



République Algérienne Démocratique et  
Populaire



Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique Université de Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et des sciences de la Nature et de la Vie

Département de : Biologie Appliquée

Domaine : Sciences de la nature et  
de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de MASTER

**Etude de la diversité métabolique et extraction  
des biomolécules produites par des souches  
d'actinomycètes**

Présenté par

*Ktir Mohamed Lamine*

*Toualbia Nada*

*Bacha Dhouha*

Devant le Jury :

*Dr. Menasria.T*

*M.C.B Université de Tébessa*

*Président*

*Dr. Benhadj .M*

*M.C.A Université de Tébessa*

*Promotrice*

*Dr. Ouarna .S*

*M.C.B Université de Tébessa*

*Examinatrice*

*Date de soutenance : 15/06/2022*

*Année universitaire 2021/2022*



République Algérienne Démocratique et  
Populaire



Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique Université de Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et des sciences de la Nature et de la Vie

Département de : Biologie Appliquée

Domaine : Sciences de la nature et  
de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de MASTER

## Etude de la diversité métabolique et extraction des biomolécules produites par des souches d'actinomycètes

Présenté par

*Ktir Mohamed Lamine*

*Toualbia Nada*

*Bacha Dhouha*

Devant le Jury :

*Dr. Menasria.T*

*M.C.B Université de Tébessa*

*Président*

*Dr. Benhadj .M*

*M.C.A Université de Tébessa*

*Promotrice*

*Dr. Ouarna .S*

*M.C.B Université de Tébessa*

*Examinatrice*

*Date de soutenance : 15/06/2022*

*Année universitaire 2021/2022*

## ملخص

الأكتينومييسات قادرة على إنتاج مجموعة متنوعة من المواد المثيرة للاهتمام، بما في ذلك المضادات الحيوية.

هذا العمل هو جزء من هدف دراسة التنوع الأيضي واستخراج الجزئيات الحيوية التي تنتجها سلالات الفطريات الشعاعية، تم اختيار

07 سلالات من الفطريات الشعاعية لدراسة خصائصها المورفولوجية والاستقلابية.

بعد إجراء العديد من الاختبارات الأيضية، قمنا بتمييز قوة التحلل البيولوجي للجزئيات المختلفة بواسطة هذه العزلات المدروسة والتي

لها تواتر ملحوظ من نشاط السليلوز، ونشاط الأميل، وكذلك القدرة على تحلل النشاء، والكازين، والجيلاتين، إلخ.

بالإضافة إلى ذلك، تم إثبات دراسة النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات التي تم الحصول عليها ضد البكتيريا، وتم تقييمها

بطريقة القرص. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن معظم سلالات الفطريات الشعاعية قادرة على إنتاج جزئيات نشطة

بيولوجيًا، والتي تمتلك نشاطًا مثيرًا للبكتيريا ضد المكورات العنقودية الذهبية، والمكورات الدقيقة، والإشريكية القولونية، والسالمونيلا،

والكلبيسيلا، والبكتيريا.

أخيرًا، تشير الاكتشافات الميكروبيولوجية والكيميائية للمضادات الحيوية إلى أن أفضل نظام فصل هو

BAE n-butanol-acetic acid-water و EAE ethanol-motheronia-water ، والجزئيات النشطة

بيولوجيًا من السلالة S158 المستخرجة من البوتانول والإيثانول ، وللسلالة S170 المستخرجة مع الإيثانول

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الشعاعية، الاستخلاص، التنوع الأيضي، الجزئيات النشطة بيولوجيًا، المذيبات

## *Abstract*

Actinomycetes are able to produce a variety of interesting substances, including antibiotics. This work is part of the aim of studying the metabolic diversity and the extraction of biomolecules produced by strains of actinomycetes, 07 strains of actinomycetes were chosen for the study of their morphological and metabolic characteristics.

After various metabolic tests carried out, we have distinguished the power of biodegradation of different molecules by these isolates studied which have remarkable frequency of cellulosic, amyl activity, also the capacity to degrade starch, casein, gelatin, etc.

In addition, the study of the antimicrobial activity of the extracts obtained was demonstrated against 07 bacteria, it was evaluated by the disk method. The results obtained indicate that most strains of Actinomycetes are capable of producing bioactive molecules, of which they possess an interesting antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* sp, *Bacillus*.

Finally, the Microbiological and chemical revelations of antibiotics indicates that the best separation system is BAE n-butanol-acetic acid-water and EAE ethanol-ammonia-water, the bioactive molecules of the strain S158 extracted with Butanol and ethanol, and for strain S170 extracted with ethanol.

**Keywords:** Actinomycetes, *Streptomyces*, metabolic diversity, bioactive molecules, scientists

## Résumé

Les Actinomycètes sont capables à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques.

Ce travail s'inscrit dans le but d'étudier la diversité métabolique et l'extraction des biomolécules produites par des souches d'actinomycètes, 07 souches d'actinomycète ont été choisies pour l'étude de leur caractéristique morphologique et métabolique.

Après différents tests métaboliques réalisés, nous avons distingué une le pouvoir de biodégradation de différentes molécules par ces isolâtes étudié qui possèdent fréquence remarquable d'activité cellulosique, amylique, aussi la capacité de dégrade l'amidon, la caséine, la gélatine...etc.

De plus, l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits obtenus a été mise en évidence envers 07 bactéries, Elle a été évaluée par la méthode des disques. Les résultats obtenus indiquent que la plupart des souches d'Actinomycètes sont capable de produire des molécules bioactives, Dont elles possèdent une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella sp*, *Bacillus*.

En fin la Révélation microbiologiques et chimiques des antibiotiques indique que Le meilleur système de séparation est BAE n-butanol-acide acétique-eau et EAE éthanol-ammoniac-eau, les molécules bioactives de la souche S158 extraites avec le Butanol et l'éthanol, et pour la souche S170 extrait avec l'éthanol.

**Mots clé :** Actinomycètes, Streptomyces, diversité métabolique, molécules bioactives, savants

## *Remerciements*

*On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce projet.*

*Ce travail a été réalisé, au « Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Larbi Tebessi Tébessa ».*

*Tout d'abord ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Dr. BENHADJ Mabrouka**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce travail. « Sincèrement madame, nous ne pouvons que vous exprimons notre respect et notre gratitude, grâce à vos conseils et à votre supervision on est entré dans un nouveau monde de sciences et de savoir ».*

*Merci à tous les membres de jury ; monsieur **Menaseria T.** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury ; Madame **Ouarna S** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*



# *Dédicace*

*Je dédier le fruit de ce travail :*

*À ma Mère*

*À mon Père*

*À mes frères*

*Aux personnes qui m'ont  
toujours aidé et encouragé, qui  
étaient à mes cotes, et qui m'ont  
accompagné durant mon chemin  
d'études, Mes aimables amis,  
Collègues d'étude*



*Mohamed Lamire*

# Dédicace

*Je dédie ce travail de fin d'études à :*

*Mes parents, ceux à qui je dois tant pour leur amour et leur support continu tout le long du cursus de mes études.*

*Ma sœur Nouha et son mari et ses enfants 'Majd Allah' et l'amour de mon cœur 'Warif' et la petite 'Maian'.*

*Ma sœur Chaima, son mari et ses enfants 'Abdelkarim et Ilef'.*

*Mon cher frère 'Dhya-eddine', sa femme et ses enfants 'Adam et Ayham'.*

*Ma grande famille Bacha et Bekakria, surtout ma tante Malika.*

*Mes belles Nada et Roufaïda, Salwa, Radia, Zohor, qui je partageais avec eux les plus beaux moments.*

*Toutes mes amies*

*Toute l'équipe de la microbiologie*

*Tout qui connaisse et aime.*

*Douha*

## Dédicace

*Je dédie ce mémoire :  
A mes très chers parents,*

*Ma mère Wahidati qui a été et est toujours  
mon soutien jusqu'à ce que j'atteigne ce niveau t  
mon père, Azzeddine est ma consolation, ma  
fierté et sera toujours pour moi d'un grand  
réconfort.*

*Que dieu les protège et leur donne la bonne  
santé*

*Mes frères Chames et Amir et ma sœur Doua,  
Je vous souhaite un avenir plein de joie, de  
réussite et de bonheur.*

*Nada*

# TABLE DE MATIERE

الملخص

Abstract

Résumé

Dédicace

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Liste des symboles

Introduction

## Partie bibliographique

### Chapitre 1 : généralité sur les Actinomycètes

1. Historique.....	1
2. Définitions .....	2
3. Classification des actinomycètes .....	2
3.1. Caractéristiques morphologiques.....	2
3.1.1. Caractéristiques macromorphologiques.....	2
3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	3
3.2. Caractères chimio-taxonomiques.....	3
3.2.1. Glucides .....	3
3.2.2. Acides aminés .....	4
3.2.3. Lipides .....	4
3.3. Caractères physiologiques .....	5
3.4. Caractères moléculaires .....	5
3.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S .....	5
3.4.2. Hybridation ADN-ADN .....	5
3.4.3. Pourcentage de guanine-cytosine (G + C).....	5
4. Cycle de développement.....	6
5. Importance des actinobactéries .....	7

5.1. En agronomie .....	7
5.2. En biotechnologie .....	7

## **Chapitre 2 : Pouvoir métabolique des actinomycètes**

1. Métabolisme général des actinomycètes.....	8
1.1. Le métabolisme primaire .....	8
1.2. Le métabolisme secondaire.....	8
2. Les substances bioactives produite par les actinomycètes.....	8
2.1. Les Antibiotiques .....	9
2.2. Les enzymes.....	10
2.2.1. Les cellulases .....	11
2.2.2. Les amylases .....	12
2.2.3. Les xylanases .....	12
2.2.4. Les lipases.....	13
2.2.5. Les pectinases .....	13
2.2.6. Les protéases.....	13
2.2.7. Les dextrinases.....	14
2.2.8. Les chitinases .....	14
2.3. Les vitamines .....	14
2.4. Les pigments .....	15
2.5. La production de siderophore .....	15
2.6. Les bioherbicides .....	15

## **Partie Expérimentale**

1. Objectif de travail.....	17
2. Cadre de l'étude .....	17

3. Matériels utilisés .....	17
3.1. Matériels non-biologique.....	17
3.1.1. Grands matériels.....	17
3.1.2. Petits matériels .....	18
3.2. Matériels biologiques .....	18
3.2.1. Les actinomycètes .....	18
3.2.2. Les germes cibles .....	18
3.3. Les milieux de cultures .....	19
3.4. Les solutions et colorants utilisés.....	19
3.5. Les solvants.....	20
3.6. Les réactifs et autres produits.....	20
4. Méthode de travail : .....	20
4.1 Origine des souches .....	20
4.2. Repiquage et purification des isolats .....	20
4.3. Etude morphologique des souches sélectionnées .....	20
4.3.1. Etude macromorphologique.....	21
4.3.2. Etude Micromorphologiques .....	21
4.3.2.1. Préparation d'état frais .....	21
4.3.2.2. Examen microscopique après coloration de Gram.....	21
4.4. Etude de la diversité métabolique.....	21
4.4.1. Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase.....	21
4.4.2. Hydrolyse de la caséine : recherche de caséine .....	22
4.4.3. Hydrolyse de la gélatine : recherche de la gelatinase .....	22
4.4.4. Action sur le lait écrème .....	22
4.4.5. Teste de dégradation des acides gras : recherche d'estérase.....	22
4.4.6. Dégradation des sels de sodium.....	22
4.4.7. La recherche de Nitrate réductase.....	22
4.4.8. Dégradation de Cellulose : recherche de cellulase.....	23
4.4.9. La recherche de l'activité hémolytique.....	23

4.5. Utilisation de l'API 20E .....	23
4.5.1. Principe .....	24
4.5.2. Mode opératoire galerie Api20E.....	24
4.5.3. Interprétation.....	24
4.6. Extraction des molécules bioactive .....	25
4.7. Recherche de l'activité antibactérienne .....	27
4.7.1. Culture des bactéries teste dans le milieu solide.....	27
4.7.2. Préparation de l'inoculum.....	27
4.7.3. Activités antibactériennes des extraits .....	27
4.7.4. Méthode de disques .....	27
4.8. Révélations microbiologiques et chimiques des antibiotiques. ....	28
4.9. Bioautographie.....	28
4.9.1. Révélations microbiologiques des molécules bioactives.....	28
4.9.2. Révélations chimiques des molécules bioactives.....	29
5. Résultats et discussion .....	30
1. Repiquage et purification de isolâtes .....	30
2. Identification des souches sélectionne .....	32
2.1. Etude macromorphologique.....	32
2.2. Etude micromorphologiques.....	35
3. Etude de la biodiversité métabolique.....	38
3.1. Résultats d'Hydrolyse de l'amidon.....	38
3.2. Résultats d'hydrolyse de la caséine .....	38
3.3. Résultats d'hydrolyse de la gélatine .....	38
3.4. Résultats de test de l'action sur le lait écrémé .....	38
3.5. Résultats de Test de dégradation des acides gras .....	39
3.6. Résultats de test de dégradation des sels de sodium.....	39
3.7. Résultats de test de production de Nitrate réductase .....	39

3.8. Résultat de test de dégradation de cellulose .....	39
3.9. Résultats de l'activité hémolytique.....	39
4. Recherche de l'activité antibactérienne .....	45
4.1. Préparation des extraits .....	45
4.2. Activité antibactérienne des extraits.....	47
4.3. Chromatographie analytique sur couche mince.....	60
4.3.1. Révélation microbiologiques : bioautographies.....	64
4.3.2. Détection des molécules bioactives par révélation chimique.....	66

Conclusion

Référence bibliographique

Les annexe

## LISTE DES TABLEAUX

N	Titre de Tableau	Page
01	Types des glucides caractéristiques présents chez des actinomycètes	04
02	Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les <i>Actinobacteria</i>	04
03	Importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyce</i>	08
04	Les codes des souches d'actinomycètes	18
05	Les germes cibles	19
06	Les différents types d'hémolyse	23
07	Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 07 isolats	28
08	Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 07 isolats	31
09	Résultat des caractères micromorphologiques de quelques isolats	34
10	Résultats de tests de la biodiversité métabolique des 07 isolats	38
11	Résultat de l'Api 20E pour les enzymes produites par les 07 isolats	39
12	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S368 extrait avec différents solvants et contre différentes souche cibles	45
13	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S316 extrait avec différents solvants et contre différentes souche cibles	46
14	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S170 extrait avec différents solvants et contre différentes souches es cible	47
15	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S97 extrait avec différents solvants	48
16	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans l'ISP1 extrait avec différents solvants	49
17	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le Bennet extrait avec différents solvants.	50
18	Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le GYEA extrait avec différents solvants	51
19	Les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie	62
20	Les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie	62
21	Les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie	63
22	Les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie	63
23	Les Rf des taches actives par bioautographie	65

## LISTE DES FIGURES

N	Titre de Figure	Page
01	Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant	06
02	Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes	09
03	Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases	12
04	Catabolisme des triglycérides	13
05	Protocole d'extraction des molécules bioactive	26
06	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la Souche S368 extrait avec déférentes solvants	52
07	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la Souche S316 extrait avec déférentes solvants	53
08	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la Souche S170 extrait avec déférentes solvants	54
09	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la Souche S97 extrait avec déférentes solvants	55
09	Localisation par bioautographie des activités des meilleurs extraits testés contre les germes cibles (système <b>BAE</b> ).	64
10	Localisation par bioautographie des activités des meilleurs extraits testés contre les germes cibles (système <b>EAE</b> ).	65
11	Détection des molécules bioactives par révélation chimique avec les trois révélateurs	66

## LISTE DES PLANCHES

N	Titre de planche	Page
01	Photos représentant les caractères culturels de quelques isolats sur le milieu ISP2	29
02	L'observation sous loupe binoculaires de 07 isolats ensemencé par touche sur le milieu ISP2	32
03	Photo des résultats de l'Observations microscopiques d'état frais de quelques isolats	33
04	Photos des résultats de l'Observations microscopiques après coloration de Gram	35
05	Photos des résultats des différentes tests métaboliques	40
06	Photos des résultats de systèmes API 20E des souches représentatives	43
07	Photos de quelque extraites avant l'évaporation	44
08	Quelques photos des résultats d'activité antibactérienne	54
09	Quelques photos des résultats nulle de l'extraction antibactérienne des souches S299, S257.	59
10	Résultat de chromatographie des extraits organiques sur couche mince de S158 ; S170 ; S368 dans les 4 systèmes.	61

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARNr 16 S** : acide ribonucléique ribosomique 16 S

**C°** : degré Celsius

**GC°/°** : Pourcentage de Guanine Cytosine

**G+C** : Coefficient de Chargaff.

**GYEA** : Gélose Yeast extracts Agar.

**ISP** : International Streptomyces Project.

**J** : jour

**LB** : Lauro-Bertani.

**MA** : mycélium aérien.

**MH** : Mueller Hinton

**Mm** : millimètre.

**MS** : Mycélium de substrat.

**Pb** : paire de base

**PCR** : Réaction de Polymérase en Chaîne

**S** : souche

**BT** : bactérie

**CCM** : chromatographie sur couche mince

# *Introduction*

## **Introduction**

Depuis des milliers d'années, les êtres humains utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer plusieurs produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes omniprésents dans notre environnement et dans certains aliments que nous consommons ne cessent d'occuper une place importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**). Parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique, les actinomycètes ou bien les actinobactéries.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses qui peuvent prospérer sur divers substrats et coloniser presque tous les environnements, même ceux qui ne sont pas propices à la vie. Ils sont la principale source de la plupart des métabolites secondaires antibactériens (**Boussaber et al., 2012**). Les actinomycètes sont connus pour leur puissante capacité à produire des antibiotiques, dont plus de 70 % des substances actives proviennent de micro-organismes (**Omura, 1992**). Ils sont largement distribués dans les milieux naturels et synthétiques et jouent un rôle important dans la dégradation des substances organiques (**Naikpatil et Rathod, 2011**).

Grâce à la production d'enzymes extracellulaires, les actinomycètes peuvent métaboliser de nombreux composés divers, notamment des polysaccharides, des alcools, des acides aminés et des composés aromatiques (**Kitouni et al., 2005**). La capacité de décomposer les pesticides, les herbicides et les hydrocarbures a également été signalée. Cette diversité métabolique est due à leur large génome excréteur qui contient des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes permettant de répondre à leurs besoins. (**Boucheffa, 2011**). Les bactéries de la famille des actinomycètes sont désormais à l'honneur et apparaissent comme de bons candidats pour la production de substances intéressantes, notamment d'antibiotiques (**Boughachiche, 2012**). On estime que les deux tiers des quelque 6 000 antibiotiques isolés à ce jour sont produits par des actinomycètes. Salman et Waksman ont montré l'abondance des actinomycètes dans cette zone et sont essentiellement isolés des premiers antibiotiques utiles. Streptomycine (1944), antibactérien, notamment antituberculeux ; néomycine (1949) et candicidine (1953), agents antifongiques aux propriétés pharmacologiques intéressantes comme ligands stéroïdes (**Djaballah, 2010**).

Partant de ce constat, cette étude a été la première à rechercher des molécules bioactives de différents souches d'actinomycètes et la seconde à extraire et caractériser ces biomolécules et enfin à examiner la diversité métabolique des souches à activité antibactérienne.

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie, (Département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Tébessa).

L'étude a portée sur les étapes suivantes :

- L'étude de la diversité métabolique par la mise en évidence de la production des différents types d'enzymes, et essentiellement leur activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries-tests.
- Dans une deuxième étape, nous nous sommes concentrés sur la production et l'extraction des molécules bioactives des souches actives

# *Partie 1*

## *Revue bibliographique*

## 1. Historique

D'après Waksman (1961), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875 et en 1878, Harz, nomma *Actinomyces bovis*, un organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin, (**Garrity et al., 2007**).

Waksman classe l'histoire des actinomycètes en quatre catégories de base :

La première période qui va de 1877 à 1890 environ, a été nommée « Période médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (**Baldacci, 1962**).

La seconde période (1900-1940) (**Mariat et Sebald, 1990**) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de Rossi-Doria (1890- 91), Gasparini (1891-94), Krainsky (1914), Waksman (1919), Lieske (1921), Orskov (1925), Jensen (1931-33) et Krassinikov (1938). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Waksman lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Trujillo et al., 1997**). Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites (**Baldacci, 1962**). Ainsi, la quatrième période (1940-1970) est caractérisée par le développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des Actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries et de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques.

Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood (**Hopwood, 1973 ; Chater, 1999**) puis de génomique (**Hopwood, 2003**) a révolutionné la classification des espèces (**Ventura et al., 2007**) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires (**Donadio et al., 2002**) et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

## 2. Définitions

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses qui peuvent prospérer sur divers substrats et coloniser presque tous les environnements, même ceux qui ne sont pas propices à la vie. Ils sont la principale source de la plupart des métabolites secondaires antibactériens (**Boussaber et al., 2012**). Les actinomycètes sont connus pour leur puissante capacité à produire des antibiotiques, dont plus de 70 % des substances actives proviennent de micro-organismes (**Omura, 1992**). Ils sont largement distribués dans les milieux naturels et synthétiques et jouent un rôle important dans la dégradation des substances organiques (**Naikpatil & Rathod, 2011**).

Les actinomycètes sont un autre nom pour les actinobactéries. Les bactéries Gram-positives capables de produire des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés non fragmentés ou fragmentés. Leur développement a abouti à des colonies circulaires constituées de filaments qui s'étendent vers l'extérieur du germe qui les a engendrés par croissance centrifuge. Ceci explique leur dénomination « actinomycètes » du Grec « *aktino, mycetes* » ou « champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants ». Les actinobactéries étaient classées dans l'ordre des *Actinomycetales*. Du fait de leur forme fongicoïde (filaments ramifiés, organes de sporulation...) et de l'aspect mycosique des maladies qu'ils provoquent, certains membres de ces micro-organismes, notamment les aérobies, ont longtemps été rejetés par toutes les bactéries et confondus avec des champignons. Ce problème est résolu et ce groupe demicroorganismes est définitivement classé parmi les bactéries et ont un pourcentage de guaninecytosine (G+ C%) supérieur à 55% (**Saker, 2015**).

## 3. Classification des actinomycètes

La classification des actinomycètes est basée sur plusieurs caractères :

### 3.1. Caractéristiques morphologiques

Les critères morphologiques sont énoncés dans trois éditions du "Bergey's Manual" de 1989, 1994 et 2010. Ce sont respectivement des propriétés macromorphologiques et micromorphologiques.

#### 3.1.1. Caractéristiques macromorphologiques

L'ensemble des caractères culturels ou en d'autres termes, les caractères observables à l'œil nu, contribuent parfois à différencier les groupes d'actinomycètes entre eux. Il s'agit de :

- Production ou non d'un mycélium aérien (MA).
- Présence d'un mycélium du substrat (MS).

- La couleur de MA et MS, ainsi que les pigments diffusibles dans les milieux de culture, sont tous déterminés.

### 3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Il s'agit d'une observation microscopique des cultures sur milieu gélosé.

