

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. MOULAY Taher » de Saida

Faculté des sciences

Département de biologie



Laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme du Master en biologie

Option : Microbiologie appliquée

Caractéristique biochimique des métabolites bioactifs
produits par des actinomycètes

Présenter par : Mr AZIZ ISMAIL

M^{ELLE}. HADJ SAYAH ZOUBEYDA

Soutenue publiquement, le 28/6/2018 devant le jury composé de :

Mr. Si Taieb T	Maitre de conférences « A » Université de Saida	Président
Mr. Benreguieg M.	Maitre de conférences « B » Université de Saida	Examineur
Mr. Adli D. H.	Maitre de conférences « A » Université de Saida	Encadreur

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour terminer ce travail

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Dr. Adli D. H.M.A..P. Université de Saïda qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux.

Ma vive reconnaissance va au Dr. Benreguiég M. ..A..G..B. Université de Saïda d'avoir accepté de présider le jury Dr. si tayeb. tayeb de soutenance du mémoire, ainsi qu'aux Dr.si tayeb. tayeb M.G.A. Université de Saïda accepté de juger ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université Dr. Moulay Tahar- Saïda-

Nos remerciements s'adressent également aux les professeurs de l'université Dr Moulay Tahar a saïda Mr.Halla N, Mr.Ammam, Mme.Amara pour leur aide précieuse, pour leurs conseils scientifiques, pour leurs soutiens et leurs gentillesse et encouragements et leurs bonnes humeurs.

Nous voudrions exprimer nos reconnaissances envers les amis :(Rahil Aek , Hamel . R et Amari. F)

Que nos remerciements aillent aussi à nos parent, nos frères et sœurs pour ses encouragements et ses prières, et toute personne ayant participé de près ou de loin dans les résultats présentés dans ce travail.

La liste est longue mais il me tient particulièrement à cœur de remercier toutes les personnes qui m'ont consacré une partie de leur temps et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce travail :

Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

Mon adorable mère qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. Que dieu la protège et lui donne bonne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

Mes frères, mes sœurs Hamoud et Joud pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant.

Mon époux Aek d'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Zoubeyda

Dédicace

A mon très cher papa, en témoignage d ('affection et Te soutien que tu m'as offert depuis ma naissance.

A ma très chère maman qui a éclairé mon chemin et qui m'a encouragé et soutenue tout au Long de mes études, tu m'as comôfé avec ta tendresse et tes sacrifices.

Aucun mot ne saurait exprimer ma gratitude, mon amour et mon profond respect à vous deux, Puisse Dieu, tout puissant, vous prêter Longue vie, santé et bonheur

Mes frères, mes sœurs et pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant.

A toute personne qui me connais de près ou de Loin

Ismail

°C : Degré.

Um : Micromètre.

nm :nanomètre

mm ;millimètre

cm centimètre

m :mètre

ml : Millilitre.

NaCl : Chlorure de sodium.

Ul : : Microlitre.

pH : Potentiel d'Hydrogène

% Pourcentage.

ATB : Antibiotique.

S/C : sous-classe

S/cl : Sous classe.

S/O : Sous ordre.

S/O : sous-ordre

P : Poids

V :volume

ADN : Acide désoxyribonucléique

- ARN : Acide ribonucléique

ADNr

ARNr

ARNm

Mn²⁺

Cu²⁺

Fe²⁺

CCM

Mn : minute

g : Gramme.

mA

V ;volte

m :masse

v :volume

S ,aureus ;Staphylococcus aureus

E,coli Escherichia coli

P,aeru : Pseudomonas aeruginosa

K,pnomo :Klebsiella pneumoniae

G ; Grossissement

ATTC : American Type Culture Collection.

Ca⁺⁺ Calcium.

CaCO₃ : Carbonate de calcium.

CO₂: Dioxyde de Carbone

Gram- : Gram negative.

Gram+: Gram positive

H₂O : Eau.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

h : heure

- : négatif

+ : positif

BN bouillon nutritif

GN : Gélose nutritif.

AF : Actinomycète fermentation

UV :

(Rf), Rapport frontale

DO :

CMI : la concentration minimale inhibitrice

(CMB): la concentration minimale inhibitrice bactéricides

S: Seconde

LISTE DE FIGURE		N°=de page
Figure 01	Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).	05
Figure 02	Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton et al., 1989).	14
Figure 03	structure chimique des β -lactamines	16
Figure 04	structure chimique de céphalosporine.	17
Figure 05	structure chimique d'aminoside.	18
Figure 06	structure chimique de Les phénicols.	19
Figure 07	structure chimique tétracycline.	20
Figure 08	structure chimique de quinolones.	20
Figure.09	Mode d'action des antibiotiques (TORTORA, 2012).	22
Figure 10	méthode d'extraction des métabolites en milieu Actinomycète fermentation.	36
Figure 11	rota vapeur (BUCHI Rota vapeur R-200) utilisé pour la concentration des métabolites secondaires.	37
Figure 12	Mise en évidence de l'activité antibiotique des extraitsde l'isolat d'actinomycètesur milieu Muller-Hinton par la méthode des puits.	41
Figure 13	La préparation de la concentration minimales inhibitrice (CMI)sur microplaque	42
	Présente la lecture de la concentration minimales bactéricides (CMB)	43
Figure 14	électrophorèse pour la séparation de l'antibiotique.	45
Figure 15	coloration et décoloration de gel.	45
Figure 16	Aspect macroscopique des souches actinomycétales.	47
Figure 17	Observation microscopique du mycélium aérien des isolats d'actinomycètes (x100).	48
Figure 18	observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram.	49

Figure 19	Test de la catalase : Formation de bulles de gaz.	49
Figure 21	Test d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes	50
Figure 22	Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes en fonction des souches tests utilisées	51
Figure 23	Test d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre <i>staphylococcus aureus</i> .	52
Figure 24	inhibition de la déférente concentration des souches pathogènes par des actinomycètes	55
Figure 25	L'activité antibactériennes des souches A4 et A18.	55
Figure 26	Diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de concentration	58
Figure 27	démentant le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A4.	59
Figure 28	démentant le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A18.	61
Figure29	les différents produits des extraits sous UV.	63
Figure30	Les déférent protéines de l'extrait A4 par méthode d'électrophorèse	66

LISTE-DE-TABLEAU		N°=de page
Tableau 1	La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (GARRITY et al, 2004 cité par AOUAR, 2006).	10
Tableau 2	Importance relative des groupes microbiens producteurs d'antibiotiques (Okami ,1988)	
Tableau 03	les maladies et les infections causées par les souches pathogènes	28
Tableau 04	Les souches bactériennes testées.	33
Tableau07	Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes	49
Tableau 08	aspect macroscopique et microscopique des souches de références cibles.	51
Tableau 09	le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A4.	53
Tableau 10	Sensibilité des différentes concentration des souches testées vis-vis des substances antibactériennes sécrétées par différents Actinomycètes	54
Tableau 11	le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A14.	58
Tableau 12	le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A18.	60
Tableau 13	Résultats de la chromatographie sur couches mince	63
Tableau 14	Détermination de CMI de l'extrait A4 sur les souches testées	64
Tableau 15	Détermination de CMI de l'extrait A18 sur les souches testées	65
Tableau 16	Concentration minimale bactéricides (mg/ml) des différents extraits des Actinomycètes vis-à vis des souches testées	65

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. Les travaux d'isolement de ces microorganismes à partir des écosystèmes extrêmes comme les sols arides et semi-arides de l'Algérie sont rares. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche des souches productrices de molécules antimicrobiennes dans les sols des zones arides et d'optimiser les conditions de leur production.

Parmi les deux milieux International Streptomyces project 2 (ISP2) et le milieu Gélose Yeast Malt (GYM) testés dans ces investigations, le milieu Gélose Yeast Malt (GYM) est le plus favorable pour la croissance des Actinomycètes. Le test de mise en évidence des activités antimicrobiennes, a révélé que cinq souches A18, A4, A30, A17 et A15 sont douées d'activités antibactériennes et antifongiques dont l'importance varie selon le milieu de culture et les souches employées, Ces molécules sont avérées, également, actives contre des bactéries Gram positif. L'activité antimicrobienne a été testée contre 4 bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC0409P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli*) et levure *Candida albicans* ATCC2091. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner deux souches d'actinomycètes codées A4 et A18 qui ont une activité antibactérienne. Enfin, Ces souches ont été cultivées par fermentation sur milieu solide Actinomycète fermentation (AF) afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. L'extrait méthanolique était actif contre les cinq bactéries pathogènes testées (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). nous a permis de constater que ces substances ont un effet antibactérien efficace.

Les Mots clés: Actinomycètes; Substances bioactive, antimicrobiennes, fermentation

Abstract

Actinomycètes are bactérie responsable for the production of Most bioactive molécules. The isolation of thèse microorganismes frome extrême écosystèmes such as the aride and semi-aride lands of Alegria Is rare. In This Works, web are intéresse in researching strains producing antimicrobial molecules in arid soils and optimizing the conditions of their production.

Of the two media International Streptomyces project 2 (ISP2) and the Yeast Malt Agar medium (GYM) tested in these investigations, Yeast Malt Agar (GYM) is the most favorable for the growth of Actinomycetes. The test of highlighting the antimicrobial activities carried out is the medium of best Hinton, revealed that five strains A18, A4, A30, A17 and A15 are endowed with antibacterial and antifungal activities whose importance varies according to the culture medium and These strains are also found to be active against Gram-positive bacteria. The antimicrobial activity was tested against 4 pathogenic bacteria (Staphylococcus aureus ATCC 25923 Entirococcus feacalis ATCC0409P, Pseudomonas aerogenosa ATCC27853, Escherichia coli) and yeast candida albicans ATCC2091 . The results obtained allowed us to select two strains of actinomycetes coded A4 and A18 which have an antibacterial activity. Finally, these strains were cultured by solid fermentation Actinomycete Fermentation (AF) to produce extracts rich in secondary metabolites. The methanolic extract was active against the five pathogenic bacteria tested (S, aureus, B, sebtillus, B, cer, K, pneumonia P, aeroginosa). has shown us that these substances have an effective antibacterial effect.

Keywords: Actinomycetes; Bioactive, antimicrobial substances, fermentation

المخلص

الأكتينوميسيتات هي البكتيريا المسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات النشطة بيولوجيا. إن عزل هذه الكائنات الدقيقة من النظم البيئية القاسية مثل الأراضي القاحلة وشبه القاحلة في الجزائر أمر نادر الحدوث. في هذا العمل ، نحن مهتمون بالبحث عن السلالات المنتجة للجزيئات المضادة للميكروبات في التربة القاحلة وتحسين ظروف إنتاجها.

العزل على أوساط انتقائية مختلفة GYM، ISP2، بين أن الوسط GYM هو الأفضل من حيث نمو الأكتينوميسات.

. يجرى الاختبار على الأنشطة المضادة للميكروبات ووسط أفضل وجدت أن خمسة سلالات A18 ، وهبت A4 ، A30 ، A17 و A15 مع أنشطة مضادة للجراثيم والفطريات التي يختلف مع مستنبت أهمية و السلالات المستخدمة، وقد ثبت أن هذه الجزيئات، ونشط أيضا ضد البكتيريا المضادة للجراثيم إيجابية الجرام تم اختباره ضد أربعة مسببات الأمراض البكتيرية (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Enterooccus feacalis* ATCC0409P) (*Escherichia coli* ، *Pseudomonas aerogénosa* ATCC27853) و *candida albicans* ATCC209). سمحت لنا النتائج التي تم الحصول عليها باختيار سلالتين من الأكتينوميسيتات المشفرة A4 و A18 التي لها نشاط مضاد للبكتيريا .. وأخيرا ،

النتائج بينت أن الأكتينوميسات A4 والأكتينوميسات A18 نشطوا بشكل جيد ضد البكتيريا ، ولذلك قمنا باستخلاص A4 والأكتينوميسات A18 النتائج بينت أن الأكتينوميسات المركبات الثاذه الأكتينوميسات بفعل الميثانول بعد أن تم تخميرها ووسط انتقائي AF. كان المستخلص الميثانولي فعال ضد البكتيريا المسببة للأمراض الخمسة المختبرة (S ، aureus ، B ، sebtillus ، cer ، K ، Pneumal pneumonia). وقد أظهر لنا أن هذه المواد لها تأثير مضاد للجراثيم فعال.

كلمات البحث: الأكتينوميسات؛ المواد النشطة بيولوجيا ، المواد المضادة للميكروبات ، التخمر

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction..... 1

Chapitre I

I.1 Historique.....4

I.2. Définition.....4

I.3. Caractères généraux.....5

I.3.1. Morphologie.....5

I.3.2. Physiologie6

a) Le taux d'humidité.....6

b) La température.....6

c) pH.....7

d) Reports avec l'oxygène7

e) Tolérance en NaCl7

f) Matière organique8

I.3.3. Caractères chimio taxonomiques.....8

I.3.3.1. Acides aminés de la paroi.....	8
I.3.3.2. Glucides	8
I.3.3.3. Acides gras	8
I.3.3.4. Acides nucléiques	9
I.4. Classification des actinomycètes.....	9
I.4.1. Genres et espèces de l'ordre Actinomycetales.....	10
I.4.1.1. Caractères morphologiques.....	10
I.5. Ecologie et distribution dans la nature.....	11
I.5.1. Sols.....	11
I.5.2. Milieux marins.....	12
I.5.4. Eaux douces	12
I.5.5. Air	12
I.5.4. Les compost	12
I.6. Importance des actinomycètes.....	13
I.7.Cycle de développement des actinomycètes.....	13
Chapitre 2	
II.1. Substances bioactives produites par les actinomycètes.....	15
II.1.1.Antibiotiques	15
II.1.1.1. Historique	15
II.1.1.2.Définition des antibiotiques	15
II.1.1.3.Classification des antibiotiques.....	16
II.1.1.3.1.Familles des β -lactamines.....	16
a)Les pénicillines	17
b)Les céphalosporines	17

c) Les aminosides.....	18
d) Les phénicols	18
e) Les tétracyclines	19
f) Les macrolides	19
g) Les quinolones	19
h) Les polypeptides	20
II.1.1.2. Mode d'action des antibiotiques	20
II.1.1.2.1. Action sur la paroi bactérienne.....	20
II.1.1.2.2. Action sur la membrane cellulaire	21
II.1.1.2.3. Action sur des ribosomes.....	21
II.1.1.2.4. Action sur la biosynthèse des acides nucléiques	21
II.1.2. Technique de production et d'identification des antibiotiques	
II.1.2.1. Métabolites des actinomycètes	21
II.1.2.1.1. Métabolisme primaire.....	22
II.1.2.1.2. métabolisme secondaire	22
II.1.2.2. Effet de la composition du milieu de culture	22
II.1.2.3.Extraction des antibiotiques	23
II.1.2.2.1. Extraction aux solvants organiques.....	23
II.1.2.4. Production d'antibiotiques chez les actionomycètes	23
II.1.3.Enzymes	24
II.1.4. Les antifongiques	24
Matériel et Méthodes	
Objectifs.....	27

III.1.Revivification, purification et sélection des isolats d'actinomycètes productrice d'antibiotique

III.1.1 Revivification des isolats28

III.1.2 Vérification de la pureté des souches.....28

III.1.3 .Conservation des souches d'actinomycètes28

III.1.3.1 conservations à court terme 28

III.1.3.2 Conservation à long terme28

III.2Caractérisation morphologique

III.2.1 Micromorphologie29

III.2.2 Cratérisation biochimique

III.2.2.1 Recherches de la catalase29

III.3 Choix de milieu de culture.....29

III.4 Purification et Confirmation de l'identité des souches ciblent30

III.5 Purification30

III.6 Confirmation de l'identité des souches

a-Confirmation macroscopique30

b-Confirmation microscopique30

III.7. L'activité antimicrobienne31

III. 7.1 Préparation de l'inoculum.....31

III.8 Criblage primaire par la technique des cylindres agar31

III.9 Préparation de l'inoculum des souches pathogènes31

III.10 Micromorphologie des souches pathogènes32

III.11 Production du métabolite secondaire

III.11.1 Fermentation sur milieu solide.....32

III.12 Extraction des métabolites

III.12.1 Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide32

III.12.2 Concentration des métabolites par utilisation d'un évaporateur rotatif (rota-vapeur)34

III.13 Tests de l'activité antibactérienne des extraits35

III.14 caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM35

III.14.a –principe.....35

III.14 .b- Préparation de la plaque36

III.14 .c- Saturation de la cuve36

III.14 -d Mode opératoire37

III.14 .e -Développement du chromatogramme37

III.15 Anti biographie et choix de solvant d'extraction37

III.15 .1-Méthode des puits37

III.15.2-Révélation microbiologique des chromatogrammes (bio autographie)..38

III.16-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur microplaque.....39

III.16.1- Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....40

III.17-Electrophorèse des extrait.....41

III.17.1-La préparation de gel de séparation.....41

IV .Résultats et interprétation

IV.1. Diversité morphologique des actinomycètes43

IV.2.Coloration de gram44

IV.3.Cratérisation biochimique

IV.3.1-Recherches de catalase	45
IV.4. Résultats de l'activité antimicrobienne	45
IV.5-Test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des Actinomycètes	
IV.5.1-Aspect des souches bactériennes indicatrices	49
IV.6. inhibition des souches pathogènes par les <i>actinomycètes</i>	51
IV.7-Extraction des métabolites secondaires	53
IV.7.1-Evaluation de l'effet des extraits.....	54
IV.8.Résultats de la détermination le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration.....	55
IV.9-Chromatographie sur couche mince en gel de silice.....	59
IV.10.a. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	62
IV.10.b-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	63
IV.10 .Résultats de technique d'électrophorèse.....	64
Discussion	65
Conclusion général.....	70.
Référence bibliographique.....	72
Annexe.....	77

Introduction :

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme utilise des micro-organismes pour préparer des boissons, des aliments, des vêtements, bien que l'existence de ceux-ci n'ait été reconnue et étudiée au XIX^e siècle.

Au siècle dernier, les micro-organismes, à mesure de leur découverte, se sont révélés à l'homme surtout comme ses pires ennemis, menaçant sa santé, son alimentation, ses biens. Ils le demeurent dès lorsqu'il existe des défaillances humaines d'hygiène, de prévention.

Avec le progrès de connaissance, il paraît que les micro-organismes peuvent aider l'homme en agriculture, dans l'environnement, dans les industries. Des réalisations telles que la biosynthèse de substances à visé thérapeutique (les antibiotiques,...) ou des vaccins antiviraux, révolutionnent certains traitements en médecine.

Les actinomycètes en général, et plus particulièrement les Streptomyces sont également d'importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de Streptomyces, y compris la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (Al-Zarban et al ,2002 ;Boughachiche et al, 2005 ; Kitouni et al ,2005).

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

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

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

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons suivi la démarche suivante :

Choisir le milieu de culture le plus favorable pour la croissance des Actinomycètes ,et en suit
Tester l'activité antibiotique de ces souches d'actinomycètes et sélection des souches productrice des antibiotiques et Production et extraction des métabolites secondaire à partir des souches actinomycétales qui ont montré une activité antibiotique.

I.1 Historique

Les actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al., 1984**). C'est en 1943 que Waksman. S a pu isoler un genre Actinomycète à partir du sol. Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des actinomycètes. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et ça de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilnikov entre autre. enfin, la dernière époque historique, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Selman Waksman lui est indissolublement lié (**Le Minor, 1989**).

