Les milieux de cultures. Bd. Doin.,p.482.
- **Marchal N., Bourdon J.L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs-Paris. P 50.
- **Mariat F. et Sebald M. (1990)** Les actinomycètes, dans : Leminor L. Bactériologie médicale. Médecine Science Flammarion Edition France: 54-62.
- **Marinelli F. (2009)** Antibiotics and Streptomyces: the futur and antibiotic discovery. Microbiology today. 2: 20-23.
- **Nicklin J.,Graeme K., Paget T. et Killington R., 2000.** L'essentiel en microbiologie .port royal livres berty editions., Paris., p362.
- **O'Donnel A. G., Minnikin D. E. and Goodfellow M., (1985).** Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. In "Chemical methods in bacterial systematics"(Goodfellow M. and Minnikin D. E., Coord.) pp 131-143. Ac. Press., London.
- **Peric-Concha, N. and Long, P.F. 2003.** Mining the microbial metabolome: a new frontier for natural product lead discovery. Drug Discov Today. Vol: 8. Pp: 1078-1084.
- **Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C., Flores M. E. (2003).** Streptomyces mexicanus sp. Nov., axylanolytic microorganism isolated from soil. Inter. J . Syst. Evol. Microbiol. p53, 269-273.(2003).
- **Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007)** Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles : 805-825.
- **Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2010.** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088.
- **Prescott., Harley & Klein., 1995.**Microbiologie. p887.
- **Pridham. T. G & Gottlieb. D. 1949.** The utilisation of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. J. Bacteriol. Vol 56. Pp: 107-114.
- **Raja. A & Prabakaran. P. 2011.** Preliminary screening of antimycobacterial effect of psychrophillic Actinomycetes isolated from Manali ice point: Himachal predesh. Journal of Microbiology and Antimicrobials. Vol. 3. N° 2. Pp: 41-46.
- **Rogers L. and Becker I., (1980).** Chemical composition of cell-wall preparation from various genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 13, 236 – 243.
- **Sanglier. J. J, Haag. H, Huck. T.A, Fehr. T. 1993.** Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). Res Microbiol. Vol: 144. Pp: 633-642.

- **Sateesh V. Naikpatil & Rathod. J. L. 2011.** Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. 3(10). Pp :48-53.
- **Shirling. E. B and Gottlieb. D. 1966.** Methods for characterization of streptomyces species. *International journal of systematic bacteriology*. Vol. 16. N° 3. Pp : 313-340.
- **Shirling. E. B and Gottlieb. D. 1966.** Methods for characterization of streptomyces species. *International journal of systematic bacteriology*. Vol. 16. N° 3. Pp : 313-340.
- **Sinot J. (1985).** Evaluation de l'activité des antibiotiques in-vitro. In : *Le Minor L. Bactériologie médicale*. Doin éditeur. 111p.
- **Stackbrandt E., Geobel B. M. 1994.** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic of Bacteriology*. **44: 846-9.**
- **Suzuki S.I. (2001).** Establishment and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy*. 15(2), 55-60.
- **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.
- **Ullah. I, Masood Arshad. M, Chuadhry. I. J. M, Noureen. U, Jadoon. W. A; Jadoon. M. A. 2012.** Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec. Zool. Surv. Pakistan*. Vol : 21. Pp: 10-13.
- **Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K. et Sudha S. (2008)** Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr J Biotechnol*. 7(18): 3225-3230.
- **Waksman. S. A. 1961.** The actinomycetes. vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC : Baltimore. Pp : 327.
- **Waksman. S. A. 1961.** The actinomycetes. vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC : Baltimore. Pp : 327.
- **William B. Whitman, Peter Kämpfer, Michael Goodfellow, George M. Garrity, Wolfgang Ludwig. 2012.** *Bergey's manual of systématique*. 2rd. volum 5. Springer, New York. Pp: 1750.
- **Williams S.T. and Cross T., (1971).** Actinomycetes. In: *Methods in microbiology*. Booth C. Ed., Academic Press, London. **4**, 295-334. *microbiology*. Booth C. Ed., Academic Press, London. **4**, 295-334.
- **Zermane F. (2008).** Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine.

- **Zhang, L. and Demain, A.L., 2005.** Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural products. In: Natural products, drug discovery and therapeutic medicine. Humana press. Totawa, New Jersey. Pp: 382.

## ANNEXES

### Milieux de culture

#### **Bennett**

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

pH= 7.3

#### **Bennett liquide**

Extrait de levure 1g  
Extrait de viande de bœuf 1g  
Peptone pancréatique de caséine 2g  
Glucose 10g  
Eau distillée 1000ml

pH= 7.3

#### **Glucose - Extrait de levure-Malt (GLM)**

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

pH = 7.2

#### **ISP2 (International Streptomyces Project)**

Extrait de levure 4g  
Extrait de malt 10g  
Glucose 4g  
Agar 20g  
Eau distillée 1000ml

pH= 7.3

#### **Tryptone -Sel-Eau (TSE)**

Tryptone 1g  
Na Cl 8.5g  
Eau distillés 1000ml

#### **Eau physiologie**

Na Cl 9g  
Eau distillée 1000ml

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

Infusion de viande 300 g

Hydrolysate de caséine 17,5 g  
Amidon 1,5 g  
Agar 17 g  
Eau distillée 1000 ml

pH=7,4

**Bouillon nutritif (BN)**

Peptone 10 g  
Extrait de levure 5 g  
Na Cl 5 g  
Eau distillée 1000 ml

pH = 7,2

**Gélose nutritive (GN)**

Peptone 10 g  
Extrait de levure 5 g  
NaCl 5 g  
Agar 15-20g  
Eau distillée 1000 ml

pH= 7,2

**Gélose TSI (Triple Sugar Iron)**

Peptone de viande 15g  
Protéose peptone 5g  
Extrait de viande 3g  
Extrait de levure 3g  
Glucose 1g  
Saccharose 10g  
Lactose 10g  
Citrate de fer ammoniacal 0,3g  
NaCl 5g  
Sodium thiosulfate 0,3g  
Rouge de phénol 0,05g  
Agar 18g  
Eau distillée 1000ml

pH =7,2

**Citrate de Simmons**

Ammonium dihydrogenophosphate 1g  
Phosphate de dipotassique 1g  
Chlorure de sodium 5g  
Citrate de sodium 2g  
Sulfate magnésium 0,2g  
Bleu de bromothymol 0,08g  
Agar 15g  
Eau distillée 1000ml

pH= 6,8

**Urée-indole**

L-tryptophane 3g

Phosphate de dipotassique 1g  
Phosphate monopotassique 1g  
Chlorure de sodium 5g  
Urée 20g  
Rouge de phénol 2,5g  
Eau distillée 1000ml

pH= 6,8

### **Milieu AF**

Extrait de levure 4g  
Extrait de malt 10g  
Glucose 2g  
NaCl 2,5 g  
CaCO<sub>3</sub> 1g  
Agar 15g  
Eau distillée 1000ml

pH = 7

### **Les colorants**

#### **Lugol**

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

#### **Violet de gentiane**

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

#### **Fuchsine**

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