Les caractéristiques étudiées sont :

- Fragmentation ou non du MS.
- La présence de sporanges sur le MA ou le MS, leur forme et leur taille, ainsi que la longueur des sporangiophores sont autant de facteurs à considérer.
- La forme, la taille et la disposition des spores sur MA et/ou MS : seules, par paires, par quatre ou en chaînes.
- Mode de sporulation : spores portées par des sporophores ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en spores.
- Présence de spores mobiles ou non mobiles.
- Ornementation de la surface des spores (lisse rugueuses, épineuses ou chevelues).
- Formation de structures particulières : faux sporanges, etc.

### 3.2. Caractères chimio-taxonomiques

D'après **Goodfellow & Minnikin, 1985**, la chimiotaxonomie consiste en l'utilisation des caractères chimiques dans la classification des organismes. Ces caractères ont été surtout étudiés au niveau des parois cellulaires. En effet, Les caractéristiques morphologiques de la classification classique sont déterminées par la composition des composants chimiques des micro-organismes. (**O'Donnell, 1988**).

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimio taxonomie(**Merouane, 2016**).

#### 3.2.1. Glucides

La séparation des glucides de la paroi cellulaire en quatre catégories principales est possible. 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*. *Streptomyces* et les genres apparentés ne produisent pas de glucose en quantité significative (spectre C). Il en va de même pour les genres *Thermomonospora* et *Thermoactinomyces*. Les *actinoplanes* et le genre *Micromonospora* se distinguent par la présence de xylose et d'arabinose (spectre D).

**Tableau 01:** Types des glucides caractéristiques présents chez des actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Type de glucide	Genres
Arabinose + galactose,	<i>Nocardia, Actinopolyspora, Prauserella</i>
Madurose	<i>Actinomadura, Streptosporangium</i>
Pas de sucres caractéristiques	<i>Nocardiopsis</i>
Arabinose + xylose	<i>Micromonospora, Actinoplanes</i>

### 3.2.2. Acides aminés

La paroi cellulaire des actinomycètes sont constituées de l'un des deux matériaux suivants :

- L'espèce *Actinomyces* est un exemple de paroi glycoprotéique contenant de la lysine trouvée dans les formes fermentaires, occupants naturels des cavités humaines et animales.
- Ce type de paroi est observé dans les formes oxydatives que l'on trouve principalement dans le sol, comme *Streptomyces*, et contient généralement de l'acide diaminopimélique LL-2,6 (DAP). *Streptomyces* et *Actinoplanes* contiennent tous deux des quantités substantielles de glycine. (Breton et al., 1989).

### 3.2.3. Lipides

La teneur en lipides pariétaux et membranaires des actinomycètes est également un élément clé de leur classification. Ce sont des lipides insaturés avec une structure compliquée Les phospholipides, ménaquinones, acides gras et acides mycoliques. L'analyse des phospholipides a permis de distinguer cinq profils de phospholipides désignés de PI à PV caractérisé par la présence d'un ou deux phospholipides caractéristiques (Bouaziz, 2018).

**Tableau 02 :** Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les *Actinobacteria*(Selon Lechevalier et al., 1977).

Type de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemple
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces, Pseudonocardia</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiopsis, Amycolatopsis</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Nocardia, Nonomuraea</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i>

PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine ; PG : phospholipides contenant de la glucosamine ; PGI : phosphatidylglycérol ; + : présent ; - : absent ; v : variable selon les genres et les espèces. Le Phosphatidylinositol PI est présent chez toutes les actinobactéries

### 3.3. Caractères physiologiques

Les espèces sont également déterminées en fonction de Caractéristiques physiologiques. Ceux-ci incluent différents tests de dégradation Glucides, composés lipidiques et protéiques, polymères complexes, stéroïdes, etc. D'autres tests impliquent parfois la détermination d'espèces, comme la résistance à différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents) et la résistance aux agents chimiques. Conditions extrêmes (température, pH, salinité, .....etc) (**Boudjelal-Bencheikh, 2012**).

### 3.4. Caractères moléculaires

Le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN et la mesure de la proportion de G + C sont les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes pour la classification des espèces. Cette dernière n'est nécessaire que lors d'une proposition de développement de nouveaux genres. La phylogénie complète des actinomycètes a été tracée grâce à ces critères(**Stackebrandt & Woese, 1981; Stackebrandt et al., 1997; Kämpfer, 2010**).

#### 3.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S est une technique fiable pour l'identification des actinomycètes (**Cook & Meyers, 2003; Weisburg et al., 1991**). Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique de taille 1500 paires de bases, présent dans toutes les bactéries, sa séquence est spécifique à chaque espèce, et dont les extrémités 5' et 3' (les 15 premières et 15 dernières bases) est une espèces bactériennes conservées dans toutes les bactéries. Le gène a été amplifié par la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR).

#### 3.4.2. Hybridation ADN-ADN

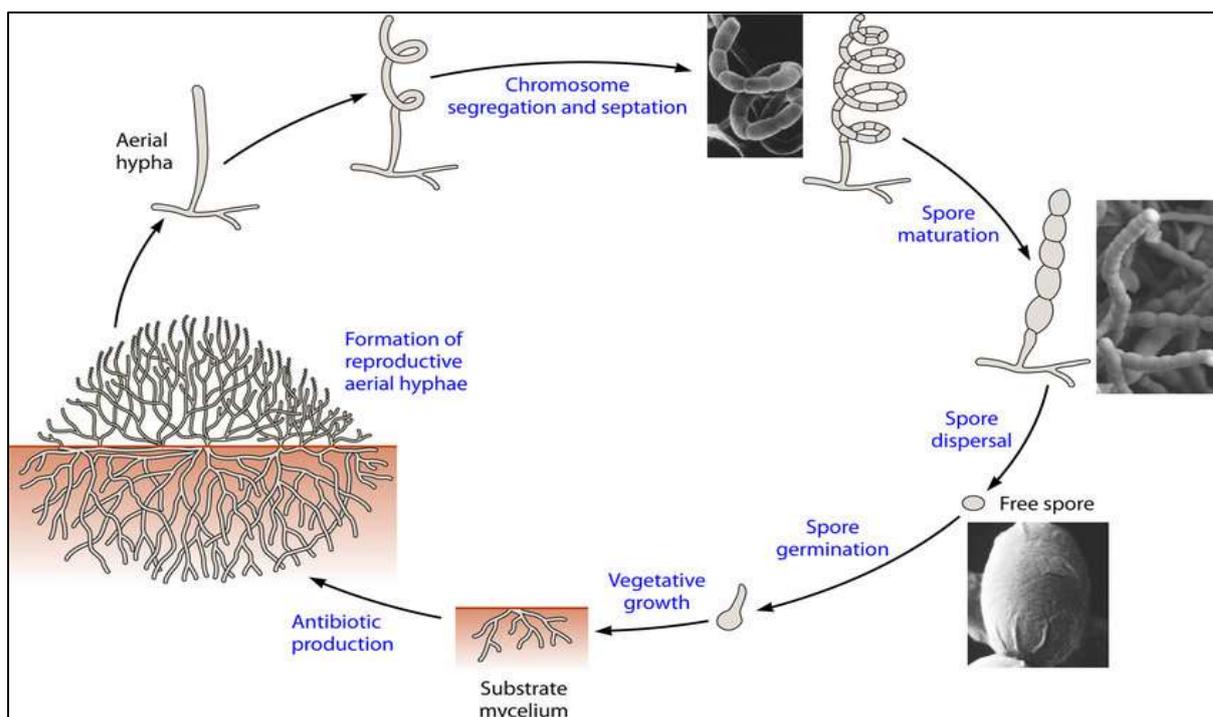
L'hybridation moléculaire ADN-ADN est définitivement utilisée pour l'identification par rapport aux espèces déjà décrites. Sa réalisation n'est qu'en Découverte de la renaturation de l'ADN (**Marmur et Doty, 1962**). Ils sont considérés comme différents s'ils ont un taux de similarité (le taux de recombinaison de leurs chaînes) ADN) moins de 70 % (**Wayne et al., 1987**).

### 3.4.3. Pourcentage de guanine-cytosine (G + C)

La détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage G + C) qui nous a permis de reconnaître la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage G + C supérieur à 55 % comme l'un des caractères importants non seulement dans la reconnaissance de genres mais aussi dans la reconnaissance des familles d'actinomycètes (qui commencent à être bien définies). Cela a permis aux scientifiques de distinguer les *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, et autres bactéries Gram+ (G+C moins de 55%) des actinomycètes. D'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* ou encore *Micrococcus* sont également considérées comme faisant partie de l'arbre phylogénétique des actinomycètes. (Goodfellow, 1989; Stackebrandt et al., 1981).

### 4. Cycle de développement

Les actinomycètes ont un cycle de vie compliqué qui régit leur développement. La plupart des actinomycètes développent un tapis épais d'hyphes en produisant un réseau d'hyphes septés et ramifiés à la surface ainsi qu'à l'intérieur du substrat (mycélium végétatif ou substrat). Les hyphes végétatifs de nombreux actinomycètes montent vers le haut pour produire un mycélium aérien, donnant aux colonies un aspect floconneux. Le mycélium aérien, en général, crée des chaînes de spores par septation. Ils sont réintroduits dans la nature une fois qu'ils ont atteint l'âge adulte (exospores). Nous pouvons appeler les spores sporangiospores contenues dans un sporange. Les morphologies de ces spores peuvent être assez diverses (Prescott et al., 2018).



**Figure 01** : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulant (Barka et al., 2016).

## 5. Importance des actinobactéries

Les actinobactéries sont les microorganismes les plus recherchés pour leur capacité de produire beaucoup de métabolites primaires et secondaires (Barakate et al., 2002). En plus de leur rôle dans la décomposition de la matière organique (Hoster et al., 2005). Ils sont connus pour leur production de substances biologiquement actives telles que les phytohormones (El-Mehalawy et al., 2004), les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (Boer et al., 2005) et des composés antifongiques. Ces derniers sont également impliqués dans le contrôle phytopathologique. Le phosphore peut être solubilisé par certaines espèces. (Crawford et al., 1993).

### 5.1. En agronomie

Les actinomycètes sont capables de décomposer les résidus de matières organiques réfractaires tels que la lignocellulose, la chitine et d'autres résidus de matières organiques récalcitrantes, et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow et Williams, 1983). *Frankia* est un actinomycète unique qui fixe l'azote de l'atmosphère et se développe en association avec de nombreuses plantes arbustives non légumineuses (Becking, 1974). Les souches de cette espèce ont une grande capacité à générer une variété de composés probiotiques, ce qui les rend importants dans les interactions plante-sol. En conséquence, ils sont suggérés

dans la lutte biologique contre les maladies des plantes, telles que *Streptomyces griseoviridis* et le fongicide *mycostop*, qui est utilisé pour lutter contre les maladies à *Fusarium* sur le concombre, la tomate, le poivron et les plantes ornementales cultivées en serre. Certains antibiotiques sont particulièrement formulés pour le secteur agricole. La blasticidine est un antibiotique utilisé au Japon pour traiter *Piricularia oryzae*, une infection du riz (Arimoto et al., 1982). Les actinomycètes sont reconnus pour produire des antibiotiques qui suppriment les infections des plantes.(Emmert & Handelsman, 1999;Barakate et al., 2002; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006; Toumatia, 2010).

## 5.2. En biotechnologie

Les actinomycètes présentent une large gamme d'hétérogénéités biochimiques et la capacité de produire des métabolites secondaires qui intéressent les industries pharmaceutiques et alimentaires (Abbas, 2006). C'est la source la plus importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires bioactifs (Arasu et al., 2009), et certaines espèces d'actinomycètes produisent jusqu'à 75 à 80 % des antibiotiques (Mellouli et al., 2003). En conséquence, divers métabolites synthétiques, tels que des enzymes alcalines, des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs, des herbicides, des insecticides et des antiparasitaires, sont créés. (Li et al., 2005).

**Tableau 03** : Importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (Djinni, 2009).

Organisme ou maladie ciblée	Antibiotiques	Organisme producteur
Typhoïde	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Tuberculose et Lèpre	Rifampicine	<i>Amycolatopsis (Streptomyces mediteranei)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> méthicilline résistant (SARM)	Vancomycine	<i>Amycolatopsis (Streptomyce sorientalis)</i>
Cancer	Daunomycine	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Pathogènes résistants à la pénicilline	Acide clavulanique	<i>Streptomyces clavuligerus</i>



## **Pouvoir métabolique des actinomycètes**

### **1. Métabolisme général des actinomycètes**

Les actinomycètes sont des bactéries chimioorganotrophes qui consomment une gamme variée de sources de carbone et d'énergie, y compris des biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Cependant, de nombreuses espèces peuvent se développer de manière chimio-autotrophe en utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le dioxyde de carbone comme source de carbone (**Mariat & Sebald, 1990**).

De nombreux métabolites de différents types sont créés au cours du cycle de développement bactérien, selon la phase de croissance, pour être utilisés dans la biosynthèse du matériel cellulaire ou en réaction aux changements des conditions environnementales. Les métabolites primaires et les métabolites secondaires sont les deux types de métabolites (**Bell et al., 1998**).

#### **1.1. Le métabolisme primaire**

Les événements cataboliques et anaboliques permettent la création de biomasse dans le métabolisme primaire. Ces réactions créent un pouvoir et une énergie réducteurs, qui sont utilisés pour construire et assembler des monomères (tels que des acides aminés) en macromolécules (telles que des protéines) (**Strub, 2008**).

Les actinomycètes ont un métabolisme de base comparable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux importants contribuent au fonctionnement du métabolisme général en formant la structure cellulaire (**Leveau & Bouix, 1993**).

#### **1.2. Le métabolisme secondaire**

Le métabolisme secondaire est une série de processus qui permet la production de minuscules composés non essentiels qui peuvent fournir un avantage sélectif dans certaines circonstances. Le métabolisme secondaire s'oppose au métabolisme principal, qui contient toutes les voies cataboliques et anaboliques nécessaires à la survie et à la reproduction de la cellule. Il existe de nombreux types différents de métabolites secondaires, chacun ayant une structure chimique unique et une vaste gamme d'activités biologiques (**Haas, 2015**).

Les actinomycètes sont considérés comme la source la plus efficace de métabolites secondaires, d'antibiotiques et d'autres substances bioactives (**Janardhan et al., 2014**).

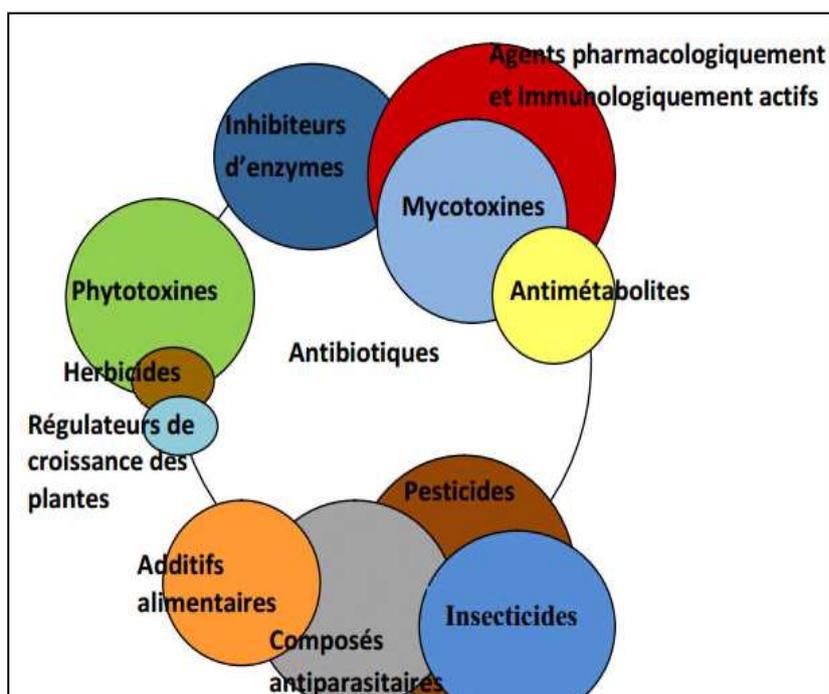
### **2. Les substances bioactives produites par les actinomycètes**

Les métabolites bioactifs sont des produits du métabolisme primaire et métabolisme secondaire de différents organismes (plantes, animaux, champignons, bactéries) (**Solecka et al., 2012**).

Les actinomycètes sont connus par leur production de substances biologiquement actives telles que les antibiotiques, les vitamines, les enzymes et les pigments. Certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore, d'autres sont impliquées aussi, dans le control phytopathologique et dans la production des composés antifongiques (Ghribi, 2019).

En effet, les actinomycètes produisent 47 % des molécules bioactives issues de microorganismes, découvertes entre 1940 et 2010 parmi lesquelles 24 % sont issues d'actinomycètes rares (Bérdy, 2012).

Deux des propriétés les plus significatives des Actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs. En effet, la streptomycine a été le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces* (Ramanarivo, 2017).



**Figure 02 :** Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

### 2.1. Les Antibiotiques

Etymologiquement, le terme « antibiotique » est dérivé des mots grec « anti » qui veut dire contre et « bio » qui signifie la vie, c'est à dire, « contre la vie ». Un antibiotique est une substance qui peut être naturelle, synthétique ou semi-synthétique inhibant ou tuant les germes

pathogènes à faible concentration(Demain, 1999;Barka et al., 2016; Mohammadipanah & Wink, 2016).

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire. (Ravi, 2015).

Ils constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinomycètes, ces molécules d'origine naturelle manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale, ou antiparasitaire(Kumar et Jadeja, 2016).

Les premiers antibiotiques découverts étaient l'actinomycine de *Streptomyces antibioticus* en 1940, streptothricine de *Streptomyces lavendulae* en 1942 et la streptomycine de *Streptomyces griseus* en 1944, qui ont tous été découverts par Waksman et ses collègues (Barka et al., 2016).

Selon Berdy (2005), les antibiotiques des actinomycètes peuvent être classés en groupes chimiques à savoir :

- Les aminoglycosides (streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine) ;
- Les macrolides (érythromycine)
- Les ansamycines (rifamycine)
- Les bêta-lactames (thiénamycine)
- Les peptides (viomycine, thiostrepton, actinomycine, pristinamycine)
- Les tétracyclines (chlortétracycline, oxytétracycline)
- Les nucléosides (puromycine)
- Les polyènes (nystatine, candicidine, amphotéricine B)
- Les polyéthers (monensine)

La capacité de production individuelle des actinobactéries peut varier énormément. Certaines espèces de *Streptomyces* produisent un seul antibiotique, tandis que d'autres produisent une gamme de différents composés.

## 2.2. Les enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs de nature protéique qui exercent une activité catalytique spécifique d'un très grand nombre de réactions chimique, et sont après les antibiotiques les plus importants produits des actinomycètes (Navarre et Françoise, 2010). Les principaux facteurs qui contrôlent la fonction des enzymes dans un milieu sont la température, le pH, la salinité et l'activité de l'eau ...etc. (Pierre, 2000).

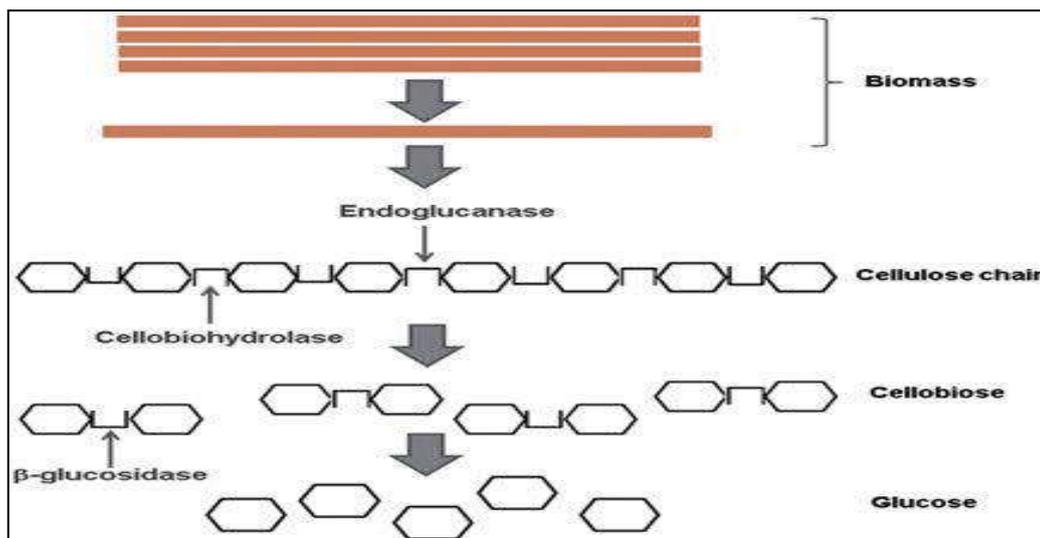
Les actinomycètes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter des molécules complexes à l'intérieur de leurs cytoplasmes. Ils synthétisent des enzymes extracellulaires pour décomposer ces molécules en nutriments utiles et essentiels. Ces sources de substances bioactives possèdent une capacité hydrolytique extracellulaire importante, qui trouve des applications dans les industries, de textile, des bio-raffineries, d'agroalimentaires, papèteries et pharmaceutiques(Janaki, 2017).

### 2.2.1. Les cellulases

La cellulase est un complexe enzymatique qui décompose la cellulose en  $\beta$ -glucose. Elle est largement répandue dans la biosphère notamment chez les organismes fongiques et microbiens (Ghribi, 2019). Les actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, excrètent des enzymes qui dégradent la cellulose ; d'autres produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (Saci, 2012).

Les cellulases microbiennes ont une large gamme d'applications en biotechnologie, dans l'environnement et dans les processus industriels. Lors des processus industriels difficiles, les bactéries thermophiles constituent une bonne source de cellulase industrielle. C'est le cas par exemple de désencrage du papier, le ramollissement de tissu, de la pâte et de papier, le biopollissage des tissus, du jus et des aliments pour animaux.... Etc. (Sahoo et al., 2019).

D'après Tanveer et al., (2014); Rajeeva et Soni, (2015); et Jasani et al., (2016), Les cellulases sont des enzymes qui convertissent la cellulose en glucose et d'autres produits chimiques de base. Il existe trois grands types d'enzymes de cellulase qui agissent en synergie: les Endoglucanases, les Exoglucanases,  $\beta$ -glucosidase(Zhang et Zhang, 2013).



**Figure 03** : Hydrolyse de la cellulose par les trois types de cellulases (Jasani et al., 2016).

### 2.2.2. Les amylases

Les amylases sont des macromolécules de protéines globulaires de type endoglycanase appartenant à la classe des hydrolases, qui agissent sur la liaison (1,4) de l'amidon. Ils catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et divers oligosaccharides de longueurs variables. L'amylase est l'une des enzymes les plus importantes de la biotechnologie actuelle (Gupta et al., 2003). Ces enzymes industrielles jouent un rôle important dans la décomposition de l'amidon, représentant environ 25 à 33 % du marché mondial en 2007 (Saxena et al., 2007).