I.2. Définition

Etymologiquement, le mot actinomycète a été dérivé des mots grecs « Aktis » qui veulent dire rayon et « mykes » qui veut dire champignon.

Les actinomycètes sont des procaryotes à structures de bactérie à gram positifs avec un coefficient de Ghargaff (GF) élevés (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**), la pluparts sont immobiles, saprophytes, largement distribuées dans le sol, l'eau et les plantes, montrant une diversité chimique et morphologiques marquée mais forment une ligne distincte de l'évolution des organismes (**Good fellow et O'Donnell, 1989**).

Les véritables Actinobacteria, également connus sous le nom d'actinomycètes, sont des microorganismes à coloration de Gram positive. Ils ont un type de croissance mycélien (les cellules produisent des filaments et des ramifications) rappelant celui des champignons filamenteux. Un des premiers organismes étudiés dans ce groupe est le genre Actinomyces qui a donné son nom au groupe (**Perry et al., 2004**).

I.3.Caractères généraux

I.3.1.Morphologie

Morphologiquement on peut rencontrer, en plus des filaments ramifiés, des bacilles et aussi des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobactérium* (Avril et al., 1992). Dans certains cas, seul le mycélium de substrat est formé, tandis que dans le cas le plus extrême il y a formation uniquement de mycélium aérien, comme chez les *Sporichthya* (Falkow, 2006). Les filaments mycéliens peuvent produire des spores, soit uniques (exp : *Micromonospora*), soit en chaînes (exp : *Streptomyces*), soit groupées dans des sporanges (exp : *Actinoplan*). D'autres structures morphologiques sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir: des sclérotes sont formés dans le genre *Chainia*, des synnemas (ou corémies) par les *Actinosynnema* et des vésicules, différentes des sporanges, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (Neyra,1992). L'analyse des hyphes des actinomycètes par imagerie révèle la présence de deux catégories de filaments (figure 01), pellet et les hyphes dispersés. Les hyphes dispersés sont divisés en deux formes « freely dispersed » et « mycelial clumps ou aggregates » (Cox et al., 1998).

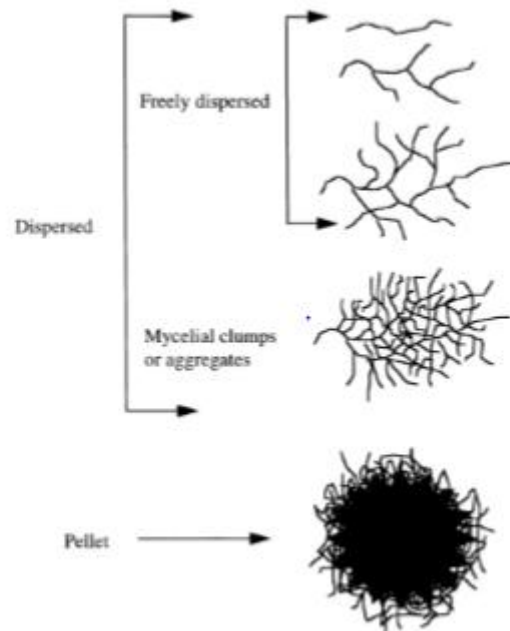


Figure 01 : Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

La première forme (pellet), est un agrégat de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres ; la seconde forme c'est des hyphes indépendants dispersés (Cox et al., 1998). Au cours du processus de fermentation, la forme pellet pose problème, à cause de limitation de diffusion des nutriments et de l'oxygène à traverses les hyphes, ce qui conduit à une autolyse, mais au cours de la fermentation industrielle, c'est la forme des hyphes indépendant dispersés qui dominant (90% des cas) (Cox et al., 1998).

I.3.2. Physiologie

Au niveau de sol, les actinomycètes représentent une des principales communautés microbiennes. Leurs présence est significativement influencée par les conditions environnantes : l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, les faibles taux d'humidité, la nature et l'abondance de la matière organique et végétation du sol (Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003).

a) 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 suggéré qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Oskay et al. ,2004 Prescott et al. 2007)

b) La température

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

c) 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* (**Wang et al., 2006**)

d) Reports avec l'oxygène

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

e) Tolérance en NaCl

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

□ **Les halophiles** ont besoin de sel (NaCl) pour leurs croissances, cette concentration peut varier de 1-6 % (P/V) pour les faiblement halophiles, jusque 15-30 % pour les bactéries halophiles extrêmes.

□ **Les halotolérants** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leurs croissances. On distingue, les légèrement tolérants (tolère de 6 à 8 % de NaCl (P/V)) ; les modérément tolérants (tolère de 18 à 20 % de NaCl (P/V)) ; et les extrêmement tolérants (se développe de 0 % jusqu'à saturation en NaCl) (**Nanjani, 2011**).

Différentes stratégies sont suivies par les microorganismes halophiliques pour assurer l'osmo-régulation de leurs cytoplasmes tout en gardant une concentration faible en ions de sodium (Na⁺) (**Oren, 2002**). - La première consiste à l'accumulation des ions de K⁺ et Cl⁻ dans leur cytoplasme sous forme de KCl (**Sandhya et al., 2011**), à des concentrations plus élevées que la concentration de NaCl présente tout au tour du milieu. Ce mode d'adaptation est énergétiquement moins coûteux (**Oren a, 1999 ; Oren b, 2006**). - La seconde agit par exclusion des différents ions présents dans le cytoplasme, par des pompes, tout en accumulant des solutés organiques pour maintenir l'équilibre osmotique. Les différents solutés organiques

utilisés sont : glycérol, betaine, ectoine, les sucres comme le saccharose et trehalose (Galinski, 1995). Ce mode est énergétiquement coûteux à cause du coût de la synthèse des molécules organiques (Oren, 1999 b).

f) Matière organique

En 1986, Henis a montré que le nombre des actinomycètes est corrélée positivement avec le taux de matière organique et que de larges populations d'actinomycètes coïncidaient avec des taux relativement élevés de matière organique, quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang, 2002).

I.3.3. Caractères chimio taxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimio taxonomie (AOUAR, 2006).

I.3.3.1. Acides aminés de la paroi

Les Streptomyces et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres Actinomycétales (AOUAR, 2006).

I.3.3.2. Glucides

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres Nocardia et Saccharopolyspora. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres Actinomadura et Streptosporangium. Les Streptomyces et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres Thermomonospora et les Thermoactinomyces. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des Actinoplanes et du genre Micromonospora (AOUAR, 2006).

I.3.3.3. Acides gras

Ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre. Les acides gras rencontrés chez les actinomycètes sont, soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone, soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que Mycobacterium, Nocardia et Rhodococcus (Collin et al., 1977)

I.3.3.4. Acides nucléiques

Les déterminations portent sur le pourcentage de guanine et cytosine, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenus par la digestion par les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Au delà de 70 % de similitude (l'hybridation ADN-ADN), deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce. Le séquençage de l'ARNr 16S, constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (Larpent et Gourgaud, 1985).

I.4. Classification des actinomycètes

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

Classe Actinobacteria

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

La classe des Actinobacteria est divisée en cinq sous-classes (Tableau 01) : 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).

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

Classe Actinobacteria					
S/Cl	Acidimicrobidae	Rubrobacteridae	Coriobacteridae	Sphaerobacteridae	Actinobacteridae
S/Cl	Actinobacteridae				
Ordres	Bifidobacteriales		Actinobacteridae		

Ordre Actinomycetales

S/O Actinomycineae	S/O Micrococcineae	S/O Corynebacterineae	S/O Micromonosporineae	S/O Propionibacterineae
Famille Actinomycetaceae	Familles Micrococcaceae Bogoriellaceae Rarobacteraceae Sanguibacteraceae Brevibacteriaceae Cellulomonadaceae Dermabacteraceae Dermatophilaceae Dermacoccaceae Intrasporangiaceae Jonesiaceae Microbacteriaceae Beutenbergiaceae Promicromonosporaceae	Familles Corynebacteriaceae Dietziaceae Gordoniaceae Mycobacteriaceae Nocardiaceae Tsukamurellaceae Williamsiaceae	Famille Micromonosporiaceae	Familles Propionibacteriaceae Nocardiodaceae
S/O Psuedonocardineae	S/O Streptomycineae	S/O Streptosporangineae	S/O Frankineae	S/O Glycomycineae
Familles	Pseudonocardaceae Actinozynnemataceae	Famille	Streptomycetaceae	Familles

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

I.4.1. Genres et espèces de l'ordre Actinomycetales

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et chimio-taxonomiques.

I.4.1.1. Caractères morphologiques

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence

des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sclérotas, de sporanges ou de synnémata (AOUAR, 2006).

I.5. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (Tableau 02). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après **Good Fellow et Williams, (1983)** généralement les 10⁶ germes par gramme de sol séché. D'après Waksman, (1967), le rapport microorganisme totaux / Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries Actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16 %. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Good Fellow et Williams, 1983**). La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (Aw) est très basse (**Davies et Williams, 1970; Good Fellow et Williams, 1983**). Les sols sahariens sont caractérisés par une teneur minime en eau avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Des travaux anciens ont prouvé définitivement que les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée (**Killian et Feher, 1939**). Parmi les bactéries Isolées, les actinomycètes font partie essentielle de cette microflore, leur présence est considérable dans ce type d'écosystème extrême (**Killian et Feher, 1939**).

I.5.1. Sols

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 mètre de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al, 2003**).

I.5.2. Milieux marins

L'opinion selon laquelle des actinomycètes peupleraient le milieu marin est très controversée. Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; ainsi certaines souches Nocardioformes isolées à plus de 2000 m de profondeur se développent sous les pressions hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18C° (**Weyland, 1981**)

I.5.4. Eaux douces

Les actinomycètes sont bien représentés dans ce milieu d'où l'on peut facilement isoler des souches de Micromonospora, d'Actinoplanes et de Streptosporangium. C'est essentiellement dans des sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa flaveur (**Davies, 1970**).

I.5.5. Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinomycètes sont des contaminants de notre environnement. L'exposition à ces derniers peut causer des effets néfastes sur la santé (**Gazenko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998 ; Suutari et al., 2002**).

I.5.4. Les compost

Le compostage est défini comme étant la décomposition biologique thermophile, en présence d'oxygène et dans des conditions contrôlées, de déchets organiques collectés séparément, sous l'action de micro et macroorganismes, afin de produire du compost. Le compost, produit final du compostage est composé pour l'essentiel de la matière organique de type humique stable et de composés minéraux (**Mustin, 1987**). Des actinomycètes, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tels que thermoactinomyces, *Pseudonocardia* (**Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997 ; Song et al., 2001**). Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

I.6. Importance des actinomycètes

Les Actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques. On estime que les deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinomycètes, et c'est Waksman qui été le premier, a démontré la richesse des actinomycètes dans ce domaine. Ce fut dans ses laboratoires que furent isolés quatre des premiers antibiotiques utiles: l'actinomycine (1940), antitumorale; la streptomycine (1944), antibactérienne, y compris antituberculeuse; la néomycine (1949), antibactérienne; et la candidine (1953), antifongique, ayant aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes en tant que ligand des stérols.

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases). Les galactosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases) (**Le Chevalier, 1981**).

I.7.Cycle de développement des actinomycètes

Sur milieu solide (Figure 01), la cellule bactérienne initiale, appelée « spore libre » croît à la surface du milieu de support non seulement en s'allongeant, comme toute bactérie, mais aussi en se ramifiant et, même, en pénétrant en profondeur dans le milieu, sans se diviser, sans qu'aucune septation n'apparaisse (= mycélium). Après quelques jours, le mycélium produit des structures aériennes qui s'étendent en hauteur (= hyphes aériens). Ces structures vont développer des torsades, tel un tire-bouchon. Leur partie terminale, après une série de réplifications et de migrations du chromosome bactérien, montre l'apparition d'un nombre important d'événements de septation, qui sont à la base de la formation d'autant de jeunes cellules bactériennes qui vont, après maturation et libération, donner naissance à de nouvelles formes libres, pour que le cycle vital recommence (**Zouaghi ,2007**).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique (**Smaoui, 2010**).

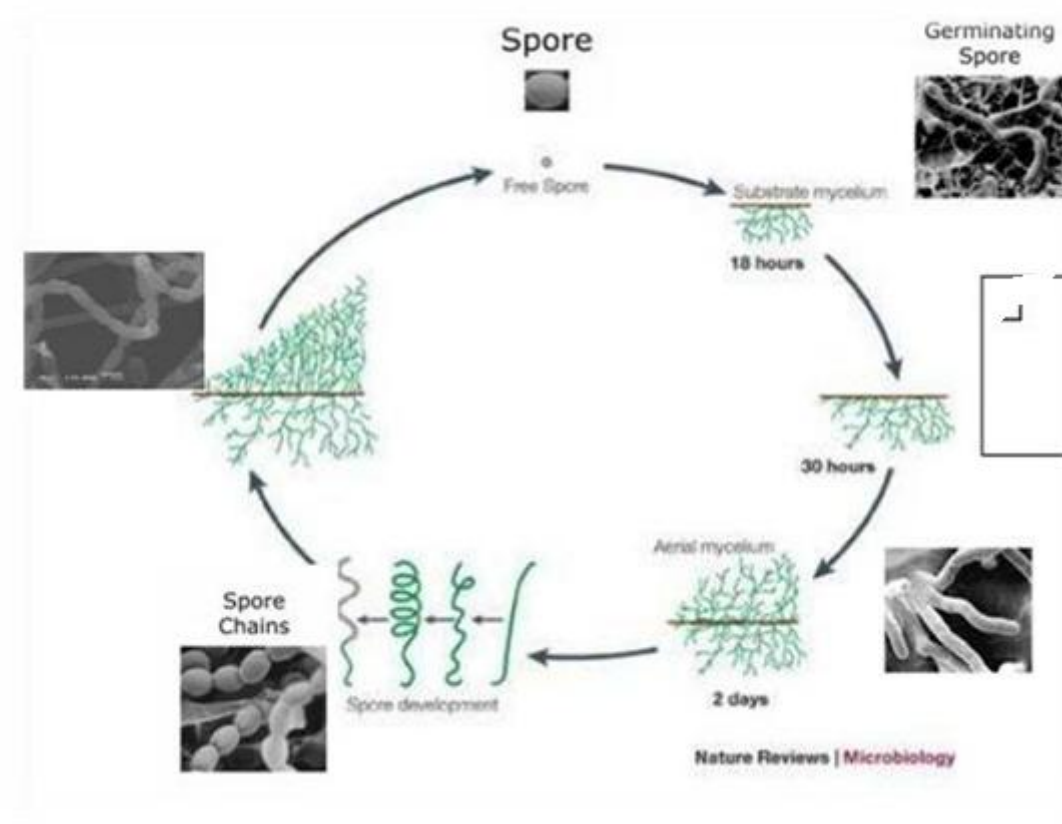


Figure 01: Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton et al., 1989).

II.1. Substances bioactives produites par les actinomycètes

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (Loucif, 2011).

II.1.1. Antibiotiques

II.1.1.1. Historique

En 1928, Alexander Fleming observa que la croissance de *Staphylococcus aureus* était inhibée autour d'une colonie de moisissure ayant contaminé la boîte de Petri où se trouvaient les bactéries. La moisissure était *Penicillium notatum*, et l'agent actif, isolé peu de temps après, fut nommé *pénicilline*. En microbiologie, lorsqu'on ensemence un milieu solide avec un échantillon prélevé dans l'environnement, en particulier dans le sol, on observe couramment entre les diverses colonies des réactions d'inhibition similaires à celles de Fleming. Ce mécanisme d'inhibition s'appelle antibiose. De ce mot dérive le terme « antibiotique », soit une substance produite par un microorganisme – habituellement une bactérie ou un mycète – et qui, en petites quantités, inhibe la croissance d'un autre microorganisme (Tortora, 2012).

II.1.1.2. Définition des antibiotiques

Le mot antibiotique fut employé pour la première fois, en 1942 par Waksman qui en a donné la définition suivante : Un antibiotique est une substance chimiquement définie, produite par des microorganismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou d'autres microorganismes en solution diluée *in vitro* ou *in vivo* (Simon et Meunier, 1970). À l'origine, le mot antibiotique désigne tout produit microbien qui, même de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large pour inclure en outre toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 1994). 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).

II.1.1.3. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques en tenant compte du spectre antimicrobien ne paraît pas être la meilleure en raison de l'évolution de la résistance bactérienne. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques. Enfin, celle basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotiques (Walsh, 2000). La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les β -lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques,etc (Smaoui, 2010).

II.1.1.3.1. Familles des β -lactamines

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique (Cavallo et al., 2004). Les β -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al., 2004). Ils exercent une action bactéricide sur de nombreuses espèces bactériennes. La thienamycine connu sous le nom de imipénème, l'un des derniers antibiotiques découvert possédant un cycle lactame et doté d'un large spectre d'action, est produit par l'espèce actinomycetale, *Streptomyces cattleya* (Demain et Lancini, 2006) (figure 02).

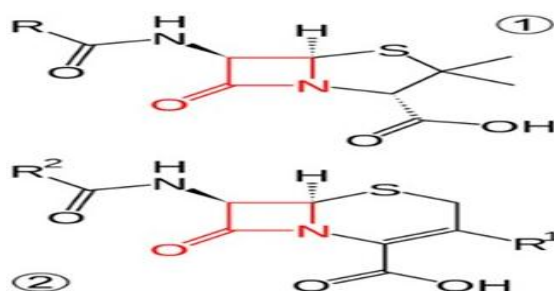


Figure 02 : structure chimique des β -lactamines

a) Les pénicillines

Le terme pénicilline regroupe plus de 50 antibiotiques chimiquement apparentés. Toutes les pénicillines ont une structure commune dans laquelle la chaîne cyclique β -lactame tient lieu de noyau. De ce fait, on les appelle aussi β -lactamines. Elles se distinguent par les chaînes latérales chimiques qui sont rattachés au noyau. Les pénicillines sont produites par voie naturel ou par voie sous-mis synthétique (**Tortora, 2012**). Elles agissent en fusant obstacle à l'assemblage du réseau macromoléculaire du peptidoglycane ; se qui bloque les dernières étapes de la formation de la paroi cellulaire ; en particulier celle des bactéries à Gram positif. Du même coup, elles inhibent la croissance du microbe. Dépourvu de protection, celui-ci meurt rapidement (**Tortora, 2012**).

b) Les céphalosporines

Les céphalosporines appartiennent à la classe des céphèmes. Elles ont été classées en quatre générations selon leur spectre d'activité (**Jacques, 2004**). La céphalosporine C est un antibiotique naturel extrait du cephalosporidium, un champignon. Elle fut le premier membre de cette famille. Celle-ci s'étoffait peu à peu sous l'impulsion des chercheurs, qui ont synthétisé des molécules de plus en plus efficaces et de moins en moins sensibles aux défenses des bactéries. On parle de céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} génération. Ces dernières ont la particularité d'être efficaces sur des zones de l'organisme qui ne pouvaient être traitées jusque-là, comme le liquide céphalo-rachidien. On peut citer les plus avancées : céfépime et cefpirome (**Nathan et Éberlin, 1994**) (figure 03).

