



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



كلية العلوم الدقيقة والعلوم الطبيعية والحياة  
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES  
ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Université de Larbi Tébessi-Tébessa-

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

Département : des sciences de la nature et de la vie

**MEMOIRE DE MASTER**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Biologie moléculaire

Option: Microbiologie Appliquée à la santé et à l'Environnement

Thème:

**Recherche de molécules bioactive produites par les  
*Actinomycètes* : essai préliminaire d'extraction des  
biomolécules**

*Présenté par:*

*Melle*

*Metrouh Roumaissa*

*Melle*

*Slim Fatma Zohra*

*Devant le Jury :*

Dr.Boukoucha.M

MmeBenhadj.M

Dr.Debebzza.M

M.C.B Université de Tébessa

M.A.A Université de Tébessa

M.C.B Université de Tébessa

Président

Promotrice

Examinatrice

Date de soutenance : 25mais 2017



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 : des sciences de la nature et de la vie

## MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Biologie moléculaire

Option: Microbiologie Appliquée à la santé et à l'Environnement

Thème:

**Recherche de molécules bioactive produites par les  
*Actinomycètes* : essai préliminaire d'extraction des  
biomolécules**

*Présenté par:*

*Melle*

*Metrouh Roumaissa*

*Melle*

*Slim Fatma Zohra*

*Devant le Jury :*

Dr.Boukoucha.M

Mme Benhadj.M

Dr.Debezza.M

M.C.B Université de Tébessa

M.A.A Université de Tébessa

M.C.B Université de Tébessa

Président

Promotrice

Examinatrice

Date de soutenance : 25mai 2017

Note	Mentien
16/20	très bien



Université Larbi Tébessi - Tébessa



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

## Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : M. Mehrez Roumaïssa  
Régulièrement inscrit(e) en Master au département : des Sciences de la Nature et de la Vie  
N° de carte d'étudiant : 4024659  
Année universitaire : 2016 / 2017  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biologie moléculaire  
Spécialité : Microbiologie Appliquée à la Santé et à l'Environnement

Intitulé du mémoire : PS  
Recherche de molécules bioactives produites par les Actinomycètes : essai préliminaire d'extraction des biomolécules

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

### Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

05 جويل 2017



Fait à Tébessa, le 04 - 06 - 2017

Signature de l'étudiant(e) :

الجامعة الجزائرية  
البيولوجيا  
معرفة الحياة  
عنه



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

### Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *slim Tatma Zaoua*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : *des sciences de la nature et de la vie*

N° de carte d'étudiant : *4059682*

Année universitaire : *2017*

Domaine : *science de la Nature et de la vie*

Filière : *science Biologie*

Spécialité : *Microbiologie Appliquée à la santé et à l'environnement*

Intitulé du mémoire : *Recherche de molécules Bioactives produites par les Actinomycètes : essai préliminaire d'extraction des Biomolécules*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

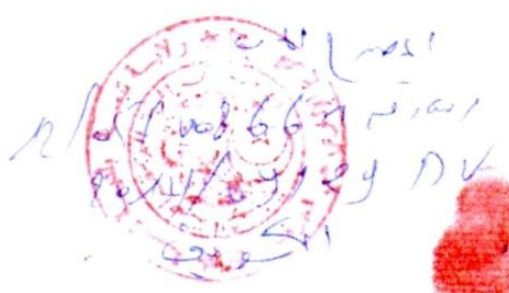
2017 06

Fait à Tébessa, le :

2017 06

Signature de l'étudiant(e) :

*slim*



المصنفة على الإضمار





## ملخص

الاكتينومييسات هي مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة مثيرة للاهتمام. فهي تعتبر من المنتجين لمعظم المضادات الحيوية ذات الأهمية الواسعة في المجال الطبي ليومنا الحالي . هذه البكتيريا الخيطية موجبة الغرام سائدة في الطبيعة تتوزع في مجموعة متنوعة من الوسائط البيئية.

من خلال هذه الأطروحة، نحن مهتمون بإثبات أن 20 عزلة من الأكتينومييسات المختارة من مخبر الميكروبيولوجيا بجامعة باجي مختار بعنابة تملك نشاط مضاد للبكتيريا و كذلك للفطريات ضد سلالات مستهدفة هي البكتيريا *Staphylococcus aureus* و الخميرة من نوع *Candida* و الفطر *Aspergillus niger* .

ان الفحوصات التي أجريت لاختبار النشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات المستهدفة كانت عن طريق تقنية الاسطوانة اجار او بما تسمى طريقة نشر في وسط الزرع ,اما بما يخص البحث عن النشاط المضاد للفطريات فتم عن طريق تقنية الخطوط العرضية او بما تعرف بالتصدعات العرضية و بتقنية الأسطوانات اجار ايضا. استخلاص هذه الجزيئات الحيوية كان من وسط زرع صلب عن طريق استعمال عدة محاليل. تم التحقق من نتائج الاستخلاص عن طريق تقنية الأسطوانات و طريقة الأبار على السلالة الاكثر حساسية.

اختبارات البحث عن النشاط الميكروبي و اختبارات الاستخلاص بينت أنّ سلالات الأكتينومييسات الخاضعة للفحوصات هي مرشحات مهمة لصناعة الجزيئات الحيوية ذات الطبيعة المختلفة و التأثير. سواء ضد البكتيريا أو ضد الفطريات.

في النهاية , ختمنا عملنا بالبحث عن دراسة الصفات الأيضية للسلالات المختارة ( S129 a,S130,S368 ,S450 ) والتي بينت أنّ هذه السلالات لديها تنوع مهمة في النشاط الانزيمي.

من خلال هذا العمل استطعنا أن نسلط الضوء على القدرة الكبيرة المضادة للمكروبات و كذلك الأيضية لعزلات الأكتينومييسات.

**الكلمات المفتاحية:**الاكتينومييسات، الجزيئات النشطة بيولوجيا، مضاد للبكتيريا، مضاد للفطريات ، الاستخلاص

## Abstract

The Actinomycet is a group of interesting microorganisms. It is a producer of the most important antibiotics in the medical field today. These Gram-positive nematode bacteria are prevalent in nature and are distributed in a variety of environmental media.

Through this thesis, we are interested in demonstrating that 20 isolates of selected Actinomycetes from the microbiology laboratory at Baji Mukhtar University in Annaba have antibacterial activity as well as antifungal against the target strains of *Staphylococcus aureus* and Yeast of the type *Candida* and filamentous fungus *Aspergillus niger*.

The screening of the antibacterial activity of the selected strains was demonstrated by the technique of agar cylinders, diffusion method on agar medium, with regard to the investigation of the antifungal activity was carried out by the method of streaks Crossed and that of agar cylinder. The extraction of these biomolecules has been carried out from solid media with organic solvents. The results of the extraction are checked by the disc method and the well method on the most sensitive strain.

The activity tests and those of the organic extracts indicate that the strains of the Actinomycetes tested are important candidates in the production of bioactive molecules of different nature against various microorganisms.

In the end, we completed our work with the metabolic characterization of representative isolates S129a, S130, S386 and S450, which showed that their strains exhibited a high frequency of enzymatic activity.

At the end of this work, it was possible to demonstrate a broad antagonist and metabolic capacity of the Actinomycetes isolates.

**Key words:** Actinomycete, bioactive molecules, antibacterial, antifungal, extractions.

## Résumé

Les Actinomycètes constituent un groupe de micro-organismes intéressants. Ils sont déjà les fournisseurs de la plupart des antibiotiques d'une importance dans le domaine médical aujourd'hui.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés, a révélé que les 20 souches d'Actinomycètes choisies parmi une collection de laboratoire de Annaba sont douées d'activités antibactérienne et antifongique contre des souches-cibles dont la bactérie *Staphylococcus aureus*, la levure de genre *Candida* et le champignon *Aspergillus niger*.

Le screening de l'activité antibactérienne des souches sélectionnées a été mis en évidence par la technique des cylindres d'agar, méthode de diffusion en milieu gélosé, en ce qui concerne la recherche de l'activité antifongique a été réalisée par la méthode de stries croisées et celle de cylindre d'agar. L'extraction de ces biomolécules a été réalisée à partir des milieux solides avec des solvants organiques. Les résultats de l'extraction ont été vérifiés par la méthode des disques et la méthode des puits sur la souche la plus sensible.

Les tests d'activités et celles des extraits organiques indiquent que les souches des Actinomycètes testés sont des candidats importants dans la production des molécules bioactives de nature différentes contre divers microorganismes.

En fin de compte, nous avons terminé notre travail par l'étude des caractères métaboliques des isolats représentatifs **S129a**, **S130**, **S386** et **S450**, qui ont montré que ces souches ont présenté une fréquence importante d'activités enzymatiques.

A l'issue de ce travail on a pu mettre en évidence une large capacité antagoniste et métabolique des isolats d'Actinomycètes.

**Mots clés :** Actinomycète, molécules bioactives, antibactérienne, antifongique, extractions.





## *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.*

*Mes sœurs et mon frère qui m'ont encouragé et soutenu dans mes  
moments les plus difficiles.*

*Mes belles Fatma, Warda, Aida, Hania et Manel qui je partageais  
avec eux les plus beaux moments.*

*Toutes mes amies*

*Toute l'équipe de la microbiologie*

*Tout qui connaisse et aime*

*EL-Roumaissa*

# dédicace

Je dédie ce travail :

A MON Père ,mon premier encadrant ,depuis ma naissance ;

A ma très chère mère : qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi ;

A ma sœur linda et frères abdrezak et zakaria qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur

Et bien sur à mon fiancé okba à qui je souhaite beaucoup de bonheur

*Et Mes chers amis El- Roumaïssa , Warda, Aida ,hania, Manel qui J'ai passé de beaux moments*

A tous les autres amies qui me sont chers, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment :qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères ;

Que dieu le tout puissant vous préserve tout et vous procure sagesse et bonheur.



## Remerciement

*Tout d'abord, longues à « **Allah** » qui nous a guidées sur le droit chemin tout au long du travail et nous a inspirées les bons pas et les justes reflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Mme Benhadj Mabrouka**, maitre-assistant à la faculté des sciences de la Nature et de la vie, Université Tébessa. Nous tenons vivement à lui exprimer nos profonde reconnaissances gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de travail. Nous la remercions de nous avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches pédagogiques. Son soutien permanent et son dynamisme nous ont permis d'avancer plus loin dans notre travail.*

*Nos remerciements vont aussi à*

*Mr **Boukoucha.M**, d'avoir ménagé son temps pour présider ce jury.*

*Mme **Mechai** pour avoir bien voulu siéger dans ce jury afin d'examiner et critiquer ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils.*

*Mme **Fenghour**, Mr **Mechai**, Mme **chadie**, Mr **Menasria**, Mr **Chanchouni***

*Aucun remerciement ne saurait exprimer notre respect et considération pour les orientations que vous avez consentis pour notre étude de l'Université.*

*Mme **warna** et Mme **Benhamlaoui**, et tous les enseignants qui nous ont fait former durant ces 5 années merci pour votre encouragement et gentillesse.*

*Melle **Sara**, Mme **Moufida**, Mme **Linda**, Melle **Narjes**, Melle **Souad**, Mme **Karima** et Mr **Hamdi** les techniciens de laboratoire qu'ils reçoivent nos vifs remerciements*

*Toute nos amies pour leur solidarité*

*La meilleure équipe, l'équipe de la microbiologie*

## Table de Matière

ملخص

**Abstract**

**Résumé**

**Dédicace**

**Remerciement**

**Liste des tableaux**

**Liste des planches**

**Liste des figures**

**Liste des symboles**

**Introduction**

### Partie bibliographique

#### Chapitre I: Les Actinomycètes

I. Généralité	5
II. Définition	6
III. Classification	7
IV. Taxonomie	7
V. Culture et morphologie	8
V.1. Mycélium primaire	9
V.2. Mycélium secondaire	9
V.3. Les Spores	9
VI. Cycle de développement	11
VII. Ecologie	12
VIII. Activité utile des Actinomycètes	13

#### Chapitre 2: Les molécules bioactives et leurs production par les Actinomycètes

I. Définition de molécule bioactive	15
I.1. Définition d'antibiotique	15
I.2. Définition d'antifongique	15
II. Origine des molécules bioactives	16
II.1. Origine d'antibiotique	16
II.2. Origine d'antifongique	16
III. Classification des molécules bioactives	16
III.1. Classification d'antibiotique	16
III.1.1. Inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane	17
III.1.2. Altérateurs de la synthèse de la membrane	17
III.1.3. Inhibiteurs de la synthèse protéique	18
III.1.4. Inhibiteurs de la synthèse nucléaire	18
III.2. Classification d'antifongique	19

IV. Mécanismes de résistance aux molécules bioactives	21
IV.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	21
VI.1.1. Résistance naturelle	21
VI.1.2. Résistance acquise	22
IV.2. Mécanismes de résistance aux antifongiques	22
V. Production des molécules bioactives par les Actinomycètes	23