### 2.2.3. Les xylanases

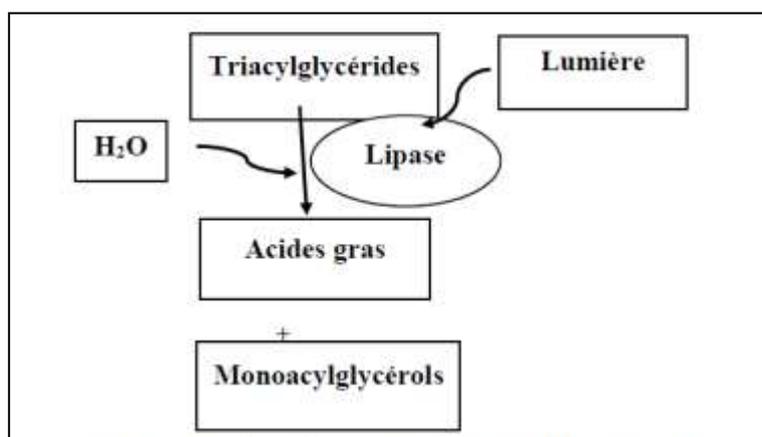
Les xylanases constituent un complexe multi-enzymatique, ce sont des glycosidases qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes afin de donner la xylose (Larreta-Garde, 1997; Georis et al., 2000).

Les xylanases sont utilisées dans la biotransformation des textiles et la fabrication des aliments pour animaux (exemple des producteurs : *Streptomyces* sp. Et *Actinomyces* sp.) (El-Sersy et al., 2010; Mehnaz et al., 2017).

Il existe de nombreux domaines dans lesquels est utilisée la xylanase, telle la gestion des déchets, l'industrie des pâtes et papiers, les textiles, la production de biocarburants et produits chimiques ainsi qu'en alimentation humaine et animale (Dickner-Ouellet, 2018).

#### 2.2.4. Les lipases

Les lipases ou les triacylglycérol-hydrolases sont des enzymes exceptionnels vu leurs mécanismes d'action et leurs spécificités de substrats. Selon la réaction à catalyser, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (Mehnaz et al., 2017). Les lipases sont produites à partir d'une variété d'actinomycètes (Taibi et al., 2012).



**Figure 04 :** Catabolisme des triglycérides (Mehnaz et al., 2017).

Ils sont couramment utilisés en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et dans le traitement des sols contaminés par des hydrocarbures comme celles produites par *Streptomycesexfoliâtes* et *Nocardiosis alba*(El-Sersy et al., 2010; Mehnaz et al., 2017).

#### 2.2.5. Les pectinases

La production d'enzymes pectinolytiques est réalisée par des actinomycètes de différents genres, tels que *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (Sanglier et al., 1993). La dégradation complète de la pectine est entraînée par l'action combinée de trois activités pectinolytiques (pectine lyase, pectine estérase, polygalacturonase).

#### 2.2.6. Les protéases

Les protéases microbiennes sont une famille d'enzymes qui a été largement étudiée et utilisée dans les opérations industrielles. On les trouve généralement dans les détergents à lessive, la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques et le tannage du cuir, ainsi que dans la gestion des déchets.(Amoozegar et al., 2008; Karbalaei-Heidari et al., 2009).

D'autres genres d'actinomycètes qui peuvent produire des kératinases comprennent *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planomonospora* et *Planobispora*. Les protéases alcalines thermostables sont produites par des espèces thermophiles du genre *Micropolyspora*, et d'autres protéases résistantes à la majorité des insecticides protéasiques sont isolées du genre *Oerskovia*. Plusieurs souches d'actinomycètes de 14 espèces différentes ont créé des élastinases. (Chitte et al., 1999).

### 2.2.7. Les dextrinases

Elles sont excrétées par de nombreuses souches d'*Oerskovia xanthineolytica* et *Actinomyces israeli* (Demain & Solomon, 1985).

### 2.2.8. Les chitinases

Les chitinases sont un autre groupe d'enzymes d'importance industrielle qui ont la capacité d'hydrolyser la chitine. De nombreuses souches d'actinomycètes telles que *Streptomyces thermoviolaceus* et *Microbispora sp.*, sont connus comme producteurs de chitinases. La chitinase de ces souches a été utilisée pour récupérer le chitibiose, un antioxydant potentiel qui a généralement des applications en biomédical et en industrie alimentaire (Mehnaz et al., 2017).

Les chitinases utilisées dans la protection contre les champignons phyto-pathogènes et dans le traitement des déchets des crustacés. Elles sont généralement produites par *Streptomyces thermoviolaceus* et *Nocardiopsis prasina* (Tsuji et al., 1993).

## 2.3. Les vitamines

Les bactéries et les actinobactéries peuvent synthétiser la vitamine B12 à l'état naturel. La séparation de la vitamine B12 des fermentations d'actinobactéries a suscité beaucoup d'intérêt pour la possibilité de fermentations microbiennes produisant des vitamines (Lichtman et al., 1949; Rickes et al., 1948).

L'ajout de sulfates de cobalt dans l'environnement semble être un précurseur de la production de vitamine B12 par toutes les actinobactéries. Le cobalt étant un agent bactériostatique assez efficace, il doit être utilisé avec prudence. Si le milieu contient suffisamment de cobalt, les fermentations qui produisent les antibiotiques streptomycine, auréomycine, griséine et néomycine produiront également de la vitamine B12, sans affecter les rendements antibactériens. Plusieurs études ont suggéré que certaines actinobactéries qui ne produisent pas d'antibiotiques synthétisent plus de vitamine. Il a également été découvert que les

actinobactéries produisent d'autres vitamines hydrosolubles, comme la thiamine et un dérivé de l'acide ptéroylglutamique, qui favorise la croissance de certaines souches de *Leuconostoc citrovorum* et de la coenzyme A. (Anandan et al., 2016).

#### 2.4. Les pigments

Les actinobactéries produisent une variété de couleurs sur des surfaces naturelles ou synthétiques, et ces pigments sont l'un des traits culturels les plus importants dans la description des organismes. Les actinobactéries bénéficient des changements phénotypiques générés par les facteurs environnementaux car elles ont des colonies morphologiquement distinctes et produisent une variété de couleurs et de filaments appelés hyphes aériens (Goodfellow et al., 2012).

#### 2.5. La production de siderophore

Le fer est le microélément le plus essentiel utilisé par les bactéries, et il sert de cofacteur pour une variété d'enzymes et de protéines (Rachid & Ahmed, 2005). Parce que cet élément est répandu dans la nature sous des formes insolubles que les plantes et les bactéries ne peuvent pas absorber, les bactéries et les champignons ont développé une variété de systèmes de chélation du fer, dont le plus courant utilise les sidérophores (Pérez-Miranda et al., 2007). Par l'intermédiaire de récepteurs particuliers, ils solubilisent et transfèrent le fer à la cellule microbienne (Cabrera et al., 2001).

#### 2.6. Les bioherbicides

Une autre application intéressante est l'utilisation de métabolites secondaires d'actinomycètes comme herbicides. Les herbimycines sont produits par *Streptomyces saganonensis* et sont utilisés pour supprimer les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. L'anisomycine est un type d'inhibiteur de croissance généré par *Streptomyces sp.* Pour les mauvaises herbes herbacées annuelles comme la digitale sanguine et les mauvaises herbes à feuilles larges. L'anisomycine peut empêcher les plantes de synthétiser la chlorophylle. Bialaphos, un métabolite de *Streptomyces viridochromogenes*, est également couramment utilisé pour contrôler les mauvaises herbes herbacées annuelles et vivaces ainsi que les mauvaises herbes à feuilles larges en bloquant la production de glutamine. La coformycine et l'hydantocidine carbocycliques produites par les espèces de *S. hygrosopicus* peuvent inhiber la synthèse de l'aclénylosuccinate en augmentant la teneur en ATP et en restreignant la synthèse (Pillmoor, 1998).

# *Partie Expérimentale*

## 1. Objectif de travail

Les actinobactéries, une famille de bactéries s'est particulièrement illustrée par la richesse de son métabolisme secondaire et par la remarquable diversité des métabolites produits (**Overbye et Barret 2005**), ils sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde. Le genre *Streptomyces*, qui secrète plus de 80% de ces molécules, est très intéressamment exploité. (**Watve et al., 2001**).

Les travaux actuels sont orientés en partie vers l'étude de la diversité métabolique des souches d'Actinomycètes, ces souches ont été soumis un ensemble des tests pour détermine les différents caractères métaboliques.

Et l'autre partie pour l'extraction de molécules bioactives à partir des milieux solides avec des solvants organiques de polarité différentes et les résultats de l'extraction sont vérifiée par la méthode du disque.

En fin, nous avons terminé notre travail par révélation primaires des molécules active par chromatographie sur couche mince par quatre systèmes de migration (**AM, ME, BAE, EAE**) et bio autographie par deux systèmes de solvants de migration (**EAE et BAE**).

## 2. Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de microbiologie, département de biologie appliquée, faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie de l'université Larbi Tébessi –Tébessa.

## 3. Matériels utilisés

### 3.1. Matériels non-biologique

#### 3.1.1. Grands matériels

- ❖ Autoclave
- ❖ Agitateur
- ❖ Balance
- ❖ Etuve
- ❖ Microscope optique
- ❖ Plaque chauffante
- ❖ Réfrigérateur
- ❖ Rhotavape

### 3.1.2. Petits matériels

- ❖ Anse de platine
- ❖ Barreaux magnétiques
- ❖ Bec bunsen
- ❖ Boites de Pétri
- ❖ Lames et lamelle
- ❖ Micropipette
- ❖ Pissette
- ❖ Pipettes Pasteur
- ❖ Spatule
- ❖ Verreries : béchers gradués, éprouvettes graduées, tubes à essai stériles, les flacons, et les erlenmeyers.

### 3.2. Matériels biologiques

#### 3.2.1. Les actinomycètes

##### • Les isolats d'actinomycète

Les sept isolats d'Actinomycètes qui appartiennent au genre *Streptomyces* proviennent d'une collection de souches d'actinomycètes isolées à partir d'un système lacustre (**Benhadj et al.,2018**).

**Tableau n° 04** : les codes des souches d'actinomycètes.

Souche	Code
Souche 01	S368
Souche 02	S316
Souche 03	S299
Souche 04	S257
Souche 05	S158
Souche 06	S170
Souche 07	S97

#### 3.2.2. Les germes cibles

Les germes cibles utilisés pour tester l'activité antimicrobienne des Actinomycètes, ce sont des bactéries à Gram positifs et négatifs.

Tableau n° 05 : les germes cibles

Les bactéries tests	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Bacillus</i>
Code	BT01	BT02	BT03	BT04	BT05	BT06	BT07

### 3.3. Les milieux de cultures

- ❖ Bennet
- ❖ Bouillon nutritif
- ❖ Chapman
- ❖ Gélose à base d'amidon 1%
- ❖ Gélose à base de gélatine 0.4%
- ❖ Gélose nutritive
- ❖ GYEA
- ❖ Lait écrème 10%
- ❖ LB liquide
- ❖ Lb molle
- ❖ Milieu à base de tween 80
- ❖ Milieu MacConkey
- ❖ ISP1
- ❖ ISP2

**NB** : La composition de chaque milieu est présente dans la partie annexe

### 3.4. Les solutions et colorants utilisés

- ❖ Alcool
- ❖ Bleu de méthylène
- ❖ Eau distillée stérile
- ❖ Eau physiologique stérile
- ❖ Fuchsine
- ❖ Huile à immersion
- ❖ Huile de paraffine
- ❖ Lugol
- ❖ Violet de gentiane

### **3.5. Les solvants**

- ❖ Acétate d'éthyle.
- ❖ Acétone
- ❖ Dichlorométhane.
- ❖ Chloroforme
- ❖ Ethanol.
- ❖ Hexane.
- ❖ Méthanol.
- ❖ N-Butanol

### **3.6. Les réactifs et autres produits**

- ❖ Api 20 E
- ❖ Kovax
- ❖ Nit1 et Nit 2
- ❖ TDA
- ❖ VP1 et VP2

## **4. Méthode de travail :**

### **4.1. Origine des souches**

Au cours de ce travail, nous avons cherché à étudier la diversité métabolique de 07 isolats d'actinomycètes sélectionnées

### **4.2. Repiquage et purification des isolats**

La première étape consiste à purifier les souches d'actinomycètes étudiées pour permettre de donner des colonies isolées et pure. Pour cela les isolats doivent être purifiés par repiquages successifs sur un milieu neufs

La purification est effectuée par ensemencement successive des boites de pétri coulées dans un milieu ISP2, par la réalisation de la méthode de strie d'épuisement. Ensuite, les boites sont incubés à 30C°pendant 7 jours.

### **4.3. Etude morphologique des souches sélectionnées**

L'identification des souches est basée sur l'étude des caractères macromorphologique, macromorphologique, et la détermination des activités enzymatique.

### 4.3.1. Etude macromorphologique

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation à l'œil nu, Après 7 jours d'incubation à 30°C on va noter la croissance des souches, l'aspect et la couleur de la colonie, la vitesse de croissance sur le milieu de culture : ISP2.

### 4.3.2. Etude Micromorphologiques

Les caractères micromorphologiques des isolats sont obtenus suite à l'observation d'états frais, et par des frottis préparés sur une lame en verre stérile et colorés par la coloration de Gram, après l'observation directe de l'aspect des colonies sous microscope optique (Gx100).

#### 4.3.2.1. Préparation d'état frais

- Sur une lame on dépose une goutte d'eau distillée
- Prélever une fraction de colonies, faire une suspension homogène
- Laisser sécher à l'air ambiant
- Observer à l'objectif 40 au microscope optique

#### 4.3.2.2. Examen microscopique après coloration de Gram

- Réaliser un frottis fixe à la chaleur.
- Recouvrir le frottis de la solution de violet de gentiane 1 minute et rincer à l'eau
- Recouvrir la préparation de Lugole, laisser agir 1 minute
- Décolorer bien à l'alcool, laisser agir puis rincer à l'eau
- Recouvrir la lame de la solution de fuchsine 30 secondes puis rincer à l'eau
- Sécher entre deux feuilles de papier buvard
- Observation sous un objectif à immersion (x100) d'un microscope optique (**Prescott et al. 2010**).

## 4.4. Etude de la diversité métabolique

### 4.4.1. Hydrolyse de l'amidon : recherche d'amylase

Ce test est réalisé en cultivant les souches sur milieu nutritif contenant 1% d'amidon soluble, Chaque isolat étudié est ensemencé sur ce milieu en boîte de pétri, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours. Puis la gélose recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour de colonies, À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. (**Geraldine et al. ;1981**).

#### **4.4.2. Hydrolyse de la caséine : recherche de caséine**

Chaque isolat testé ensemencé sur milieu gélose en boîte pétri additionné de 2 à 5% de lait écrémé stérile, les boîtes incubées à 28°C pendant 7 jours. L'observation des zones claires autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**Gordon et Smithe, 1953 ;Kitouni,2007**).

#### **4.4.3. Hydrolyse de la gélatine : recherche de la gélatinase**

En utilisant un film photographique usé préconisée par (**Pickett et al., 1991**). La production de gélatinase par les bactéries est étudiée à partir de tubes qui contiennent de l'eau physiologique stérile (environ de 5ml), ensemencées pour réaliser une suspension bactérienne à laquelle une bandelette de film photographique (1cm de largeur) est ajoutée, un tube non ensemencé contenant une bandelette servira de témoin négatif. Après une période d'incubation de 7 jours à 30 °C, apparaît un éclaircissement du film photographique, signe de l'attaque de la gélatine par la bactérie qui indique une réaction positive ; ce test est confirmé par le résultat du système Api20E (**Morakchi, 2011**).

#### **4.4.4. Action sur le lait écrémé**

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10% dans l'eau distillée, ces derniers sont ensemencés avec les souches d'actinomycètes et incubés à 30°C, des observations régulières pendant 14 jours permettant de noter la coagulation du lait provoquée par les souches (**Williams et Cross, 1971**).

#### **4.4.5. Teste de dégradation des acides gras : recherche d'estérase**

Ce test est effectué par l'utilisation de milieu à base de tween 80', après l'ensemencement des isolats et l'incubation à 30°C pendant 7 jours, la lecture est basée sur l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie indique que le test positif (**Delmotte,1958**).

#### **4.4.6. Dégradation des sels de sodium**

Ce test est réalisé dans le milieu de citrate de Simmons, dans lequel on ensemence la surface par une touche au moyen d'une anse, l'incubation s'effectue à 30 °C, pendant 14 à 21 jours, le virage de couleur du milieu vers le bleu indique la positivité de test (**Gordon et Smith, 1953**).

#### **4.4.7. La recherche de Nitrate réductase**

Des tubes contenant 10 ml du milieu bouillon nutritif (ISP8) sont ensemencés, puis incubés à 30°C pendant 7 jours. Une coloration rose à rouge clair suite à l'addition des réactifs (Nit I et Nit II) signe la réduction du nitrate en nitrites (**Guiraud et Duriod, 2003**).

$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$  Nitrate réductase  $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés :

- L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche).
- En l'absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites) (Marchal et al., 1991).

#### 4.4.8. Dégradation de Cellulose : recherche de cellulase

Dans des tubes contenant 05 ml de l'eau physiologie on trompe des bandelettes de papier Wattman N° 1 stérile, comme une seule source de carbone, puis ensemencé avec l'isolat considéré, un tube non ensemencé sert de témoin, les tubes sont incubés à 30C° pendant 14 jours au plus, un développement de croissance sur le papier est considéré comme résultat positif (Yugal, 2014).

#### 4.4.9. La recherche de l'activité hémolytique

Pour teste l'activité hémolytique chez les actinomycètes en réalise une culture sur la gélose de Columbia (900ml) additionnée de 100 ml de sang de cheval à raison de 5% (COS), si les Actinomycètes possèdent une activité hémolytique, ils produisent différentes zones d'hémolyse sur la gélose au sang. (Tableau 02) (Guérin et al., 1992).

**Tableau 06** : les différents types d'hémolyse (Dellars, 2007).

Zone d'hémolyse	Type d'hémolyse
Colonies à large auréole claire, à bord net, Hémolyse complète	$\beta$ hémolytique
Colonie à halo étroit, avec verdissement (formation de méthémoglobine), hémolyse incomplète.	$\alpha$ hémolytique
Colonie sans zone d'hémolyse	$\gamma$ hémolytique

#### 4.5. Utilisation de l'API 20E

L'API 20 E (BioMérieux), est un système standardisé d'identification des *Enterobacteriaceae*, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, cela permet d'aborder parallèlement des aspects du métabolisme bactérien (permet de mettre en évidence l'assimilation de certains sucres ainsi que la recherche de la production de certaines enzymes caractéristiques de certaines voies métaboliques), d'après ces caractères, il peut être utilisé pour le groupe des Actinomycètes (Stanckebrandt et al., 2001).

### 4.5.1. Principe

La galerie Api 20E se compose de 20 microtubes contenant un substrat déshydraté, on inocule chaque microtube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile par une suspension préparée à partir des cultures pures jeunes de chaque souche d'Actinomycètes à identifier, et incubée sous 7 à 30 C°. Les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs ; la lecture et l'identification s'effectuent à l'aide d'une base de données (**Stanckebrandt et al., 2001**).

### 4.5.2. Mode opératoire galerie Api20E

- Répartir un peu d'eau dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Déposer la galerie de façon stérile dans la boîte.
- Inoculation de la galerie
- Ensemencer la galerie avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule.
- Tenir la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles.
- Pour les caractères encadrés (CIT, VP, GEL) : remplir entièrement la cupule (tube et orifice) pour mise en aérobiose.
- Pour les autres caractères, ne remplir que le tube.
- Pour les caractères soulignés (ADH, LDC, ODC, H2S, URE) : remplir l'orifice de la cupule avec de l'huile de vaseline stérile mise en anaérobiose.
- Refermer la boîte et mettre à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. (**Stanckebrandt et al., 2001**).

### 4.5.3. Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés en groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est attribuée pour chaque test.
- La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres.
- Pour les isolats d'Actinomycètes, on a utilisé la galerie biochimique comme un test confirmative, d'une part et pour rajoutés d'autres résultats aux activités de biodégradation notamment sur l'assimilation des sucres d'autre part.

#### **4.6.Extraction des molécules bioactive**

Les métabolites secondaires sont extraits à l'aide du Solvants, après la sélection des meilleurs jours de production des molécules bioactives et le meilleur milieu pour chaque souche d'actinomycètes.

Les souches sont ensemencées (16 boites pour chaque souche) en stries serrées dans le milieu GYEA et incubé à 30C° pendant dix jours.

La souche S158 est aussi ensemencée en stries serrées dans le milieu ISP1 pendant sept jours et dans le Bennet pendant dix jours, puis incubé à 30C°.

Puis la gélose est fragmentée et mélangé avec 40ml des différents solvants organiques de polarité différentes : Acétate d'éthyle (de polarité moyenne), Acétone, Chloroforme (de polarité moyenne), Dichlorométhane (de polarité moyenne), Ethanol (polaire), N-Hexane (apolaire), Méthanol (polaire), N-Butanol (polaire) a raison de deux répétitions pour chaque solvant. Après une agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante, la biomasse formée est filtrée sur papier filtre ensuite évaporées à sec sous vide à l'aide d'un rota-vapeur (Heidolph) à 40C° jusqu'à évaporation

Les résidus secs obtenus sont resuspendue pour les tests Antibactériens dans 1ml de méthanol (RM) et dans 1ml de DMSO (RM).