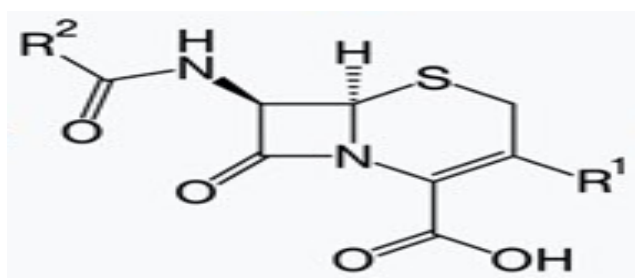


Figure 03 : structure chimique de céphalosporine

c) Les aminosides

Les aminoglycosides, ou aminosides, forment une famille d'antibiotiques dont les molécules sont reliées par des liaisons glycosidiques. Ils comprennent la streptomycine et la gentamicine, qui perturbent les premières étapes de la synthèse des protéines en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. Il en résulte des erreurs de lecture du code génétique des ARNm (**Tortora, 2012**). L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamicine produite par *Micromonospora purpurea* (**Demain et Lancini, 2006**) (figure 04).

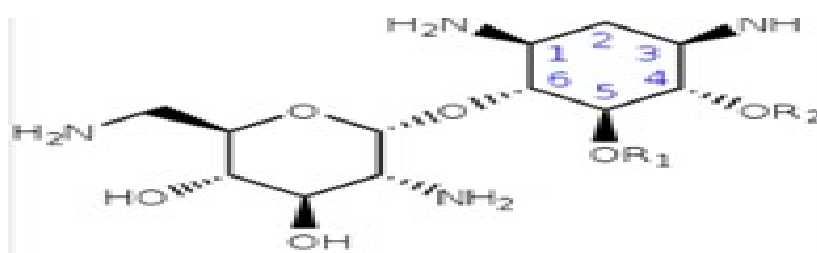


Figure 04 : structure chimique d'aminoside

d) Les phénicols

On retrouve dans ce groupe le chloramphénicol, facile à synthétiser. Ce sont des antibiotiques à large spectre, capables de traiter de nombreuses zones de l'organisme, dont le système nerveux central, mais à toxicité élevée. On les utilise par exemple dans le traitement des méningites (**Nathan et Éberlin, 1994**). Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre qui perturbe la synthèse des protéines. En se liant à la sous unité 50S du ribosome, il inhibe la formation des liaisons peptidiques dans les polypeptides en croissance. Du fait de sa structure chimique relativement simple, il est moins dispendieux à synthétiser chimiquement qu'à isoler à partir de culture de *Streptomyces*. Sa faible taille moléculaire facilite sa diffusion dans des régions du corps habituellement inaccessibles à beaucoup d'autres agents (**Tortora, 2012**).

e) Les tétracyclines

Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaînes latérales. Ces antibiotiques inhibent la

synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien (**Prescott et al., 2013**). Elles s'interposent entre les ARN t porteurs des acides aminés et la sous-unité 30S du ribosome, ce qui empêche l'ajoute de nouveaux acides aminés au polypeptide en formation (**Tortora, 2012**) (figure 05).

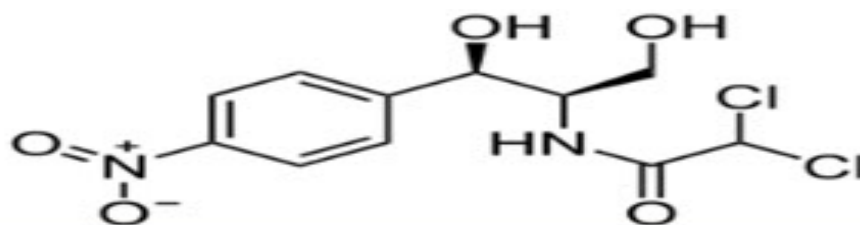


Figure 05 : structure chimique tétracycline

f) Les macrolides

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

g) Les quinolones

Les quinolones sont des composés cycliques et l'ajoute de fluor sur la structure de base a permis d'obtenir les fluoroquinolones. Toutes les molécules de cette famille inhibent la réplication de l'ADN bactérienne. Pour ce faire, elles se fixent sur une enzyme indispensable à la réplication : la gyrase ou ADN gyrase, cette enzyme était intra-cytoplasmique. La quinolone doit traverser les différentes membranes bactériennes (**Jacques, 2004**) (figure 06).

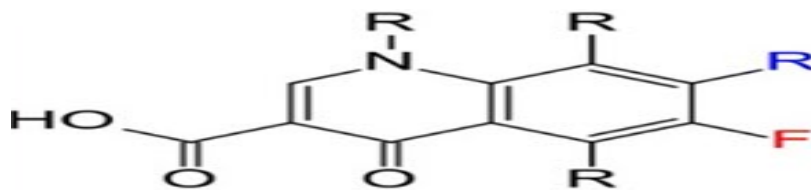


Figure 06 : structure chimique de quinolones

h) Les polypeptides

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

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

La colistine entre dans la composition de nombreuses spécialités où elle est associée aux sulfamides, aux β - lactamines et aux macrolides (Ruckebusch et Toutain, 1982).

II.1.1.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire les cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte. Comme le montre la figure 07, le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre (Smaoui, 2010).

II.1.1.2.1. Action sur la paroi bactérienne

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

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

II.1.1.2.2. Action sur la membrane cellulaire

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

II.1.1.2.3. Action sur des ribosomes

D'autres, comme les aminoglycosides, les tétracyclines, les phénicoles, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines, qui se fixent sur le ribosome bactérien inhibant différentes étapes de la synthèse protéique (Benzeggouta, 2005).

II.1.1.2.4. Action sur la biosynthèse des acides nucléiques

La synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) peut aussi être perturbée par les antibiotiques: cas des sulfamides, du triméthoprim, des quinolones, des rifamycines et des nitro-imidazoles (Benzeggouta, 2005).

La structure des acides nucléiques bactériens ou fongiques (ADN ou ARN) ne présente aucune particularité. Par conséquent, les antibiotiques qui agissent à ce niveau sont toxiques pour toutes les cellules. On utilise d'ailleurs cette propriété pour une action antimitotiques (dans les antitumoraux). Les antibiotiques de *Streptomyces* employés en tant que cytostatiques sont de différentes natures : la mitomycine et l'adriamycine (anthracyclines), l'actinomycine (peptide), la bléomycine (glycopeptide), la puromucine

(nucléoside). D'autres molécules sont utilisées en tant qu'antibactériens comme la novobiocine (glycoside) qui inhibe la réplication de l'ADN et la rifamycine (ansamycine) qui bloque la synthèse de l'ARNm par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (**Kieser et al., 2000 ; Tortora et al., 2003**).

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, et un deuxième groupe intervient au niveau de leurs précurseurs de synthèse. Dans le premier groupe on peut distinguer :

Les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN tel que les topo-isomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN. Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines (**Smaoui, 2010**) (figure 07).

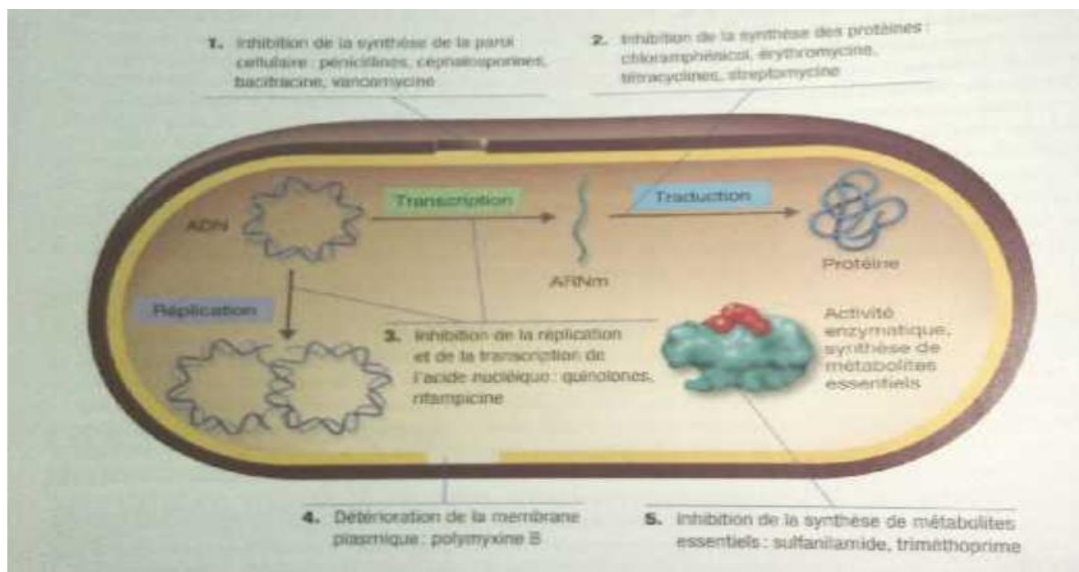


Figure 07 : Mode d'action des antibiotiques (Tortora, 2012).

II.1.2. Technique de production et d'identification des antibiotiques

II.1.2.1. Métabolites des actinomycètes

Au cours de croissance des actinomycètes peuvent passer d'un métabolisme dit primaire (trophophase) à un métabolisme dit secondaire (idiophase). Au cours de ces deux phases, des métabolites sont synthésés. Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthésés (**Delaunay et al., 2003**).

II.1.2.1.1. Métabolisme primaire

Par convention, le métabolite primaire synthésés par un (micro) organisme vivant-dont la disponibilité est physiologiquement permanente chez celui-ci (Disponibilité nécessaire à la vie) regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteurs et l'énergie produits par ces réaction sont utilisés pour former et assembler (ex : acides aminés) en macromolécules (ex : Protéine)

II.1.2.1.2. métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont définit comme des composés de faible poids moléculaire, non essentiels à la croissance du microorganisme producteur, la production de ces métabolites est souvent associée à la croissance des microorganismes correspondant à la phase stationnaire de la courbe de croissance (**Demain, 1995**). Une des propriétés la plus significative des actinomycètes est leur aptitudes à synthésés de nombreux métabolites secondaires d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique important (**Higashide, 1984 ;Vining 1992**), c'est en 1940, après la découverte de l'actinomycine, que les actinomycètes sont devenus l'objet de nombreuses recherches et ils ont été exploités durant les années 80, en conséquence, de structures et surtout les antibiotiques sont continuellement isolés à partir des actinomycètes, ainsi, ces microorganismes sont devenus les premiers fournisseurs de ces métabolites.

II.1.2.2. Effet de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. (**Gesheva et al., 2005**), ont montré que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux (essentiellement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), affectent fortement la production de la molécule antibiotiques.

La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate : induction et répression de la biosynthèse, rétro inhibition et inactivation enzymatique (**Martin et Demain, 1980**). Les sels minéraux jouent un rôle de régulation non négligeable, mais leur épuisement n'altère pas pour autant l'initiation du métabolisme secondaire.

II.1.2.3.Extraction des antibiotiques

La conduite d'un procédé d'extraction et de purification des molécules actives est ramenée à trois opérations de base :

1. Séparation des particules insolubles, telles que les composantes du milieu de culture, les cellules et le mycélium. Ceci se fait par filtration ou par centrifugation.
2. L'extraction du produit se fait par fractionnement avec les solvants organiques ou précipitation par la phase de partition
3. La purification partielle des molécules est réalisée de façon très sélective grâce à l'application de la technique chromatographique (**Zouaghi, 2007**).

II.1.2.2.1. Extraction aux solvants organiques

Le but de l'extraction à l'aide des solvants organiques est de faire passer l'antibiotique de la phase aqueuse à la phase organique .Cette opération permet déjà de purifier partiellement les molécules présentes dans le surnageant. Le choix du solvant dépend de la stabilité des substances antimicrobiennes dans le solvant lors de l'extraction (**Zouaghi, 2007**).

II.1.2.4. Production d'antibiotiques chez les actinomycètes

Un antibiotique (du grec anti : (contre) ,et la vie est la défini comme une substance naturelle produite par les microorganismes dont l'action est d'inhiber la croissance de bactéries (action bactériostatiques) ou de les tuer (action bactéricide) (**Decre et courvalain,1995**) , il peut être antibactérien antifongique, antiviral ou antibiotiques ,la synthèse insouhaitées en sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde (tableau 2) (Okami ,1998)

(tableau2) :Importance relative des groupes microbiens producteurs d'antibiotiques
(Okami,1988)

Microorganismes producteurs d'antibiotique	% du total des antibiotiques décrits
Lichens et algues	0.8
Champignons	4.1
Penicillium	3.0
Aspergillus	1.2
Fusarium	0.8
Cephalosporium	5.4
Autres champignons imparfaits	5.0
Basidiomycètes et Ascomycètes	
Bactéries	1.3
Pseudomonaceae	7.0
Bacillaceae	1.7
Autres Eubactéries	
Actinomycètes	69.7

II.1.3.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 (**Tanaka et Omura, 1990; Vonothini et al., 2008**), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**Park et al., 2002**). A titre d'exemple : la D-xylose isomérase, plus connue sous le nom de glucose isomérase, produite par l'espèce *Actinoplanes missouriensis* et plusieurs espèces de *Streptomyces*, est utilisée pour obtenir des sirops riches en D-fructose. Un complexe amyliase issu de *Streptomyces hydroscopicus* et *S. praecox* a été exploité pour préparer des sirops riches en maltose. 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 *S. griseus*) (**Theilleux, 1993**). Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3glucanase et causent

des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des pathogènes (Conn, 2005). D'après Park et al., (2002), les chitinases produites et sécrétées par les actinomycètes agissent sur les cuticules des nématodes adultes et provoquent ainsi leur mort. Notamment l'espèce *Streptomyces coelicolor* qui sécrète de nombreuses hydrolases incluant : 60 protéases/peptidases, 13 chitinases/chitosanases, 8 cellulases/endoglucanases, 3 amylases et 2 pectates lyases (Bentley et al., 2002).

II.1.4. Les antifongiques

Les antagonistes microbiens sont largement utilisés en lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. L'activité antagoniste de *Streptomyces* vis-à-vis des pathogènes fongiques est généralement liée à la production de composés antifongiques extracellulaires des enzymes hydrolytiques (Prapagdee et al., 2008).

Les pramimidines sont des antifongiques synthétisés par une souche d'*Actinomadura bibisca* (Tomita et al., 1990). Elles sont très actives contre des infections systémiques fongiques malgré leur activité modérée in vitro (sanglier et Trujillo, 1997).

II.6.-mise en évidence de l'activité antibactérienne :

II.6.1 choix des microorganismes ciblent :

Pour évaluer le spectre d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes isolées, nous avons sélectionné plusieurs modèles d'étude comprenant une gamme représentative de bactéries (Gram positive et négative), et levures. Certains de ces microorganismes sont également connus pour être des pathogènes opportunistes sévissant principalement en milieu hospitalier.

1. *Escherichia coli* est principalement l'agent d'infections urinaires qui sont les plus fréquentes en termes d'infections nosocomiales, telles que les cystites ou pyélonéphrites. Cette espèce est également responsable entre autres de septicémies (le plus souvent à point de départ urinaires), de méningites, pneumopathies et infection de plaies chirurgicales. *E. coli* se caractérise par son aptitude à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques tels que les pénicillines et céphalosporines de première et troisième génération comme la cefotaxime, et ceftazidime (Nys et al., 2008).

2. *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène majeur qui provoque une large gamme de manifestations cliniques, telles que les infections de plaies, pneumonies, septicémies, et endocardites et se place à l'heure actuelle comme l'un des principaux agents d'infections nosocomiales. Les bêta-lactamines constituent l'antibiotique privilégié pour le traitement d'infections sévères à *S. aureus* (**Chambers, 2001**), toutefois depuis l'introduction de la méthicilline en utilisation clinique, l'émergence de souche résistante dites « MRSA » est en constante augmentation. L'espèce MRSA présente en plus une résistance aux fluoroquinolones et aux céphalosporines (**Tacconelli et al., 200 ; Salem et al., 2011**).
3. La prévalence croissante des infections nosocomiales générée par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi résistantes aux antibiotiques (MDR) compromet gravement la sélection des traitements appropriés et elle est donc associée à une morbidité importante (**Cabot et al., 2011**). Agent pathogène opportuniste par excellence, cette espèce est responsable de broncho-pneumopathies, septicémies, infections urinaires et d'infections cutanées (**Jacobsen et al., 2011**) et possède une extraordinaire capacité pour développer une résistance à presque tous les antibiotiques disponibles. Cette antibiorésistance est le résultat de la sélection de mutations dans les gènes chromosomiques et de la prévalence croissante de déterminants génétiques de résistance transférables (**Cabot et al., 2011**).
4. *Streptococcus faecalis* est l'espèce prédominante des infections nosocomiales à entérocoques (**Benachour et al. 2009 ; Del papa et Perego, 2011**) Elle peut être l'agent d'endocardites, d'infections urinaires et cutanées et présente de nombreuses résistances aux antibiotiques comme les aminoglycosides. Céphalosporines, et les pénicillines semi-synthétiques telles que l'oxacilline (**Eliopoulos, 2005**). Des souches résistantes à la vancomycine (VRE) sont de plus en plus isolées mais leur fréquence reste à l'heure actuelle relativement faible (**Muto et al., 2003 ; Zhneg et al 2009**).
5. Parmi les micromycètes testés, *Candida albicans* est l'espèce la plus incriminée dans les infections fongiques humaines, elle est responsable d'infections cutanéomuqueuses et viscérales localisées ou disséminées ainsi que des candidoses systémiques (Pfaller et

Diekema, 2007). Les résistances de *Candida albicans* aux antifongiques polyéniques tel l'Amphotéricine B sont rare, cependant chez les dérivés azolés et chez les triazolés tels que le fluconazole ou le voriconazole, on voit apparaître après traitement des souches de *Candida* résistantes à ces produits (Miyazaki et al. 2006 ; Goldman et al. 2004).

6. *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* sont des germes saprophytes, rarement pathogènes opportunistes. Des cas d'infections de types nosocomiales graves sont rarement signalées avec ces deux espèces tel que les endocardites, septicémie et pneumonie (Seifert et al, 1995 ; Sietsche et Diderichsen, 1991).

Le tableau suivant présente les maladies et les infections causées par les souches pathogènes citées précédemment :

Souche	Infections
<i>Escherichia coli</i>	Diarrhée, Myocardites, appendicite, infection de foie, infections urinaires, méningites...etc.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Trachéites, thyroïdites, bronchites, Endocardites, Diarrhée, appendicite, infections urinaires, abcès cutané, infection de la paupière...etc.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Laryngite, thyroïdites, infections urinaires, infection pancréatique, infections de sang...etc.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bronchites, appendicite, infections urinaires, infection pancréatique, gastroentérites...etc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bronchites, Endocardites, appendicite, infections urinaires, infection pancréatique...etc.

<u>Salmonella enteridis</u>	Diarrhée, fièvre entérique, choc septique, gastroentérites, myocardites..etc.
-----------------------------	---

Tableau : les maladies et les infections causées par les souches pathogènes.

Objectif

- Choisir le milieu de culture le plus favorable pour la croissance des Actinomycètes.
- Tester l'activité antibiotique de ces souches d'actinomycètes et sélection des Souches productrice des antibiotiques.
- Production et extraction des métabolites secondaire à partir des souches
- Actinomycétales qui ont montré une activité antibiotique.