## **Partie expérimentale**

I. Objectif de travail	27
II. Cadre de l'étude	28
III. Matériels utilisés	28
III.1. Matériels non-biologique	28
III.2. Matériels biologiques	29
III.3. Milieux de cultures	29
III.4. Solutions et colorants utilisés	30
III.5. Réactifs et autre produits	30
III.6. Les solvants	30
IV. Méthode de travail	30
IV.1. Origines des souches	30
IV.2. Repiquage et vérification de la pureté des isolats	31
IV.3. Conservation des souches d'Actinomycète	31
IV.4. Etude des caractéristiques morphologiques des Actinomycètes	31
IV.4.1. Etude macromorphologique	31
IV.4.2. Etude micromorphologique	32
IV.4.2.1. Préparation d'état frais	32
IV.4.2.2. Technique de la coloration de Gram	32
IV.5. Recherche de l'activité antimicrobienne des Actinomycètes	33
IV.5.1. Etude des caractéristiques des levure-test	33
IV.5.1.1. Etude macromorphologique	33
IV.5.1.2. Etude micromorphologique	33
IV.5.1.2.1. Coloration au bleu de méthylène	33
IV.5.1.2.2. Recherche de pseudofilamentation	33
IV.5.2. Etude des caractéristiques des bactéries-test	34
IV.5.2.1. Etude macromorphologique	34
IV.5.2.2. Etude micromorphologique	34

IV.5.2.3. Test de Staphylocoagulase	34
	35
IV.5.3. Recherche de l'activité antibactérienne	35
IV.5.3.1. Culture des bactéries-tests dans le milieu solide	35
IV.5.3.2. Préparation de l'inoculum	35
IV.5.3.3. Application de cylindre d'agar	36
IV.5.4. Recherche de l'activité antifongique	36
IV.5.4.1. Culture des levures et champignon-tests	36
IV.5.4.2. Préparation de la suspension	36
IV.5.4.3. Application des stries croisée	36
IV.5.4.4. Application de cylindre d'agar pour les levure-tests	37
IV.5.4.5. Application de double couche pour les	37
champignon-tests	
IV.6. Extraction préliminaire des molécules bioactive	37
IV.7. Activités antimicrobiennes des extraits	38
IV.7.1. Méthode des disques	38
IV.7.2. Méthodes des puits Antibiographie	39
	39
IV.8. Etude biochimique des souches Actinomycètes représentatives	
IV.8.1. Production des pigments mélanoides	39
IV.8.2. Hydrolyse de l'amidon	
IV.8.3. Hydrolyse de caséine	39
IV.8.4. Action sur lait écrémé	40
IV.8.5. Hydrolyse de la gélatine	40
IV.8.6. Test d'estérase	40
IV.8.7. Recherche de l'activité hémolytique	40
IV.8.8. Galerie Api 20 <sup>E</sup>	41
IV.8.8.1. Principe	41
IV.8.8.2. Mode opératoire	41
V. Résultats et discussion	43
V.1. Repiquage et vérification de la pureté des isolats	43
V.2. Etude morphologique des isolats des Actinomycètes	46
V.2.1. Etude macromorphologique	46
V.2.2. Etude micromorphologique	51
V.3. Recherche de l'activité antimicrobienne des Actinomycètes	55
V.3.1. Etude des caractéristiques des levure-test	55
V.3.1.1. Etude macromorphologique	55
V.3.1.2. Etude micromorphologique	56
V.3.1.2.1. Coloration au bleu de méthylène	56
V.3.1.2.2. Recherche de pseudofilamentation	56
V.3.2. Etude des caractéristiques des bactéries-test	59
V.3.2.1. Etude morphologique	59

V.3.2.2. Test de Staphylocoagulase	60
V.3.3. Recherche de l'activité antibactérienne	67
V.3.4. Recherche de l'activité antifongique	75
V.4. Extraction préliminaire des molécules bioactives	75
V.4.1 Extraction des molécules antibactériennes	
V.4.2. Extraction des molécules antifongiques	80
V.5. Etude biochimique des souches Actinomycétales représentatives	86

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexe**

## Liste des Tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre de Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Répartition des Actinomycètes dans la nature	<b>6</b>
<b>2</b>	La division dans la Classe <i>Actinobacteria</i>	<b>7</b>
<b>3</b>	Les principales classes des antifongiques	<b>20</b>
<b>4</b>	Les différents types d'hémolyse	<b>41</b>
<b>5</b>	Résultats de repiquage et vérification de la pureté des 20 isolats	<b>44</b>
<b>6</b>	Les caractères morphologiques des 20 isolats sur les deux milieux Bennet et ISP <sub>2</sub> après 14 jours d'incubation	<b>47</b>
<b>7</b>	Résultats des caractères micromorphologiques de quelques isolats	<b>52</b>
<b>8</b>	Résultats des caractères microscopiques des 2 ICF représentatifs	<b>57</b>
<b>9</b>	Résultats des tests d'activité antibactérienne	<b>62</b>
<b>10</b>	Résultats des tests d'activité antifongique	<b>69</b>
<b>11</b>	Résultat de test de biodégradation des souches représentatives	<b>86</b>
<b>12</b>	Résultats de l'Api 20 <sup>E</sup> pour les enzymes produites par les 4 souches représentatives	<b>91</b>



## Liste des Planches

<b>N°</b>	<b>Titre de planche</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur le milieu ISP <sub>2</sub>	<b>45</b>
<b>2</b>	Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur les milieux Bennet et ISP <sub>2</sub>	<b>49</b>
<b>3</b>	Photos de l'observation sous loupe binoculaire de quelques isolats ensemencés par touche sur le milieu ISP <sub>2</sub>	<b>50</b>
<b>4</b>	photos des isolats produites des pigments sur le milieu Bennet et ISP <sub>2</sub>	<b>51</b>
<b>5</b>	Photo des résultats de l'Observations microscopiques d'état frais des quelques isolats	<b>52</b>
<b>6</b>	Photos des résultats de l'Observations microscopiques après coloration de Gram	<b>54</b>
<b>7</b>	photos des résultats de test d'activité antibactérienne de quelques isolat	<b>66</b>
<b>8</b>	photos des résultats de test d'activité antibactérienne de quelques isolats	<b>73</b>
<b>9</b>	Photos de quelques résultats de l'extraction antibactérienne	<b>77</b>
<b>10</b>	Photos de quelques résultats de l'extraction antifongique	<b>82</b>
<b>11</b>	Photos de résultats de déférente tests métaboliques	<b>89</b>

## Liste des Figures

N°	Titre de figure	N°
<b>1</b>	Organisation des conidies chez quelques genres d'Actinomycètes, a: une seule, b : paires ou chaines courtes, c : longues chaines	<b>10</b>
<b>2</b>	Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes a: sur le mycélium secondaire, b: sur le mycélium primaire, 1: spores nombreuses, 2: spores en nombres limité	<b>10</b>
<b>3</b>	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	<b>12</b>
<b>4</b>	Mécanisme d'action des principaux antibiotiques	<b>14</b>
<b>5</b>	L'évolution de la découverte des molécules bioactives	<b>23</b>
<b>6</b>	Mise en évidence de l'activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat d'Actinomycète sur milieu LB solide par la méthode des puits	<b>40</b>
<b>7</b>	Caractéristiques culturaux de quelques isolats sur milieu Sabouraud et chromagar <i>Candida</i>	<b>57</b>
<b>8</b>	Aspect des colonies des quelques isolats de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman	<b>60</b>
<b>9</b>	Photos de résultats d'observation microscopique des quelques isolats de <i>S.aureus</i> après coloration de Gram	<b>60</b>
<b>10</b>	Résultats de test de Staphylocoagulase de quelques isolats cliniques	<b>61</b>
<b>11</b>	Activité antibactérienne de J3 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>65</b>
<b>12</b>	Activité antibactérienne de J7 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>65</b>
<b>13</b>	Activité antibactérienne de J10 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>66</b>
<b>14</b>	Activité antibactérienne de J14 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>66</b>
<b>15</b>	photos des résultats de test anti- <i>Candida</i> par la technique stries croisées de quelques isolats	<b>68</b>
<b>16</b>	Activité antifongique de J3 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>71</b>
<b>17</b>	Activité antifongique de J7 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>71</b>
<b>18</b>	Activité antifongique de J10 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>72</b>
<b>19</b>	Activité antifongique de J14 des 20 isolats d'Actinomycètes	<b>72</b>
<b>20</b>	Photos des résultats d'activité antifongique des souches d' <i>Aspergillus niger</i> par la technique stries croisées de quelques isolats	<b>74</b>
<b>21</b>	Activité anti- <i>Candida</i> et anti- <i>Aspergillus</i> par la technique stries croisées	<b>75</b>
<b>22</b>	Photos d'activité anti- <i>Aspergillus</i> par la technique de double couche	<b>76</b>
<b>23</b>	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la souche S130 extrait avec différentes solvants (A) Méthode des disques (B) Méthode des puits	<b>78</b>
<b>24</b>	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la souche S450 extrait avec différentes solvants (A) Méthode des disques (B) Méthode des puits	<b>79</b>
<b>25</b>	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antifongique de la souche S129a extrait avec différentes solvants (A) Méthode des disques (B) Méthode des puits	<b>83</b>
<b>26</b>	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antifongique de la souche S386 extrait avec différentes solvants (A) Méthode des disques (B) Méthode des puits	<b>84</b>
<b>27</b>	Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antifongique de la souche S450 extrait avec différentes solvants (A) Méthode des disques (B) Méthode des puits	<b>85</b>
<b>28</b>	Photos des résultats de systèmes API 20 <sup>E</sup> des souches représentatives	<b>90</b>

## Liste des Symboles

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AMY**: Amygdaline

**ARA**: Arabinose

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ARNr** : Acide Ribonucléiques Ribosomaux

**DO** : Densité Optique

**GC** :Guanine Cytosine

**GEL**: Gélatinase

**GLU**:Glucose

**GYEA**: **Gélose** Yeast extracts Agar

**H<sub>2</sub>S**: Production d'H<sub>2</sub>S

**IC** :Isolat Clinique

**ICF** :Isolat Clinique Fongique

**IND**: Production d'indole

**INO**: Inositol

**ISP** : International Streptomyces Project

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** :Phosphate dipotasique

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate monotasique

**LB** : Laureat Bertani

**LDC** : Lysine; Lysine Decarboxylase

**MA** : Mycélium de substrat

**MAN** : Mannose

**MEL**: Melibiose

**MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O** : Sulfate de magnésium sept fois hydraté

**MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O** : Chlorure de magnése quatre fois hydraté

**MS**:Mycelium de substrat

**ODC**:Ornithine Decarboxylase

**ONPG**:Ortho-nitro-phenyl-galactoside; B-galactosidase

**RAT**: Rice Agar Tween 80

**RHA**: Rhamnose

**S**:Souche

**SAC:** Saccharose

**SOR:** Sorbitol

**TDA:** Tryptophane; Tryptophane Désaminase

**URE:** Urease

**VP:** Pyruvate de sodium

# Introduction

## Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes. Ces germes omniprésents dans notre environnement, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie, et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie. En effet, ils sont doués de plusieurs activités importantes et peuvent être considérés comme étant des agents performants de transformation, certaines espèces sont également des agents de dégradation et peuvent être exploitées dans des domaines extrêmement variés (**Smaoui, 2010**). Malgré ce côté très bénéfique des microorganismes, certains d'entre eux pathogènes causent des véritables problèmes pour l'humanité. A ce propos, actuellement on assiste à un problème très épineux, d'une part l'augmentation de l'incidence des infections fongiques et bactériennes et d'autre la résistance des microorganismes pathogènes aux molécules antibactériennes et antifongiques communément utilisées. En fait, qu'elle que soit le type et la nature de la molécule bioactive utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactérienne et fongique qui leur sont résistantes. Par exemple les souches de *Candida* qui sont responsable de la plupart des infections fongiques acquissent une résistance aux antifongiques utilisés couramment comme les polyènes, au 5-fluorocytosine utilisé en monothérapie mais aussi aux échinocandines qui représentaient jusqu'à présent une alternative de choix au traitement des maladies fongiques (**Hope et al., 2004 ; Fournier et al., 2011**).

Cette situation augmente un besoin d'urgence de trouver des solutions aux problèmes thérapeutiques rencontrés. La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuse, elle consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes. Parmi ces derniers les Actinomycètes, qui sont les plus grands producteurs de substances antimicrobiennes (**Xiao et al., 2002; Bressan, 2003**). Elles synthétisent environ 70% des molécules actives d'origine microbienne, avec des caractéristiques intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (**Islam et al., 2009**). Ces germes sont des bactéries filamenteuses de colorations à Gram positive, ont été retrouvés dans plusieurs écosystèmes aquatiques, lacustres ou marins. Leur étude a pris son ampleur surtout après la découverte de l'aptitude de certains membre de ce groupe à produire les antibiotiques dont en plus de 50 ont été isolés uniquement à partir du genre *Streptomyces*, à savoir la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (**Djaballah, 2010**). On outre, plusieurs souches rares de ce groupe bactérien montrent aussi une

capacité remarquable de la production des molécules bioactives à titre d'exemple, la nouvelle espèce *Saccharotrix algeriensis* avère qu'elle produit un nouveau antibiotique : le dithiolopyrrolone (**Chorin, 2009**).

Devant ce constat, cette étude mène à un objectif principal, dans un premier temps de rechercher des molécules bioactives à partir d'une gamme des souches d'Actinomycètes, dans un second temps, d'extraire ces biomolécules et de les caractérisés et enfin d'étudier la diversité métaboliques des souches possédant une activité antimicrobienne remarquable.

Pour répondre à cette problématique nous avons réalisé un travail de recherche portant sur cette thématique.