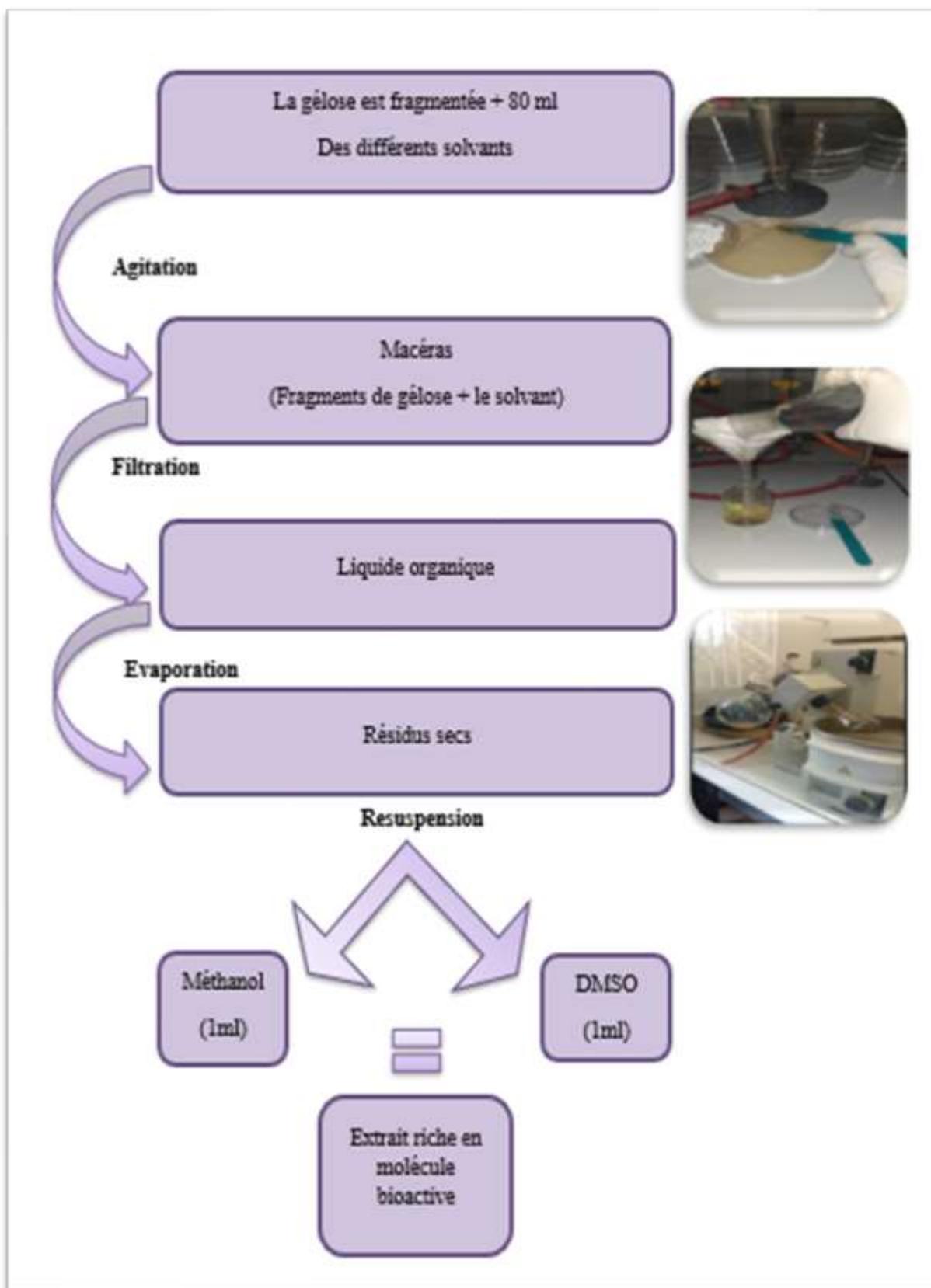


Figure 05 : Protocole d'extraction des molécules bioactive

---

---

## 4.7. Recherche de l'activité antibactérienne

### 4.7.1. Culture des bactéries teste dans le milieu solide

Les souches tests sélectionnées (07 souche) ont été ensemencées par la méthode de strie d'épuisement à l'aide d'une anse de platine sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches microbiennes utilisées :

1. BT01 et BT02 : dans le milieu Chapman.
2. BT03 et BT07 : dans le milieu GN.
3. BT04, BT05 et BT06 : dans le milieu macConkey

Puis incubées pendant 48 heures à 37°C pour les BT01, BT02, BT04, BT05, BT06 et à 30° pour les BT03 et BT07.

### 4.7.2. Préparation de l'inoculum

Afin d'obtenir des colonies bactériennes teste jeunes et bien isolées. Un inoculum de chaque bactérie est préparé en milieu Lureat Bertani (LB) liquide et incubés pendant 48 heures. Par la méthode des suspensions dilutions corrélée à la mesure de la densité optique on réalise la standardisation des germes cibles (densité optique égale 0.4 à 600 nm).

### 4.7.3. Activités antibactériennes des extraits

L'activité antibactérienne des isolats actinomycètes a été réalisée en suivant les méthodes des disques pour tester la sensibilité des germes bactériens aux molécules bioactives de les extraits organique obtenus à partir des milieux gélose est mesurée après 24h d'incubation (**Barry et al. 1970**).

### 4.7.4. Méthode de disques

Des disques de papier Whatman N°1 (6mm de diamètre) stériles sont déposés sur la gélose LB molle préalablement ensemencée avec la bactérie-test "BT1" les disques sont ensuite imbibés par 20 µl des extraits organiques et sont séchés sous la haute bactériologique pour les extraits dilués dans le méthanol et sous un courant d'air froid pour les extraits dilués dans la DMSO en préparé cette opération avec tous les bactéries-test (bt2-bt3-bt4-bt5-bt6-bt7). Les boîtes ensemencées sont incubées à 35°C après une diffusion de 2 à 4h à 4°C. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation. (**Barry et al. 1960**).

#### 4.8. Révélations microbiologiques et chimiques des antibiotiques

Une fois le meilleur solvant d'extraction est mis en évidence pour chaque souche étudiée, il est nécessaire de déterminer le meilleur système de séparation par migration en réalisant une chromatographie sur plaques de gel de silice.

Dépôt des échantillons et développement des plaques :

A l'aide d'une micro seringue, les échantillons sont déposés sur la plaque sous forme de spots par petites fractions. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant (**Merck, 1975**).

Les systèmes de solvants utilisés sont :

- **AM** acétate d'éthyle-méthanol (10-1.5, v/v)
- **EAE** éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v)
- **BAE** n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v)
- **ME** méthanol-eau (7/4, v/v).

Après développement, la migration est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt. Les plaques sont ensuite retirées des cuves puis séchées sous hotte toute une nuit afin d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du germe-cible lors de la bioautographie. Les chromatogrammes obtenus sont observés à l'œil nu puis sous UV à 254 nm (absorption) et à 365 nm (fluorescence). Les taches sont alors délimitées. Permettant ainsi de situer les composés actifs entre eux et par rapport aux composés non actifs (une fois la bioautographie réalisée). Le rapport frontal (Rf) de chaque tâche est obtenu en divisant la distance de migration (en cm) des composés bioactifs sur la distance parcourue par le solvant (en cm).

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration de la tache active (en cm)}}{\text{Distance de migration du solvant (en cm)}}$$

#### 4.9. Bioautographie

##### 4.9.1. Révélations microbiologiques des molécules bioactives

Les composés actifs sont révélés par bioautographie. Leur nombre et leur Rf seront ainsi déterminés. La bioautographie est réalisée en utilisant des plaques de gel de silice. Les deux meilleurs systèmes de solvants ont été utilisés 'EAE' éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v) et

'BAE' n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v) (Boudjella, 2007). La méthode utilisée est celle de Betina (1973). Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 × 24 cm) nettoyée à l'éthanol. Au fond de la boîte, une feuille de papier filtre imbibée d'environ 30 ml d'eau stérile permet de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est alors stérilisé durant 30 à 45 min sous UV à 254 nm. Un volume de 50 ml de gélose LB molle maintenue en surfusion (45 à 50°C) est inoculé avec le germe-cible. Le milieu est réparti avec une seringue stérile sur les plaques. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances bioactives dans le milieu puis incubées à 30°C. Le germe-cible se développera sur toute la plaque, sauf au niveau de la zone de migration des composés bioactifs (auréole claire d'inhibition). Les zones d'inhibitions sont mesurées après 24 à 48h et les Rf calculés pour chaque tache active selon la formule :

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration de la tache active (en cm)}}{\text{Distance de migration du solvant (en cm)}}$$

#### 4.9.2. Révélations chimiques des molécules bioactives

Des révélations chimiques sont effectuées sur des plaques de gel de silice développées de la même manière que pour les bioautographies pour avoir une idée sur la nature chimique des molécules bioactives. Les révélateurs utilisés (Merck, 1975) sont les suivants :

- Le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : révélateur des composés aromatiques polycycliques.
- Le chlorure de fer ferrique : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.
- La ninhydrine : révélateur des fonctions amines.

Les taches colorées peuvent apparaître à froid et/ou à chaud (5 min à 100°C).

## Résultats et discussion

### 1. Repiquage et purification de isolâtes

Le repiquage successif sur le milieu ISP2 par la méthode d'épuisement a été réalisé pour obtenir des souches pures. Les 07 isolats ont des Mycélium de Substrat et des Mycélium aérienne de couleur déférentes comprise entre le gris, blanc, jaune, orange crevette et le bige (illustré dans le **Tableau 07** et la **Figure 06**).

Les colonies des souches d'actinomycètes possèdent des contours irréguliers par fois régulier comme le cas des deux souches (S97 et S257).

La couleur du mycélium aérien des toutes les souches est gris sauf pour la souche 316 est de couleur blanche, celle du mycélium substrat est diffère d'une souche a une autre. Selon **Priam (1965)**, la couleur du mycélium aérien et substrat est considérée comme un bon critère dans la caractérisation des streptomycètes

La souche S316 se développe plus rapidement, on observe la présence des colonies au bout de 2 à 3 jours. Après 7 jours d'incubation les colonies perdent leurs pigmentations orange crevette qui se propagent dans le milieu, les colonies en suite prennent la couleur blanche, et aussi pour la souche S97 le pigment est de couleur marron fonce

La pigmentation diffusible produite par ces isolats d'Actinomycètes peut être des substances bioactives et ceci d'après (**Margalith, 1992**).

**Tableau 07** : Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 07 isolats

Les caractères Les souches d'actinomycètes	Mode de Croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigmentation
<b>S368</b>	Importante	Gris	Jaune verdâtre	Absence
<b>S316</b>	Importante	Blanc	Orange crevette	Rouge fonce
<b>S299</b>	Importante	Gris	Brun olive à noire	Absence
<b>S257</b>	Importante	Gris	Brun olive à noire	Absence
<b>S170</b>	Faible	Gris	Jaune	Absence
<b>S158</b>	Importante	Gris	Beige foncé	Absence
<b>S97</b>	Moyenne	Gris	Orange crevette	Marron fonce



Planche 01 : Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur le milieu ISP2

## **2. Identification des souches sélectionne**

### **2.1. Etude macromorphologique**

L'aspect macromorphologique des souches ont été déterminés sur le milieu ISP2 après incubation pendant 3 à 7 jours à 30C°, ceci signifie que la croissance des souches été lente par rapport à la plupart des bactéries

L'étude macroscopique est basée sur plusieurs parmi ces caractères ; L'aspect de colonie, la couleur, la vitesse de la croissance, et les résultats ont été notés dans le **Tableau 08**

Les colonies sont de forme ronde d'une consistance crémeuse, brillant avec un contour irrégulier, d'une surface ridée

Les colonies des souches S257, S97 sont de forme ronde avec un contour irrégulier, par contre les souches S170, S158 elles sont de forme ronde d'un aspect mat et une surface granuleuse.

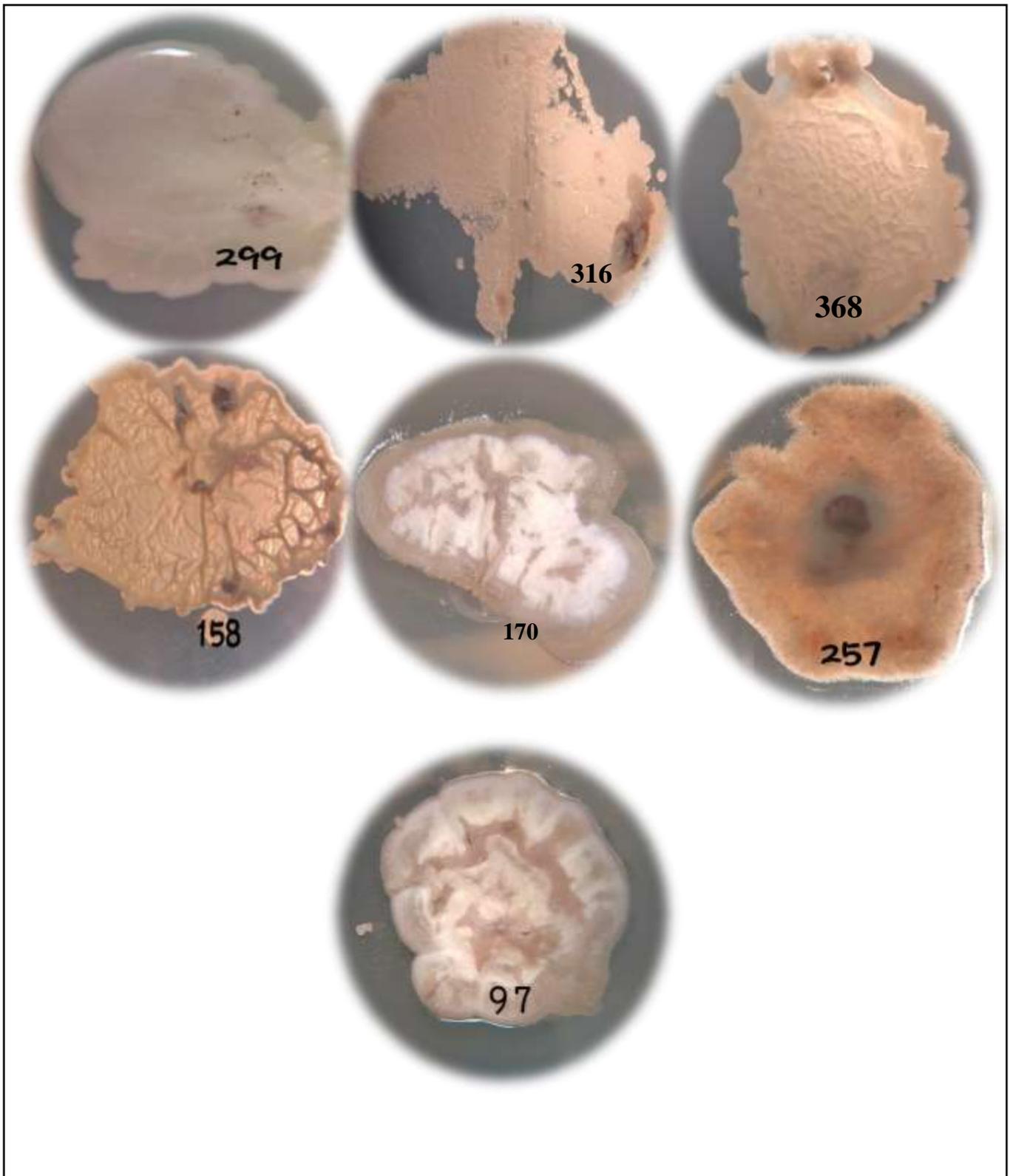
A la contrer les deux souches S368, S316 elle sont d'un aspect brillant avec un contour irrégulier

En général, l'aspect macroscopique des souches est différent. Certains forment des colonies de grande taille S170, S97 d'autres de taille moyenne S368, S299, S257, et certains d'autres forment des colonies de petite taille S316, S158.

La forme des colonies était différente aussi : sont rondes à contours irréguliers S368, S299, S185 et réguliers à l'exception la Souche S257, S97.

**Tableau 08** : Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 07 isolats

<b>Caractères</b> <b>Souches</b>	<b>Forme</b>	<b>Surface</b>	<b>Bords</b>	<b>Aspect</b>	<b>Couleur</b>	<b>Pigments diffusable</b>
<b>S368</b>	Rende	Ridée	Irréguliers	Brillante	Jaune / blanche	-
<b>S316</b>	Irrégulier	Granuleuse	Irréguliers	Brillante	Crevette	+
<b>S299</b>	Rende	Lisse	Irréguliers	Brillante	Blanc clair	-
<b>S257</b>	Rende	Granuleuse	Réguliers	Mate	Beige et virent vers le marron	-
<b>S170</b>	Irrégulier	Bombé	Irréguliers	Opaque	Blanc \ Beige	-
<b>S158</b>	Rende	Ridée	Réguliers	Mate	Beige foncé	-
<b>S97</b>	Rende	Bombé	Irréguliers	Opaque	Blanc \ Beige	+



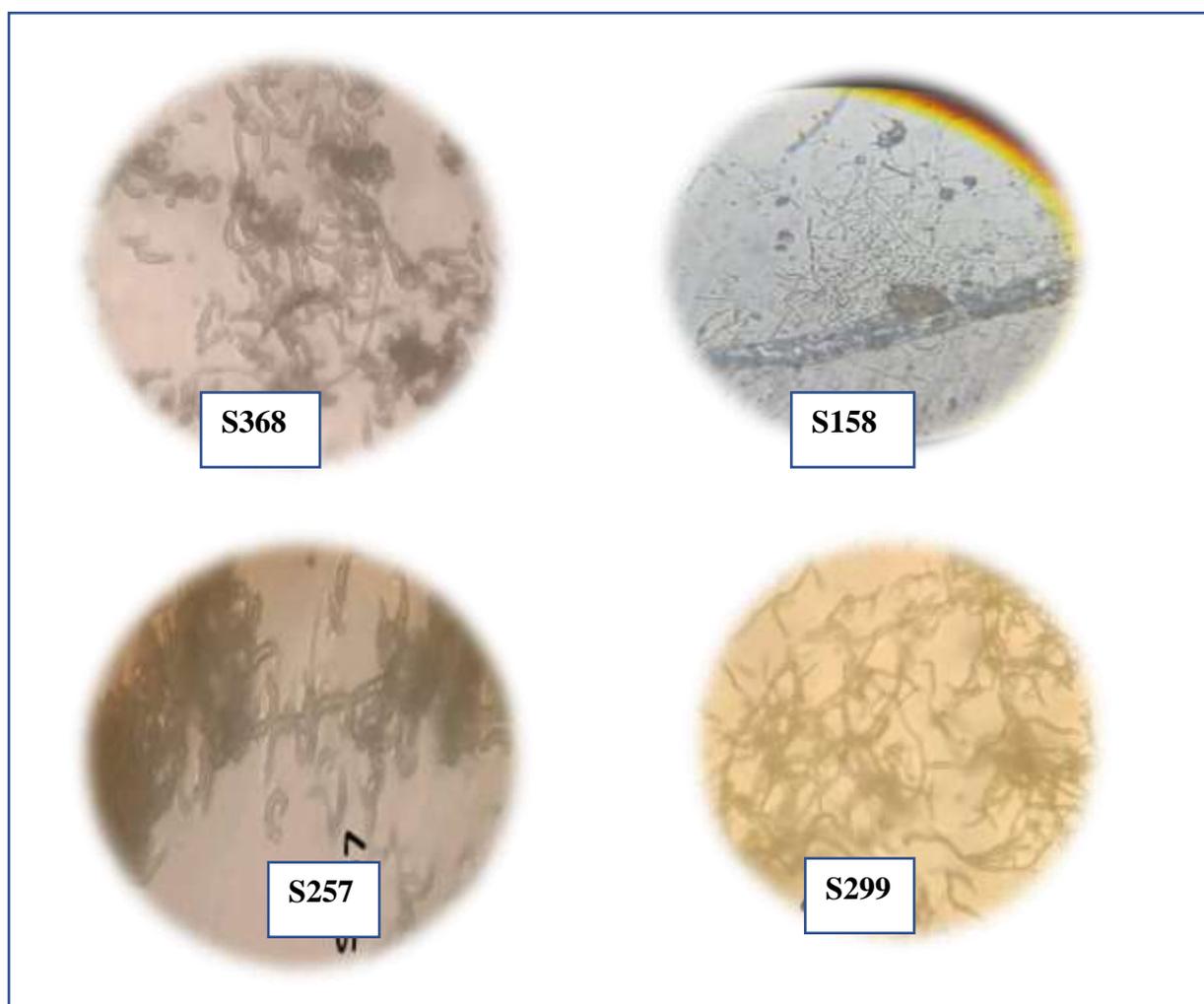
**Planche 02** : l'observation sous loupe binoculaires de 07 isolats ensemencé par touche sur le milieu ISP2.

## 2.2. Etude micromorphologiques

D'après les résultats obtenus après l'observation direct et la coloration de Gram on résume que les actinomycètes sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, aérobies avec présence des spores, Elles présentent certaines analogies avec les champignons : structure mycélienne présentant des ramifications

L'étude microscopique montre, que tous les isolats présentent un aspect filamenteux avec présence des spores isolés ou en amas qui sont parfois à court ou à longues chaînes, ce qui confirme leur appartenance au groupe majeur des Actinomycètes

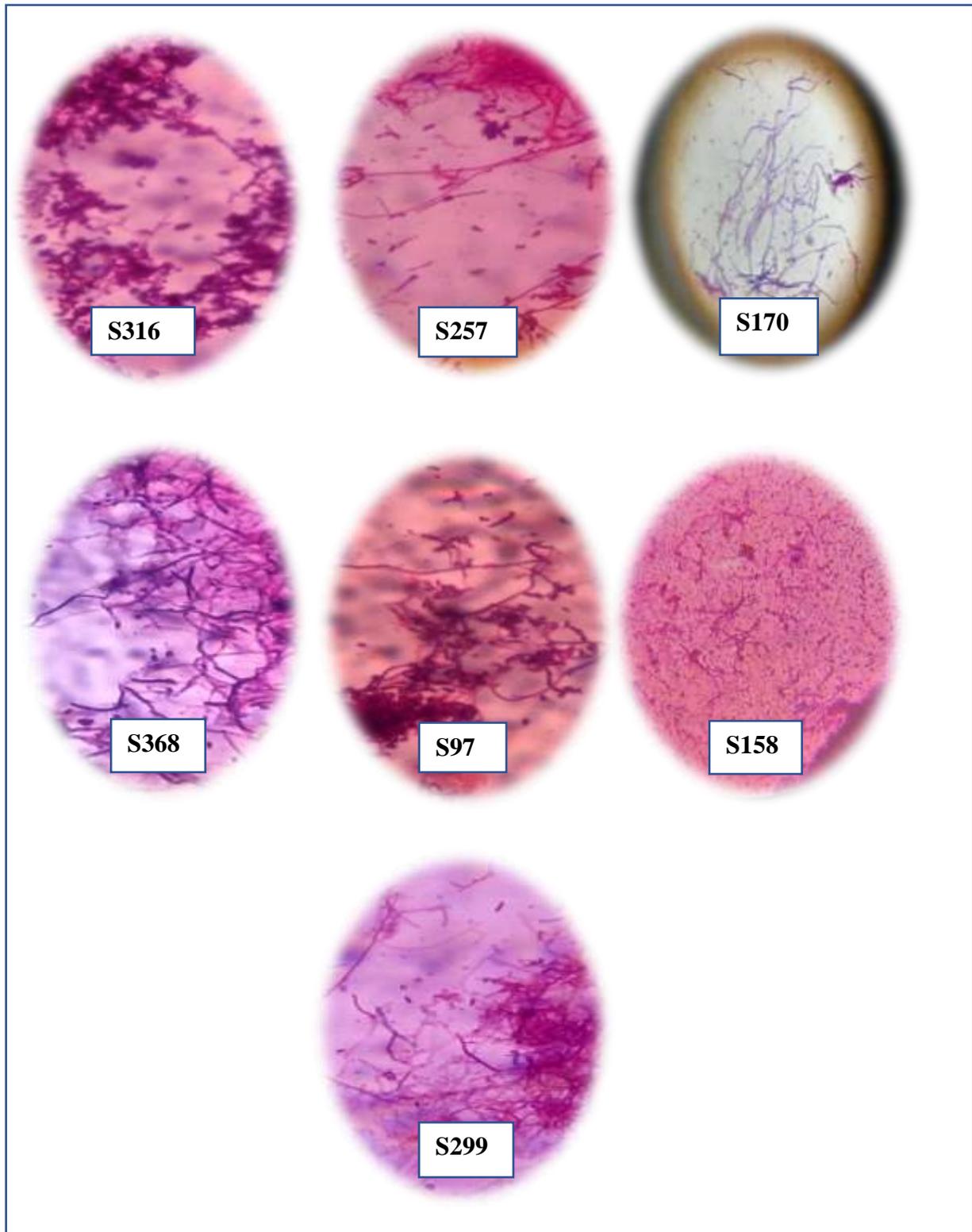
Cette étude permet de déterminer les caractéristiques et les chaînes de spores (nombre forme et morphologie) par examen direct au grossissement X100



**Planche 03** : Photo des résultats de l'Observations microscopiques d'état frais de quelques isolats

**Tableau 09** : Résultat des caractères micromorphologiques de quelques isolats

<b>N° de souche d'Actinomycètes</b>	<b>Observation microscopique après coloration de Gram</b>
<b>S368</b>	Des Longues filament fine, linéaire, avec des spores isolées
<b>S316</b>	Court filament, avec des spores regroupe en amas
<b>S299</b>	Des Longues filament avec des spores en courte chaine regroupe en amas
<b>S257</b>	Des Longues filament fines, et des spores isolées
<b>S170</b>	Longue fragment de filament linéaire, avec des spores isolées
<b>S158</b>	Des Longues filament fines, et des spores isolées
<b>S97</b>	Absence de filament, avec des spores regroupées en amas, et a longue chaine



**Planche 04** : Photos des résultats de l'Observations microscopiques après coloration de Gram

### 3. Etude de la biodiversité métabolique

Ce travail est réalisé pour la mise en évidence de la capacité métabolique de ces isolats telle que la production des différents types d'enzymes essentielles, comme l'amylase, la gélatinase, lipase et nitrate réductase...etc. ainsi, on a testé la capacité d'assimiler certains types de sucres (**Boucheffa, 2011**).