III.1.Revivification, purification et sélection des isolats d'actinomycètes productrice d'antibactériennes

III.1.1 Revivification des isolats

Cette revivification est réalisée sur des isolats d'actinomycètes , fournis par notre enseignant, codés(AK,A₁,A₂,A₄,A₃₁,A₁₈,A₉,A₁₅,A₁₉,A₁₇,A₂₉,A₃₀,A₇,A₆,A₂₆,A₂₇,A₈,A₂₀,A₁₄,A₁) conservés sur des géloses inclinées (GLM , Bennett) à 4°C. Chaque souches est ensemencée à la surface des boites de pétri contenant dans le milieu de culture GYM (milieu Gélose Yeast Malt) Dont les compositions sont mentionnée dans l'annexe .Les boites sont ensuite incubées à 28°C pendant 14 à 21 jours. (Davet et al ,1997 ; Kitouni, 2007)

III.1.2 Vérification de la pureté des souches

Les colonies qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques et microscopiques, sont purifiées pour obtenir des cultures pures.

À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un inoculum à partir des colonies de souche actinomycète, qui sera ensuite ensemencé par épuisement sur le même milieu, sous forme des stries. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention des cultures pures. La pureté des souches d'actinomycètes sont contrôlées par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage (Boussaber & al, 2012).

III.1.3 .Conservation des souches d'actinomycètes

Les souches purifiées sont conservées pour être utilisés dans des tests ultérieurs. La conservation est réalisée selon deux techniques :

III.1.3.1 conservations à court terme

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées sur la gélose de l' GYM incliné puis incubé pendant 7 jours à 28°C. Les tubes sont ensuite conservés à 4°C (Arifuzzamanet al,2012).

III.2 Caractérisation morphologique

III.2.1 Micromorphologie

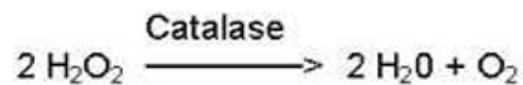
Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (G×40) (Suzuki, 2001).

Une observation au microscope optique (G×100), après coloration de Gram est ensuite réalisée.

III.3. Cratérisation biochimique

III.3.1 Recherches de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante :



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ 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.4 Choix de milieu de culture

Les souches d'actinomycète sontensemencées en strie sur deux milieux d'isolement (GYM, ISP2).

Les colonies des actinomycètes sont observées et comptées après 3 à 14 jours d'incubation pour connaître le milieu le plus favorable à leur multiplication et qui répond aux besoins nutritifs de ces germes.

III.4 Purification et Confirmation de l'identité des souches ciblées

En suit un tableau qui présente les défieront souches testées microbiennes (Tableau 04)

coloration de gram	Noms de la souche	No ATTC
Gram positifs	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Entirococcus feacalis</i>	ATCC0409P
Gram négatifs	<i>Pseudomonas aerogénosa</i>	ATCC27853
	<i>Escherichia coli</i>	
Levure	<i>candida albicans</i>	ATCC2091

Tableau 04: Les souches bactériennes testées.

III.5 Purification :

Les souches microbiennes testées (*Staphylococcus aureus* ; *Entirococcus feacalis* ; *Pseudomonas aerogénosa* ; *Escherichia coli* ;) sont repiquées sur le milieu le milieu sélectif de chaque bactérie comme le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* et le milieu sabouraud pour *candida albicans* (voir annexe), stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

III.6 Confirmation de l'identité des souches

a-Confirmation macroscopique :

Sur la boîte de pétrie (la forme de colonie, la texture, le couleur de colonie et la couleur du revers de la culture)

b-Confirmation microscopique

Le teste biochimique (coloration de gram, oxydase (-), aéro-anaérobie, voie d'attaque fermentative du glucose, nitrate réductase (+) stade nitrites).

III.7. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes est mise en évidence par deux criblages, le premier criblage, réalisé sur le milieu solide, consiste à sélectionner le meilleur isolat qui sera utilisé dans le deuxième criblage réalisé sur le milieu liquide.

III. 7.1 Préparation de l'inoculum

Pour cela, nous avons utilisé deux bactéries, dont un à Gram positifs : *Staphylococcus aureus* et *Listeria*.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur le milieu BN. Les souches tests sont ensuite inoculées sur le milieu GN. , puis incubées à 37 °C.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24heures d'incubation pour les bactéries cibles (Lemriss et al, 2003).

III.8 Criblage primaire par la technique des cylindres agar

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en strie serré à la surface du milieu GYM et incubés à la température de 28 °C pendant 3 jours. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par les bactéries tests. Les boîtes pétris sont ensuite placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances et après elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition formée autour des cylindres sont alors mesurées (Pazhanimurugan & al, 2012).

III.9 Préparation de l'inoculum des souches pathogènes

Pour cela, nous avons utilisé sept bactéries, dont trois à **Gram positifs** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* , , ATCC0409P , , *S.aureus*(5),

et deux à **Gram négatifs** : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogénosa* ATCC27853 et une levure *candida albicans* ATCC2091.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur le milieu BN. Les souches tests sont ensuite inoculées sur le milieu GN. , puis incubées à 28 °C. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24 heures d'incubation pour les Bactéries cibles (**Lemriss et al, 2003**).

III.10 Micromorphologie des souches pathogènes

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×40**) (**Suzuki, 2001**).

Une observation au microscope optique (**G×100**), après coloration de Gram est ensuite Réalisée.

III.11 Production du métabolite secondaire

III.11.1 Fermentation sur milieu solide

Les souches A4 et A18, retenues parmi les 20 souches d'actinomycètes testées après avoir donné des activités antibiotiques importantes avec la méthode de cylindre d'agar, sont ensemencées en stries serrées sur milieu AF stérile, à l'aide d'une anse de platine puis incubé à 28°C pendant 14 à 21 jours.

III.12 Extraction des métabolites

III.12.1 Extraction des métabolites de fermentation sur milieu solide

Les deux isolats retenus dans cette étude (A4 et A18) sont ensemencés en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 14 jours, la gélose est fragmentée puis repartie dans des flacons stériles contenant 20ml de méthanol à raison de chaque boîte. Les flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures avec agitation vigoureuse.

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

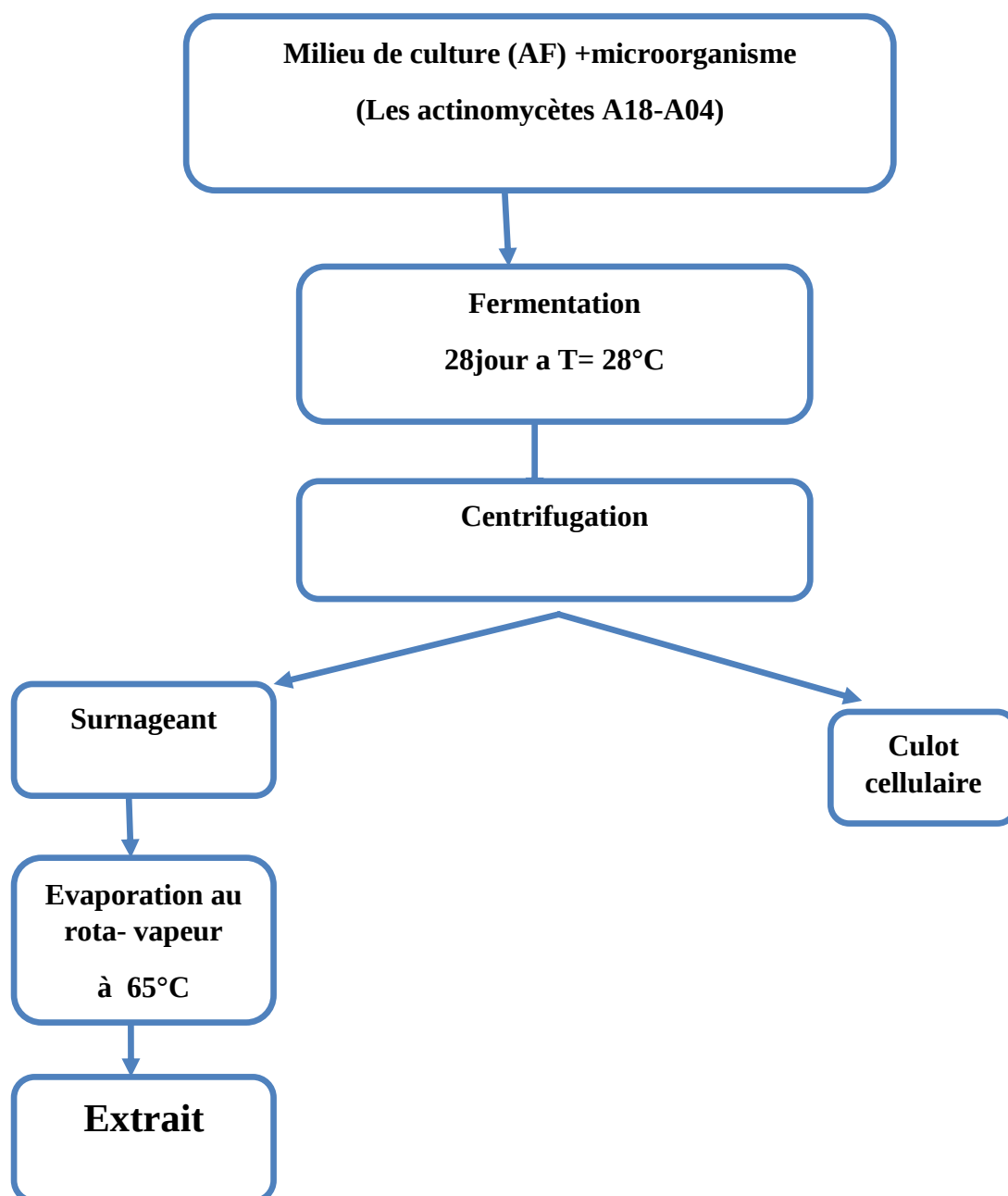


Figure 10: méthode d'extraction des métabolites en milieu Actinomycète fermentation.

III.12.2 Concentration des métabolites par utilisation d'un évaporateur rotatif (rota-vapeur)

La concentration est faite à l'aide d'un appareil le rota-vapeur

Avec un évaporateur rotatif par rota-vapeur, une seule étape séparation rapide s'effectue d'une manière affectueuse sur le produit (phase organique). La base de cette transformation est d'évaporer puis condenser les solvants en utilisant un rota-vapeur sous pression séparer les composants sous pression augmente le degré de performance et diminue le risque d'endommager les molécules présentes.

Dans cette étude on a suivi les étapes suivantes :

- 1-faire chauffer l'eau dans un bain marie à une température de 60°C.
 - 2-Mettre la phase organique dans l'ampoule et faire baigner l'ampoule dans le bain marie.
 - 3- Allumer le moteur pour augmenter la pression dans rota-vapeur.
 - 4- N'arrêter pas l'opération jusqu'à que le solvant soit évaporer entièrement.
 - 5- Récupérer ce qui reste dans l'ampoule (métabolites secondaires) dans 1 ml de méthanol
 - 6- Conserver l'extrait à une température de 4°C avant l'utilisation (**Arasu et al., 2009**)
- (Figure 11)



Figure 11 : rota vapeur (BUCHI Rota vapeur R-200) utilisé pour la concentration des métabolites secondaires.

III.13 Tests de l'activité antibactérienne des extraits

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

Cette méthode repose sur l'étude de l'effet de l'incorporation des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes A4 et A18 dans le milieu de culture sur la croissance des souches bactériennes (*Staphylococcus* ,*Pseudomonas A* ,*Bacillus S*,*Bacillus cereus* ,*kleibseila*)

. Une série des dilutions (de 0.5 à 8 mg/ml) est préparée en suspension avec le milieu de culture, à partir de la solution mère par addition des volumes variables de l'extrait méthanolique des souches d'actinomycètes. But d'inhiber les souches bactériennes.

Dans des tubes à essais on verse 10 ml du méthanol, on ajoute l'extrait avec différent volume de tel façon à obtenir les dilutions (0,5, 1, 2, 4 et 8mg/ml). Des témoins, contenant 10mL de méthanol seule.

En a couler les boites pétries de 90 mm de diamètre avec Meilleur Hinton stérilisés à autoclave (20 min à 120°C).

On laisser solidifier pendant 15min à T : 4°C, puis a l'aide d'une pipette pasteur stérile en a formé des puis. Et après avec un écouvillon stérile en aensemencé les souches bactérien testés.

III.14 caractérisation préliminaire de l'agent antifongique par CCM

III.14. a-Principe

Des plaques de gel de silice (60 F254) ont été activées à 110 ° C pendant une demi-heure à l'étuve. Des microlitres d'un échantillon provenant du meilleur milieu de production extraient par le meilleur solvant sont déposés graduellement sur la plaque de gel de silice. La cuve chromatographique est saturée pendant une heure par la vapeur de deux systèmes de solvant suivant (Rakshanya & al, 2011)

(Toluène-acétone (6 :4),

Toluène- acide acétique (7 :3)

N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1),

Acétate d'éthyle- méthanol (5 :5),

Toluène- méthanol (5 :5) (**Boughachiche, 2012**).

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

Ensuite les plaques sont introduites dans la cuve. Après développement, les plaques sont séchées pour éliminer les solvants, puis elles sont observées sous lumière UV à 255 et 366 nm (Boudjella & al. 2006).

Pour chaque tache obtenue on calcule le rapport frontal (Rf),

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

Rf: Rapport frontale.

X : Distance parcourue par le produit

Y: Distance parcourue par le solvant

III.14 .b- Préparation de la plaque

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à environ 1cm du bord inférieur de la plaque.

Puis les échantillons en solution sont déposés sous forme de trait sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Ils sont espacés de 1cm. Les dépôts sont séchés immédiatement puis vérifiés sous UV pour s'assurer que la quantité déposée est bien suffisante

III.14 .c- Saturation de la cuve

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

III.14 -d Mode opératoire

Dix microlitres de chaque extrait méthanoïque des souches actinomycétales A4, A18 sont déposés à l'aide d'une micro seringue sur des plaques de CCM en plastique (6cm × 6 cm) étalées par une couche mince de gel de silice GF254.

Ces plaques sont ensuite maintenues verticales dans des cuves de CCM contenant les systèmes de solvants suivants:

- Toluène-acétone (6 :4)
- Toluène- acide acétique (7:3)
- N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1)
- Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4)
- Toluène- méthanol (5 :5) (Boughachiche, 2012).
- Déchlorométhane –méthanol (8,2) (Andriambololona, 2010).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV à deux longueurs d'onde différentes 254nm et 365 nm (Boughachiche, 2012).

III.14 .e -Développement du chromatogramme

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

III.15 Anti biographie et choix de solvant d'extraction

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par anti biographie (méthode des puits).

III.15 .1-Méthode des puits

L'activité antimicrobienne de la phase organique et aqueuse est testée par antibiographie (méthode des puits) on utilisant le milieu Muller Hinton qui, une fois coulé dans des boîtes de Pétri, estensemencé avec les germes cibles. Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce.

Un aliquote de 50 μ l de surnagent de culture est prélevé stérilement puis introduit dans les puits préalablement tapissés, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant la croissance des germes, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les moisissures. La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits après 24 h pour les bactéries (DJINNI, 2009). (Figure12)

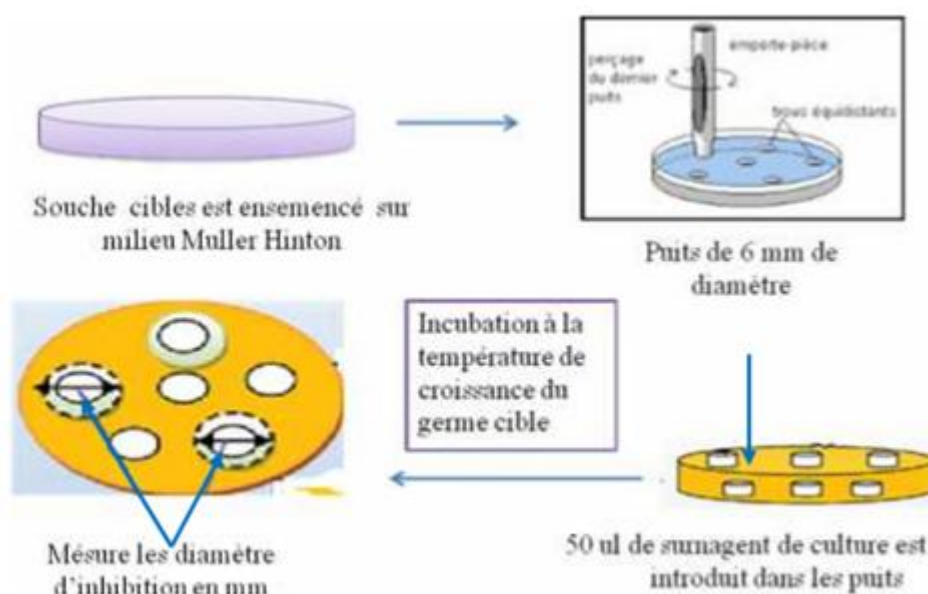


Figure12 :-Mise en évidence de l'activité antibiotique des extraits de l'isolat d'actinomycète sur milieu Muller-Hinton par la méthode des puits.

III.15.2-Révélation microbiologique des chromatogrammes (bio autographie)

Cette méthode consiste d'une part, à détecter les taches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur rapports frontaux (Rf) respectifs et d'autre part, à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de séparer le mieux les antibiotiques entre eux ou des autres composés non actifs. Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm). A la base de la boîte, une feuille de papier filtre imbibée d'environ 30ml d'eau stérile afin de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est stérilisé durant 1 h sous UV à 254 nm. Un volume de 50 ml de gélose molle (semi solide) Muller Hinton en surfusion est inoculé avec 1ml de la suspension de germe cible. Ce milieu est réparti de façon homogène et uniforme avec une pipette stérile sur les plaques. Après solidification, la boîte est mise à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion de substance antibiotique dans le

milieu puis incubée à 28°C. Les zones d'inhibition sont notées après 24 à 48 h et les Rf calculés selon la formule: (BETINA, 1973).

III.16-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur microplaque

La méthode utilisée a été décrite par CLSI en 2006. 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.

A partir d'un pré culture bactérienne sur solide GN de 24h à 37°C, nous avons prélevé quelques (5-6) colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendu dans 5ml de Le bouillon nitraté. L'inoculum est ajusté à $1-2 \times 10^8$ cellules/ml (DO de 0,08 à 0,13) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration cellulaire finale fixée à $1-2 \times 10^7$ cellules/ml, est obtenue par dilution de l'inoculum initial à 1/10 dans de Le bouillon nitraté. (EUCAST, 2003)

Pour la préparation de la microplaque, nous avons suivi le même protocole que celui utilisé pour les levures. Le milieu de culture utilisé est le Muller Hinton liquide.

Après une incubation de 24h à 37°C, nous avons observée la croissance visible à l'œil nu à l'aide d'une torche.