Cette étude est devisée en deux axes, le premier axe intitulé « la partie bibliographique » englobe ; les informations générales liées aux Actinomycètes, leur taxonomie, écologie ainsi que de leur importance et un aperçu sur les antifongiques et les antibiotiques ainsi que leur production par les Actinomycètes. La partie expérimentale constitue le deuxième axe de ce travail. Elle comprendra : le matériel et méthodes mis en œuvre pour la réalisation de cette étude, les résultats obtenus ainsi qu'à leurs discussions.

# Partie Bibliographique



# Chapitre I

## Les Actinomycètes

## I. Généralité

Les Actinomycètes constituent un groupe de micro-organismes fascinant. Ils sont la source de la plupart des antibiotiques utilisée en médecine aujourd'hui. Il produisent aussi des métabolites employés comme médicament anticancéreux, comme antihelminthique (par exemple l'ivermectine qu'on donne aux chien pour prévenir le ver du cœur) et les médicament qui suppriment le système immunitaire chez les patient qui ont subi une transplantation d'organe (**Lansing et al., 2010**).

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al.,1984**). Le plus ancien genre d'Actinomycètes aérobie décrit, a été appelé *Streptothrix*. Ce nom était assigné à un vrai champignon et donc pour des raisons de priorité dans la classification, ce genre bactérien a été déclaré invalide. En 1877, l'espèce *Actinomycesbovis* isolée d'un cas d'actinomycose de bœuf a été décrite comme étant une moisissure. Ainsi, les Actinomycètes ont débuté leur carrière appelés: moisissures rayonnants (**Zerizer, 2014**). Et c'est en 1943 que S. Waksman a pu isoler un genre Actinomycète à partir du sol (**Melouah, 2015**).

En 1964, le projet international des *Streptomyces* (ISP) a essayé de standardiser les critères de détermination de l'espèce (**Shirling et Gottlieb , 1966** ). On décrit des critères standards clés pour la détermination des espèces :

- ✘ La forme des chaînes de spores (rectiflexible pour les chaînes droites ou flexueuses, spirale pour les chaînes hélicoïdales).
- ✘ La couleur du mycélium aérien sporulé avec sept classes de couleur (blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet).
- ✘ La production de pigments mélanoloïdes bruns ou noirs.
- ✘ L'ornementation de la paroi sporale (lisse, verruqueuses, echinelee ou chevelue).
- ✘ La présence ou non de pigments solubles.
- ✘ La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer (D-glucose, Dxylose, D-galactose, D-raffinose, D-mannitol, D-fructose, L-arabinose, L-rhamnose, inositol et saccharose).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des Actinomycètes (**Lacey, 1973**). Après

*Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970).

## II. Définition

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « *Aktis* » qui veut dire rayon et « *mykes* » qui veut dire champignon (Gottlieb, 1973). Ces organismes forment de longs filaments composés de nombreuses cellules, ces filaments se ramifient en réseaux étendus composés de centaines ou de milliers des cellules, de tels réseaux sont appelés « mycélium » (Jerome et al., 2004). Les filaments des Actinomycètes sont en réalité constitués de cellules procaryotes dont le diamètre est beaucoup plus petit que celui des cellules eucaryotes des moisissures (Andria, 2010). Les Actinomycètes formant des filaments ramifiés qui se développent dans la gélose formant un mycélium végétatif et à la surface formant un mycélium aérien, ce dernier forme des conidies ou conidiospores, la différenciation des spores, leur regroupement ainsi que la composition en sucre de la paroi du mycélium constitue un critère de classification des différents genres de ce groupe Gram positif qui sont répandue dans la nature et distribuée dans une variété d'habitats écologiques comme le sol. Certaines souches ont été retrouvées dans les environnements marins (Singhet al., 2006) eau douce, plantes (comme Endophytes) et d'autres (Tableau n°1) (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Larpent et Larpent Gourgaud, 1997).

**Tableau n°1 : Répartition des Actinomycètes dans la nature (willaims et al., 1983)**

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Sireptomycetes</i>	Sol, eau, litière
<i>Sireptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

Les Actinomycètes représentent un pourcentage en G + C supérieur à 50 %, la plupart de ces derniers sont non mobiles ; la mobilité est présentée chez les spores libérés par les sporanges et qui sont flagellées caractéristiques présentés chez les *Actinoplanes* (Lee et al., 2008).

### III. Classification

Les Actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des *Firmicutes* et à la classe des *Thalobacteria*, contenant l'ordre des *Actinomycetales* (Larpen, 2000). La classe des *Actinobacteria* se présente comme suit : 5 sous-Classes, 5 Ordres, 4 Familles (Tableau n°2) (Ratiba, 2015).

Tableau n° 2 : la division dans la Classe *Actinobacteria* (Melouah., 2015)

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

### IV. Taxonomie

Le genre le plus prédominant dans les Actinomycètes est *Streptomyces*. Ce genre a été classé dans la famille des *Streptomycetaceae* en se basant sur la morphologie et la composition de la paroi cellulaire. Le développement de la classification numérique a permis la reclassification de six autres genres de cette famille (*Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* et *Microellobosporia*) dans le genre *Streptomyces*. Ces anciens systèmes numériques utilisant les caractères phénotypiques sont fondamentalement changés par l'introduction des caractéristiques de labiologie moléculaire dans les systèmes de classification (Stackebrandt et al., 1997).

Les genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* étaient deux genres distincts possédant des caractères morphologiques différents, en 1990 Witt et Stackebrandt, ont conclu à

partir des comparaisons des séquences d'ARNr 16S et 23S que le genre *Streptoverticillium* doit être considéré comme un synonyme de *Streptomyces* (**Stackebrandt et al., 1997**).

Les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des Actinomycètes qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés. En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobosporia*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces. Cependant, les genres *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Microellobosporia* et *Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, les équençages de l'ARNr 16s, ont été assimilés au genre *Streptomyces* (**Bergey's manual, 2007**).

## V. Culture et morphologie

La croissance des colonies des Actinomycètes est variable en fonction de la composition des milieux de culture. La forme, la taille et la texture de la colonie sont des critères qui aident à différencier les genres. Les Actinomycètes se caractérisent par une diversité morphologique importante et des formes mycéliennes complexes comme le genre *Streptomyces* (**Gottlieb, 1973**). Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien).

Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermés dans un sporange. D'autres Actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de forme bactériose irrégulière, et enfin d'autres ne présentent que des mycéliums très rudimentaires au point d'être inexistantes (**Mariat et Sebald, 1990 ; Lacey, 1997**). La couleur des pigments varie selon les espèces (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Les colonies des Actinomycètes sont des entités multicellulaires, elles forment des structures très variées morphologiquement et biochimiquement qui ont des fonctions spécifiques et des relations spatiales précises l'une par rapport à l'autre. Ces structures peuvent être utilisées dans leur taxonomie.

### V.1. Mycélium primaire

Le mycélium primaire est appelé aussi mycélium végétatif, mycélium de substrat ou mycélium intra-matriciel, c'est un ensemble de filaments multi-nucléaires formés à partir du tube germinale (hyphe) issue d'une spore. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des jeunes colonies, formées par des filaments attachés en matrice complexe. Cet hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises (**Mighélez et al., 2000**).

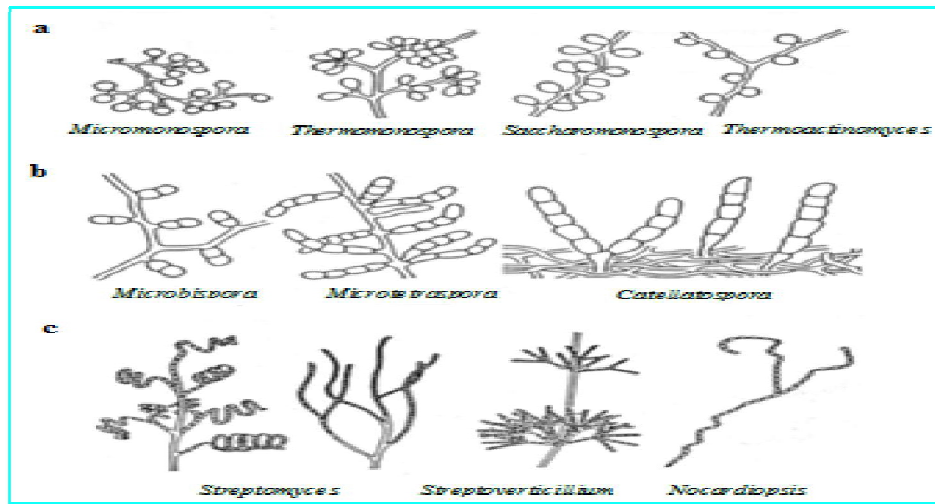
### V.2. Mycélium secondaire

Le mycélium secondaire est appelé aussi mycélium aérien, il se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Contrairement à celui du substrat, le mycélium aérien est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur milieu pauvre en sources nutritionnelles, dans la plupart des cas, par la dégradation du mycélium de substrat dont les produits assurent un apport de nutriments pour sa croissance loin de la colonie (**Miguélez et al., 2000**).

### V.3. Les Spores

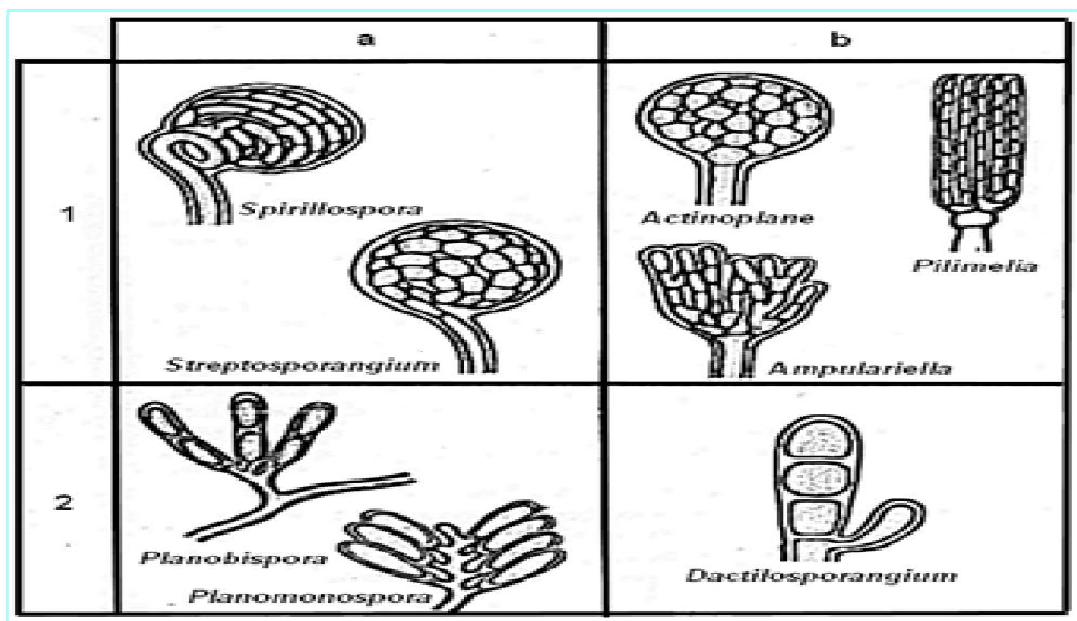
Les hyphes aériens des Actinomycètes subissent une série de changements développementaux qui donneront naissance aux spores (**Wildermuth et Hopwood, 1970 ; Williams et al., 1970**).

D'un genre à l'autre, les spores des Actinomycètes s'organisent en diverses structures et nous observons ; conidies un terme utilisé pour désigner les spores asexuées, qui sont des chlamidiospores ou des sporangiospores non intercalaires. Les conidies des Actinomycètes peuvent avoir plusieurs organisations: une seule, en paires, en chaînes courtes ou longues (plus de 20 spores par chaîne) (**Figure n°1**), ou bien rassemblées dans des synnémata (**Holt et al., 1994**).



**Figure n°1 :** Organisation des conidies chez quelques genres d'Actinomycètes, a: une seule, b : paires ou chaînes courtes, c : longues chaînes (**Larepent et Sanglier , 1989**)

Les sporanges, nombreux ou limités, sont des sacs contenant des spores, ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien ou à l'intérieur du milieu solide (**Figure n° 2**) (**Holt et al., 1994**).