Ces tests reposent sur la culture des isolats d'Actinomycètes dans des milieux de culture appropriés pour chaque test (voir matériel et méthode), ce qui permet de déterminer après, la présence ou l'absence de l'activité enzymatique pour chaque isolat.

#### 3.1. Résultats d'Hydrolyse de l'amidon

D'après les résultats du tableau, on observe que 100 % de ces isolats présentent une activité amylolytique sur le milieu à base d'amidon, après addition du Lugol, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie traduite par la dégradation de l'amidon. Cela montre que les souches testées possèdent une amylase (**Kuo et Hartman 1966 ; Chao et Wen, 2007**).

#### 3.2. Résultats d'hydrolyse de la caséine

4/7 Souches possèdent une activité caséinolytique où après une période d'incubation de 7 jours dans un milieu à base de caséine (voir l'annexe) les résultats positifs sont indiqués par l'apparition des zones claires autour des colonies. Ces résultats comparables avec celle de (**Gulve et Deshmukh, 2011**) qui ont montré dans le cadre de la recherche de l'activité enzymatique d'Actinomycètes que divers genres possèdent une activité caséinolytique.

#### 3.3. Résultats d'hydrolyse de la gélatine

Après 7 jours d'incubation, l'éclaircissement de la bandelette de film photographique est apparu chez 43% des isolats, ce qui traduit l'hydrolyse de la gélatine par une enzyme extracellulaire qui est la gélatinase, mais dans les cas des souches S257, S316, S97, S299, la couleur de bandelette ne change pas comme dans le cas du témoin négatif durant la période d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Djaballah (2010)** dont il a assigné que la liquéfaction de la gélatine par des souches halophiles et halotolérantes isolées de la sebkha d'Ain M'Lila qui sont proches des genres *Actinopolyspora*, *Streptoaloteichus*, *Streptosporagium*, *Kitasatospora*. Ce test a été confirmé par le résultat du test de l'Api 20.

#### 3.4. Résultats de test de l'action sur le lait écrémé

Les résultats du **Tableau 10** montrent que la coagulation de lait écrémé est apparue chez 100% de ces souches (**Figure 10 B**). Les Actinomycètes sont connus pour la production des coagulases (**Gordon et al., 1974**).

### **3.5. Résultats de Test de dégradation des acides gras**

L'apparition d'un halo opaque autour des colonies de toutes les souches se traduit par la présence des estérases et par conséquent la dégradation des acides gras

### **3.6. Résultats de test de dégradation des sels de sodium**

La dégradation de sel de sodium est notée positivement après virage d'indicateur coloré du vert au bleu ou bleu-vert (alcalinisation) sur le milieu Citrate de Simmons, après la durée d'incubation, 100% de ces souches. Ces résultats sont confirmés par le système Api 20E où, on trouve les mêmes résultats.

### **3.7. Résultats de test de production de Nitrate réductase**

Les résultats de la réduction du nitrate par les souches d'Actinomycètes testées, on constate que 100 % des souches testées présentent une réduction du nitrate, cette activité est traduite par une réaction colorée en rouge après l'ajout des deux réactifs qui sont le nitrate réductase 1 et le nitrate réductase 2 (Guérin, 1992).

### **3.8. Résultat de test de dégradation de cellulose**

Les résultats montrent que 57% des souches d'Actinomycètes se développent sur la bandelette de papier Wattman, ce qui explique que ces isolats présentent une activité cellulolytique.

### **3.9. Résultats de l'activité hémolytique**

D'après les résultats, l'activité hémolytique apparaissent chez 43% des isolats (S316, S257 et S386) sous forme d'une zone claire de type  $\beta$  hémolytique, ces résultats sont similaires à ceux représentés par (Guérin et al., 1992) qui ont montré que la production de l'enzyme hémolysine est observé par des souches  $\beta$  hémolytique *Actinomyces pyogènes*. Par contre 57% de ces isolats présente une zone verdâtre de type alpha hémolytique (voir matériel et méthode)

**Tableau 10** : Résultats de tests de la biodiversité métabolique des 07 isolats

Test N Souche	Amidon	Caséinease	Gélatina se	Lait écrémé	Estérase	Citrate de Simmons	Nitrate réductas e	Cellulose	Hémolyse
S97	+	-	-	+	+	+	+	-	A
S158	+	+	+	+	+	+	+	-	A
S170	+	+	+	+	+	+	+	-	A
S257	+	+	-	+	+	+	+	+	B
S299	+	+	-	+	+	+	+	+	A
S316	+	-	-	+	+	+	+	+	B
S368	+	-	+	+	+	+	+	+	B

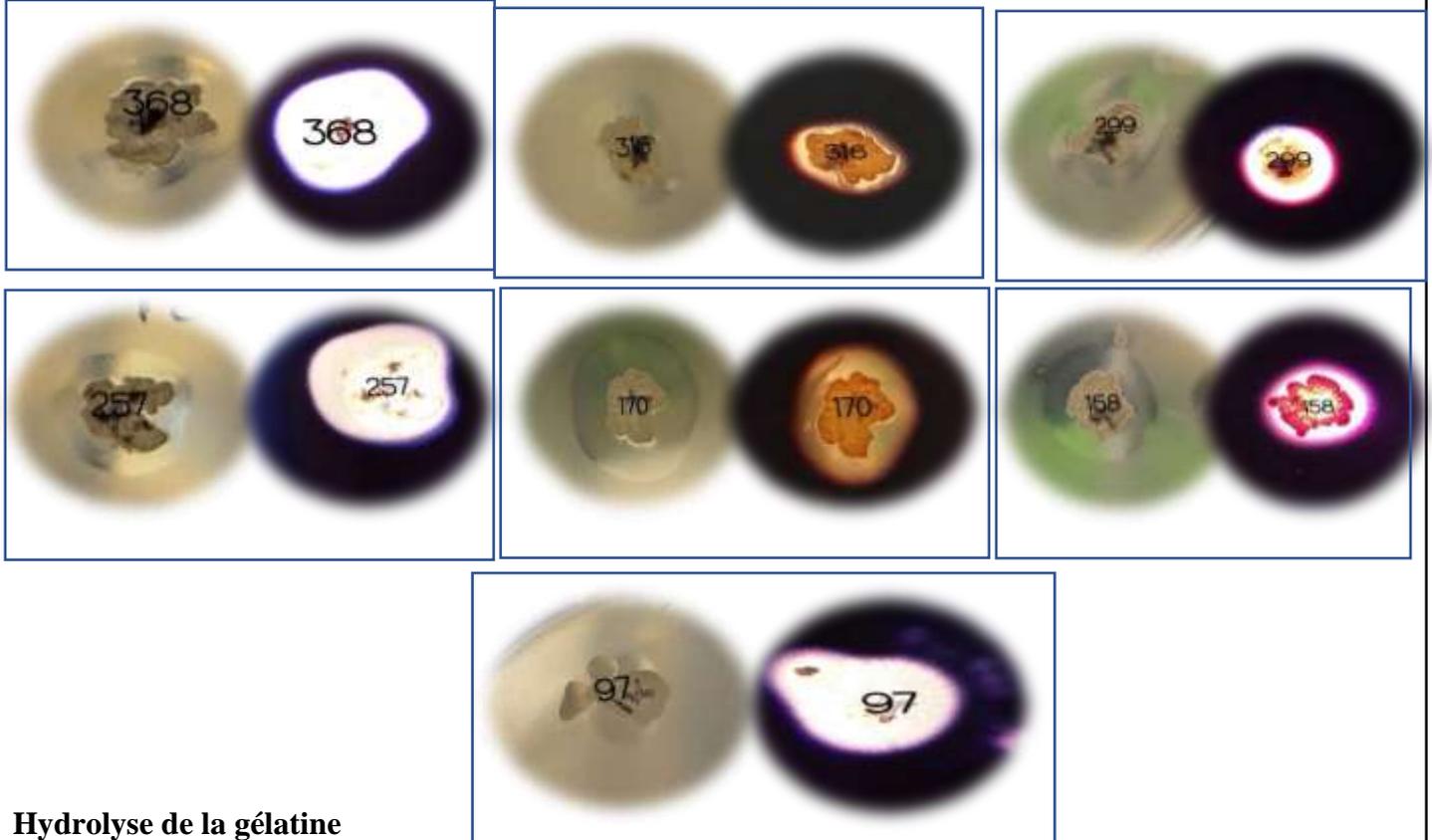
(-): Absence, (+) : Présence, ( $\alpha$ ): Verdâtre, ( $\beta$ ):Claire, ( $\gamma$ ): Absence

Il faut noter que ces tests sont confirmés et complétés par le système Api 20E, les résultats de galerie biochimique sont reportés dans le (**Tableau 11**), qui montre que la plupart des isolats des Actinomycètes, ont la capacité de produire certains types d'enzymes, essentiellement la gélatinase, ainsi on résulte que ce isolats ont utilisé les sucres comme une source de carbone de façon différente, ce qui est analogue à des résultats obtenus précédemment. Ces résultats sont similaires avec ceux qui se trouvent dans les travaux de **Boudjalleb (2009)**, qui utilisent le système Api 20E, on trouve que les différentes souches d'Actinomycètes sont capables d'utiliser des différentes sources carbonées et produisent certaines enzymes nécessaires pour leur métabolisme. Ces enzymes ont été utilisées dans plusieurs domaines en biotechnologie comme dans les industries alimentaires, l'industrie du textile, la bioconversion des déchets cellulosiques (**Ando et al., 2002 ; Sukumaran et al., 2005**).

**Tableau 11** : Résultat de l'Api 20E pour les enzymes produites par les 07 isolats

Paramètres	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S 97	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
S 158	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
S 170	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
S 257	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S 299	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S 316	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
S 368	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+

**Hydrolyse de l'amidon (avant et après l'ajoute de Lugol)**



**Hydrolyse de la gélatine**



**Hydrolyse de la caséine**



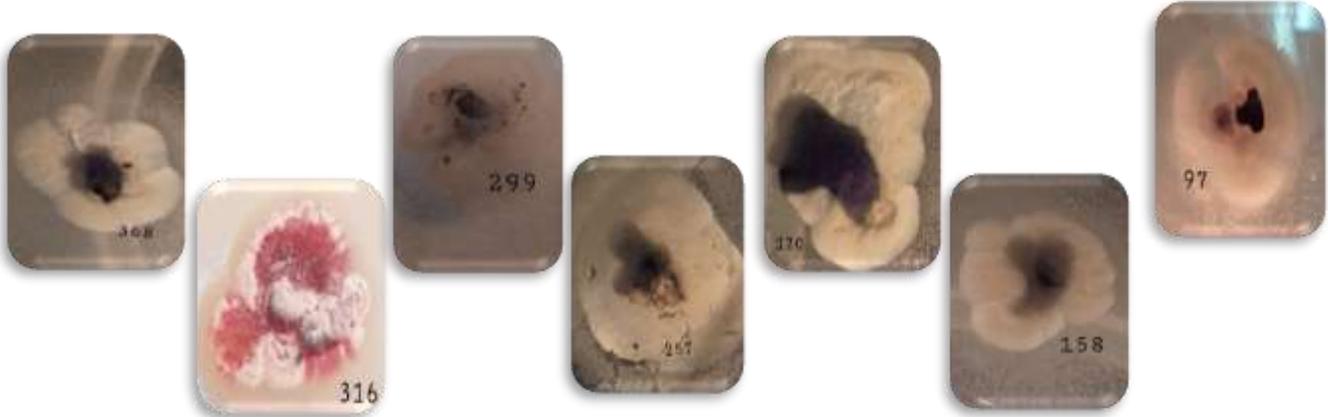
**Planche 05 A : Photos des résultats des différents tests métaboliques**

Lait écrème



+

Test de dégradation des acides gras



Teste de dégradation des sels de sodium

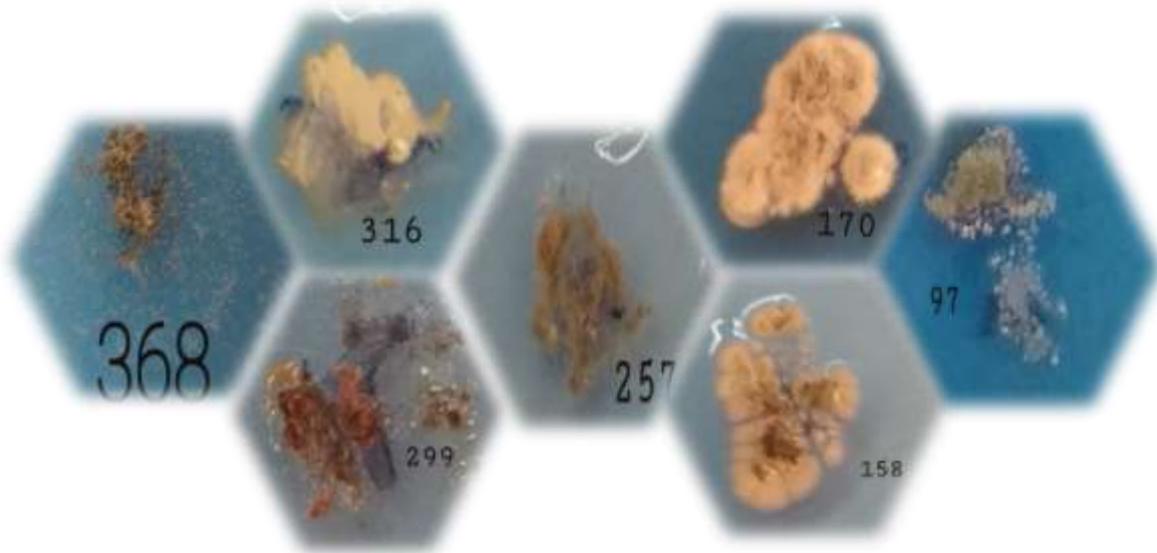
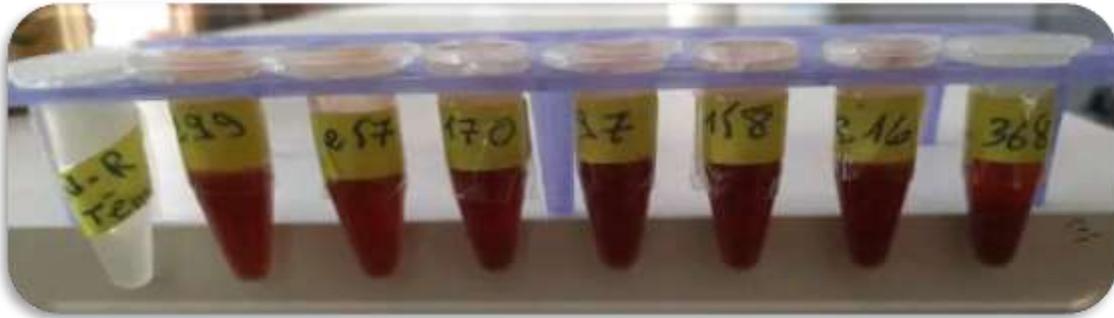
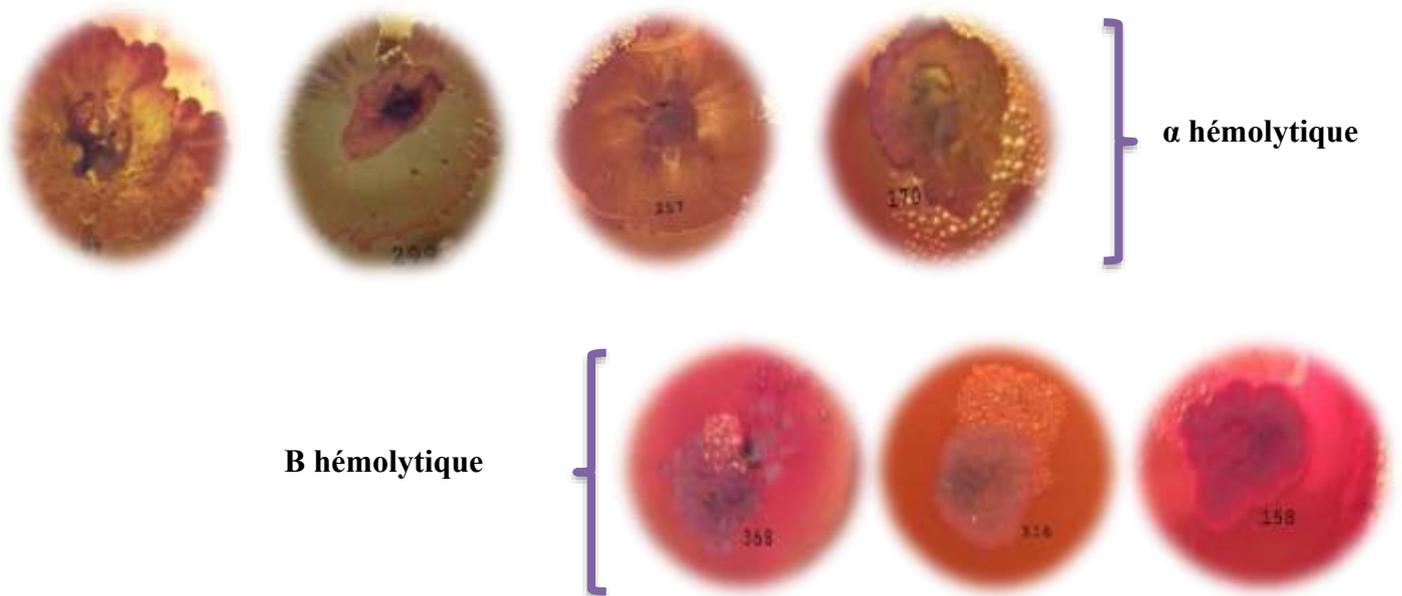


Planche 05 B : Photos des résultats des déférentes tests métaboliques

**Test de production de Nitrate réductase**



**Test d'hémolyse**



**Test de dégradation de cellulose**



**Planche 05 C : Photos des résultats des déférentes tests métaboliques**

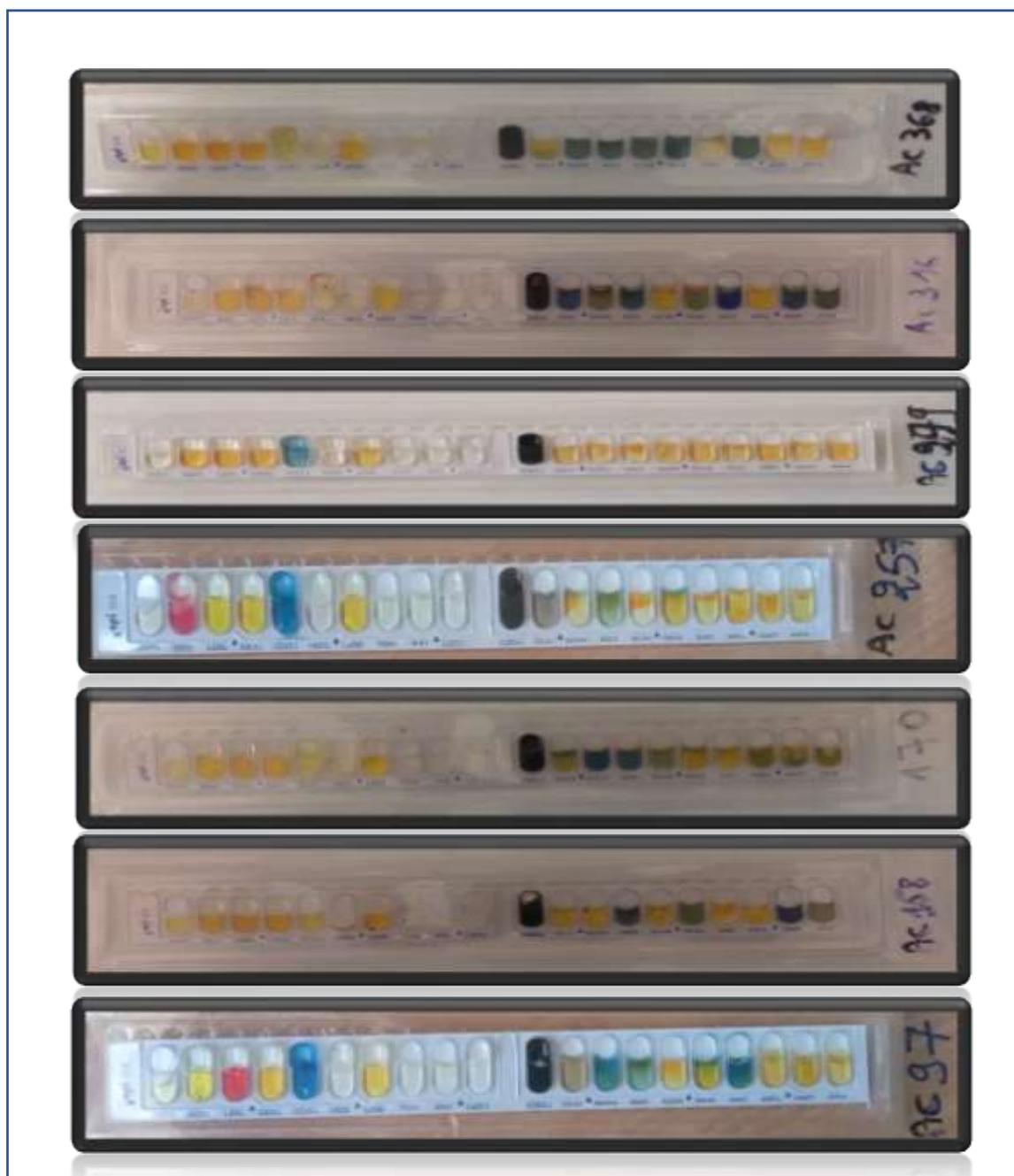


Planche 06 : Photos des résultats de systèmes API 20E des souches représentatives

#### 4. Recherche de l'activité antibactérienne

##### 4.1. Préparation des extraits

Pour l'extraction des molécules bioactives à partir du filtrat de culture des souches d'actinomycètes (S386, S316, S299, S257, S158, S170, S97). 08 solvants organiques de polarités différentes ont été testés : Acétate d'éthyle, Acétone, Chloroforme, Dichlorométhane, Ethanol, n-Hexane, Méthanol, n-Butanol.