La plus faible concentration de chaque extrait ne montrant aucune croissance est considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la recherche de la CMB.(Figure13)

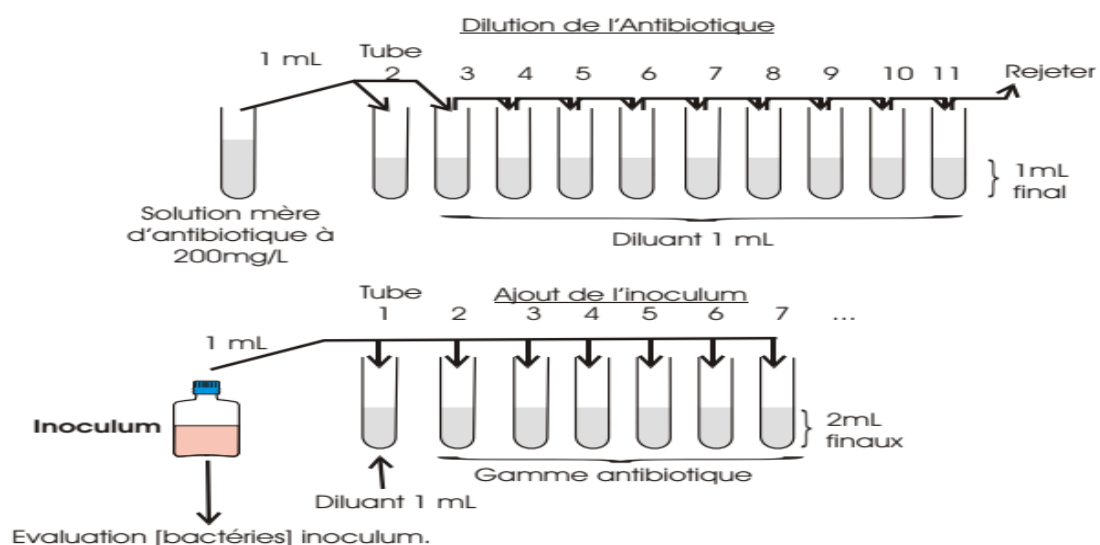


Figure 13: la préparation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur microplaque.

III.16.1- Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB est définie comme la concentration la plus faible de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI, les deux puits contenant les concentrations en substance antibiotique strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB.

Pour ce faire, un échantillon de 201.μL de chaque puits (ne présentant pas de croissance) vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Muller 1-linton Agar (MHA). Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35°C pendant 20h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de la CMB renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Prescott et al., 1995). (Figure14)

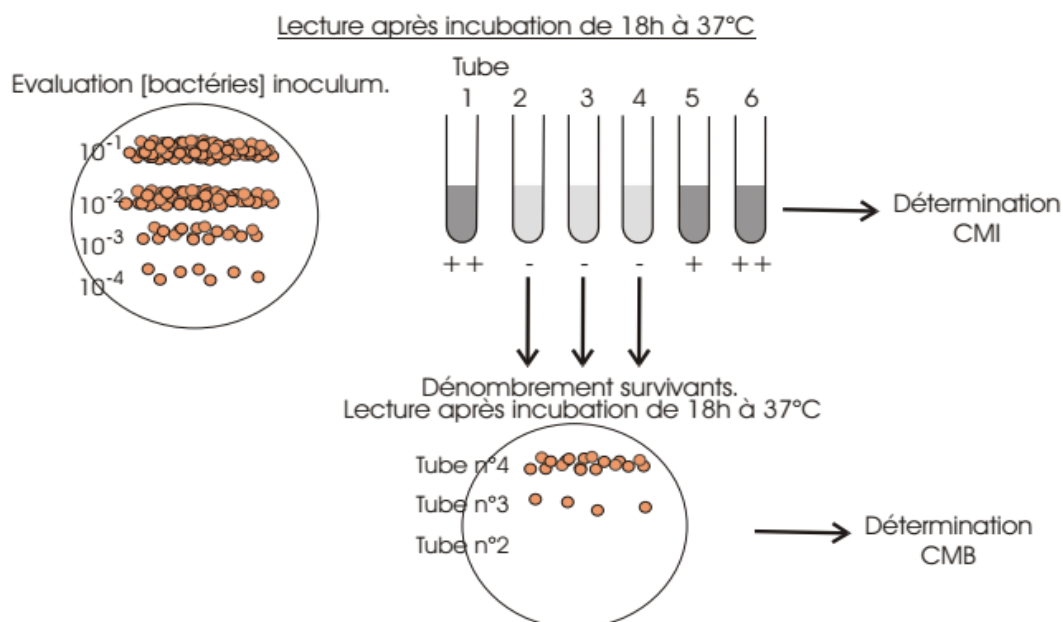


Figure 14: présent la lecture de la concentration minimale bactéricide (CMB).

III.17-Electrophorèse des extraits

les échantillons sont déposés dans les puits du gel de séparation afin de faire la migration

III.17.1-La préparation de gel de séparation

- pour un pourcentage de 12% mettre dans un bécher puis ajouter (1,6 ml Eau ,1,3 ml Tris 1,5M (Ph 8,8), 2 ml de 30% Acrylamide ;bis- Acrylamide(29¹), 50 µl SDS 10%, 50 µl Persulfate d'ammonium*10% ,2 µl TEMED mélanger le tout
- couler le gel dans une cuve contenant un peigne (pour faire des puits)
- Laisser le gel s'apparaitre avant d'enlever délicatement le peigne
- Mettre le gel dans une position horizontale par rapport à la base de l'électrophorèse,

Dépôts des échantillons

-préparer une solution de 10mg /ml de l'**extrait** dans méthanol

-centrifuger 1ml d'une culture jeune de l'**extrait**

-ajouter 10ul d'une solution de lysozyme (20mg /ml) aux échantillons des bactéries à Gram positif puis incubé à 37°C pendant 1 heure.

-prendre 75 ul de chaque échantillon et l'ajouter 25ul de tampon de charge (1.5 ml Tris pH 6.8 ; 0.03g bleu de Bromophénol ; 3 ml Glycérol ; 0.35ml B-Mercaptoéthanol ; 0.6 SDS ; qsp7.5 ml Eau distillée).

-chauffer à 95°C pendant 3 mn pendant 10 mn les échantillons bactériens afin de favoriser la lyse bactérienne et la dénaturation des protéines.

Déposer les échantillons dans les puits du gel à l'aide d'une seringue Hamilton.

-faire migrer l'antibiotique (30mA, 100V) jusqu'à ce que le bleu de Bromophénol atteigne le bord inférieur du gel d'électrophorèse (front de migration)

.la figure ci-dessous présente le dépôt des échantillons ainsi que le sens de migration .(Figure15)

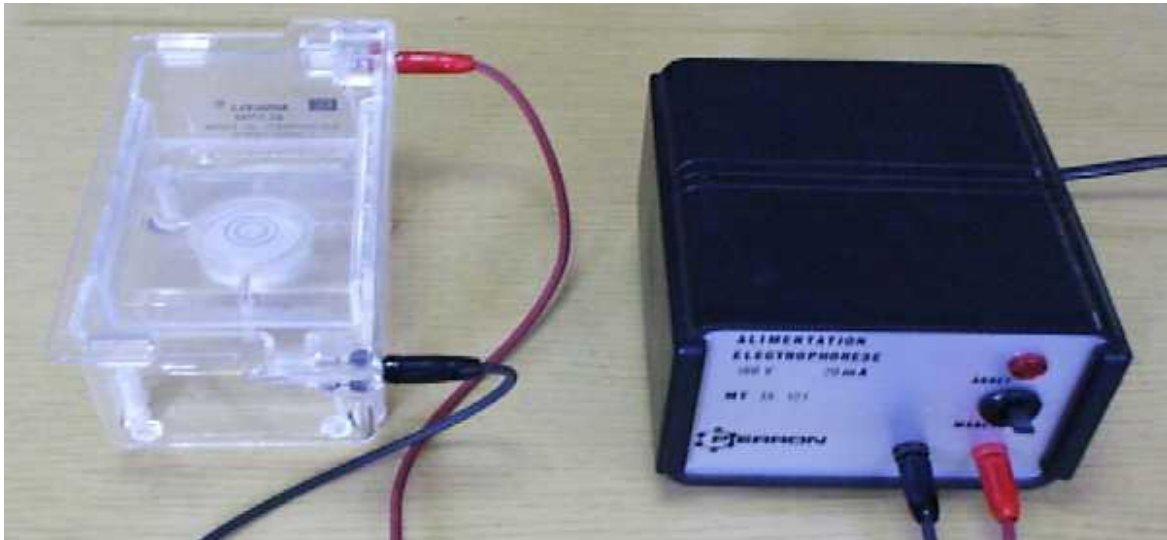


Figure 15: électrophorèse pour la séparation des antibiotiques

III.17.2-Coloration et décoloration du gel :

Le gel est mis dans une solution de coloration à 0.5%(m/v) de bleu de coomassie Après une heure de coloration sous agitation la décoloration est réalisée à l'aide de plusieurs bains dans une solution décoloration (Figure 16)

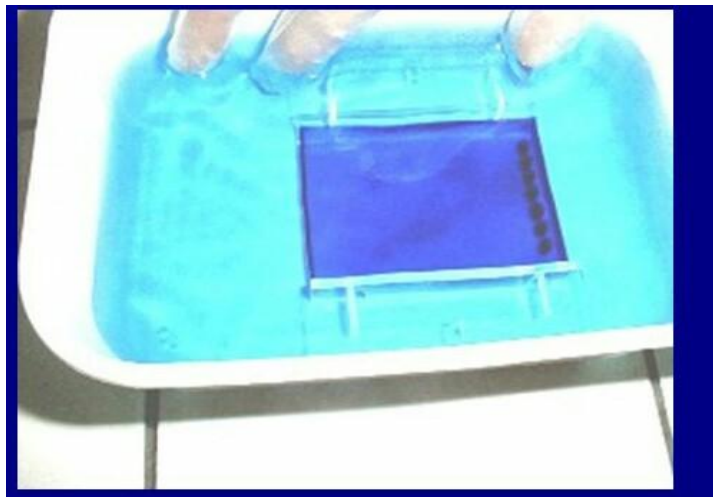


Figure 16 : coloration et décoloration de gel

Résultats

IV.1. Diversité morphologique des actinomycètes

Après 3 jusqu'à 14 d'incubation, les colonies apparaissent. Les colonies obtenues ont des tailles différentes (petite, moyenne, grande) de forme variable (lisse, bombé, aplatie....etc.) sont tous incrustées dans la gélose, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (jaune, blanche, marron...etc.), parfois le mycélium aérien est absent (Figure 17).

L'aspect macroscopique des actinomycètes est différent. Certains forment des colonies de grande taille, d'autres de taille moyenne et certains d'autres forment des colonies de petite taille. La forme des colonies était différente aussi : colonies bombées, aplatie, poudreuse...etc.



Figure17 : Aspect macroscopique des souches actinomycétales

L'aspect microscopique, indique que tous les actinomycètes ont un aspect filamenteux ramifié segmenté ou non, parfois il est fragmenté, ce qui les rapproche d'une façon certaine aux actinomycètes (figure18).

Résultats

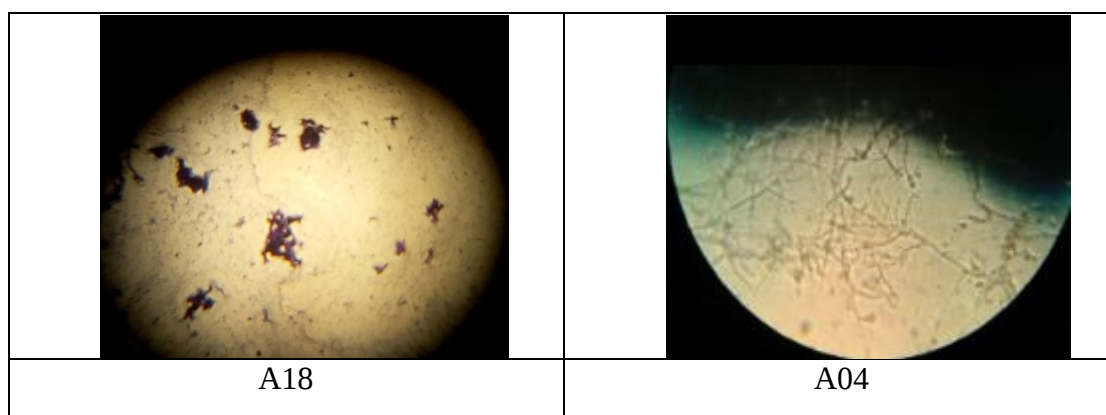


Figure18 : Observation microscopique du mycélium aérien des isolats d'actinomycètes (x100).

IV.2.Coloration de gram

La coloration de Gram des souches actinomycètes a montré une couleur violette , elles sont toutes des bactéries Gram positif, ainsi qu'elles représentent la même forme des streptomycés qui se présentent sous microscope (grossissement 10X100) (Figure19)

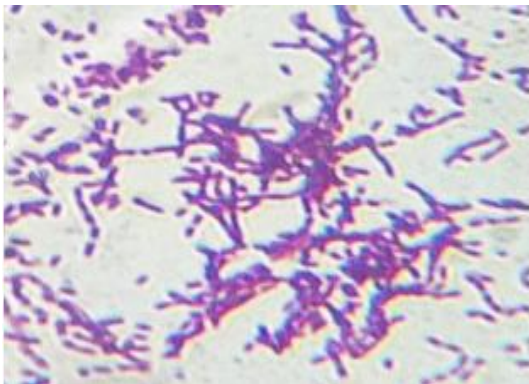
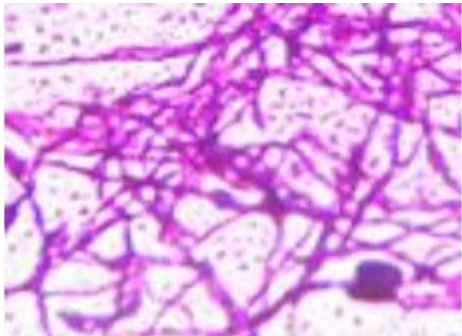
Souches	Aspect macroscopique	Coloration de Gram
A18		
A04		

Figure19: observation des souches d'actinomycètes (Gx100) après coloration de Gram

Résultats

IV.3.Cratérisation biochimique

IV.3.1-Recherches de catalase

Le résultat de la recherche de catalase a montré des bulles d'air ou une mousse qui se présente dans l'eau oxygénée donc catalase positif (Figure20)



Figure 20: Test de la catalase : Formation de bulles de gaz

IV.4. Résultats de l'activité antimicrobienne

Nous avons testé l'activité antibactérienne des actinomycètes par la technique de cylindres d'agar, afin de sélectionner les actinomycètes les plus producteurs de substances antibactériennes. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 07 :

Tableau 07 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents actinomycètes

	S. aureus Diamètre(mm)	Listeria sp Diamètre(mm)
A25	-	-
A2	-	-
A4	12	-
A18	13	07
A9	10	-
A10	11	-
A15	15	-
A19	15	07
A17	15	-
A30	1	10
A7	14	-

Résultats

A26	20	08
A5	14	-
A8	17	-
A20	17	06
A14	13	06
K17	-	-
AK	-	-

D'après le tableau 07, la plus part des actinomycètes ont montré une activité antibactériennes contre deux bactéries pathogène.

Les souches d'actinomycètes (A18, A19, A30, A26, A20, A30,A17,A19,A15,A10,A9), agissent sur *Staphylococcus aureus* .A14), sont actifs uniquement contre *Listeria sp*, tandis que les(A4 ,A18, 20,A8 ,A5,A26,A7,

Les souches A18, A19, A30 A26, A14, A20 inhibe les deux bactéries testée, et donnant des zones d'inhibitions importantes (supérieurs à 7mm).

La plus grande zone d'inhibition est obtenue par la souche A26 avec 20mm de diamètre contre la bactérie staphylococcus aureus, suivie par les souches A8, A20 contre *staphylococcus aureus* par une zone d'inhibition de 17mm de diamètre. La plus petite zone d'inhibition est observée par les souches A18, A19, A30, A26, A20, A14 contre la bactérie *Listeria sp* avec une zone d'inhibition de entre (7 et 10 mm) de diamètre.

Les deux souches K17 et AK apparaissent comme les souches les plus faibles.(Figure 21)

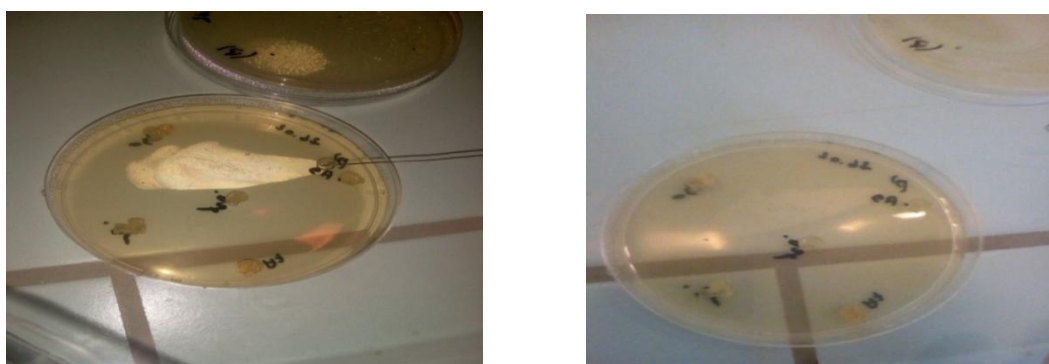


Figure 21 :Test d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes.

Résultats

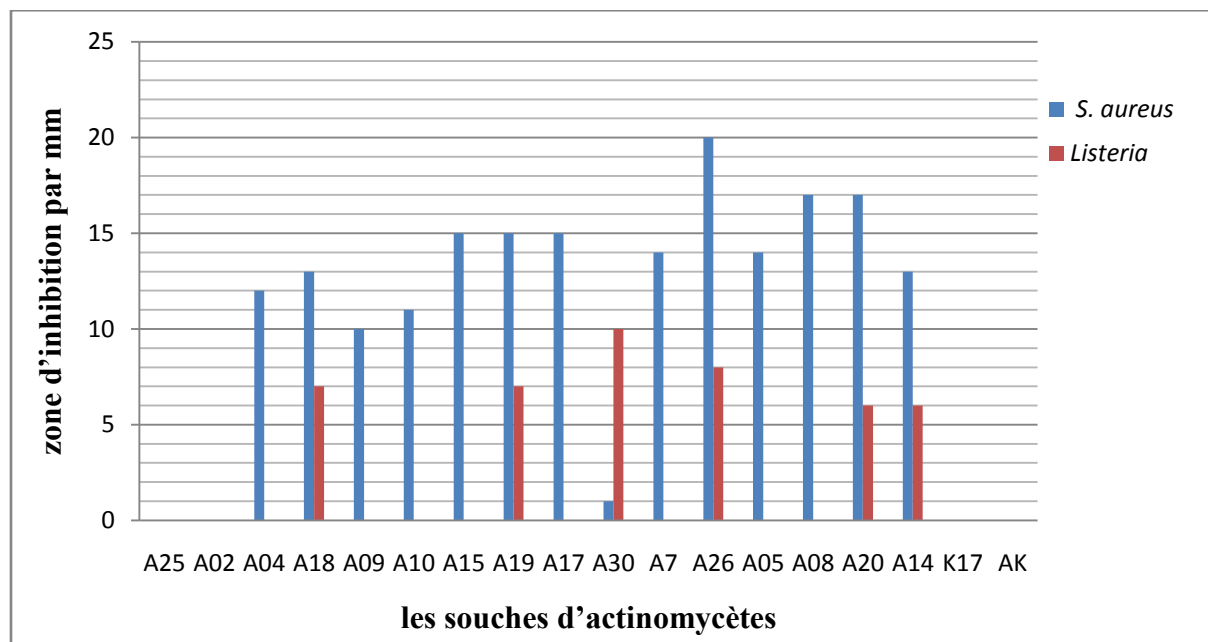


Figure 22: Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes en fonction des souches testées

La comparaison entre la sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des substances bioactives sécrétées par les actinomycètes est représentée dans le tableau suivant:

Tableau 08: Sensibilité des différentes souches testées vis-à-vis des substances antimicrobiennes sécrétées par les différents actinomycètes.