**Figure n°2 :** Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'Actinomycètes a: sur le mycélium secondaire, b: sur le mycélium primaire, 1: spores nombreuses, 2: spores en nombres limité (**Larpen et Sanglier, 1989**)

Autre que les structures ordinaires quelques genres d'Actinomycètes forment des structures rares comme:

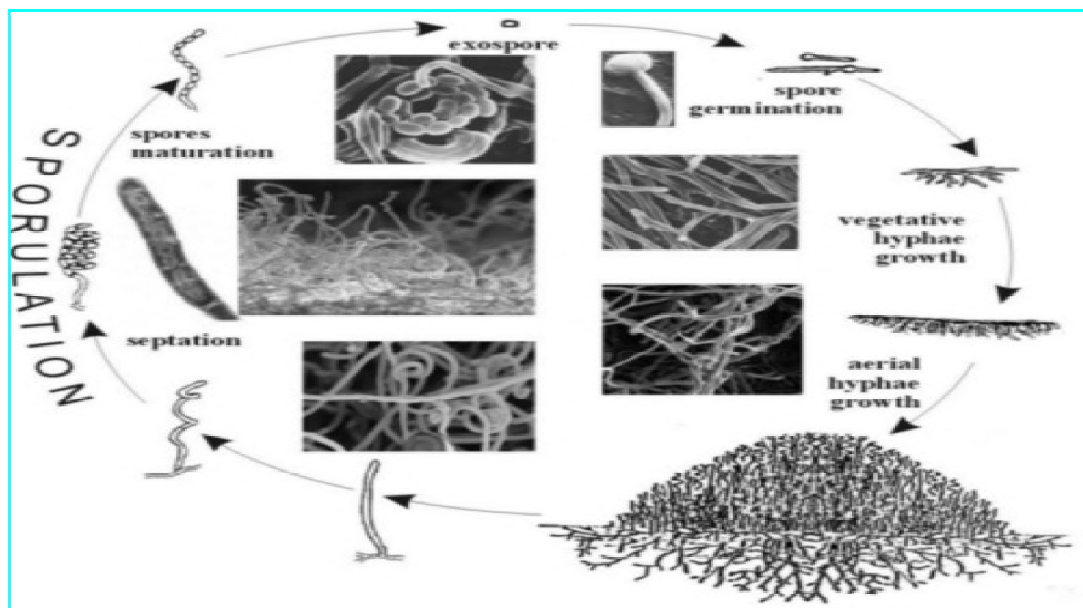
- ✎ Des structures sphériques sur les hyphes aériens, et on peut trouver de l'eau condensée autour des chaînes de spores ( **Holt et al., 1994**).
- ✎ Des synnémata qui sont un ensemble de conidiophores, dressés et consolidés ensemble, pouvant former des conidies uniquement à leur apex, ou bien à leurs apex et bords latéraux (**Hasegawa et al., 1978; Holt et al., 1994**).
- ✎ Des sclérotés qui sont des structures sphériques compactes de mycélium, formées chez quelques espèces de *Streptomyces*, ils ne contiennent pas de spores mais des cellules enfilées avec des lipides ( **Holt et al., 1994**).

Les critères morphologiques principalement utilisés pour délimiter les genres d'Actinomycètes sont: la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium de substrat et du mycélium aérien, la présence des spores, leur nombre, leurs formes, leur mobilité et leur position sur les hyphes, la formation de structures spéciales comme les sporanges, sclérotés ou synnémata (**Schofield et Schaal, 1981 ; Demain et Solomon, 1985 ; Shirling et Gottlieb, 1966**).

## VI. Cycle de développement

Les Actinomycètes ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Sur milieu solide (**Figure n°3**), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se spiralsent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores, qui sont des agents de dissémination (**Kim et al., 2004 ; Smaoui, 2010**).





**Figure n° 3 :** Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Jakimowicz, 2007)

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certaines souches peuvent sporuler dans cet environnement (Madigan et Martinko, 2007). En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée tandis qu'en milieu liquide la différenciation est généralement physiologique (activation d'un métabolisme secondaire dans le cas d'un stress nutritionnel ou environnemental ralentissant significativement la croissance) (Hodgson, 2000).

## VII. Ecologie

Comme beaucoup de microorganismes du sol, la plupart des Actinomycètes se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température variant entre 25°C à 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité) (Madigan et Martinko, 2007). Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 colonisant ainsi les sols acides, ils ont la particularité de produire des hydrolases et des chitinases acides (Alexander, 1977).

Dans le sol, les *Streptomyces* sécrètent des enzymes dégradant les polymères insolubles tels que les protéines, l'amidon, la cellulose et la lignine provenant des plantes et consomment les produits issus de la réaction de ces enzymes, en plus de la dégradation de la pectine, la kératine et la chitine. Ces produits apparaissent naturellement dans les litières

en décomposition et dans les sols pour former l'humus. Leurs actions se situent également dans la dégradation des composts et des pollutions dues à l'activité de l'homme (Lacey,1997). Dans la rhizosphère, les *Streptomyces* jouent un rôle important dans la protection des racines des plantes par inhibition du développement des champignons potentiellement pathogènes par leur sécrétion d'antifongiques (Doubou et al., 2001 ; Samac et al., 2003 ; Bouizgarne et al., 2009).

### VIII. Activité utile des Actinomycètes

Les Actinomycètes sont impliqués dans la décomposition de la matière organique du sol, y compris la lignine et d'autres polymères et peuvent dégrader les déchets urbains. Représentent le groupe de microorganismes le plus important dans la production de métabolites bioactifs, ils sont à l'origine de plus de 45 % de composés bioactifs connus, 34% dérivent du genre *Streptomyces* et 11 % des genres d'Actinomycètes rares comportant plusieurs activités biologiques.

En ce qui concerne l'action des métabolites bioactifs, les Actinomycètes sont montrés une capacité importante de la production des molécules antimicrobien, cytotoxique, antiviral, antioxydant, insecticide, antiprotozoaire, anthelminthique, inhibiteur enzymatique, favorisant la croissance des plantes et des agents herbicides. Il faut signaler que les molécules bioactives des Actinomycètes est actif meme contre les bactéries résistantes et les champignons pathogènes. Ces microorganismes sont connus également par leurs rôle clé dans la bioremédiation de colorants, produits pétroliers et pesticides et biosorption de métaux lourds (Lee et al. , 2008 ; Zerizer, 2014).

# Chapitre 2

## Les molécules bioactives et leurs production par les Actinomycètes

Les molécules bioactives sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, ils inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (**Marinelli, 2009**). Parmi les microorganismes producteurs, les Actinomycètes qui ont une capacité de produire une large variété de ces biomolécules que ce soit à effet antibactériens "antibiotiques" ou antifongiques (**Loucif, 2011**).

## I. Définition de molécule bioactive

Une substance bioactive est une entité matérielle qui mis en contact avec de la matière vivante entraîne une réaction de celle-ci. Cette activité biologique peut être antibactérienne, antifongique, antiviral.....

### I.1. Définition d'antibiotiques

Le mot antibiotique fut employé pour la première fois, en 1942 par Waksman qui en a donné la définition suivante : Un antibiotique est une substance chimiquement définie, produite par des microorganismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou d'autres microorganismes en solution diluée *in vitro* ou *in vivo* (**Simon et Meunier, 1970**).

On l'emploie maintenant dans un sens plus large, le terme antibiotique désigne toute substance naturelle ou synthétique, d'origine microbienne ou dérivée chimiquement (**Walsh, 2003 ; Zomahoun, 2005**) dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des bactéries sensibles (**Prescott, 1995**). On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (**Prescott, 2003**). Dans la majorité des cas, leur synthèse débute à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et le début de la phase stationnaire (idiophase) (**Bu'Lock, 1965**).

### I.2. Définition d'antifongiques

Les antifongiques ou antifungiques sont des molécules qui permettent de lutter contre les champignons, également appelés mycètes. La plupart des champignons apprécient les zones de macération où ils aiment à se développer, car ce sont des milieux chauds et humides, favorables à leur développement. Certains antifongiques sont locaux sous forme

de crèmes, pommades, shampooings ou poudres, quand la surface atteinte est accessible, comme la bouche en cas de muguet, la peau, ou les cheveux en cas de teigne. Cependant, le mode d'administration peut aussi être oral, notamment dans le traitement de champignons du tube digestif (Said, 1989).

## II. Origine des molécules bioactives

### II.1. Origine d'antibiotique

Les antibiotiques sont obtenus par voies :

- ✎ Naturelles issues de microorganismes ; la majorité des antibiotiques d'origines naturelles commercialisés sont produits par les Actinomycètes comme la streptomycine (willey et al., 2008).
- ✎ Semi-synthétiques ; représentées par des molécules d'origine naturelle ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires dans le but de les rendre moins sensibles à l'inactivation par les microorganismes, aussi, beaucoup d'antibiotiques semi-synthétiques présentent un spectre d'activité plus large que la molécule d'origine, la pénicilline V et la méthicilline en sont de bons exemples (willey et al., 2008).

### II.2. Origine d'antifongique

Les molécules à activité antifongiques peuvent être issues d'une voie :

- ✎ Naturelle ; ceux d'origine naturelle sont produits par les Actinomycètes ou par des champignons, nous pouvons citer l'exemple de l'Amphotéricine B produite par *Streptomyces nodosus*.
- ✎ Semi-synthétiques ; comme l'acétate de caspofungine qui est un dérivé aminé semi-synthétique de la pneumocandine B, produit naturel de la fermentation de *Glarealozoyensis*.
- ✎ Synthétiques ; les antifongiques de synthèse sont beaucoup plus nombreux, c'est le cas de la fluorocytosine, les azolés, les dérivés de l'imidazole, et les dérivés triazolés, et les antifongiques qui appartiennent aux échinocandines (Ripert, 2013).

### III. Classification des molécules bioactives

#### III.1. Classification d'antibiotique

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Ces antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : leurs natures chimiques, en fonction des bactéries qu'ils inhibent ou selon leurs modes d'action sur les agents infectieux.

La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques. La classification des antibiotiques en tenant compte du spectre antimicrobien ne paraît pas être la meilleure en raison de l'évolution de la résistance bactérienne (Walsh, 2000). Enfin, les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire les cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte. La classification basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotiques (Walsh, 2000). En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs classes (Smaoui, 2010).

##### III.1.1. Inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram-.

La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives, chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. On peut citer, les bêta-lactamines qui fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique appelées les PLP (protéines liant la pénicilline). Ils bloquent leur fonctionnement inhibant ainsi la formation du peptidoglycane. Cette inhibition entraîne le blocage de la multiplication cellulaire. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (Colamia et Doyle, 2002 ; Prescott et al., 2010).

##### III.1.2. Altérateurs de la synthèse de la membrane

La membrane plasmique des microbes, située juste après la paroi cellulaire, est la cible de nombreux agents antimicrobiens. Essentielle à la cellule, cette membrane joue un rôle actif dans la régulation de l'entrée des nutriments et de l'élimination des déchets. Certains antibiotiques, en particulier les antibiotiques polypeptidiques tels que les gramicidines et

les polymyxines grâce à leur caractère amphitique pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides des membranes externes et cytoplasmiques, ce qui entraîne la désorganisation de celles-ci et perturbe la perméabilité membranaire (**Podie-Magne, 1999 ; Zomahoun, 2005 ; Tortora, 2012**).

### III.1.3. Inhibiteurs de la synthèse protéique

Plusieurs antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes préférentiellement sur la sous-unité 30S et/ou la sous-unité 50S et la biosynthèse des protéines bactérienne (**Euzéby, 2007**). Par exemple, les aminosides ou aminoglycosides ; ce sont des antibiotiques bactériostatiques à faible doses et bactéricides à forte doses, la cible principale de ces molécules est le ribosome, et en particulier sa sous-unité 30S. La plupart des aminoacides se fixent aussi sur la sous-unité 50S. Cette fixation sur le ribosome conduit à une altération de la synthèse des protéines en particulier inhibition de la traduction. En effet, ils provoquent des erreurs de lecture du message porté par l'ARN messager ce qui engendre plusieurs perturbations ; altération fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, blocage des systèmes de sécrétion et de respiration, etc (**Mimoz, 2003 ; Zomahoun, 2005 ; Philippon, 2006**).

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

### III.1.4. Inhibiteurs de la synthèse nucléaire

Le dérèglement du fonctionnement de l'ADN empêche la cellule de se diviser et/ou la synthèse des enzymes indispensables. Ce dérèglement des acides nucléiques peut être perturbé par des antibiotiques (**Benzeggouta, 2005**).

Dans cette classe des antibiotiques, on trouve deux groupes :

- ✎ Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques cas des quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN tel que les topo-isomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN (**Mimoz, 2003 ; Zomahoun, 2005 ; Euzéby, 2007**), les rifamycines qui se fixent sur l'ARN polymérase en formant un complexe irréversible ce qui bloque la formation de l'ARN messager (**Zomahoun, 2005 ; Euzéby, 2007**) et la mupirocine

inhibiteur de l'isoleucyl-ARN-synthétase qui permet la synthèse de l'ARN de transfert (**Podie-Magne , 1999 ; Tortora et al., 2003**).

- Un deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines (**Smaoui, 2010**).

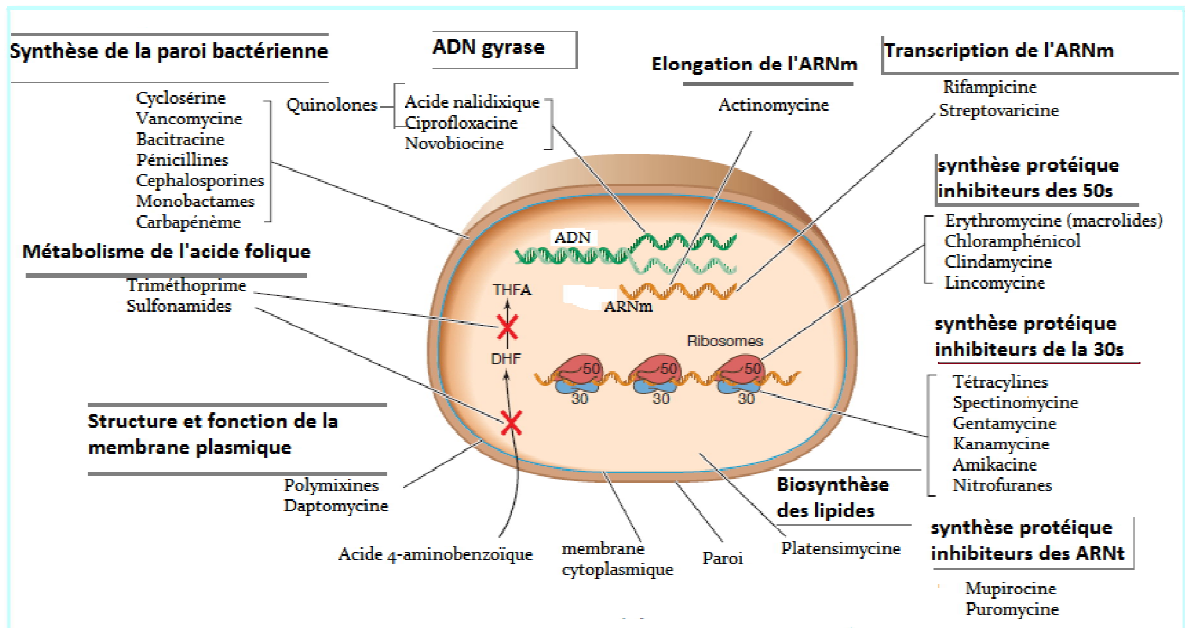


Figure n° 4 : Mécanisme d'action des principaux antibiotiques (**Madigan et al., 2012**)

### III.2. Classification d'antifongique

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires les principales molécules antifongiques disponibles relativement limite appartiennent à quatre familles, les polyènes, les analogues nucléosidiques, les azolés, et les échinocandines ciblant trois voies métaboliques distinctes (**Mouly et Sellier, 2004 ; Martin, 2008 ; Vandeputte, 2008**).