Il existe des extraits qui se distinguent par des couleurs différentes entre le marron clair, le marron foncé et le jaune orange, comme l'extrait butanolique de les souches S170 et S368 est de couleur jaune orange, laquelle caractérise cette souche, les extraits avant l'évaporation sont représentés dans la **Figure 10**.

Contrairement à certains extraits dont la couleur est restée transparente et n'a pas changé comme l'extrait éthanolique et méthanolique de les souches S299, S257 et S368.



**Planche 07** : photos de quelque extraits avant l'évaporation.

#### 4.2. Activité antibactérienne des extraits

L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la technique de disques. Les souches test utilisées sont des bactéries pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Bacillus*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella Klebsiella sp*). Les résultats de test des extraits organiques de l'activité antibactérienne sont représentés dans les tableaux 12, 13,14, 15, 16, 17,18 qui portes des photos des zones d'inhibition de 07 souches d'actinomycètes visa vis des bactéries cibles.

**Tableau 12** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S368 extrait avec différents solvants et contre différentes souche cibles

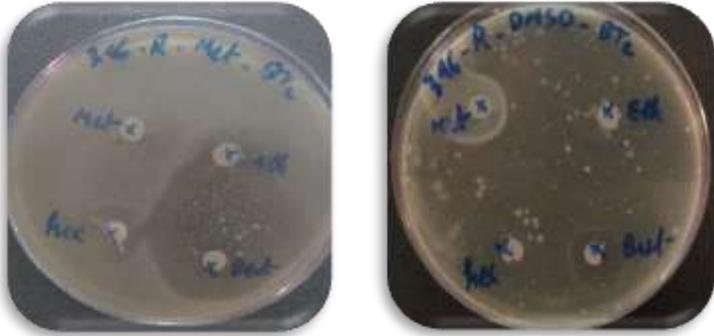
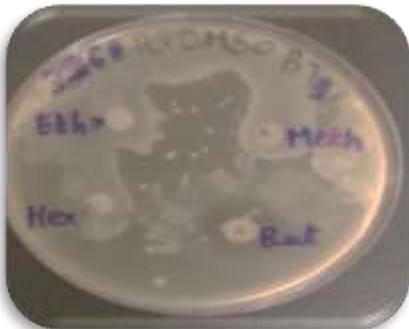
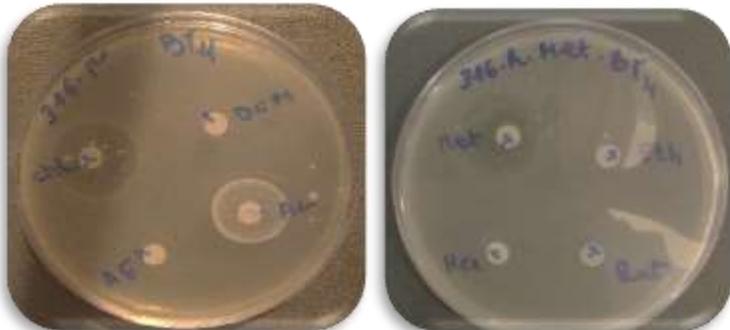
Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition
<b>S368 BT 01</b>	ET	22	-	
	MT	-	-	
	BU	13	-	
	HX	-	-	
	CHL	22	-	
	DCM	21	-	
	AC	33	-	
	AE	25	-	
<b>S368 BT 04</b>	ET	10	-	
	MT	-	-	
	BT	12	-	
	HX	-	-	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait,

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S368 contre les souches cible BT2, BT3, BT5, BT6 et BT7 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMS

**Tableau 13** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S316 extrait avec différents solvants et contre différentes souche cibles

Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition	
<b>S316 BT 02</b>	ET	20	-		
	MT	-	-		
	BU	33	15		
	HX	18	-		
	CHL	-	-		
	DCM	-	-		
	AC	-	-		
	AE	-	-		
<b>S316 BT 03</b>	ET	-	-		
	MT	-	-		
	BT	-	22		
	HX	-	-		
	CHL	-	-		
	DCM	-	-		
	AC	-	-		
	AE	-	-		
<b>S316 BT 04</b>	ET	-	-		
	MT	17	-		
	BT	-	-		
	HX	-	-		
	CHL	22	-		
	DCM	-	-		
	AC	-	-		
	AE	-	-		

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol, **HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S316 contre les souches cible BT1, BT5, BT6 et BT7 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO.

**Tableau 14 :** Résultat d'activité antibactérienne de la souche S170 extrait avec différents solvants et contre différentes souches es cible.

Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition	
<b>S170 BT 02</b>	ET	28	30		
	MT	25	09		
	BU	16	14		
	HX	-	10		
	CHL	-	-		
	DCM	30	-		
	AC	-	-		
	AE	-	-		
<b>S170 BT 03</b>	ET	11	12		
	MT	10	09		
	BT	-	-		
	HX	-	09		
	CHL	-	12		
	DCM	15	10		
	AC	-	13		
	AE	-	-		
<b>S170 BT04</b>	ET	-	14		
	MT	-	-		
	BT	-	-		
	HX	-	-		
	CHL	-	-		
	DCM	-	20		
	AC	-	17		
	AE	-	-		
<b>S170 BT07</b>	ET	31	26		
	MT	28	29		
	BT	19	-		

	HX	-	09	
	CHL	-	22	
	DCM	23	20	
	AC	16	21	
	AE	-	-	

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S170 contre les souches cibles BT1, BT5 et BT6 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO.

**Tableau 15** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S97 extrait avec différents solvants

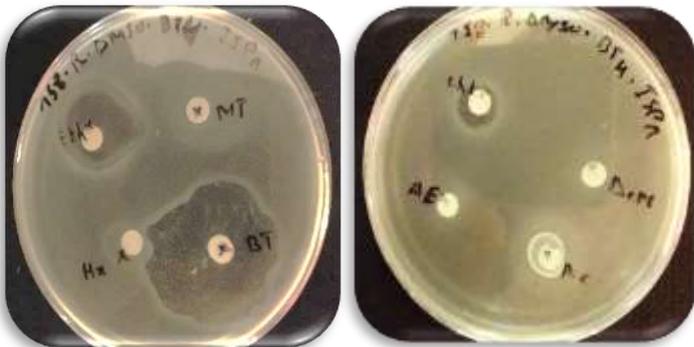
Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition
<b>S97 BT 04</b>	ET	-	10	
	MT	25	17	
	BU	27	15	
	HX	-	-	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	
<b>S97 BT 06</b>	ET	24	-	
	MT	-	-	
	BT	25	-	
	HX	-	-	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S97 contre les souches cible BT1, BT2, BT3, BT5 et BT7 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO

**Tableau 16** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans l'ISP1 extrait avec différents solvants

Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition
<b>S158</b> <b>Dans</b> <b>ISP1</b> <b>Contre</b> <b>BT 02</b>	ET	-	17	
	MT	-	-	
	BU	-	-	
	HX	-	22	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	
<b>S158</b> <b>Dans</b> <b>ISP1</b> <b>Contre</b> <b>BT 03</b>	ET	-	20	
	MT	-	-	
	BT	-	30	
	HX	-	-	
	CHL	-	09	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	
<b>S158</b> <b>Dans</b> <b>ISP1</b> <b>Contre</b> <b>BT 04</b>	ET	-	23	
	MT	-	-	
	BT	-	33	
	HX	-	-	
	CHL	-	13	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	
<b>S158</b> <b>Dans</b> <b>ISP1</b> <b>Contre</b>	ET	-	-	
	MT	-	26	
	BT	22	-	
	HX	-	-	

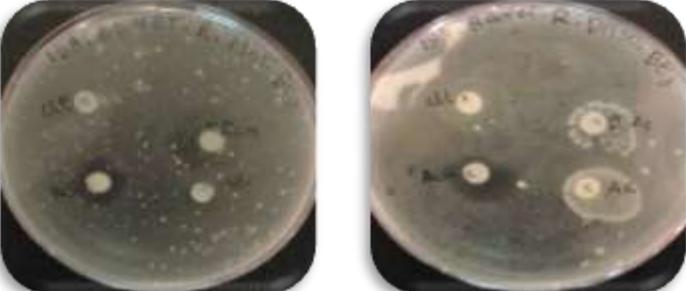
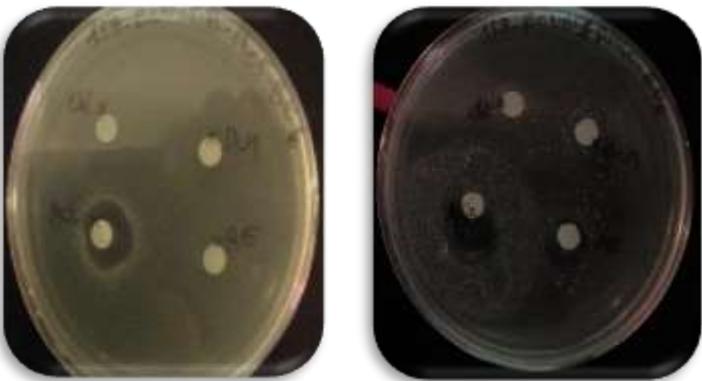
<b>BT 07</b>	CHL	-	14	
	DCM	-	-	
	AC	-	-	
	AE	-	-	

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : le résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le milieu ISP1 contre les souches cible BT5 et BT6 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO

**Tableau 17** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le Bennet extrait avec différents solvants.

Souche	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition	
<b>S158 Dans Bennet Contre BT 03</b>	ET	-	-		
	MT	-	-		
	BU	-	-		
	HX	-	-		
	CHL	-	-		
	DCM	20	-		
	AC	14	17		
	AE	-	-		
<b>S158 Dans Bennet Contre BT 06</b>	ET	-	-		
	MT	-	-		
	BT	-	-		
	HX	-	-		
	CHL	-	-		
	DCM	-	-		
	AC	16	13		
	AE	19	-		

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le milieu Bennet contre les souches cibles BT1, BT2, BT4, BT5 et BT7 avec tous les extraits ne présentent aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO

**Tableau 18** : Résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le GYEA extrait avec différents solvants

	EXTR	RM	RD	La zone d'inhibition
S158 Dans GYEA Contre BT 01	ET	-	-	
	MT	-	10	
	BU	17	-	
	HX	-	-	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	12	
	AE	-	-	
S158 Dans GYEA Contre BT 03	ET	-	-	
	MT	07	-	
	BT	18	-	
	HX	-	-	
	CHL	-	-	
	DCM	-	-	
	AC	-	14	
	AE	-	-	

**AE** : Acétate d'éthyle, **AC** : Acétone, **CHL** : Chloroforme, **DCM** : Dichlorométhane, **ET** : Ethanol,

**HX** : n-Hexane, **MT** : Méthanol, **BT** : n-Butanol. **EXTR** : extrait.

**NB** : Le résultat d'activité antibactérienne de la souche S158 dans le milieu GYEA contre les souches cible BT2, BT4, BT5, BT6 et BT7 avec tous les extraits ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit dans le méthanol ou le DMSO.