Souches testes	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria</i>
Le nombre actinomycètes actifs	14	6

Quatorze isolants sont actifs contre la bactérie *S. aureus*, ce qui nous amènent à dire que c'est la bactérie la plus sensible, Tandis que *Listeria* avec 6 actinomycètes actif

Résultats

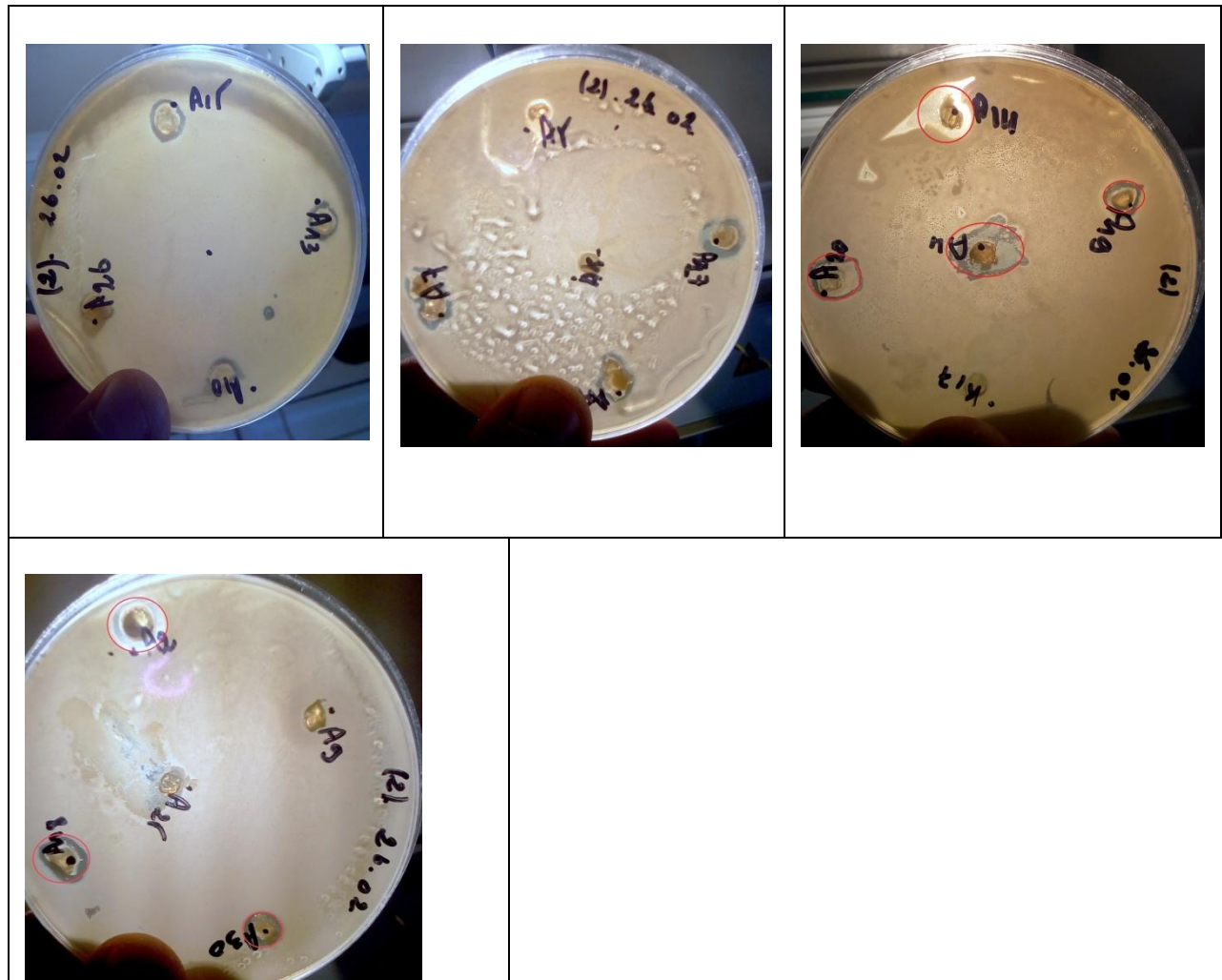


Figure23 : Test d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre *staphylococcies aureus*.

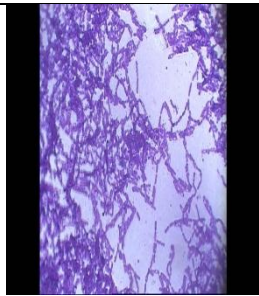
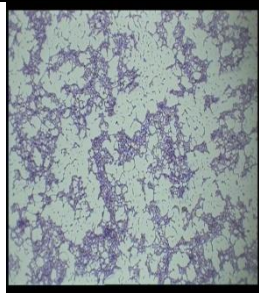
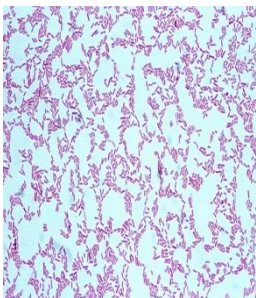
IV.5-Test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des Actinomycètes

IV.5.1-Aspect des souches bactériennes indicatrices

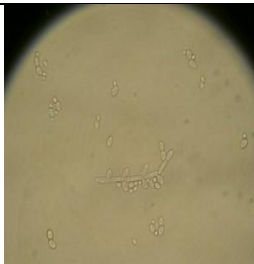
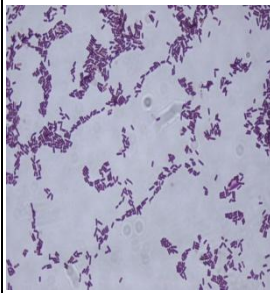
Les résultats des tests de purification et de confirmation des souches indicatrices sont regroupés dans le tableau 10

Résultats

Tableau 09 : aspect macroscopique et microscopique des souches de références cibles
suivants :

Souches de références	Observation macroscopique	Notes	Observation microscopique	Notes
<i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923		Colonies de taille moyenne		Cocci Gram positif regroupés en grappes de raisins
<i>Enterococcus faecalis</i> , , ATCC0409P		Colonie de taille petit		
<i>E. coli</i>		Colonies de taille moyenne Contour régulier, lisse, bombées de couleur beige		Des bâtonnets Gram négatif de longueur et diamètre moyen
<i>Pseudomonas aerogénosa</i> ATCC27853		Colonies de taille moyenne bombées muqueuses, contour régulier		Des bâtonnets très fins Gram négatif

Résultats

<i>Candida albicans</i> ATCC2091		Colonie de taille petit		
<i>B.sibtullus</i>		Colonie de taille moyen		

IV.6. inhibition des souches pathogènes par les actinomycètes

Les résultats de l'activité antibactérienne de nos actinomycètes vis-à-vis des souches pathogènes sont représentés dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Sensibilité des différentes concentrations des souches testées vis-à-vis des substances antibactériennes sécrétées par les différents Actinomycètes

Souches testés	<i>B.sibtullus</i>					<i>E. coli</i>				
	Diamètre (mm)					Diamètre (mm)				
Défirent concentration	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Les actinomycètes choisissent										
A18	07	09	13	14	00	00	00	00	00	00
A17	08	09	10	13	00	00	00	00	00	00
A30	07	09	12	00	00	00	00	00	00	00
A15	08	10	10	10	00	04	00	00	00	00
A4	06	08	10	00	00	10	00	00	00	00

Résultats

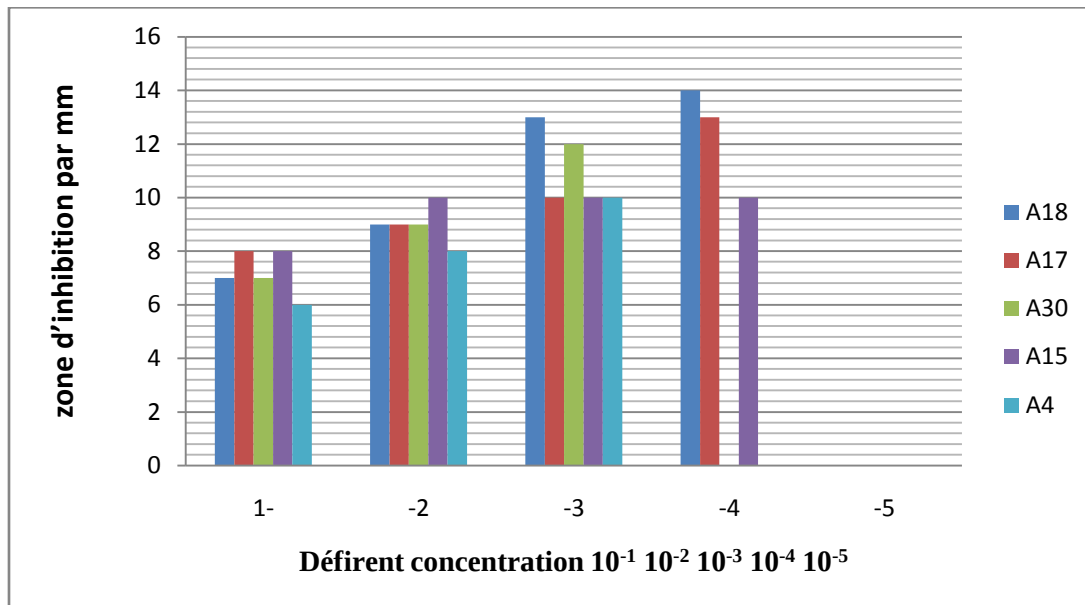


Figure 24 : Diagramme: inhibition de la déférente concentration des souches pathogènes par des actinomycètes

Il sera souhaitable dans les prochaines travaux d'intégrer au moins deux méthodes en même temps dans l'évaluation de l'effet antibactérien. Après ce criblage, deux souches (A18, A4) ont été sélectionnées pour prochains tests (extraction). Ces deux souches ont présenté un effet antibactérien très remarquable par rapport aux autres souches.

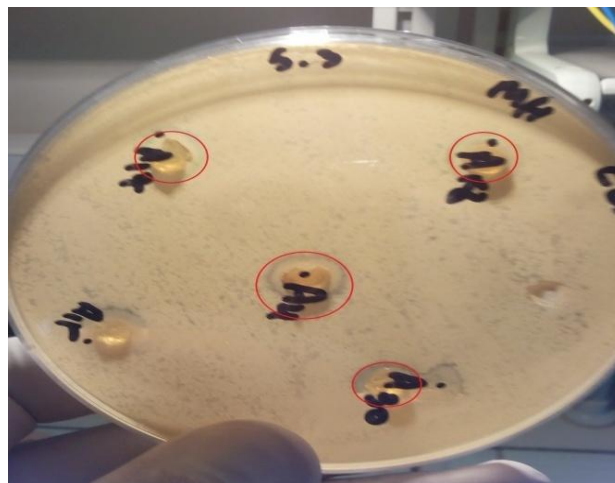
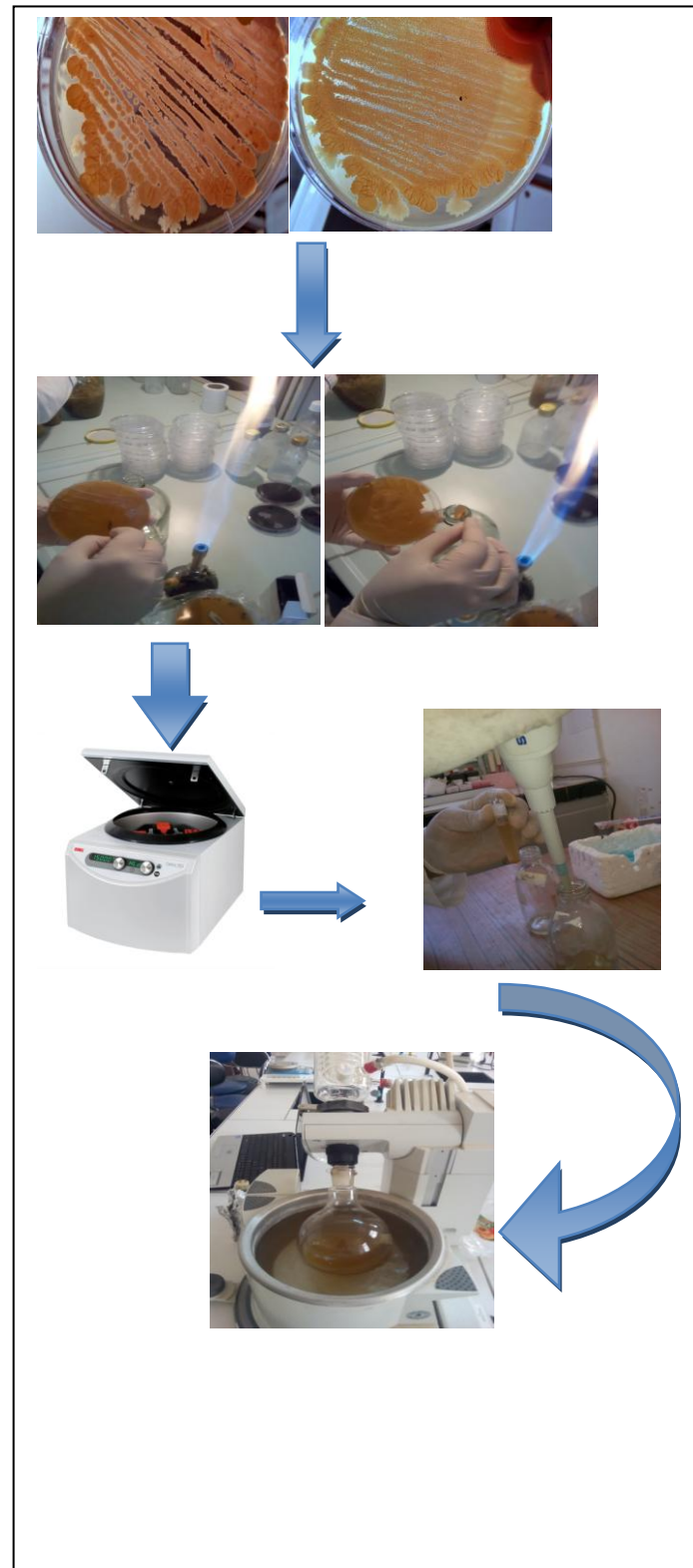


Figure 25 : L'activité antibactériennes des souches A4 et A18

Résultats

IV.7-Extraction des métabolites secondaires

- A. Les souches d'actinomycètes retenues, après montré un pouvoir inhibiteur important test de cylindre d'Agar, sont ensemencées dans boîtes de Pétri contenant le milieu AF (40boîtes pour chaque souche), puis incubées à 28° C pendant 21 jours.
- B. Après une incubation de 21 jours les milieux Produisant des métabolites sont fragmentés dans flacons contenant du méthanol 15ml pour chaque boîte). Est utilisé comme un solvant d'extraction.
- C. Les flacons subissent une agitation rigoureuse pendant 2heures.
- D. Le mélange obtenu à subi par la suite une filtration du contenant, la culture est centrifugée (11000 tours pendant 10min) et le surnageant est récupéré dans des flacons stériles.
- E. Ensuite cette phase organique qui contient les molécules extraites dissoutes dans le solvant est concentrée à sec à l'aide d'un rota -vapeur afin d'avoir extrait brute.



Résultats

IV.7.1-Evaluation de l'effet des extraits

Les extraits ont présenté un effet antibactérien assez remarquable surtout envers *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, cet effet est très limité pour des souches *Pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae*

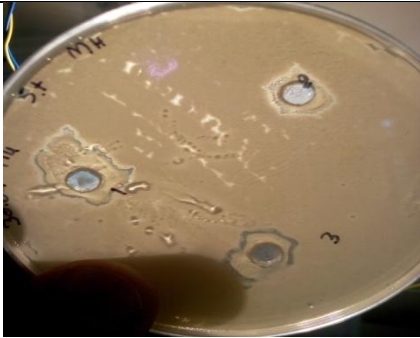
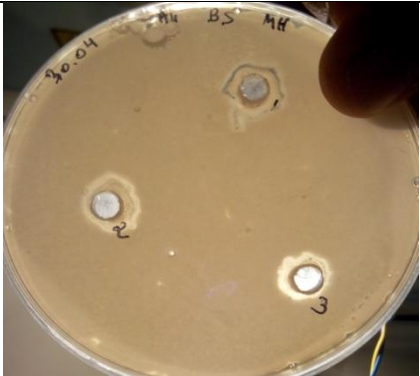
	A04	A18
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus cer</i>		

Figure 31 :d'effets inhibiteurs des extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* .

Résultats

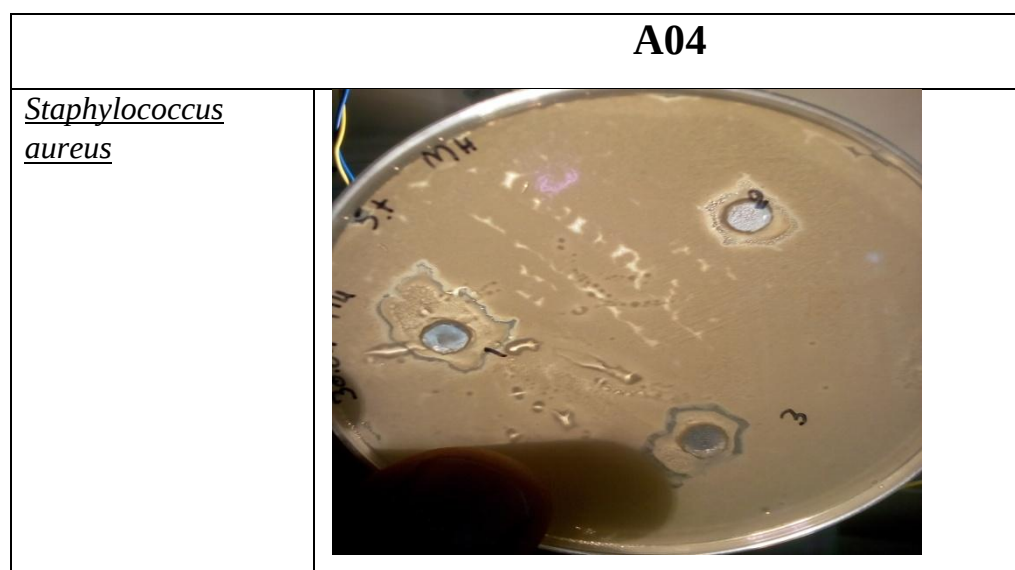
IV.8.Résultats de la détermination le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration

Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A4 sont présentés dans le (tableau11)

Tableau 11 : le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A4.

Concentration (mg/ml)	Les souches pathogènes testées				
	<i>S ,aureus</i>	<i>B,sebtillus</i>	<i>B,cer</i>	<i>K,pneumeuniae</i>	<i>P,aeroginosa</i>
8	18	12	11	00	00
4	14	11	10	00	00
2	12	10	09	00	00
1	00	08	06	00	00
0,5	00	00	00	00	00

D'après le tableau 12 : on note que aucune concentration de l'extrait A4 de souche d'actinomycètes n'a inhibée *Pseudomonas aeruginosa* *kleibseila pneumeuniae*. La bactérie *S.aureus* a été inhibée par les trois concentrations de l'extrait A4 :8,4, 2. *B. sebtillus* et *B. cer* sont inhibées par quatre concentrations de l'extrait A4 : 8,4, 2,1. Alors que la concentration 8 de l'extrait A4 a donnée la zone d'inhibition la plus grande (18mm) contre *S. aureus*.