Pendant les antifongiques les plus utilisés dans le traitement des mycoses sont les molécules macrolides polyéniques. Mais, malgré leur efficacité, les polyènes trouvent des limitations d'applications thérapeutiques vu leur toxicité vis à vis des cellules hôtes ainsi que des effets secondaires importants notamment des fièvres, céphalées, collapsus et des réactions anaphylactiques. Actuellement, l'attention est de plus en plus tournée vers la recherche de molécules antifongiques non polyéniques et d'origine naturelle, ayant comme site d'action des cibles autres que l'ergostérol. (Ces deux classes sont résumées dans le **tableau n°3**).



Tableau n°3 : les principales classes des antifongiques

Classe d'antifongique	Cible	Mode d'action
<p>Les Poléniques :</p> <p>- La nystatine : le plus ancien des antifongiques naturels, a été isolée de <i>Streptomyces noursei</i> en 1950 ; est le plus souvent indiquée pour le traitement courant des candidoses digestives, vaginales et cutanées.</p> <p>- L'Amphotéricine B : Isolée de <i>Streptomyces nodosus</i> en 1955, est un macrolide polyénique amphotère, elle est indiquée comme traitement des candidoses vaginales et cutanées.</p>	<p>Membrane fongique</p>	<p>Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores transmembranaires (Vandeputte, 2008) provoquant l'augmentation de la perméabilité membranaire (Tulkens, 2008)</p>
<p>Les non Poléniques :</p> <p>appartiennent à plusieurs familles d'antibiotiques. Ils jouent un rôle moins important en thérapeutique que les polyènes sauf la griséofulvine qui joue un rôle important en thérapeutique humaine dans le traitement des mycoses superficielles et sous-cutanées. mais leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans la lutte contre certains champignons phytopathogènes est relativement courante (Deacon., 1984 ; Vandamme., 1985).</p>	<p>Paroi fongique</p> <p>Acides nucléiques</p>	<p>le type d'action par lequel les non-polyéniques inhibent les mycètes est mal connu. Plusieurs mécanismes sont invoqués : inhibition de la mitose des cellules fongiques et de la synthèse des acides nucléiques, interférence probable avec la fonction des microtubules.</p>

#### IV. Mécanismes de résistance aux molécules bioactives

La découverte des molécules bioactives à la fin des années 1940 a marqué une étape capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces traitements ont permis d'épargner un grand nombre de vies et aurait dû provoquer une catastrophe chez les microbes (Smoui, 2010). En revanche, les microbes avaient trouvé les moyens pour résister à cet environnement hostile et par conséquent, éviter l'action des biomolécules, et se développer en présence d'une concentration en molécules bioactives significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de la même espèce (Benzeggouta, 2005).

##### IV.1. Types de résistance aux antibiotiques

La résistance deux types ; innée ou naturelle et résistance acquise apparaissant chez des bactéries sensibles aux antibiotiques

###### VI.1.1. Résistance naturelle

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développées dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewski et Rabaud, 2010). Cette résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches d'une espèce bactérienne donné (Madigan et al., 2012).

Elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe (Yala et al., 2001), se manifeste essentiellement par l'expression d'une protéine innée empêchant l'antibiotique d'accéder à sa cible, c'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosae* face à l'ampicilline (Madigan et al., 2012) ou par la production naturel des bêta-lactamases, c'est le cas de *Klebsiellasppet P.aeruginosa* (Lozniewski et Rabaud, 2010). Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Lozniewski et Rabaud, 2010). Ainsi tous les bacilles à Gram négatif à l'exception de *Legionella*, *Campylobacter* et *Haemophilus* sont résistants à la spiramycine un antibiotique produit par *Streptomyces*. leur résistance naturelle est due à l'impossibilité pour la spiramycine de franchir la paroi de ces bactéries (Rouveix et al., 1988).

### VI.1.2. Résistance acquise

À côté de la résistance naturelle, il existe aussi des résistances acquises ; c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques (Yala *et al.*, 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007).

Cette adaptation des bactéries aux antibiotiques, est due soit à des mutations, soit à la présence de nouveaux gènes portés par des plasmides ou des transposons. La résistance par mutation chromosomique ne concerne qu'un faible pourcentage des souches isolées en clinique; c'est un processus spontané qui se produit par exemple dans le gène qui code pour une protéine ciblé par l'antibiotique, rendant ce dernier inefficace contre ce mutant. Par contre la résistance d'origine plasmique est beaucoup plus fréquente, découverte à la fin des années 50, au Japon à la suite d'une épidémie de dysenterie bacillaire (Benzeggouta, 2005 ; Madigan *et al.*, 2012), ici le plasmide qui contient le gène de résistance peut se transmettre en générale par conjugaison permettant ainsi la propagation rapide des résistances, souvent plusieurs gènes de résistance peuvent se regrouper chez un seul plasmide (Madigan *et al.*, 2012).

### IV.2. Mécanismes de résistance aux antifongiques

A l'exemple des bactéries qui deviennent résistantes aux antibiotiques, les champignons pathogènes pour l'homme ainsi que les phytopathogènes développent des formes de résistances aux antifongiques. C'est durant les années 1980 à 1990 une augmentation considérable du nombre de souches fongiques résistantes a été observée, accompagnée avec une large utilisation des antifongiques polyéniques mais surtout azolés qui a conduit à l'émergence d'espèces naturellement peu sensibles ou résistantes à ces molécules (Pfaller , 2012 ; Sheikh *et al.*, 2013). C'est le cas d'*Aspergillus fumigatus* ou sa résistance clinique aux traitements par l'itraconazole, un des antifongiques les plus utilisés en médecine pour combattre les aspergilloses, augmente de plus en plus.

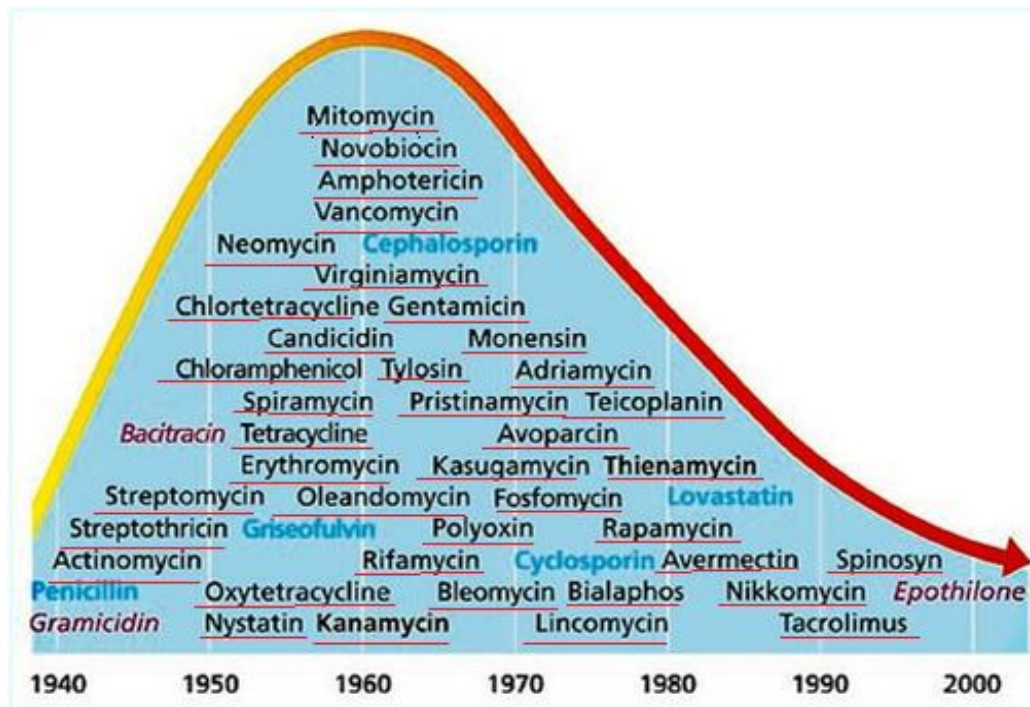
Les mécanismes de résistance, mis en place par certaines souches de champignons, sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*.

Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques soit par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol ou d'en bloquer l'accès, soit par la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires

impliqués dans un rejet actif de l'antifongique tel que les gènes ERG3 et ERG6 responsable de ce type de résistance chez *C.albicans* (Spampinato et Leonardi, 2013).

## V. Production des molécules bioactives par les Actinomycètes

Les Actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques (Berd, 2005). Historiquement dans la période des années 1940-1960, l'âge d'or dans la découverte des molécules bioactives (illustré dans la **figure n°5**), Waksman fut le premier à démontrer la richesse de ces microorganismes dans ce domaine (Sherk, 2000). Il a isolé de nombreux molécules bioactives sécrétés par des Actinomycètes : actinomycine (1940), clavacine, streptothricine (1942), streptomycine (1943), griséine (1946), néomycine (1948), fradicine, candidine, etc (Procópio et al., 2012).



**Figure n°5** : L'évolution de la découverte des molécules bioactives, d'après (Hopwood, 2007). Les molécules bioactives soulignées en rouge sont produites par les Actinomycètes

Les molécules bioactives produites et sécrétés par les Actinomycètes n'ont pas seulement des applications thérapeutiques, ils sont utilisés aussi dans le traitement de certaines maladies des plantes. La blasticidine, par exemple, est active sur *Piricularia oryzae*, un pathogène du riz (Tomita et al., 1990 ; Berdy, 2005).

Parmi les espèces Actinomycétales, Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs **(Revel et al., 2000)**.

Les biomolécules produits par *Streptomyces* montrent une grande diversité au niveau de leurs structures et de leurs cibles cellulaires, ces derniers appartenant à différents classes chimiques, ils sont fournisseurs d'oligosides, de  $\beta$ -lactamines, de peptides, de tétracyclines, d'anthracyclines, d'ansamycines, de macrolides, de polyènes, de nucléosides et de la fosfomycine, néomicine et streptomycine qui ont des activités antibactériens , antifongiques et même antiparasitaire produites essentiellement par *Streptomyces griseus* et *Streptomyces fradia*. Les molécules bioactives produites par *Streptomyces mutabilis* présentent aussi une activité antifongique contre *Candida albicans* **(Sanasam et Ningthoujam, 2010)**, et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophytumrubrum* **(Lakshmipathy et Krishnan, 2009)**.

Ces molécules bioactives représentent aujourd'hui un marché considérable de vingt-huit milliards de dollars au niveau mondial **(Thomson et al.,2004 ; Madigan et Martinko, 2007)**.

Outre que les *Streptomyces*, le genre *Micromonospora* est caractérisé aussi par la production d'un nombre très important des antibiotique tel que les cephamycines et les gentamicines **(Kirby et Meyers, 2010)**. En plus de nombreux souches de *Nocardia* citer l'exemple de *Nocardia mutabilis*, *Nocardia syringar* et *Nocardiosis dassonvillei* ont la capacité de synthétiser un ensemble des molécules biologiquement actives telles les antibactériens de types macrolides et lactones qui ont une forte activité même contre les souches les plus résistantes comme *Staphylococcus aureus* multirésistantes et les antifongiques activent contre une gamme importante d'*Aspergillus* telles l'*Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* ainsi que les levures tel que *Candida tropicans* et *Candida albicans* **( Kageyama, 2004 ; Zerizer, 2014)**.

Plusieurs membres du genre *Nonomuraea* sont responsables de la productions des molécules antimicrobiennes telle que la Maduramycine **(Pplpass et al., 2014)**.

*Actinomadura* parmi les Actinomycètes rares est une excellente candidate productrices des antifongiques activent contre divers champignons pathogènes et toxicogènes **(Maharjan et al.,2011)**.