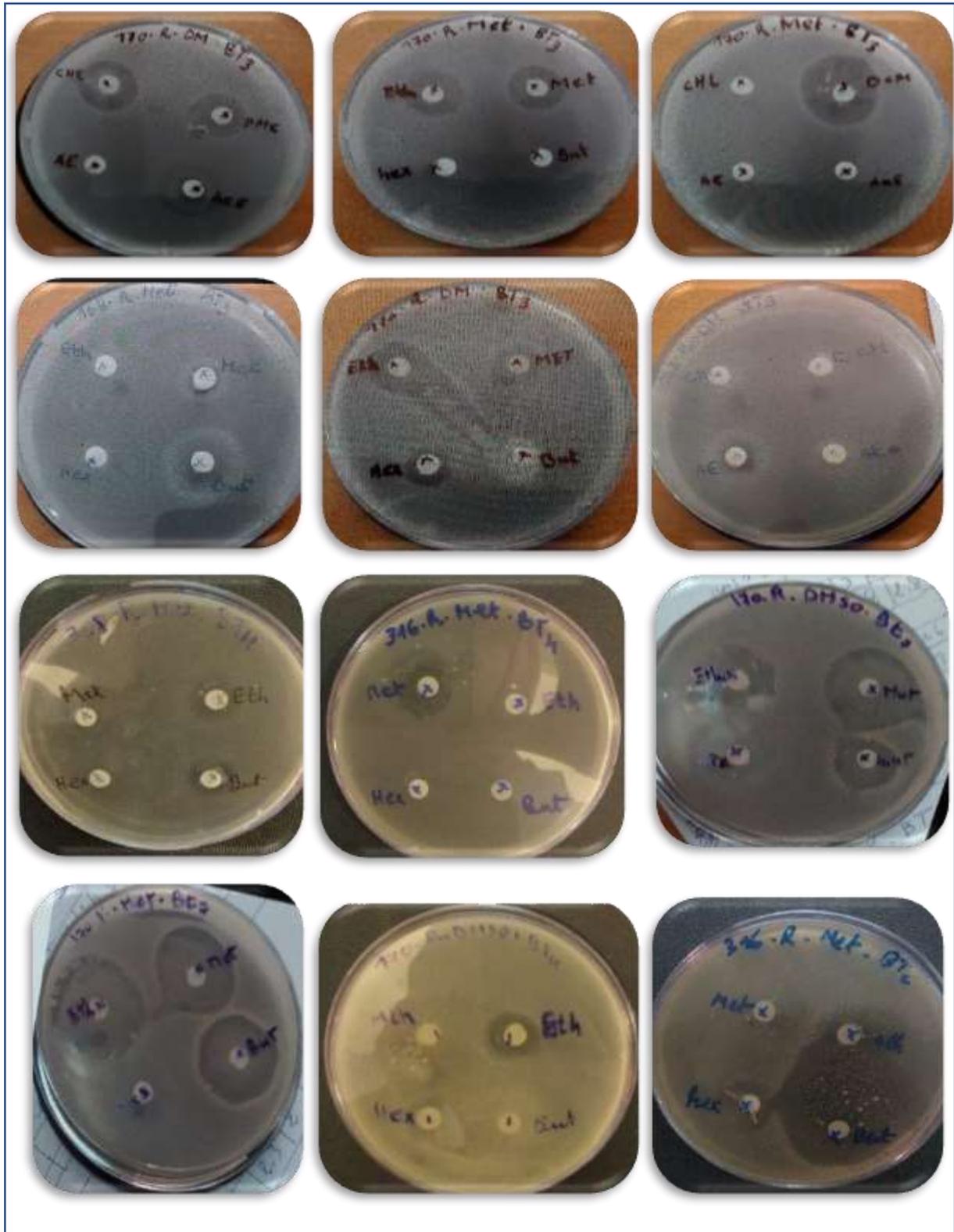


Planche 08 A : Quelques photos des résultats d'activité antibactérienne

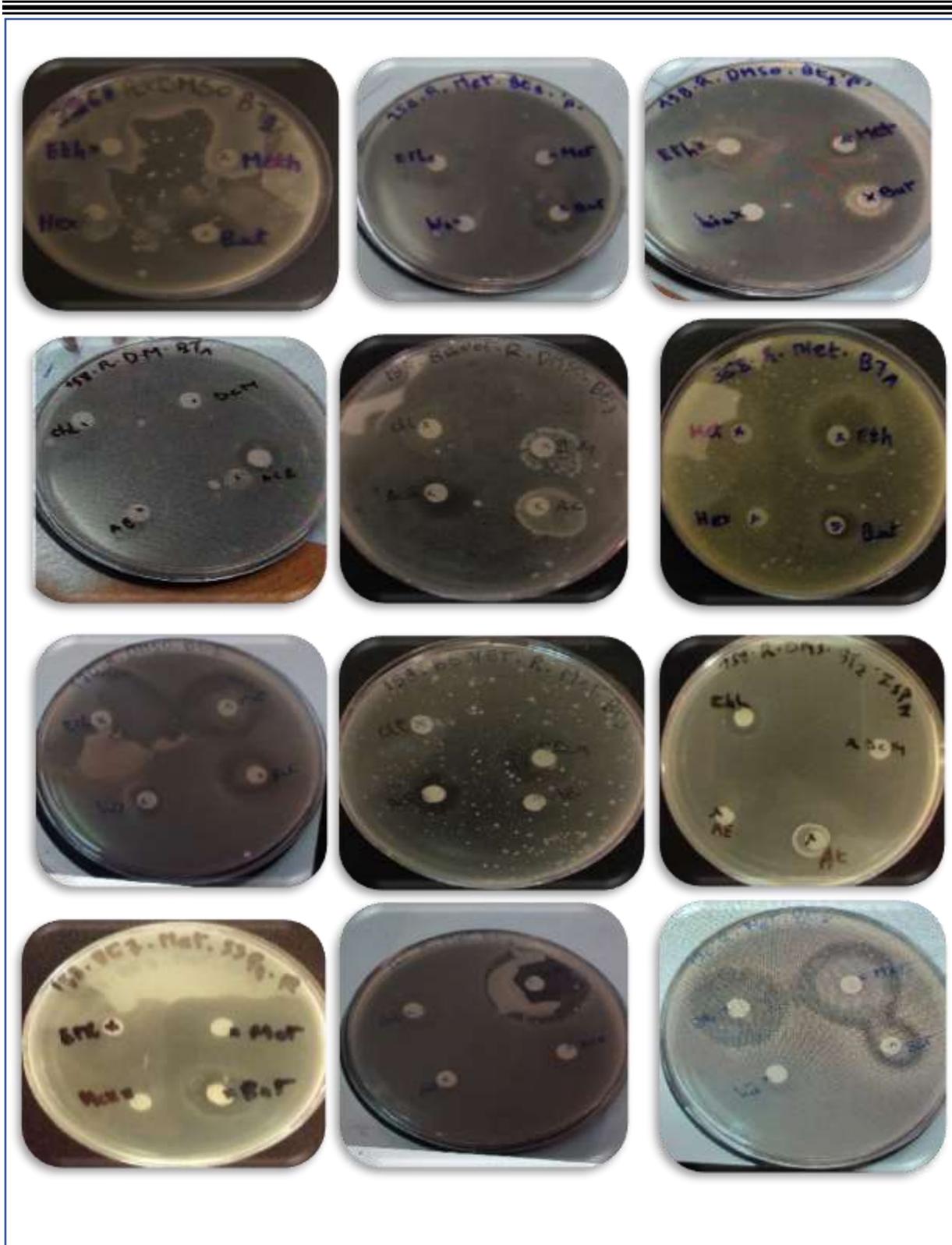


Planche 08 B : Quelques photos des résultats d'activité antibactérienne

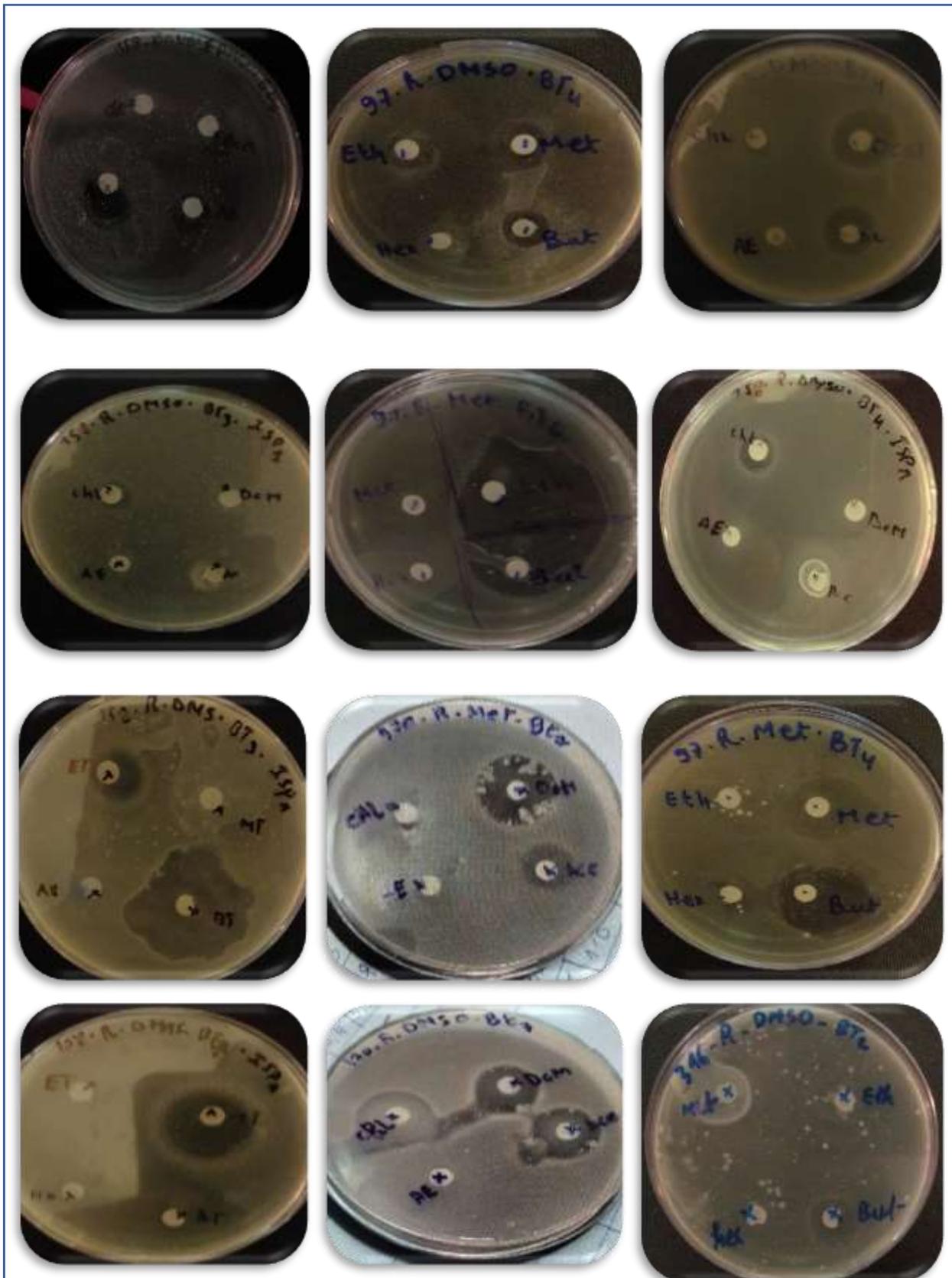


Planche 08 C : Quelques photos des résultats d'activité antibactérienne

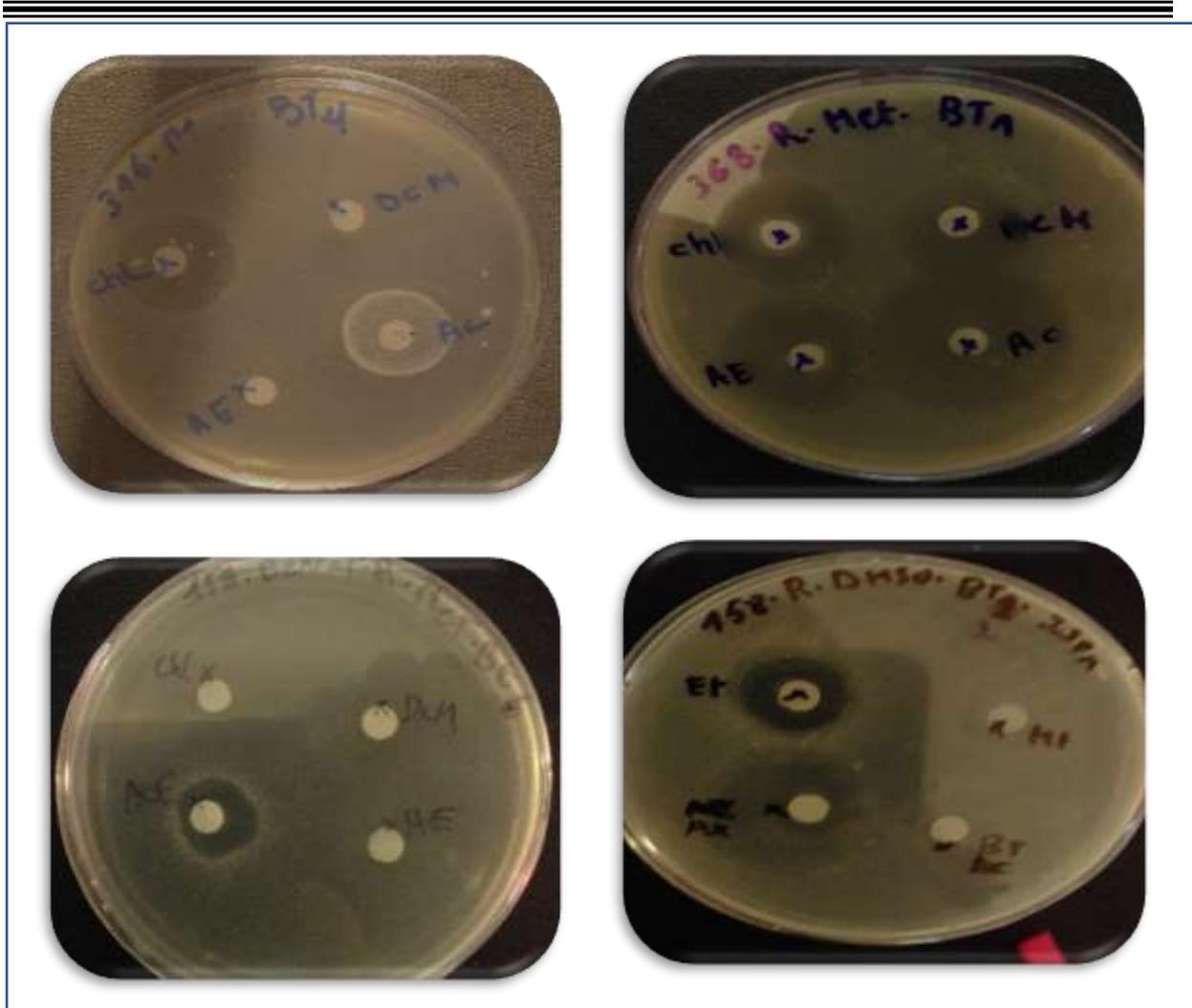


Planche 08 D : Quelques photos des résultats d'activité antibactérienne

Les extraits de la S368 ne montrent aucune activité lorsqu'ils sont dilués dans le DMSO, cela indique que la ou les biomolécules extraites ne sont pas hydrophile, par contre les extraits à l'éthanol, au butanol, au chloroforme, au dichlorométhane dilués dans le méthanol et contre BT01, BT04 donnent des zones d'inhibition comprise entre 12 et 22 mm, et les extraits à l'acétone, à l'acétate d'éthyle contre la même souche teste représentes des zones entre 25 et 33mm.

D'après les résultats obtenus on remarque que les biomolécules produites par les souches S368 sont soluble dans le méthanol beaucoup plus que le DMSO, donc peut dire que ces molécules bioactives sont de nature polyénique non-peptidique.

Les résultats obtenus avec les extraits à l'acétone, à l'acétate d'éthyle, au dichlorométhane des souches S316 diluée dans le méthanol et dans le DMSO ne présentent aucune activité inhibitrice. Par contre les résultats de même souche avec l'extrait au butanol diluée dans le méthanol ou dans le DMSO possèdent une activité antibactérienne caractérisée par des zones d'inhibition comprise entre 15 et 33 mm, et avec les extraits à l'éthanol, méthanol, n-hexane et au chloroforme les zones d'inhibition entre 12 et 22mm de diamètre.

A partir de ces résultats, on peut noter qu'il existe une activité antibactérienne dans un solvant polaire (le butanol) et un de polarité moyenne (chloroforme) et un autre non apolaire (le n-hexane), dont il s'agit une ou plusieurs molécules solubles dans des solvants variés, cette note selon **(Guéret et Hamon, 1981)**.

L'activité antibactérienne presque des tous les extraits organiques dilués dans le méthanol et le DMSO de la souche S170 testé par la souche cibles BT02, BT03, BT04, BT07 donné des zones d'inhibition comprise entre 9 et 31 mm de diamètre. En revanche, sauf l'extrait d'acétate d'éthyle ne présente aucune activité inhibitrice.

L'extrait à l'éthanol démontré le meilleur rendement d'extraction des molécules bioactives de la même souche puisque la plus grande zone d'inhibition est obtenue par celle-ci (31 mm).

A partir de ces résultats on peut dire en principe que la S170 présente une activité inhibitrice contre différentes souches test, avec différents solvants de polarité différente, et les molécules produites c'est une biomolécule de nature polyénique. Dont, La souche S170 possède une activité inhibitrice très importante.

Pour la souche S158, on remarque que les résultats de l'activité antibactérienne changent avec le changement de milieu car la souche cibles BT02, BT04, BT07 sont sensibles aux différentes molécules bioactives présentes dans les extraits du milieu ISP1, Par contre les mêmes souches ne montre aucune activité avec les extraits des milieux GYEA, Bennet.

Les diamètres d'inhibitions de la souche S158 obtenues sur milieu GYEA varient de 07 à 18 mm Par contre, sur le milieu Bennet entre 13 à 20mm et sur le milieu ISP1, elles varient de 09 à 33mm.

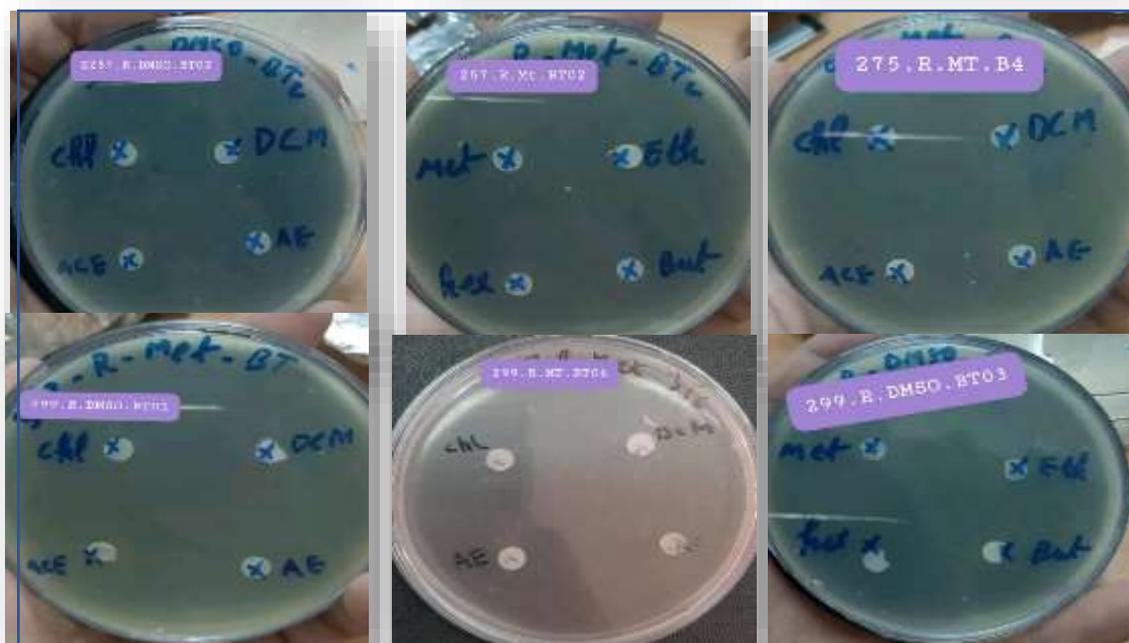
On peut noter à partir de ces résultats, Les molécules bioactives qui inhibe la croissance des souches teste sont des molécules Hydrophiles, car certaines zones d'inhibition ont été obtenues par les extraits dilués dans DMSO. Aussi, elle est sensible aux molécules polaires (butanol, éthanol) et apolaires (n-hexane).

De même, vu que le butanol est les meilleurs solvants d'extraction qui extrait les polyènes cette molécule est de nature polyénique, cette observation selon (Lamari, 2006).

On a détecté une activité antibactérienne variable de la souche S158, en fonction de la nature des solvants et la composition des milieux,

Pour les extraits obtenus par les deux souches S299, S257, on constate l'absence absolu de l'activité antibactérienne contre toutes les bactéries test que ce soit celle diluées dans le méthanol ou dans le DMSO.

En ce qui concerne l'absence de l'activité antibactériens, suppose qu'il s'agit soit de faible concentration des molécules bioactive solubles dans les diffères extraits des deux souches, dont les souches teste ne révèlent pas une sensibilité à ces derniers, elles ont résisté à toutes les molécules bioactives. Ou bien les extraits à une faible solubilité des molécules produites par les deux souches.



**Planche 09** : Quelques photos des résultats nulle de l'extraction antibactérienne des souches S299, S257.

Pour la souche S97, les résultats montrent que l'activité antibactérienne testés par la souche BT06 apparait des zones d'inhibitions comprise entre 23 et 25 mm avec les extraits d'éthanol, butanol dilués dans le méthanol par contre dans le DMSO ne présente aucune activité.

Tandis que, l'activité antibactérienne testés contre la souche BT04 apparait des zones d'inhibitions comprise entre 25 et 27 mm avec les extraits de méthanol, butanol dilués dans le méthanol, et des zones entre 10 et 15mm avec l'éthanol, méthanol, butanol dilués dans le DMSO.

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait butanolique.

D'après ces résultats obtenus on peut noter que la biomolécule produite par la S97 est soluble dans le méthanol plus que le DMSO.

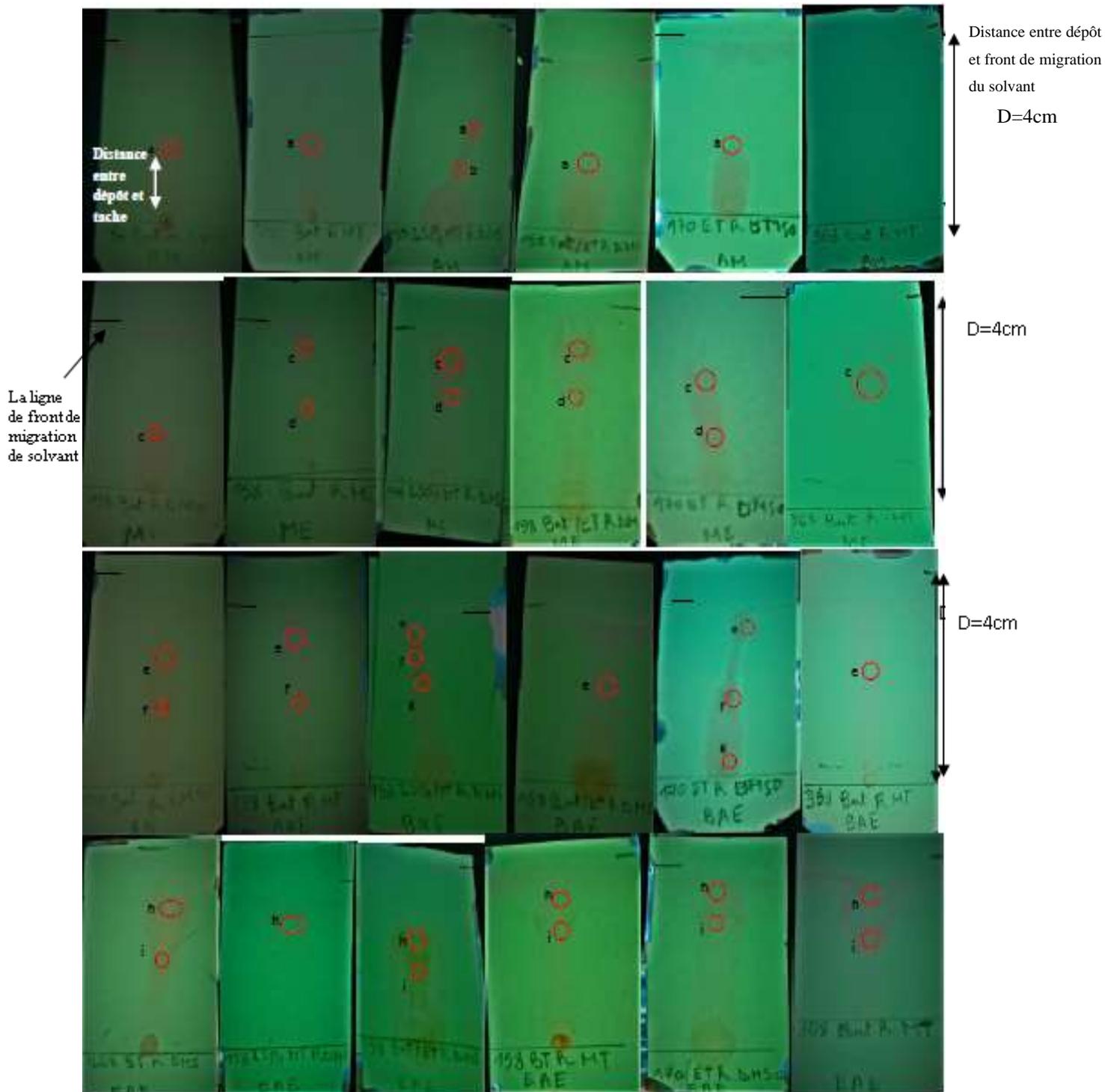
On constate que le butanol qui est un solvant polaire s'est avéré être le meilleur solvant organique utilisé pour extraire les molécules bioactives et cela pour les souches S97 contre les germes *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*

#### **4.3. Chromatographie analytique sur couche mince**

Quatre systèmes de solvants de migration, 'AM' acétate d'éthyle-méthanol (10-1.5, v/v), 'EAE' éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v), 'BAE' n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v), 'ME' méthanol-eau (7/4, v/v), ont été testés pour l'élution des extraits qui a déjà les bonnes zones d'inhibitions dans le test d'activités.

Les systèmes BAE et EAE a été retenu pour les bioautographies, les révélations chimiques car il permet une meilleure séparation des taches qui sont localisées sous UV et à l'œil nu, comparativement au AM et ME.

Les résultats des chromatogrammes élués par les différents systèmes de migration sont représentés dans les planches et le tableau suivants :



**Planche 10 :** résultat de chromatographie des extraits organiques sur couche mince de S158 ; S170 ; S368 dans les 4 systèmes.

**Tableau 19** : les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie

‘AM’ acétate d’éthyle-méthanol (10-1.5, v/v)							
Souche	S158				S170	S368	
Meilleurs extrait	Butanol (GYEA)		Méthanol (ISP1)	Ethanol (ISP1)	Ethanol (GYEA)	Butanol (GYEA)	
Résuspendue dans	DMSO	METHANOL	DMSO	DMSO	DMSO	METHANOL	
Les taches	<b>Rapport frontal</b>						
	A	0.4	0.5	0.3	0.25	0.4	–
	B	–	–	0.25	–	–	–

**Tableau 20** : les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie

‘ME’ méthanol-eau (7/4, v/v)							
Souche	S158				S170	S368	
Meilleurs extrait	Butanol (GYEA)		Méthanol (ISP1)	Ethanol (ISP1)	Ethanol (GYEA)	Butanol (GYEA)	
Résuspende dans	DMSO	METHANOL	DMSO	DMSO	DMSO	METHANOL	
Les taches	<b>Rapport frontal</b>						
	C	0.3	0.9	0.8	0.8	0.75	0.6
	D	–	0.4	0.5	0.5	0.4	–

**Tableau 21** : les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie

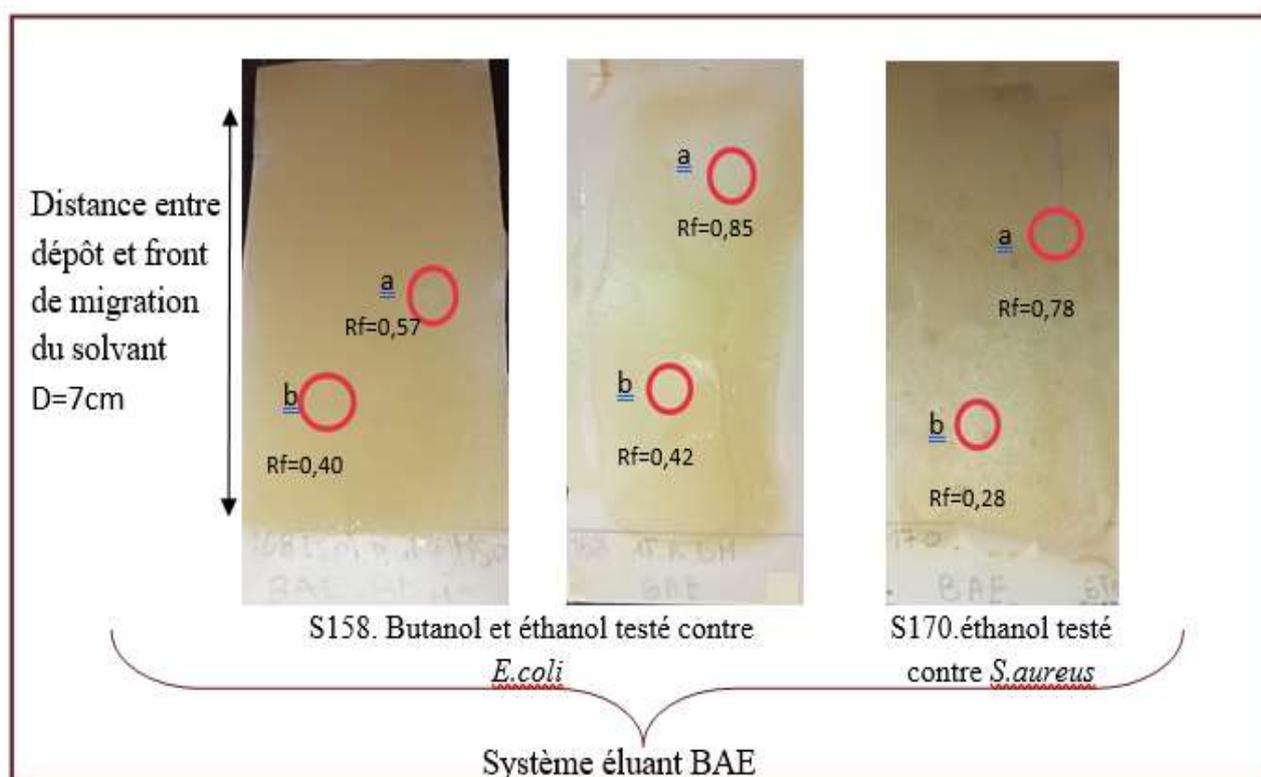
‘BAE’ n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v)							
Souche	S158				S170	S368	
Meilleurs extrait	Butanol (GYEA)		Méthanol (isp1)	Ethanol (ISP1)	Ethanol (GYEA)	Butanol (GYEA)	
Résuspende dans	DMSO	METHANOL	DMSO	DMSO	DMSO	METHANOL	
Les tache	Rapport frontal						
	E	0.6	0.9	0.8	0.75	0.7	0.75
	F	0.4	0.4	0.7	–	0.4	–
	G	–	–	0.5	–	0.1	–

**Tableau 22** : les rapports frontaux des séparations des molécules des extraits des souches par chromatographie

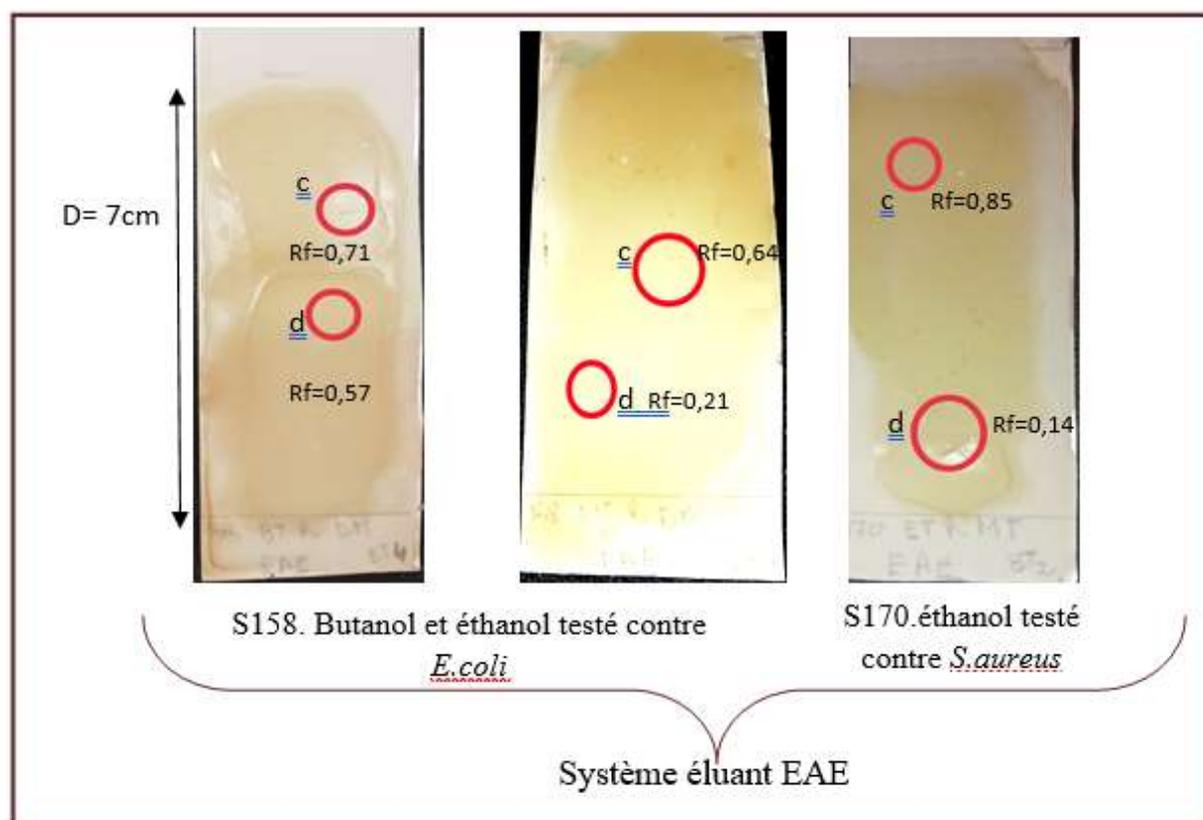
‘EAE’ éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v)							
Souche	S158				S170	S368	
Meilleurs extrait	Butanol (GYEA)		Méthanol (isp1)	Ethanol (ISP1)	Ethanol (GYEA)	Butanol (GYEA)	
Résuspende dans	DMSO	METHANOL	DMSO	DMSO	DMSO	METHANOL	
Les taches	Rapport frontal						
	H	0.6	0.8	0.7	0.6	0.9	0.9
	I	0.4	0.7	-	0.4	0.8	0.7

### 4.3.1. Révélations microbiologiques : bioautographies

La bioautographie consiste à faire migrer les fractions par chromatographique sur couche mince et détecter les taches actives contre la souche cible et cela par révélation microbiologique (Melouah., 2015). Après migration sur les systèmes **BAE** et **EAE** des extraits, les plaques de CCM ont fait l'objet d'une bioautographie contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* voir (Tableau 23). Les résultats des bioautographies des extraits après deux jours d'incubation présentes dans les figures et le tableau suivants ;



**Figure 09** : Localisation par bioautographie des activités des meilleurs extraits testés contre les germes cibles (système **BAE**).