Résultats

Bacillus subtilis

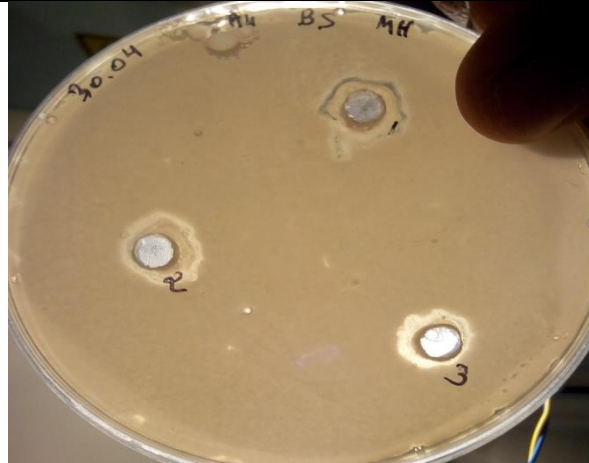


Figure26 : diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration.

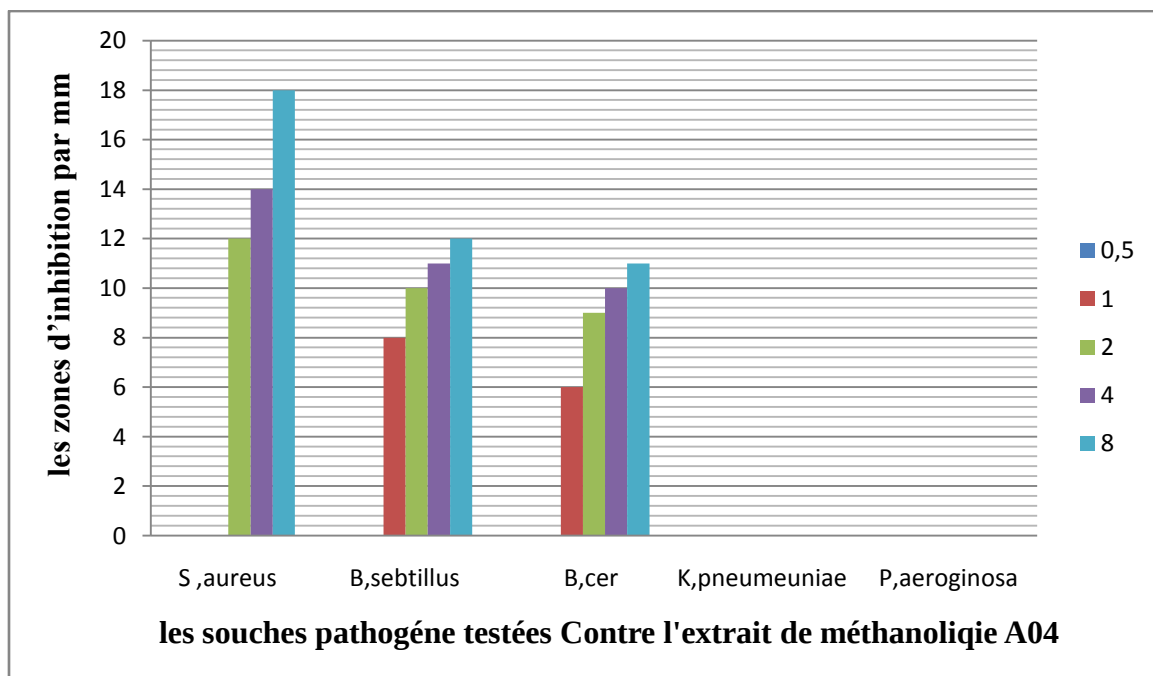


Figure27 : démentant le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A4.

Selon les résultats obtenus, les zones d'inhibition augmentent avec la sur concentration de l'extrait chez les deux souches testées. Avec une première concentration de 0.5mg/ml l'extrait n'a pas donné une zone, alors qu'à partir de 1 mg/ml une zone d'inhibition de 8mm apparaît chez *B. subtilis* et 6mm chez *B. cer* et augmente avec la sur concentration. Chez *S. aureus* une zone de 12 mm apparaît à une concentration de 2mg/ml augmente avec la sur concentration. Et aucune concentration n'inhibe *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae*.

Résultats

Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A18 sont présentés dans le (tableau 12)

Tableau 12 : le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A18.

Concentration (mg/ml)	Les souches pathogènes testées				
	diamètre (mm)				
	<i>S ,aureus</i>	<i>B,sebtillus</i>	<i>B,cereus</i>	<i>K,pneumeuniae</i>	<i>P,aeruginosa</i>
8	00	08	00	00	00
4	00	06	00	00	00
2	00	05	00	00	00
1	02	00	00	00	00
0,5	05	00	00	00	00

Aucune concentration de l'extrait A18 de souche d'actinomycètes n'a inhibée *Pseudomonas aeruginosae*, *kleibseila pneumeuniae* et *B.cer*. La bactérie *S.aureus* a été inhibée par les deux faible concentrations de l'extrait A18 :1,0, 5. *B. sebtillus* est inhibée par trois concentrations de l'extrait A18 : 8,4, 2. Alors que la concentration 8 de l'extrait A18 a donnée la zone d'inhibition moyenne (08mm) contre *B.sebtillus*

le meilleur extraits qui présente un effet antibactérien est celui de la souche A4, avec une zone d'inhibition 18 mm pour le diamètre, tandis que l'autre extraits n'ont pas pu exercer le même effet que celui réalisé lors des tests d'antagonisme

Résultats

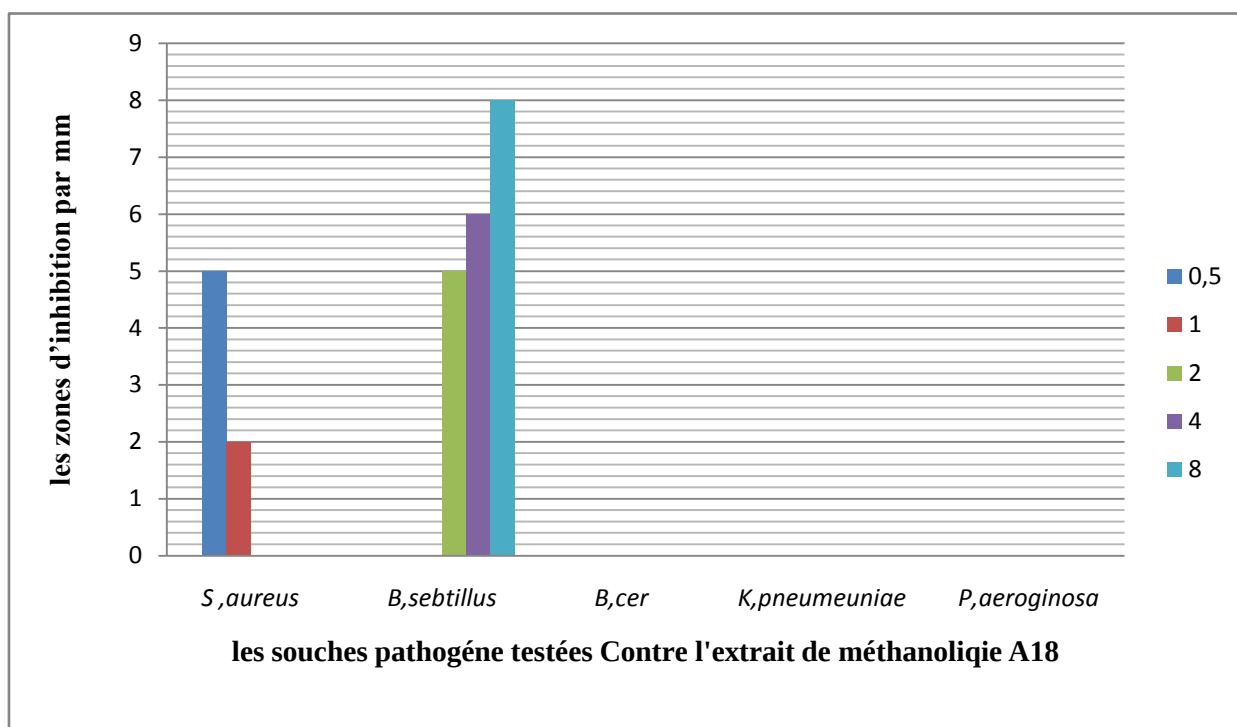


Figure28: démentant le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la souche A18.

Selon les résultats obtenus, les zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la concentration de l'extrait chez la souche testée. Avec une première concentration de 0.5mg/ml l'extrait a donné une zone d'inhibition 5mm chez *S.aureus*, et diminuer avec l'augmentation de la concentration. Chez *B.sebtillus* une zone de 5 mm apparait à une concentration de 2mg/ml augmente avec l'augmentation de la concentration. Et aucune concentration n'inhibe *Pseudomonas aeruginosa*, *kleibseila pneumeuniae* et *B.cereus*.

IV.9-Chromatographie sur couche mince en gel de silice

Le tableau (14) représente les résultats de la chromatographie sur couche mince en gel de silice de l'extrait méthanolique de la souche A4.

La constante de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelé le rapport frontal (Rf). Par définition, le rapport frontal est égal au rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt.

Résultats

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 14, le système solvant Méthanol/Acétate d'éthyle (4,6) est le meilleur système permettant une migration rapide des molécules antibactériennes. Une grande partie des séparations par chromatographie sur couche mince fait appel au processus d'adsorption.

Les résultats ont montré que la meilleur séparation des produits de l'extrait a été donnée par le système d'éluent Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4) les résultats sont représentés dans la figure 35

.

Le tableau (14) représente les résultats de la chromatographie sur couche mince en gel de silice de l'extrait méthanolique de la souche A18.

La constante de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelé le rapport frontal (Rf). Par définition, le rapport frontal est égal au rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 14, le système solvant Toluène /Acide acétique (7,3) est le meilleur système permettant une migration rapide des molécules antibactériennes. Une grande partie des séparations par chromatographie sur couche mince fait appel au processus d'adsorption.

Les résultats ont montré que la meilleur séparation des produits de l'extrait a été donnée par le système d'éluent Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4) les résultats sont représentés dans la figure 29

Résultats

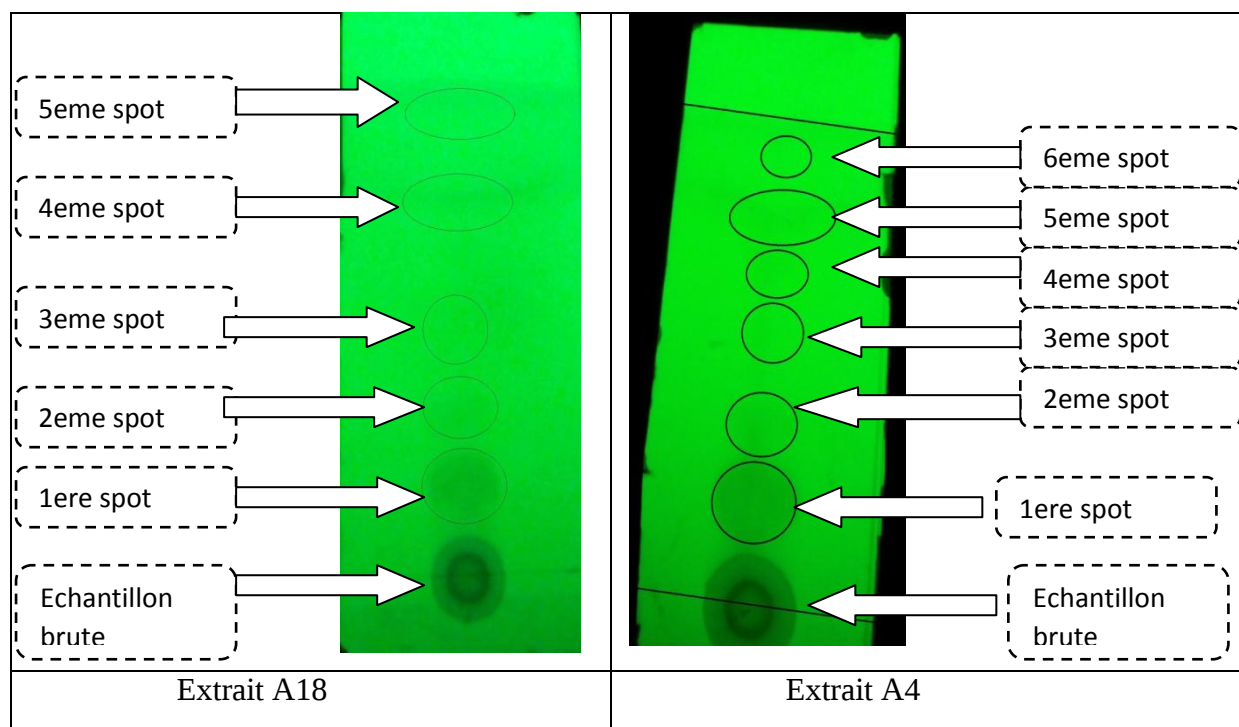


Figure29 : les différents produits des extraits sous UV.

Les résultats de la CCM montrent que l'extrait de la souche A4 et A18 sont constituée de 7 composés qui ont migré chacun avec sa polarité, le rapport frontale de chacun de ses composés est illustré dans le tableau suivant :

Tableau 13: Résultat de la chromatographie sur couche mince

Les extraits	A4	A18
Les spots	RF	RF
1ere spot	0.15	0,10
2eme spot	0.44	0,29
3eme spot	0.58	0,48
4eme spot	0.70	0,6
5eme spot	0.81	0,72
6eme spot	0.81	

Résultats

Les résultats ont montré que les spots 2 et 3 et 4 de l'extrait A4 a le rapport frontale respectivement RF= (0,44, 0,58 et 0,70) alors que le 1er spot de l'extrait de A18 et le 1^{er} et le 2^{eme} spot au rapport frontale respectivement

IV.10.a. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats relatifs à l'évaluation des CMI de extrait A4 (tableau15) sur les souches de bactéries de référence sont présentés dans le tableau15. Nous remarquons que l'extrait A4 actif sur les cinq souches testées ,avec une bonne résultat sur le germe *Bacillus subtilis* ATCC 6633 avec une concentration 2/5 ,et une faible résultat sur le germe *Selmonella entiridis* (9)sp seulement avec l'extrait brute (Tableau14)

Tableau 14 : Détermination des CMI de l'extrait A4 sur les souches testées

Les bactéries testé concentration d'extrait	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces</i> (2) sp	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Selmonella entiridis</i> (9)sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeroginisa</i> ATCC 7853	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

-Nous remarquons que l'extrait A18 actif sur les trois souches (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 ,*Selmonella entiridis* (9)sp, *Pseudomonas aeroginisa* ATCC 7853), avec une bonne résultat sur les deux germe *Selmonella entiridis* (9) et *Pseudomonas aeroginisa* ATCC 7853 avec une concentration 3/5, et les germes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces* (2) sp résistance à l'extrait A18 (tableau15).

Résultats

Tableau 15 : Détermination des CMI de l'extrait A18 sur les souches testées .

Les bactéries testé concentration d'extrait	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces (2) sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Selmonella entiridis (9)sp</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeroginisa</i> ATCC 7853	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

IV.10.b-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

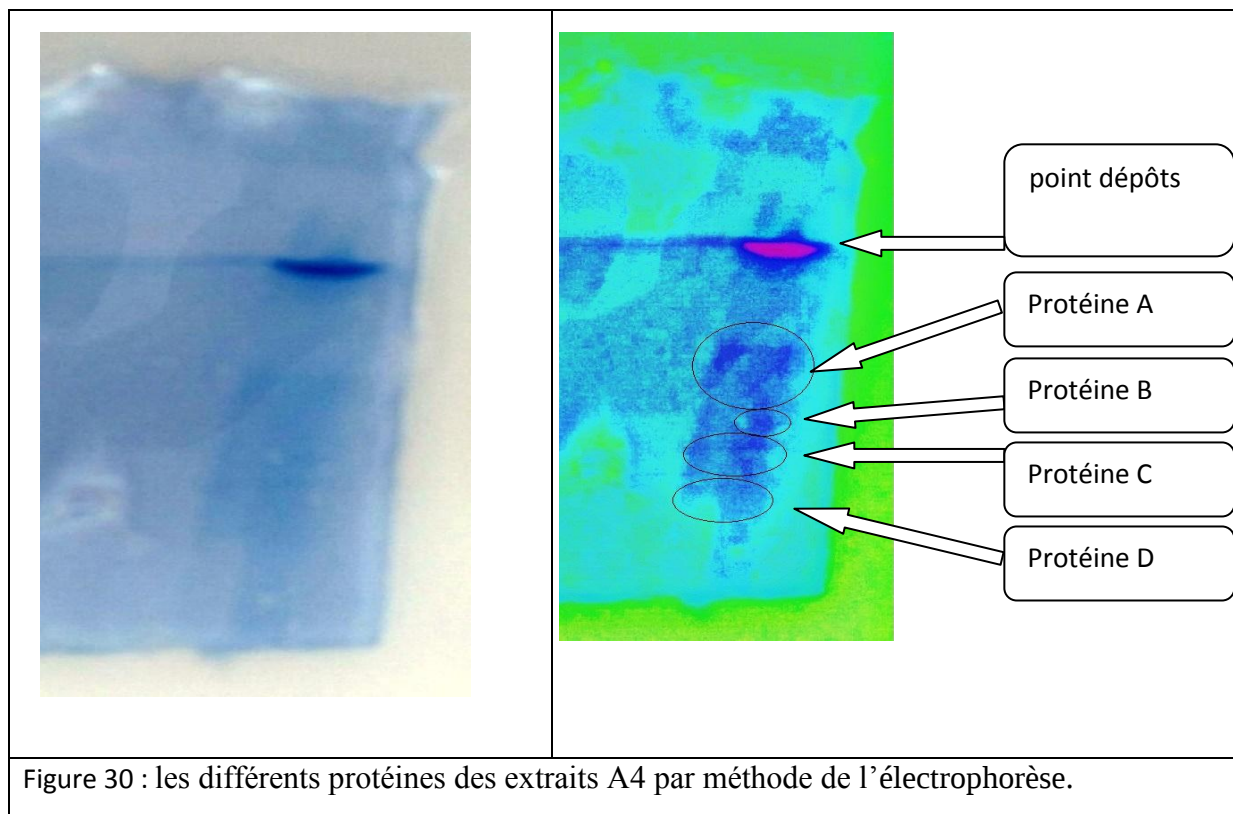
Les résultats relatifs à l'évaluation des CMB des extraits méthanolique (A4 et A18) vis-à-vis des bactéries de référence testées sont présentés dans le tableau 16

Tableau 16 : Concentrations minimales bactéricides (mg/mL) des différents extraits des Actinomycètes vis-à-vis des souches bactériennes testées.

	Extrait A4	Extrait A18
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	à la concentration 2/5	à la concentration 7/10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	à la concentration 5/10	Résultat négatif
<i>Saccharomyces (2) sp</i>	à la concentration 4/5	Résultat négatif
<i>Selmonella entiridis (9)</i>	à la concentration 1	à la concentration 7/10
<i>Pseudomonas aeroginisa</i> ATCC 7853	à la concentration 5/10	à la concentration 3/5

IV.11 .Résultats de technique d'électrophorèse

D'après les résultats mentionnés dans le figure 36 on observe que l'extrait A4 contient quatre protéine à différent taille, en ce qui concerne l'extrait A18 il existe pas une migration (figure30). On conclu que ces extraits ne contient pas des protéines



Discussion

Les actinomycètes en général, et plus particulièrement les Streptomyces sont également d'importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. **(Kitouni et al ,2005).**

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose, certaines montrent seulement un mycélium du substrat **(Boudemagh, 2007)**. Pour cela, L'utilisation du milieu ISP2 et GYM additionné des antibiotiques antibactériens et antifongiques est ainsi une des méthodes sélectives pour l'isolement des Actinomycètes.