Parmi les nombreuses molécules bioactives produites par les Actinomycètes, on peut citer les exemples suivants :

- ✎ La spiramycine ; un antibiotique de la famille des macrolides, est l'un des premières molécules aux propriétés antibactériennes isolée chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877(Albouy et al., 1955), elle est utilisée en médecine comme antibiotique active contre des bactéries Gram-positives (*Staphylocoques*, *Pneumocoques*, *Corynébactéries*, *Clostridium* et *Listeria monocytogenes*), quelques bactéries Gram-négatives (*Neisseria*, *Campylobactersp* et *Legionellasp*), certaines bactéries particulières comme les *chlamydies* et les mycoplasmes (*Mycoplasma pneumoniae*) et possède également des propriétés antiparasitaires contre plusieurs espèces de *Toxoplasma* (Chew et al., 2012) .
- ✎ La thioline ; une des molécules bioactives, fait partie du groupe de dithiopyrrolones. Le spectre d'activité de la thiolutine est très large. Il touche aussi bien les bactéries à Gram positif et à Gram négatif que les levures ou les champignons microscopiques et même les protozoaires et les insectes (Webster et al., 2002). Cette molécule agit principalement en empêchant la synthèse de l'ARN messager en inhibant les ARN polymérases. Elle est produite par *Saccharothrix algeriensis* la seule espèce du genre à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones (Merouche , 2012).
- ✎ La griséofulvine ; un antifongique dont le spectre d'activité est strictement limité aux dermatophytes. IL est actif sur les trois variétés de champignons dermatophytes : *Microsporum*, *Epidermophyton* et *Trichophyton* (Vandamme, 1985 ).
- ✎ La platensimycine ; une molécule antibactérienne d'une classe précédemment inconnue, d'origine naturelle isolée de *Streptomyces platensis*, découverte en 2006, cette molécule montre une activité à large spectre contre les bactéries Gram positives, son mode d'action réside dans l'inhibition de la biosynthèse lipidique cellulaire, aussi cette molécule a montré une activité sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (Wang et al., 2006 ; Allahverdiyev et al., 2013).

# Partie Expérimentale

### I. Objectif de travail

Depuis la découverte de la Pénicilline par Alexandre Fleming en 1928, les antibiotiques ont eu un immense impact dans le traitement d'infections causés par des microorganismes pathogènes. En effet, Ces microbes, grâce à leur plasticité génétique acquissent non seulement une capacité de survivre, mais même de prospérer dans cet environnement hostile (**Fernandez et al., 2011**).

Pour combattre ces microorganismes dangereux, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, et vue la complexité de leur structure chimique, le moyen le plus utilisé pour la recherche de ces molécules actives est le moyen naturel qui consiste à chercher ces molécules notamment à partir de microorganismes (**Smaoui, 2010**). Et comme les Actinomycètes occupent la place la plus importante dans la production de ce type des molécules bioactives à savoir à effet antibactérien, antifongique, antiparasitaire et antiviral. Nous nous sommes intéressés à exploité ce côté très bénéfique dans notre travail.

#### Notre travail a pour but :

- ☒ La recherche à partir des souches d'Actinomycètes, des molécules actives contre divers isolats cliniques et alimentaires à savoir la bactérie *Staphylococcus aureus*, les levures *Candida albicans*, *Candida kefyr* et même le champignon *Aspergillus niger*.
- ☒ L'essai préliminaire de l'extraction de molécules en question.
- ☒ La pré-identification des souches d'Actinomycètes les plus actives par l'étude de leur caractéristique biochimique.



## II. Cadre de l'étude

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 Tébéssa, pendant une durée de 3 mois dès le 01 février 2017 jusqu'à 27 avril 2017.

## III. Matériels utilisés

### III.1. Matériels non-biologique

#### III.1.1. Grands matériels

- ✎ Agitateur
- ✎ Autoclave
- ✎ Bain marie
- ✎ Balance
- ✎ Etuve
- ✎ Hotte bactériologique et Hotte chimique
- ✎ Loupe binoculaire
- ✎ Microscope optique
- ✎ pH mètre
- ✎ Plaque chauffante
- ✎ Réfrigérateur
- ✎ Table à niveau
- ✎ Vortex

#### III.1.2. Petits matériels

- ✎ Anse de platine
- ✎ Barreaux magnétique
- ✎ Bec bunsen
- ✎ Boîtes de Pétri
- ✎ Portoirs
- ✎ Entonnoir
- ✎ Film photographique
- ✎ Lames
- ✎ Micropipette
- ✎ Papier watman n°1

- ✘ Picette
- ✘ Pipettes Pasteur
- ✘ Spatule
- ✘ Verreries: béchers gradués, éprouvettes graduées, tubes à essai stériles et les flacons

### III.2. Matériels biologiques

- ✘ Les 20 isolats d'Actinomycètes.
- ✘ Les bactéries-tests : *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.
- ✘ Les bactéries d'origine clinique : (IC13, IC28, IC29, IC30, IC31, IC32, IC33), *Staphylococcus aureus*.
- ✘ Les levures d'origine clinique : (ICF18, ICF19, ICF20, ICF21, ICF22, ICF23, ICF24), *Candida albicans* et *Candida Kefyr*.
- ✘ Les champignons d'origine clinique : (ICF25, ICF26), *Aspergillus niger*.
- ✘ Les champignons d'origine alimentaire : (IAF 27), *Aspergillus niger*.

### III.3. Milieux de cultures

- ✘ Bennet
- ✘ Bouillon nutritif
- ✘ Chapman
- ✘ Chromagar *Candida*
- ✘ Gélose à base d'amidon 1%
- ✘ Gélose à base de caséine 5%
- ✘ Gélose à base de gélatine 0,4%
- ✘ Gélose Cos
- ✘ Gélose nutritive
- ✘ ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub>
- ✘ Lait écrémé 10%
- ✘ LB liquide, molle et solide
- ✘ Milieu à base de tween 80
- ✘ Milieu de RAT
- ✘ Milieu Sabouraud molle et solide

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

### III.4. Solutions et colorants utilisés

- ☒ Alcool
- ☒ Bleu de méthylène
- ☒ Eau distillée stérile
- ☒ Eau physiologique stérile
- ☒ Fuchsine
- ☒ Lugole
- ☒ Violet de gentiane

### III.5. Réactifs et autre produits

- ☒ Api 20 E
- ☒ Huile à immersion
- ☒ Huile de paraffine
- ☒ Kovax
- ☒ Nit1 et Nit 2
- ☒ TDA
- ☒ VP1 et VP2

### III.6. Les solvants

- ☒ Acétate d'éthyle .
- ☒ Dichlorométhane .
- ☒ Ethanol .
- ☒ N-Hexane apolaire.
- ☒ Méthanol .
- ☒ N-Butanol .

## IV. Méthode de travail

### IV.1. Origines des souches

Dans le cadre de ce travail on vise a étudié l'activité antimicrobiennes de 20 isolats d'Actinomycètes qui proviennent d'une assortiment de souches d'Actinomycètes du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'UniversitéBadji Mokhtar Annaba, ces isolats sont représentés par les codes suivants : (S13 ,S129a ,S129b , S130, S227 , S235, S292 , S302, S312,S372 , S386, S403, S417 , S418 , S419 , S428, S429, S430, S431 , S450).

## IV.2. Repiquage et vérification de la pureté des isolats

La croissance des Actinomycètes est réprimée par la présence de champignons qui sont caractérisés par une croissance envahissante (Williams et Cross, 1971). Pour cela les isolats doivent être purifiés par repiquages successifs sur un milieu neuf dans notre étude c'est le milieu ISP<sub>2</sub>.

Le repiquage des souches se fait par la méthode d'ensemencement par stries d'épuisement. Après l'ensemencement, les boîtes sont incubées à 30C° pendant 7 jours et examinées régulièrement.

## IV.3. Conservation des souches d'Actinomycète

Les colonies d'Actinomycètes doivent être conservées par deux techniques différentes :

- ✎ Conservation des spores et des fragments mycéliens, elle est réalisée par raclage de la surface de la culture puis la centrifugation pour récupérer le culot qui contient les spores. La conservation se fait par congélation à -20 °C en présence du glycérol à 20 % (sik, 1999).
- ✎ Conservation par culture sur une gélose inclinée du même milieu d'isolement à 4 °C (Xueta., 2012).

Dans la première technique la conservation peut durer plusieurs années, dans la deuxième technique un repiquage est réalisé chaque deux mois.

## IV.4. Etude des caractéristiques morphologiques des Actinomycètes

### IV.4.1. Etude macromorphologique

L'étude des caractères macromorphologiques des Actinomycètes permet de déterminer l'aspect phénotypique ainsi les caractères cultureux et les différents aspects et pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat, qui varient en fonction de milieux de cultures.

Les isolats d'Actinomycètes sont ensemencés par la méthode de stries sur le milieu Bennet préalablement coulé dans les boîtes de Pétri, aussi par la méthode de stries et par touche sur le milieu ISP<sub>2</sub>. L'ensemencement s'effectue à partir d'une culture pure mature de chaque isolats d'Actinomycètes. Les cultures sont observées dans le 7<sup>ème</sup> jour et le 14<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30C° à l'aide d'une loupe binoculaire.

L'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur chaque milieu sont observées. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat et la présence de pigments diffusibles dans la gélose sont notés (Shirling et Gottlieb, 1966).

#### IV.4.2. Etude micromorphologique

Les caractères micromorphologiques des isolats sont obtenus suite à l'observation d'états frais où une lame est additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope et par des frottis réalisés à partir des cultures pures des isolats, pour déceler la forme. Ces frottis sont colorés par la coloration de Gram. La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram + et Gram- sur la base de différence de composition chimique et d'ultra structure des parois cellulaires.

##### IV.4.2.1.Préparation d'état frais

- ☒ Mettre une goutte d'eau distillée stérile sur une lame
- ☒ Mette une portion de colonie âgée avec la goutte d'eau et faire un frottis mince
- ☒ Laisser sécher à l'air ambiant
- ☒ Observer au microscope optique grossissement x 100(**Funke, 2003**).

##### IV.4.2.2.Technique de la coloration de Gram

- ☒ préparer le frottis.
- ☒ fixer le frottis à lachaleur.
- ☒ Recouvrir la lame de violet de Gentiane pendant 1 minute, laver à l'eau distillée.
- ☒ Recouvrir du lugol pendant 1 minute.
- ☒ Décolorerà l'alcool puis laver à l'eau.
- ☒ Recouvrir la lame de fuchsine diluée pndant 30 secondes puis lave à l'eau.
- ☒ sécher entre deux feuillets de papier buvard.
- ☒ Observer sous objectif à immersion (X100) d'un microscope optique (**Nelly, 1992; Jean, 1997 ; Funke, 2003 ; Dellars, 2007**).

Cet examen nous permetd'apprécier un certain nombre de caractères qui sont les suivants:

- ☞ Sachant que les Actinomycètes sont des bactéries Gram +.
- ☞ Morphologie de la chaine de spore.
- ☞ Présence ou absence de spores isolées.
- ☞ Aspect des filaments (**Cross, 1989; Wink, 2001**).

## IV.5. Recherche de l'activité antimicrobienne des Actinomycètes

### IV.5.1. Etude des caractéristiques des levure-test

En générale, la première étape dans l'identification d'espèces du genre *Candida* fait appel à la détermination de caractères morphologiques (**Chabasse et al., 2008**).

#### IV.5.1.1. Etude macromorphologique

L'étude des caractères macromorphologique des *Candida* permet de déterminer l'aspect et la couleur de leur colonie.

Pour l'observation de ces caractères, une culture de *Candida* se fait par la méthode de stries d'épuisement sur les milieux Sabouraud et chrom agar *Candida*, cependant, sur le milieu RAT ( Rice-Agar-Tween 80) elle s'effectue par la réalisation de trois stries parallèles à partir d'une goutte de suspension de l'inoculum. Après une incubation de 48 h à 30°C, l'observation effectuée est notée.

#### IV.5.1.2. Etude micromorphologique

Cette étude est basée sur l'examen direct de ces agents fongiques, en utilisant des colorations spécifiques ou non spécifiques telle que le bleu de méthylène ou des réactifs pour la mise en évidence de pseudo-filaments (**Vaubourdolle, 2007**).

##### IV.5.1.2.1. Coloration au bleu de méthylène

- ✎ Réaliser un frottis et le fixer.
- ✎ Recouvrir la lame de bleu de méthylène et laisser agir 3 min.
- ✎ Laver à l'eau distillée.
- ✎ Observer après séchage à l'immersion (X 40 et X100) (**Leyral et Noffin, 1991**).

Cette coloration nous ont permis de déterminer quelques indications sur la forme des *Candida*.

##### IV.5.1.2.2. Recherche de pseudofilamentation

###### ✎ Recherche de pseudofilamentation en utilisant le milieu RAT

- ✎ Sur le milieu spécifique RAT réaliser un strie (ou trois stries éloignés) de chaque levure sur boîte de Pétri à l'aide de pipette pasteur stérile.
- ✎ Recouvrir immédiatement le strie par une lamelle préalablement stérilisée.
- ✎ Incuber la boîte à 28 °C pendant 24 heures.

Observer directement la boîte sous le microscope à l'objectif x40 (**Leyral et Noffin, 1991**).

🔍 **Recherche de pseudofilamentation en utilisant le sérum « blasté »**

- 👉 Dans un tube à hémolyse stérile bouché, émulsionner dans 1 ml de sérum (patient du jour) une colonie blanche porcelainique isolée sur milieu de Sabouraud Chloramphénicol.
- 👉 Incuber 3 heures à 37°C.
- 👉 Au bout des 3 heures, observer au microscope à l'immersion (×40 et ×100) une goutte de la suspension et noter la filamentation des levures (**Overblog, 2016**).