**Figure 10 :** Localisation par bioautographie des activités des meilleurs extraits testés contre les germes cibles (système **EAE**).

**Tableau 23 :** les Rf des taches actives par bioautographie

		'BAE' n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v)		
Souche		S158		S170
Meilleurs extrait		Butanol	Ethanol	Ethanol
Le germe cible		<i>Escherichia coli</i>		<i>S. aureus</i>
Les taches	<b>Rapport frontale</b>			
	A	0.57	0.85	0.78
	B	0.40	0.42	0.28
	<b>'EAE' éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v)</b>			
	<b>Rapport frontale</b>			
	C	0.71	0.64	0.85
D	0.57	0.21	0.14	

Dans le système 'BAE' n-butanol-acide acétique-eau (6/2/2, v/v/v) on révélant deux taches active notée a et b ayant une action à la fois contre *Escherichia coli*, *S. aureus*.

Dans le système 'EAE' éthanol-ammoniac-eau (8/1/1, v/v/v) on révélant aussi deux tache active notée c et d ayant une action à la fois contre *Escherichia coli*, *S. aureus*.

#### 4.3.2. Détection des molécules bioactives par révélation chimique

Parallèlement aux bioautographies, des plaques similaires de CCM ont fait l'objet de révélations chimiques.

La tache 'A' réagit positivement avec la ninhydrine (révélateur des amines en violet), et le formaldéhyde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (révélateurs des aromatiques polycycliques), et le FeCl<sub>3</sub> (révélateur des phénols et des acides hydroxamiques en rose). Ceci suppose la présence d'une molécule bioactive aromatique polycyclique aminé contient des acides hydroxamique dans sa structure. La tache 'b' réagit positivement avec la ninhydrine, et le FeCl<sub>3</sub>. Ceci suppose la présence d'une molécule bioactive aminé contient des acides hydroxamique dans sa structure.



Figure 11 : Détection des molécules bioactives par révélation chimique avec les trois révélateurs.

|

# *Conclusion*

Les Actinomycètes constituent un groupe de micro-organismes intéressant qui secrets des métabolites d'une importance dans le domaine médicale aujourd'hui.

Les résultats obtenus dans la présente étude qui entre dans le cadre de l'axe d'étude de la diversité métabolique et extraction des biomolécules produites par des souches d'actinomycètes montrent que :

Les résultats des études métabolique a révèle le pouvoir de biodégradation de différentes molécules par certain isolat étudié qui possèdent une fréquence importante d'activités enzymatique en terme cellulolytique, amylolytique, on la capacité de dégrade l'amidon, la caséine, la gélatine...etc.

L'activité antibactérienne des extraits organiques à polarité différente des sept souches d'actinomycètes a été testée sur sept bactéries pathogènes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Bacillus*) et à Gram négatif (*Escherichia coli* *Salmonella* *Klebsiella* sp). Les cinq souches d'actinomycètes étudiées sont actives envers au moins une bactérie.

Les deux souches S170et S158 sont sélectionnées comme les souches les plus productrices d'antibactériens, possèdent une activité très importante et cela contre presque toutes les bactéries cibles avec des zones d'inhibition plus importantes (80% des bactéries tests sont sensibles).

Le test d'activité des extraits organiques indique que le butanol et l'éthanol serait les meilleurs extracteurs,

La révélation microbiologique par bioautographie avec les extraits Butanolique et l'éthanol des deux souches 170 et 158 à Activité antibactérienne intéressante.

Dans ce travail on peut conclure que les actinomycètes possèdent une diversité métabolique importante ce qui leur permet à se développer sur divers substrats et coloniser différentes niches écologiques.

Aussi constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes.

## Référence Bibliographique

### A

- ❖ Abbas, I. H. (2006). A biological and biochemical studies of actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res*, 2(10), 809-815.
- ❖ Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., Agastian, P., & Ignacimuthu, S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale*, 19(1), 22-28.
- ❖ Ait Barka, E. Vatsa, P. Sanchez, L. Gaveau-Vaillant, N. Jacquard, C. Klenk, HP. Clément, C. Ouhdouch, Y. Van Wezel, GP. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. (80).1-43.
- ❖ Angehrn P., Buchanans., Funk C., Goetschi E. (2004) New antibacterial agents derived from the dna gyrase inhibitor cycloethiridine. *J. Med. Chem* 47.1487.1513.

### B

- ❖ Barry A.L., Garcia F. et Thrupp L.D. 1970. An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am J Clin Pathol*. 53 : 149- 158. prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M ; Bell. J.A ; Lilburn. T.G, Springer. New York Berlin Heidelberg.
- ❖ Becker, M. H., (1974). A new approach to explaining sick-role behavior in low-income populations. *American journal of public health*, 64(3), 205-216.
- ❖ Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K., & Beaulieu, C. (2002). Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 49-54.
- ❖ Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- ❖ Boer, W. de, Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world : Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 795-811.
- ❖ Bouaziz S. (2018). Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. P : 4-13.

- ❖ BOUDJELAL-BENCHEIKH, F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97.
- ❖ Boussaber, E., Kadmiri, I., Hilali, L., & Hilali, A. (2012). Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *Science Lib Editions Mersenne*, 4, 1-21.
- ❖ Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., & Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Aïn Mlila. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 5-10.
- ❖ Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., & Boulahrouf, A. (2012, March). Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 70, No. 2, p. 169).
- ❖ Breton, A., Theilleux, J., Sanglier, J., & Viobis, G. (1989). Organismes producteurs : Biologie, taxonomie et écologie. Larpent JP, et Sanglier JJ (eds) *Biotechnologies des antibiotiques*. Masson, Paris, 33-70.
- ❖ Bennamoun L. (2017). Isolement, sélection de souches levuriennes de sols arides sahariens (El-M'gheir). Productrices de polygalacturonase : purification et caractérisation enzymatique. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri-Constantine 1. P : 37-40.
- ❖ Berdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.*, 65 : 385–395.
- ❖ Bouaziz S. (2018). Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. P : 4-13.
- ❖ Boudjelal-Bencheikh F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P : 5-35.
- ❖ Barry A.L., Garcia F. et Thrupp L.D. 1970. An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am J Clin Pathol.* 53 : 149-158. procaryotes. Second edition. Garrity. G.M ; Bell. J.A ; Lilburn. T.G, Springer. New York Berlin Heidelberg.

## C

- ❖ Cook, A. E., & Meyers, P. R. (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1907-1915.
- ❖ Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., & Ousley, M. A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3899-3905.
- ❖ Chater, N., (1999). Ten years of the rational analysis of cognition. *Trends in cognitive sciences*, 3(2), 57-65.
- ❖ Conn. V.M. (2005). Molecular Interactions of endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. Adelaide, South Australia. pp 297.

## D

- ❖ Dastager S. Dayanand A. Li WJ. Kim CJ. Lee JC. Park DJ, et al (2008). Proteolytic activity from an alkalithermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Curr Microbiol*; 57(6):638–642.
- ❖ Demain A.L.(1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms *Appl.Microbiol .Biotechnol.*52:455-463.
- ❖ Delmotte, A. (1958). L'activite lipolytique microbienne decelée par la methode de Sierra avec reference speciale au *M. pyogenes* var. *aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 24(1), 309-320.
- ❖ Djinni I. (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées production de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Bejaia. Thèse de Magister. Université. A. Mira-Bejaia. 154 p.
- ❖ Djinni, I., (2018). *Streptomyces thermoviolaceus* SRC3 strain as a novel source of the antibiotic adjuvant streptazolin: A statistical approach toward the optimized production. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 161-168.
- ❖ Dickner-Ouellet L. (2018). Optimisation de l'usage des coproduits dans l'alimentation des porcs en croissance : impact du type de fibre et de la xylanase sur la digestion des nutriments. Thèse de Doctorat. Université LAVAL Québec-Canada. P : 36-38.
- ❖ Demain A.L. and Solomon N.A.1985. *Biology of industrial microorganisms*. Edition: The Benjamin/ Commings Publishing Company, London, p. 291–357.

## *E*

- ❖ El-Mehalawy, A. A., Hassanein, N. M., Khater, H. M., El-Din, E. K., & Youssef, Y. A. (2004). Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int J Agric Biol*, 6(4), 599-605.
- ❖ El-Sersy N., Abd-Elnaby H., Abou-Elela G. M., Ibrahim H. A. H. and El-Toukhy N. M. K. 2010. Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr Journal Biotechnol* 9 (38): 6355-6364.

## *G*

- ❖ Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., & Tindall, B. J. (2007). Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007; Part 1- The "Archea", Phyla "Crenarchaeota" and "Euryarchaeota". *Taxonomic Outline*, 551, 73.
- ❖ Goodfellow, M. (1989). Supregeneric classification of actinomycetes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2333-2339.
- ❖ Gerois J., Gianotta F., De Buyl E., Garnier B., Frère J.M., (2008). Purification and properties of three endo b-1-4 xylanases produced by *Streptomyces* sp. Strain S38. *Enzyme Microb. Technol.* 26 : 178-186.
- ❖ Geraldine, O. (1981). Low-temperature hydrogen transfer and cracking catalysis in molten  $SbCl_3-AlCl_3$ . *Fuel*, 60(8), 694-698.
- ❖ Ghribi M. (2019). La biodiversité microbienne des déchets (boues, papetières et huiles usées) et son potentiel d'application enzymatique. Thèse de Doctorat. Université du Québec à TroisRivières. P : 20
- ❖ Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E., Pang, C.H.-N. 1974. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24, 54–63.
- ❖ Gordon, R. E., & Smith, M. M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I: Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *Journal of bacteriology*, 66(1), 41-48.
- ❖ Geraldine, M., Schofield, M., Schaal, K. P. 1981. A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J Gen Microbiol.* 127(2): 237–259.

- ❖ Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (1984). - Introduction to and importance of the actinomycetes. In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp. 1-6.H
- ❖ Hitesh J., Nimita U., Darshan D., Manthan K., Shilpa S., and Jagdish P., (2016). Isolation, Optimization and Production of Cellulase by *Aspergillus niger* from Agricultural Waste. *Journal of pure and applied microbiology*. 10(2) : 1159-1166

### ***H***

- ❖ Hamraoui, M., Osman, T., Boucheffa, A., & Rashidi, M. M. (2011). Analytical modelling of the three-dimensional steady-state temperature in a bearing ring. *Mechanics & Industry*, 12(1), 1-4.
- ❖ Hopwood, D. (1973). Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Fixation in histochemistry*, 47-83.

### ***J***

- ❖ Janaki T., (2017). Enzymes From Actinomycetes. *International Journal of ChemTechResearc*.10(2) : 176-182
- ❖ Jean C., C.J.C., Gérard C., Bernard F., (2004). Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestives, John Libbey. Euro. text, Paris. Pp 71.

### ***K***

- ❖ Kämpfer, P. (2010). Actinobacteria. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- ❖ Kitouni, M. (2007). *Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Constantine: Université Mentouri, 2007: 68-71).

## *L*

- ❖ Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4), 435-443.
- ❖ Li, S., Chen, C., Zhang, H., Guo, H., Wang, H., Wang, L., Zhang, X., Hua, S., Yu, J., & Xiao, P. (2005). Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral research*, 67(1), 18-23.
- ❖ Larreta., Garde V.,( 1997). *Enzymes en Agroalimentaire*. Edition Lavoisier. Pp.179-361.
- ❖ Limkhada, J.R. ;Mander, P. ; Cho, S.S. and Yoo, J.C. 2010. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684.*ProcBiochem*. 45: 88-93.

## *M*

- ❖ Marmur, J., & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of molecular biology*, 5(1), 109-118.
- ❖ Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R. B., Sioud, S., Salem, M., & Bejar, S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology*, 154(5), 345-352.
- ❖ Merouane, F. (2016). Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c, et tests biologiques.
- ❖ Meziani.A., Mahcene.H., (2017). Activités hydrolases des souches fongiques : Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium*. sp sur substrat solide. Thèse de Master Biotechnologie des Mycètes. Université de Mentouri Constantine.
- ❖ Mobini-Dehkordi M and Fahime A.J. 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology.
- ❖ Mohammadipanah F. and Wink J. (2016). Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity . *Front. Microbiol*. 6: 1541.
- ❖ Mukhtar S., Ahmad Z., Dalaq A., Kauser A. M., and Samina M., (2017). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*.10 : 316-319.

- ❖ Mukhtar S., Zaheer A., Aiysha D., Abdulla Malik K and Mehnaz S.2017. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *J Proteomics Bioinform* 10: 316-319.
- ❖ Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. 2000. Streptomycetes: A new model to study cell death. *J. Cell. Biol.* 3: 153–158.

## *N*

- ❖ Naikpatil, S. V., & Rathod, J. (2011). Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*.
- ❖ Navarre., Françoise I., (2010). *L'œnologie*. 7ème Edition.pp39 et 42.
- ❖ Nicemol C., Asha P., Prem., (2008). Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Journal Bioresource Technology*.99:6697–6701.

## *O*

- ❖ O'Donnel A. G., Minnikin D. E. and Goodfellow M., (1988). Integrated lipid and wall analysis of actinomycete. In “chemical methode in bacterial systematic” (Goodfellow M.and Minnikin D.E., coord)PP131-143, ac press.,London.
- ❖ Omura, S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Science & Business Media.
- ❖ Ouargli Moufida,2018. Les actinomycètes producteurs de molécules bioactives .Thèse Doctorat. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA. P: 21.

## *P*

- ❖ Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- ❖ Prescott, C. E. (2010). Litter decomposition: what controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils?. *Biogeochemistry*, 101(1), 133-149.
- ❖ Pierre F., (2000). Livre le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae.123p.

## *R*

- ❖ Rajeeva G., Soni.T., (2015).Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07.*Journal of BMC Biotechnology*.15 :19.

- ❖ Ramananarivo, R. (2017). Activités biologiques d'actinomycètes du sol sous baobabs dans les parties ouest et moyen ouest de Madagascar (Doctoral dissertation, Université D'Antananarivo). P : 40
- ❖ Ravi Ranjan K., Vasantba J., Bhoomi M., Bonisha T., Bhumika C. 2015. Antibacterial Potentials of Actinomycetes Isolated from Gujarat. *Int Journal Pharm Sci Rev Res* 30(15) :78-83.
- ❖ Roth, B. J., Johnson, D. H., Einhorn, L. H., Schacter, L. P., Cherng, N. C., Cohen, H. J., ... & Greco, F. A. (1992). Randomized study of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus etoposide and cisplatin versus alternation of these two regimens in extensive small-cell lung cancer: a phase III trial of the Southeastern Cancer Study Group. *Journal of clinical oncology*, 10(2), 282-291.

## S

- ❖ Saker, R. (2015). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes.
- ❖ Smaoui, S. (2010). *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés* (Doctoral dissertation).
- ❖ Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 479-491.
- ❖ Stackebrandt, E., & Woese, C. R. (1981). The evolution of prokaryotes (Vol. 32, p. 1-31).
- ❖ STACKEBRANDT, E., WUNNER-FÜSSL, B., FOWLER, V. J., & SCHLEIFER, K.-H. (1981). Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among sporeforming members of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 31(4), 420-431.
- ❖ Saci A. (2011). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine. P : 10-12.
- ❖ Saci .A (2012). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchet d'orange .Thèse de Magister : écologie. constantine, Algérie : Université Mentouri. p21-10
- ❖ Sahoo K., Sahoo R. K., Gaur M. et Subudhi E. (2019). Isolation of cellulase genes from thermophiles. A novel approach toward new gene discovery. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. P : 151-169.

- ❖ Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A., (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7: 373-390.
- ❖ Shum, D., Smith, J. L., Hirsch, A. J., Bhinder, B., Radu, C., Stein, D. A., ... & Djaballah, H. (2010). High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay and drug development technologies*, 8(5), 553-570.

## **T**

- ❖ Tanveer P., Shashank G., Joginder S., Ashish V., Manish K., Naseem G., MadhuBala., Reiaz R., Ajit V., Vivek K., and Manoj K., (2014). Characterization of Actinomycetes and Trichoderma spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *Journal of Spirnger*, 3:622
- ❖ Tsujibo, H., Okami, Y., Tanno, H., Inamori, Y. 2003. Cloning, sequence and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Journal of Bacteriology*: 175-181.

## **W**

- ❖ Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, L., Moore, W., Murray, Rge., & Stackebrandt, E. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- ❖ Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703
- ❖ . (Williams S.T. and Cross T . (1971). "Actinomycete isolated from rice -field soil in thailand. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol...*,56.1257-1261).
- ❖ Williams, S. T., & Cross, T. (1971). Chapter XI actinomycetes. In *Methods in microbiology* (Vol. 4, pp. 295-334). Academic Press.

## **Z**

- ❖ Zhang X .Z., Zhang Y.H. P.,(2013). Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. *Biotechnol. Bioeng.* 94 : 888 – 898.

## **ANNEXE**

### **I. Les milieux des cultures**

1. Les compositions des milieux utilisés pour l'étude morphologique des actinomycètes

#### **1.1. Les milieux ISP**

##### **ISP1**

Tryptone.....5g

Extrait de levure .....3g

Agar .....20g

H2O distillée .....1000ml

PH : 7.0 a 7.2

##### **ISP 2**

Extrait de levure.....4g

Extrait de malt.....10g

Glucose.....4g

Agar...20g

H2O distillée.....1000ml

PH : 7.2

2. Composition des milieux utilisés pour l'étude de la biodégradation

#### **2.1 Milieu amidon 1%**

GN.....100ml

Amidon .....1g

#### **2.2 Milieu caséine 5%**

Eau

Distille.....100ml

Agar .....2g

Caséine soluble .....5g

PH : 6 à 6.5

#### **2.3 Milieu de test action sur le lait écrémé 10%**

Eau distille .....100ml

Lait écrème.....10g

#### **3.4 Milieu de test d'estérase**

NaNO<sub>3</sub>.....1g

Extrait de levure .....5g  
Solution saline ...50ml  
Ca Cl 2 2H2O.....0.1g  
Tween 80.....10ml  
Agar .....18g  
Eau distille.....1000ml

### **2.5 Citrate de Simmons**

Citrate de Simmons.....28.29g  
Eau distillée .....1000ml  
PH : 6 à 6.2

### **2.6 Bouillon**

3.8 Milieu Mueller  
Hinton Infusion de viande .....300g  
Hydrolysate de caséine .....17.5g  
Amidon .....1.5g  
Agar .....17g  
PH : 7.4

### **2.9 Gélose Columbia au sang de cheval à 5% « COS »**

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....10g  
Hydrolysate de protéine animales (bovin ou porcin).....10g  
Peptone de coeur (bovin ou porcin) .....3g  
Amidon de maïs .....1g  
Chlorure de sodium .....5g  
Agar .....13.5g  
Sang de cheval .....5ml  
PH : 7.3

## **3. Composition des milieux utilisés pour l'étude de la bio activité**

### **3.1 Milieu Bennet**

Glucose.....10g  
Extrait de levure.....1g  
Tryptone.....2g  
Extraits de viande.....1g

Agar.....18g  
Eau distille.....1000ml  
PH : 7,3

### **3.2 Milieu GYEA**

Extrait de levure.....10g  
Glucose.....10g  
Agar.....18g  
Eau distille.....1000ml  
PH : 6,8

### **3.3 Milieu LB solide**

Treptone.....10g  
Extrais de levure.....5g  
Na Cl.....10g  
Agar.....20g  
Eau distilles ...1000ml  
PH : 7,2

### **3.4 Milieu LB mole**

Trepton.....4g  
Extrais de levure.....2g  
Na Cl.....2g  
Eau distille.....800ml  
PH : 7.2

### **3.4Milieu LB Liquide**

Treptone.....10g  
Extrais de levure.....5g  
Na Cl.....10g  
Eau distilles .....1000ml  
PH : 7,2

## II. REVELATEURS CHIMIQUES UTILISENT POUR LES TACHES ACTIVES

**1.- Chlorure de fer ferrique (FeCl<sub>3</sub>) :** révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

\* Solution de vaporisation : solution de FeCl<sub>3</sub> de 1 à 5% dans HCl 0,5N. Les taches correspondant aux phénols sont colorées en bleu-vert et celles des acides hydroxamiques, en rose.

**2.- Formaldéhyde - acide sulfurique :** révélateur des aromatiques polycycliques.

\*Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 mL d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Les taches apparaissent de diverses couleurs (brunes, blanchâtres, etc.).

**3.- Ninhydrine :** révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et des phospholipides

contenant la phosphatidyléthanolamine.

\* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 mL d'éthanol.

Traitement complémentaire : chauffer à 110°C (5 à 10 min) jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette ou rose).