Les milieux ISP2 et GYM ont été utilisés dans cette étude, ils contiennent des substrats sélectifs pour la croissance des actinomycètes et ils sont utilisés dans de nombreux travaux d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés **(Allaoueddine B, 2007 ; kitouni, 2007 ; Boussaber et al.,2012).**

D'après cette étude, les milieux GYM est plus favorable pour la croissance des actinomycètes à partir de repiquage. il offre à 18 / 20 actinomycètes du total des souches d'actinomycètes, par contre **kitouni,2007 ; Allaoueddine, 2007** qu'on trouve que GLM et Bennett sont meilleurs milieux pour les actinomycètes

Dans notre travail, on s'est intéressé par la recherche des souches d'actinomycètes qui montrent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des souches bactériennes. Pour réaliser ce travail, des souches actinomycétales, déjà isolées et conservées dans des travaux antérieurs, sont revivifiées sur deux milieux. Les travaux d'isolement sélectif des actinomycètes à partir des sols arides sont relativement récentes et rares **(Hacène et al, 1994, Ouhdouch et al, 2001, Zitouni et al, 2005).**

Les actinomycètes existent dans divers habitats en nature y compris le sol qui est considéré comme le réservoir principal de ces bactéries **(Davies et Williams, 1970)**. Ils constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes. Le criblage des souches d'actinomycète présente une nouvelle voie de recherche d'antimicrobiens naturels. La plupart des criblages concernant la recherche des substances antimicrobiennes à partir des souches d'actinomycètes ont été effectués.

De plus, les actinomycètes sont connus comme étant de grands producteurs d'antibiotiques et un des objectifs de notre étude est de rechercher de nouvelles molécules

Discussion

antibiotiques. Pour mettre en évidence les activités antibactériennes des souches actinomycètes. L'activité antibactérienne de 18 souches des actinomycètes a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar. Cette méthode est une technique de diffusion en milieu gélosé (le milieu Mueller-Hinton). Après incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des cylindres d'actinomycètes produisant des antibactériens actifs contre la souche testée. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires autour des cylindres d'agar, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries sont résistantes aux substances produites par les actinomycètes. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (**Petrosyan et al., 2003**). L'activité antibactérienne était très remarquable en fonction des zones d'inhibition lors des tests d'antagonisme des souches d'actinomycètes vis-à-vis des souches pathogènes.

Concernant le nombre des souches actives contre un pathogène, il y a eu plus de 25,88% du nombre global des souches suspectées être des streptomycètes.

Dans le travail d'**Anzai et al.,(2008)** le nombre global des souches qui ont une activité antimicrobienne est de l'ordre de 30% ;sachant que **Ben Fguira et al ,(2010)** .dans leur travail, ils ont trouvé que 58,84% des souches ont une activité antibactérienne ;ainsi que le travail de **Jeffrey et al ,(2008)** a montré que 38,8% des souches dans l'étude ont une activité.

En effet, une forte concentration de molécules bioactives libérées diffuse plus rapidement que la croissance de la souche testée ce qui conduit à une zone d'inhibition importante (**Koch, 1999**). L'activité contre les bactéries à Gram positif apparaît plus importante en comparaison avec celle contre les bactéries à Gram négatif. En ce qui concerne les germes testés, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des deux actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, ceci a été également constaté par **Hasavada et al., (2006)** et **Atta et al.,(2009)**.

Parmi les 20 souches d'actinomycètes obtenus 16 souches, de caractéristiques, sont testées pour leurs effets antimicrobiens.. 14 souches possèdent une activité vis-à-vis de la souche pathogène *Staphylococcus aureus*. L'effet inhibiteur le plus fort est marqué par la souche A26. L'efficacité des Actinomycètes contre les staphylocoques a été observé également par plusieurs chercheurs (**Oskay et al., 2004 ; Kariminik et Baniasadi , 2010**).

Discussion

Six souches également ont pu inhiber *Listeria* ce qui est très intéressant vu l'importance de cette souche dans les domaines sanitaire et technologique. La caractérisation de l'agent inhibiteur qu'a donné une activité contre ce germe peut être un axe de recherche d'un intérêt à l'échelle internationale

L'incubation de 21 jours de ces souches actives présente une gamme de couleur assez variée blanc, marron,. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966 ; Williams et Wallington, 1983 ; Sabaou, 1988).

Nos résultats font ressortir le milieu de meilleur Hinton (l'activité de la souche A4 et A18) comme le meilleur milieu de production d'antibactériens pour l'ensemble des actinomycètes du point de vue quantitative(croissance dans ce milieu) et qualitative (le diamètre de la zone d'inhibition), par contre que KITOUNI et al.; 2005. LOUCIF ,2011 qu'on trouve que GLM et Bennett sont meilleurs milieux pour les actinomycètes.

Après 21 jours d'incubation sur milieu AF solide, les deux souches A4et A18 ont donné des colonies poudreuses et granuleuses de couleur marron. Dans cette étape il y avait une production des métabolites secondaires, qui sont dispersées dans le milieu de culture et sont extraites avec le solvant organique. Puis la culture par fermentation a été macérée avec 20 ml de méthanol pendant 2 heures. La filtration et la centrifugation de l'extrait est indispensable pour débarrasser les cellules vivantes présents dans l'extrait.

Les molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes ont été extraites sous l'action d'un solvant organique (méthanol). Boudmagh (2007) a fait une comparaison entre les différents solvants d'extraction, il a trouvé que les molécules extraites par le méthanol sont actives contre plusieurs souches pathogènes, y compris *Staphylococcus aureus*, *Baccillus sibtilus* et *Escherichia coli*.

L'étude de l'activité antibiotique des extraits organiques a été faite par la méthode de contact direct, qui est dû à l'incorporation des différentes concentrations dans le milieu avant sa solidification.

La détermination de la concentration minimale bactéricide de la bactérie pathogène cible se fait par une incorporation des différentes concentrations de l'extrait dans le milieu de culture, d'intervalles allant de 0.5 mg/ml à 8 mg/ml. La souche *S.aureus* est la plus sensible vis-à-vis l'extrait provenant de la souche A4, car elle donne une grand zone d'inhibition t à une

Discussion

concentration de 8 mg/ml. Par contre, *K.pneumoniae* et *P. aeruginosa* sont les plus résistantes vis-à-vis cet extrait, car elle n'a pas été inhibée

En effet, l'extrait issu de la souche A4 était moins efficace, par rapport à celui d'A18, contre *S. aureus*, qui est inhibé, par 1 mg/ml. La souche *B. subtilis* est la plus sensible est de 8mg/ml. *B. cere* et *K.pneumoniae* et *P.aeruginosa* ont les plus résistantes vis-à-vis cet extrait

D'une manière générale, la diminution de la croissance en présence de l'extrait comparé au témoin pourrait s'expliquer par la présence dans ces extraits des composés terpéniques à activité antibiotique (**Tatsadjieu, 2003**).

Conclusion

L'objectif principal de ce travail, est la recherche de métabolite secondaire chez les actinomycètes dits rares, afin de mettre en évidence leurs activités antimicrobiennes, et sélectionné les meilleures souches pour identifier et étudier leurs substances antimicrobiennes sécrétées.

D'après les analyses morphologiques et chimiques effectuées sur vingt souches. En effet, 18 souches parmi les 20 souches certaines forment des colonies de grande taille, d'autres de taille moyenne et certains d'autres forment des colonies de petite taille. La forme des colonies était différente aussi : colonies bombées, aplatie, poudreuse...etc. Toutes ces structures sont des caractéristiques des genres rares d'actinomycètes.

D'après les résultats, cinq souches d'actinomycètes (A26,A18 ,A7 A10,A4) ont été sélectionnées comme les souches les plus productrices d'antimicrobiennes sur le milieu de culture GYM qui favorise la croissance et la production des agents inhibiteurs. Vue leurs importance en pathologie infectieuses (Actinomycètes), la bactérie testées *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est sélectionnée comme souche type. Les deux souches d'actinomycètes (A4,A18) sont sélectionnées comme les souches les plus productrices des substances antimicrobiennes et le milieu de culture Meilleur Hinton favorise la croissance et la production des agents inhibiteurs contre la bactérie- testée *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concernant l'activité antibactérienne les extraits ont montré une activité importante contre les souches bactériennes testées, donne une zone d'inhibition importante aux différentes concentrations bactériennes comprises entre 2 et 8 mg/ml.

Les molécules sécrétées par les souches A4 et A18 on montré une l'activité antibactérienne importante est ceci par d'autres techniques (Chromatographie sur couche mince, électrophorèse, CMI sur microplaque).

Les principales perspectives de ce travail :

- Tester l'activité antifongique des souches A4 et A18.
- Compléter l'étude des molécules antibactériennes sécrétées par les souches Actinomycètes (A4 et A18) par d'autres techniques, afin d'élucider leurs structures chimiques exactes en utilisant (HPLC, spectre de masse, CPG). .
- Etudier en cas de sécrétion, la stabilité des antibiotiques envers la température et la lumière.

Référence bibliographie

- **Allaoueddine Boudemagh, 2007.** Isolement, à partir d es sols Sahariens, de bactéries actinomycète a les productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat d 'Etat En Microbiologie Appliquée de l'Université Mentouri Constantine
- **Almaris N. Alonso. 2007.** Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytique actinomycetes *Thermobifida fusca*. UMI. Pp: 134.
- **Avril, J, L., & al. 1992.** Bactériologie clinique.2 éd. Paris : ellipses. Pp. 511.
- **Benachour A,Morin T,** Henert L, Budin-varneuil A, Le Jeune A, Auffray Y and Pichereau V ,2009.
- **BENTLEY S.D., Chater K.F., Cerdeno-Teraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., HarrisD.E., Quail M.A., Kieiser H.And Harper D. (2002).** Complète génome séquence of the model actinomycète cetes *Streptomyces Coelicolor* A3(2).Nat.417,141-147.
- **BENZEKGOUTA N., 2005-**Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Thèse Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmaco chimie. Université Mentouri de Constantine
- **Boudemagh A., (2007) .** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université de Mentouri Constantine
- **Boussaber E., Issam M. K., Hilali L., Hilali A. (2012).**Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques. Volume 4N° 120801
- **Cabot G ,Ocampo-Sona A.A., Tubau F.,Macia M.D .,Rodriguez C.,Moya B.,Zamorano L.,Suarez C .,Pena C.,Martinez L .,Oliver A.,and the Spanich Network for Research in infectious Diseases (REIPI),2011.**Overexpression of Ampc and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeroginosa* Isolates from Bloodstream infections ;Prevalence and impact on Resistance in a Spanich Multicenter Study .Antimicrobial Agents and Chemotherapy .Vol 55(5) ;1906-1911
- **CAVALLO J.D., FABRE R., JEHLF., RAPP C., et GARRABÉ E., 2004 -** Betalactam antibiotics. EMC-Maladies Infectieuses: 1, 129–202.

Référence bibliographie

- **Cox.P. W, Paul. G. C & Thomas. C. R. 1998.** Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. Microbiology. Vol 144. Pp: 817–827.
- **Del Papa M.F and Perego M, 2011.**Enterococcus faecalis Virulence Regulator FsrA Binding to Target Promoters .Journal of Bacteriology .Vol 193(7) :1527-1532.
- **DEMAIN A.L., et LANCINI G., 2006.** - Bacterial Pharmaceutical Product in Procaryotes, 1, 812–833.
- **DJINNI I., 2009-** Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Mémoire De Magister en Microbiologie Appliquée, Université A. Mira de Bejaia : 154p.
- **Eliopoulos G.M, 2005,** Antimicrobial agents for treatment of serious caused by resistant Staphylococcus aureus and enterococci.European Journal of Clinical Microbiology and infectious Diseases .Vol 24(12) ;826-831.
- **Goldman G.H.,da Silva Ferreira M.E. ,dos Reis Marques E.,Savoldi M .,Perlin D.,Park S. ,Godoy Martinez P.C.,Goldman M .H.and colombo A.L,2004** .Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in brazil.Diagn Mivrobiol Infect Dis .Vol 50 :25-32
- **Goodfellow M., O'donnell A.G. (1992).** Search and discovery of industriallysignificant Actinomycetes. In: Microbial products: new approaches. Cambridge University Press, Cambridge
- **Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the actinomycétales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F. A. Skinner. Academic press, London, New York.
- **Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G. (1994).** Screening for nom-polenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. Microbiol. 79: 81.
- Identification of secreted and surface proteins from Entrococcus faecalis,Canadian Journal of Microbiologiy .Vol .55(8) :967-974Chambers H.F,2001.
- Identification of secreted and surface proteins from Entrococcus faecalis,Canadian Journal of Microbiologiy .Vol .55(8) :967-974Chambers H.F,2001.
- **Jacobsen F.,Fisahn C.,Sorkin M.,Thiele I.,Hirsch I.,Klaaassen T., Roemer A., Fugmann B and Steistraesser L .,2011.**Efficacy of Topically Delivered

Référence bibliographie

Moxifloxacin against wound infection by pseudomonas aeruginosa and Methicillin – Resistant Staphylococcus aureus .Antimicrobial Agents and chemotherapy .Vol 55(5) :2325-2334.

- **JAQUES B., 2004**-Le technicien d'analyse biologique. 2eEdition, Paris : 1201p
- **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.
- **Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M., (2000)**. Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of Streptomyces yeochonensis sp.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 54, 211-214.
- **Kitouni Mahmoud 2007**.Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées, doctorat d'état en microbiologie appliquée, d'université mentouri-constantine.
- **Lee. J. Y & Hwang. B. K. 2002**. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. Vol : 48. Pp : 407–417.
- **LOUCIF K., 2011**-Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine : 21p.
- **MADIGAN M. T et MARTINKO J.M., 2007**-Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e édition : 331-423, 686-718.
- **Miyazaki T.,Miyazaki Y.,Izumikawa K.,Kakeya H.,Miyakoshi S.,Bennett J.and Kohno S ,2006** .Fluconazole treatment is effective against a Candida albicans erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance .Antimicrob Agents chemother.Vol 50 :580-586.
- **Muto C.A.,Jernigan J.A.,Ostorowsky B.E.,Richet H.M.,Jarvis W.R .,Boyce J.M.,Farr B.M,2003**.Infection control and Hospital Epidemiology.Vol.24(5). :362-386.
- **Nanjani. S. G & Soni. H. P. 2011**. Isolation and characterization of extremely halotolerant and halophilic organisms from dwarka and veraval. Bioinformatica .Vol: 1. N°: 1. Pp: 1-15

Référence bibliographie

- **NATHAN et ÉBERLIN., 1994** - Antibiotiques : classification et mode d'action, utilisation thérapeutique, 9-23.
- Neyra, M. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/rhizobium. 1992. Food & Agriculture Org. Pp: 200
- **Nys S.,Terporten P.H.,Hoogkamp-Korstanje J.A.A et Stobberingh E.E.,2008.**Trends in antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolates from urology services in the netherlands (1998-2005) .Jornal of Antimicrobial chemotherapy.Vol 62 :126-132.
- **Pfaller M.Aand Diekema D.J, 2007** .Epidemiology of invasive candidiasis :a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev.Vol 20 :133-163.
- **PRESCOTT W.M., SHERWOOD M., WOOLVERTON J., 2013**-Micbiologie.8e édition Bruxelles : 568p.
- **Sabaou. N. 1988.** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et ecologie. Thèse doc : USTHB. Pp : 192.
- **Salem A.H.,Elkhatib W.F and Norreddin A.M,2011.**Pharmacodynamic assessment of vacomycin-rifampicin combination against methicillin resistant Staphylococcus aureus biofilm :a parametric response surface analysis .Journal of pharmacy and pharmacology.Vol 63 :73-79.
- **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.
- **Seifert H.,Kalthener M and Perdereau-Remington F, 1995.**Micrococcus luteus endocarditis :case report and review of the literature.Zentralblatt fur Bakteriologie .Vol 282(4) :431-435.
- **SHIRLING E.B. et GOTTLIEB D., (1966).** Methods for characterisation of Streptomyces species. Int.J.Syst.Bacteriol. 16(3): 313-340.
- **SINGLETON P., 1994**-Bactériologie. Masson. France : 480p
- **SMAOUI S., 2010**-Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. en vue de l'obtention du doctorat . Toulouse : 22p.
- **Tacconelli E. De Angelis G.,Cataldo M.A.,Pozzi E and Cauda R ,2008.**Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation.Journal of antimicrobial chemotherapy.Vol61 :26-38.
- The changing epidemiology of Staphylococcus aureus ,Emerg.Dis .Vol 7 :178-1.

Référence bibliographie

- **TORTORA G.J., FUNKE B.R. et CASE C.L. 2012**-Introduction à la microbiologie . Edition de Renouveau pédagogique, Québec: 152-408. .
- **WALCH C., 2000**-Molecular mechanisms that confer antibacterial drug résistance. Nature. 406: 775-781
- **Wang L; Huang. Y; Liu. Z; Goodfellow. M & Rodri guez. C. 2006.** Sreptacidiphilus oryzae sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. In. J. Sys. Ev. Microbiol. Vol 56. Pp: 1257-1261.
- **Williams S.T., Wellington E.M.H. (1983).** Ecology of Actinomycetes. In: M. Goodfellow.
- **ZITOUNI A., LAMARI L., BOUDJELALE H., BADJI B., SABAOU N., GAOOUAR A., et al., (2005).** Saccharothrix algeriensis sp. Nov., isolated from a sahara soil. IJSEM

Eau physiologie

Na Cl	9g
Eau distillée	1000ml

Bouillon nutritif (BN)

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

Gélose nutritive (GN)

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

Milieu AF

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	2g
NaCl	2,5 g
CACO3	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Isp2 :

Extrait de malt	10g
Extrait de levure	4g
Glucose	4g
Agar-agar	15g
Eau	1000ml

PH= 7

GYM :

Glucose	4g
Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Ca CO ₃	2g
Agar	12g
Eau	1000ml

PH= 7.2

Sabauroud :

Peptone.....	10 g
Glucose massé.....	20 g
Agar-agar.....	15 g
Eau distillée (qsp).....	1 000 ml

pH = 6,0

La gélose Hektoen :

- protéose-peptone:.....12,0 g
- extrait de levure : facteur de croissance.....3,0 g
- lactose : critère de différenciation.....12,0 g
- saccharose : critère de différenciation.....12,0 g
- salicine : critère de différenciation.....2,0 g
- citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H₂S.....1,5 g
- sels biliaires : inhibiteur.....9,0 g
- fuch sine acide : inhibiteur.....0,1 g
- bleu de bromothymol : indicateur de pH.....0,065 g
- chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique.....5,0 g
- thiosulfate de sodium : précurseur d'H₂S.....5,0 g
- agar.....14,0 g

::pH = 7,6

Chapman :

- Peptone :.....10,0 g
- Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g
- Chlorure de sodium :.....75,0 g
- Mannitol :.....10,0 g
- Rouge de phénol :.....0,025 g
- Agar-agar :.....15,0 g
- Eau distillée :.....qsp 1 Litre

pH = 7,4

les colorant :

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