#### **IV.5.2. Etude des caractéristiques des bactéries-test**

##### **IV.5.2.1. Etude macromorphologique**

L'isolement direct est pratiqué sur le milieu sélectif (Chapman), A l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur stérile on prélève une portion (pus) ou une quantité (liquide) du prélèvement puis nous ensemençons par épuisement sur gélose en boîte de Pétri, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Sur le milieu de Chapman, les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune, la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé (**Kloos, 1999**).

##### **IV.5.2.2. Etude micromorphologique**

L'étude microscopique est réalisée à partir des résultats obtenus par la coloration de Gram. Cette coloration est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose de Chapman présentant l'aspect caractéristique du staphylocoque (**Kloos, 1999**).

##### **IV.5.2.3. Test de Staphylocoagulase**

À partir d'une culture pure de 18 heures de la souche à étudier, nous réalisons une subculture en bouillon nutritif (cœur-cervelle). Dans un tube à hémolyse contenant 0,5ml de plasma on introduit 0,5ml de la suspension bactérienne déjà préparée, puis on incube à 37°C pendant 1 à 2 heures voire 24 heures. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif au plasma du lapin. Ces témoins ne sont pas ensemencés. La prise en masse recherchée par inclinaison du tube est observée, au point que le tube peut être retourné. Un caillot moins compact, visible avant la 24<sup>ème</sup> heure doit être considéré comme

positif; car il peut être suivi de redissolution provoquée par la fibrinolyse entraînant une fausse réaction négative. La souche de contrôle est l'espèce *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### IV.5.3. Recherche de l'activité antibactérienne

#### IV.5.3.1. Culture des bactéries-tests dans le milieu solide

Pour la détermination de l'activité antibactérienne des isolats d'Actinomycètes contre les bactéries-tests de référence « *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 » et « *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 » et la collection des isolats cliniques « IC13, IC28, IC29, IC30, IC31, IC32, IC33 », ces bactéries sont ensemencées par la méthode de strie d'épuisement à l'aide d'une anse de platine sur le milieu Chapman ensuite incubés à 37°C pendant 24h, dans le but de la vérification de leur pureté.

#### IV.5.3.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture de 18 h sur le milieu Chapman. Un inoculum de chaque bactéries-tests est préparé en milieu LB liquide. Après incubation de 24h la densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau distillée stérile pour l'obtention d'une densité optique égale 0,4 à 600 nm (Cavalla et Eberlin, 1994).

#### IV.5.3.3. Application de cylindre d'agar

Le milieu LB molle sur lequel nous avons effectué le test d'activité antibactérienne est préalablement ensemencé dans la masse par les bactéries tests (DO 0,04). Des cylindres d'agar de 7 mm de diamètre portant une culture de 3J d'Actinomycètes, découpés à l'aide d'un emporte-pièce sont déposés sur la gélose précédemment citée à raison de deux répétitions qui sont notées R1 et R2 (Lee et Hwang, 2002). Les répétitions sont considérées comme test confirmatif de la présence ou l'absence de l'activité antibactérienne.

Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures pour permettre une diffusion des molécules bioactives, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures (Kitouni, 2007).

Ce test a été répété pour des cultures des Actinomycètes de 7j, 10j et 14j d'incubation.

Les zones d'inhibition apparues autour des cylindres d'Actinomycètes sont alors mesurées en mm.



#### IV.5.4. Recherche de l'activité antifongique

##### IV.5.4.1. Culture des levures et champignon-tests

L'activité antifongique a été déterminée contre le champignon filamenteux *Aspergillus niger*, et la levure unicellulaire *Candida*.

La croissance des levures et champignons se fait sur les milieux de cultures, commerciaux ou préparés aux laboratoires, avec comme référence :

###### ✎ milieux non spécifiques

Comme le milieu sabouraud, on obtient en 24 ou 48 heures des colonies blanches, crémeuses, brillantes pour le *Candida* et pour *Aspergillus niger* les Colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires (**Euzéby, 2008 ; Pihet et Marot, 2013**).

###### ✎ milieux spécifiques

*C. albicans* à produire des chlamydospores, après culture à 37°C pendant 24 heures dans le milieu RAT gélose à la crème de riz et contenant du tween 80.

*C. albicans* se présente avec des colonies vert sur le milieu Chromaga *Candida* et *Candida kefyr* en rose (**Euzéby, 2008 ; Pihet et Marot, 2013**).

Dans notre étude on a basé sur la culture sur milieu Sabouraud.

##### IV.5.4.2. Préparation de la suspension

Pour chaque germe fongique « levure ou champignon », à partir d'une culture jeune une suspension a été réalisée dans l'eau distillé stérile de telle manière à obtenir une DO de 0,04 pour une longueur d'onde de 600 nm.

##### IV.5.4.3. Application des stries croisées

L'activité antifongique contre *Candida* et *Aspergillus niger* sur milieu solide ISP<sub>2</sub> est réalisée par la technique des stries croisées. Selon (**Duraipandiyar et al., 2010**) la technique des stries croisées consiste à ensemencer la souche d'Actinomycètes par un strie central de façon vertical dans une boîte de Pétri contenant le milieu ISP<sub>2</sub>, d'incuber pendant 7 jours à 28°C, ensuite les souches tests seront ensemencées par un strie croisant de façon horizontal perpendiculairement celui de l'Actinomycète, incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h, une autre boîte de témoin négatif du milieu ISP<sub>2</sub> est également ensemencée avec

les souches testées seules et incubées (Valanarasu et al., 2009). La production de molécules antimicrobiennes se traduira par une inhibition partielle ou totale de la souche test.

#### IV.5.4.4. Application de cylindre d'agar pour les levure-tests

La production de métabolites anti-*Candida* par les souches des Actinomycètes est confirmée par la technique des cylindres d'Agar.

Les Actinomycètes sont ensemencés en stries serrées à la surface de milieux ISP<sub>2</sub> et incubée à 30°C. Des cylindres de gélose de 7 mm de diamètre sont prélevés dans le 3<sup>ème</sup>, le 7<sup>ème</sup>, le 10<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jours d'incubation et sont déposés à la surface de milieu Sabouraud solide à raison de deux répétitions pour chaque souche. Le milieu Sabouraud solide est préalablement ensemencés à la surface à l'aide d'échoviollage par les suspensions des levures indicatrices ICF18, ICF19, ICF20, ICF21, ICF22, ICF23 et ICF24 (Titora et al., 1979 ; Petrosyan et al., 2003 ; Abouwarda et Abu El-Wafa, 2011).

Après une diffusion de 4 heures à 4°C, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures.

#### IV.5.4.5. Application de double couche pour les champignon-tests

L'activité anti-*Aspergillus* des souches d'Actinomycètes est aussi évaluée par la technique de la double couche. La technique consiste à ensemencer l'Actinomycète ponctuellement sur la boîte de Pétri contenant le milieu ISP<sub>2</sub>, après incubation de 7 jours à 30°C, on coule à la surface 10 ml de milieu semi-solide Sabouraud (agar 8 g/l) préalablement ensemencé en masse avec le champignon testé *Aspergillus niger*, incubé à 37°C de 24 à 48 h (Bastide et al., 1986).

Le résultat positif se traduit par absence de croissance de la souche test autour de la colonie d'Actinomycète.

#### IV.6. Extraction préliminaire des molécules bioactives

Après la sélection des souches les plus actives et la détermination des meilleurs jours de production des molécules bioactives que ce soit antibactériennes ou antifongiques.

Les souches sélectionnées sont ensemencées en stries serrées sur milieu ISP<sub>2</sub>. Après incubation à 30°C pendant trois à dix jours selon le meilleur jour de production, la gélose est fragmentée puis répartie dans des érlenmeyer contenant 40 ml des différents solvants organiques de polarité différente: méthanol (polaire), éthanol (polaire), n- butanol (polaire) dichlorométhane (de polarité moyenne), acétate d'éthyle (de polarité moyenne), et n-

hexane ( apolaire) à raison de deux répétitions pour chaque solvant . Après une agitation modéré pendant une heure, le liquide est filtré puis évaporé par le rhotavape.

Les premiers répétitions "R1" des extraits obtenues sont resuspendue dans 5 ml de méthanol absolu et les deuxièmes répétitions "R2" de ces extraits sont resuspendue dans 1 ml de DMSO à 10% (**Sutthinan et al., 2009**).

### **IV.7.Activités antimicrobiennes des extraits**

Les extraits organiques obtenus à partir des milieux gélosés sont testés par la méthode des disques et celle des puits.

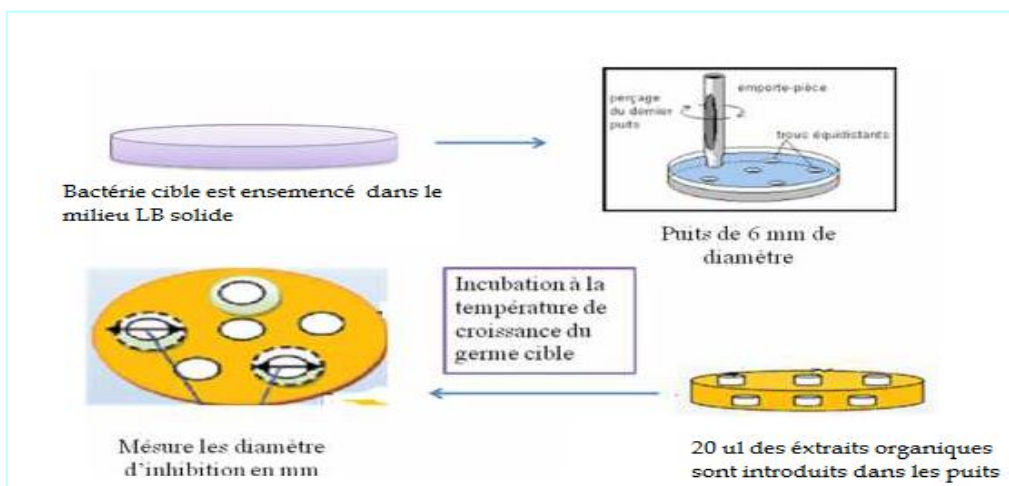
#### **IV.7.1. Méthode des disques**

Des disques de papier Whatman N°1 (6mm de diamètre) stériles sont déposés sur la gélose LB molle préalablementensemencée avec la bactérie-test "IC30" et le milieu Sabourad préalablementensemencé par les levure-tests "IC19 et ICF23" selon l'extrait a testé. Les disques sont ensuit inbété par 20 µl des extraits organiques et sont séchés sous la haute bactériologique pour les extraits diluées dans le méthanol et sous un courant d'air froid pour les extraits diluées dans la DMSO. Les boitesensemencées par les extraits antibactériennes sont incubées à 37°C alors que les boitesensemencées par les extraits antifongiques sont incubés à 30C° après une diffusion de deux à quatre heures à +4°C.

Des disques témoins, imprègnes de solvants purs et sèches dans les mêmes conditions, sont également testés. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuéeaprès 24 à 48 heures d'incubation (**Barry et al.,1970**).

#### **IV.7.2.Méthodes des puits**

Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce sur le milieu LB solide et Sabouraud solide qui ont préalablementensemencés avec la bactérie-test et les levures-tests .Un aliquote de 20 ul des extraits organiques est prélevé stérilement puis introduit dans ces puits, les boites sont mises à 4°C pendant 4h afin de permettre une diffusion des substances actives, incubées à 37°C cellesensemencés par les extraits antibactériennes et à 30C° les boitesensemencés par les extraits antifongiques. La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits après 24 h (**Djinni, 2009**).



**Figure n°6 :** Mise en évidence de l'activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat d'Actinomycète sur milieu LB solide par la méthode des puits (Melouah,2015).

#### IV.8. Etude biochimique des souches Actinomycétals représentatives

##### IV.8.1. Production des pigments mélanoides

Les pigments mélanoides sont des pigments bruns diffusibles. Leur mise en évidence est réalisée par la culture de la souche d'Actinomycètes sur milieu gélosé ISP<sub>6</sub> et ISP<sub>7</sub> par touche. La production des pigments mélanoides est appréciée après 2 et 4 jours d'incubation à 30°C. La pigmentation des milieux ensemencés est comparée avec celle du milieu stérile incubé dans les mêmes conditions (Djabaalh, 2010 ; Belyaagoubi, 2011).

##### IV.8.2. Hydrolyse de l'amidon

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

##### IV.8.3. Hydrolyse de caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de Gordon et Smith sur un milieu gélosé contenant 5% de caséine soluble et ensemencer par touche avec la souche d'Actinomycète. L'apparition des zones claires autour des colonies après 7 à 14 jours d'incubation à 30°C témoigne l'hydrolyse de la caséine (Staneck et Roberts, 1974; Gordon et al., 1974 ; Geraldine et al., 1981).

#### **IV.8.4. Action sur lait écrémé**

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

#### **IV.8.5. Hydrolyse de la gélatine**

En utilisant un film photographique usé préconisée par (**Pickett et al., 1991**).

Découper des bandelettes de papier photographique usé de tels sorte qu'il sera transférer dans les conditions de stérilité dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique stérile (environ 5ml), y ajouter un inoculum dense de la souche d'Actinomycète à tester. De même façon préparer un tube à essai avec de l'eau physiologique stérile, y ajouter la bandelette de papier photographique pour créer un témoin négatif (témoin de comparaison). Incuber à 28°C pendant 7 jusqu'à 14 jours, la liquéfaction de la gélatine se traduit par décollement de la couche supérieur du film. ; ce test est confirmé par le résultat du système Api20E.

#### **IV.8.6. Test d'estérase**

Est mise en évidence après ensemencement des isolats sur le milieu de Sierra (1957) (voir l'annexe). Après 3 à 9 jours d'incubation, l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie indique un test positif (**Delmotte, 1958**).

#### **IV.8.7. Recherche de l'activité hémolytique**

Pour tester l'activité hémolytique chez les Actinomycètes en réalisé une culture sur la gélose de Columbia à base de sang frais 5% (COS), si les Actinomycètes possèdent une activité hémolytique, elles produisent différentes zones d'hémolyse sur la gélose au sang (**Tableau n°4**).

**Tableau n°4:** les différents types d'hémolyse (Dellars, 2007)

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

#### IV.8.8. Utilisation de la galerie Api 20 E

Le système Api 20E Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des Entérobacteriaceae, permet de mettre en évidence l'assimilation de certains sucres et la production de quelques enzymes. L'Api 20 E peut aussi être utilisé pour le groupe des Actinomycètes (Wink, 2001 ; Stanckebrandt et al., 2001).

##### IV.8.8.1.Principe

La galerie Api 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile par une suspension préparées à partir des cultures pures jeunes de chaque souche à identifier (7 jours d'incubation à 30°C), les réactions produites pendant la période d'incubation se traduits par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs, la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Stanckebrandt et al., 2001).

##### IV.8.8 .2.Mode opératoire

###### 🔪 Préparation de la galerie

- 👉 Repartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour crée une atmosphère humide, répète ce juste toute la durée d'incubation.
- 👉 Mettre la référence de la bactérie sur la languette latérale de la boite.
- 👉 Placer stérilisement la galerie dans la boite d'incubation.

### 🔗 Inoculation de la galerie

A partir d'une suspension bactérienne préalablement préparé pour chaque isolat et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte

- 👉 Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL.
- 👉 Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- 👉 Créer une atmosphère anaérobie dans les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- 👉 Renfermer la boîte d'incubation et incuber a 37 °C pendant 7 jours (Stanckebrandt et *al.*, 2001).

**NB:** Lemode de lecture de L'Api 20E est présenté dans l'annexe.

### V. Résultats et Discussion

#### V.1. Repiquage et vérification de la pureté des isolats

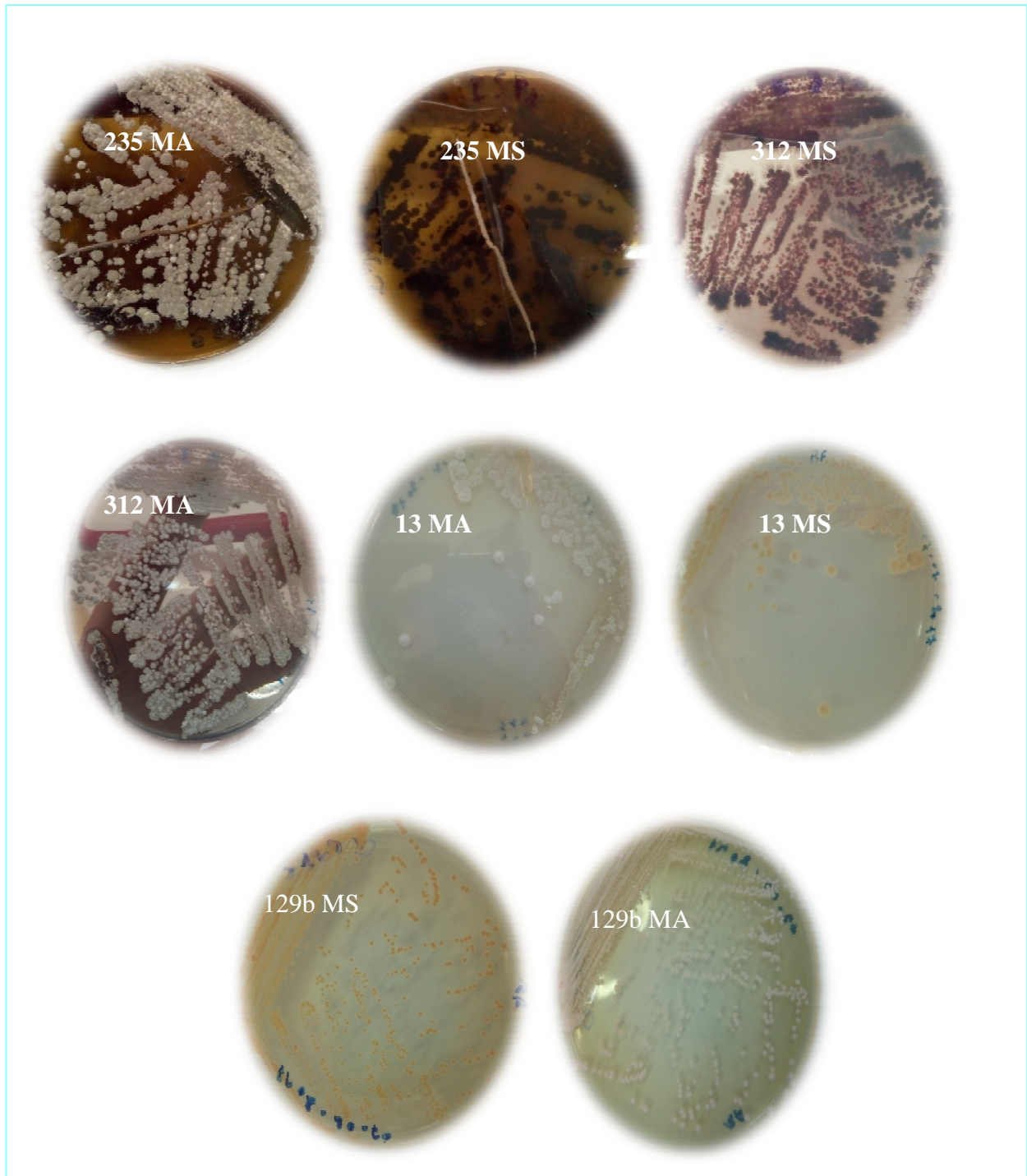
Des colonies pures des isolats sont obtenues après un repiquage successif sur le milieu ISP<sub>2</sub> par la méthode d'épuisement. Chaque isolat pur est caractérisé par une mode de croissance déférentes. A l'exception des souches S235 ,S302, S312, S403 et S418 qui montré une croissance faible, les isolats sont caractérisés par une croissance moyenne au bout de 3<sup>ème</sup> jours, tandis que le mode de croissance est devient important pour tous les souches au bout de 7<sup>ème</sup> jusqu'aux 14<sup>ème</sup> jours .

Les 20 isolats ont des Mycélium de Substrat et des Mycélium aérienne de couleur déférentes comprise entre le vert, le beige, le marron, le blanc et le gris (illustré dans le **Tableau n°5** et la **Planche n°1**). Les isolats S235, S 312 et S372 produisent des pigments diffusibles dans le milieu ISP<sub>2</sub>. Pour la S235 et S372 le pigment est de couleur vert foncé et pour la S312 est de couleur violé puis devient au bout de temps noire. Cette pigmentation peut être liée à la production de molécules bioactives.



Tableau n°5 : Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 20 isolats

N° de souche d'Actinomycètes	Mode De Croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigmentation
S13	importante	blanc	beige	absence
S129a	importante	blanc	orange	absence
S129b	importante	blanc	orange	absence
S130	importante	blanc	gris	absence
S227	importante	beige	beige	absence
S235	faible	gris	Vert devient noir	Vert foncé
S292	importante	gris	beige	absence
S302	faible	beige	Beige	absence
S312	faible	violé	Violé et gris	Violé devient noir
S372	importante	gris	Vert foncé	vert
S386	importante	marron	marron	absence
S403	faible	beige	orange	absence
S417	importante	marron	orange	absence
S418	faible	blanc	orange, crevette	absence
S419	importante	blanc	beige	absence
S428	moyenne	blanc	blanc	absence
S429	importante	marron	marron	absence
S430	importante	marron	marron	absence
S431	importante	marron	marron	absence
S450	importante	blanc	gris	absence



**Planche n°1** : Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur le milieu ISP<sub>2</sub>

### V.2. Etude morphologique des isolats des Actinomycètes

#### V .2.1. Etude macromorphologique

Les colonies d'Actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Ce qui permet d'utiliser ces caractéristiques dans la taxonomie microbienne en plus elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives.

L'étude macroscopique des isolats d'Actinomycètes est basé sur l'observation des caractéristiques culturaux à savoir : le mode de croissance, l'aspect des colonies, la couleur de MA et MS et l'apparition ou non de pigmentation après leur ensemencement sur les milieux gélosés Bennett et ISP<sub>2</sub>.

La plupart des colonies des isolats d'Actinomycètes apparaissent au bout de 3<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30°C, c'est une caractéristique de ces microorganismes à croissance lente. Les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. On constate que les colonies de certaines genres érigent des hyphes en 2 a 3 jours. Par ailleurs, certains isolats présente une croissance nulle dans cette période on citer la S403, S418 et S428.

La nature des colonies est changée avec l'évolution de la croissance. Au 7<sup>ème</sup> jusqu'aux 14<sup>ème</sup> jours la plupart des isolats présentent une croissance et une sporulation abondantes sur les deux milieux ou la majorité des colonies devient poudreuses ou granuleuses adhérent à la gélose possédant des couleurs caractéristiques des mycéliums.

La couleur de MA de la plupart des isolats est invariable dans les deux milieux utilisé dans le cadre de cette étude où on a enregistré la même observation concernant l'aspect de la plupart des souches telle S129a, S129b, S227, S235 et S372 . Ceci corrobore les résultats obtenus lors des travaux menés par **Muiru** et ses collaborateurs (**2008**), stipulent que les milieux de culture utilisés pour l'identification des Actinomycètes n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoides .

Tandis que, le développement de MA est liée fortement par le milieu de culture d'après (**Vijgenboom et Keijer, 2001**) qui on rapporte que la composition de milieu et importante pour le développement de ce mycélium pour certain genre d'Actinomycètes comme les

*Streptomyces*, c'est pour cela dans notre étude on a utilisé les milieux Bennet et ISP<sub>2</sub>, qui ont été choisis pour leur richesse en substrats carbonés "le glucose" et azotés "extrait de levure et extrait de viande".

L'aspect de colonies varie d'un isolat à un autre d'un aspect rond à plat, avec un contour irrégulier par fois régulier. La surface est ridée poudreuse chez les isolats S130, S235, S292, S302, S372 et S450 et leur contour est échancré et parfois porte des fructifications. Tandis que les isolats S129a et S129b, présentent un aspect qui ressemble plus au moins à celui des bactéries ordinaires présentant des colonies rondes, convexes, lisses, avec un MA de couleur blanc et MS de couleur orange. Bien que les isolats S386, S417, S430 et S431 possèdent une surface non poudreuse et un aspect de huileux et brillant.

Les colonies obtenues par l'ensemencement par touche caractérisé par des formes particuliers à celle ensemencer par stries serrées où leur forme apparaissent clairement ainsi que leur couleurs (**Planche n°3**).

En général, la croissance de la plupart des isolats est abondante pour les deux milieux de culture avec une taille moyenne des colonies est comprise entre 1 à 4mm.

Le **tableau n° 6** et la **planche n° 2** illustre les différents aspects morphologique pour les isolats d'Actinomycètes sur le milieu Bennet et ISP<sub>2</sub>.

**Tableau n°6** : Les caractères morphologiques des 20 isolats sur les deux milieux Bennet et ISP<sub>2</sub> après 14 jours d'incubation

N° d'Actinomycètes	Milieu de culture							
	Bennet				ISP <sub>2</sub>			
	Cr	MA	MS	P	Cr	MA	MS	P
<b>S13</b>	+++	beige	beige	-	+++	blanc	beige	-
<b>S129a</b>	+++	blanc	orange	-	+++	blanc	orange	-
<b>S129b</b>	+++	blanc	orange	-	+++	blanc	orange	-
<b>S130</b>	+++	Blanc et gris	beige	-	+++	blanc	gris	-
<b>S227</b>	+++	beige	beige	-	+++	beige	beige	-
<b>S235</b>	+++	gris	vert	+	+	gris	vert	+
<b>S292</b>	+++	gris	gris	-	+++	gris	beige	-
<b>S302</b>	+++	beige	beige	-	+	beige	beige	-
<b>S312</b>	+++	beige	beige	-	+	Violet et gris	violet	+
<b>S372</b>	+++	gris	vert	-	+++	gris	vert	+
<b>S386</b>	+++	marron	marron	-	+++	marron	marron	-
<b>S403</b>	+	beige	orange		+	beige	orange	-
<b>S417</b>	+++	marron	orange	-	+++	marron	orange	-
<b>S418</b>	++	blanc	beige	-	+	blanc	Orang/ crevette	-
<b>S419</b>	+++	blanc	beige	-	+++	blanc	beige	-
<b>S428</b>	++	blanc	blanc	-	++	blanc	blanc	-
<b>S429</b>	+++	marron	marron	-	+++	marron	marron	-
<b>S430</b>	+++	marron	marron	-	+++	marron	marron	-
<b>S431</b>	+++	marron	marron	-	+++	marron	marron	-
<b>S450</b>	+++	Gris et blanc	beige	-	+++	Gris/ blanc	Gris et beige	-

+ : croissance faible

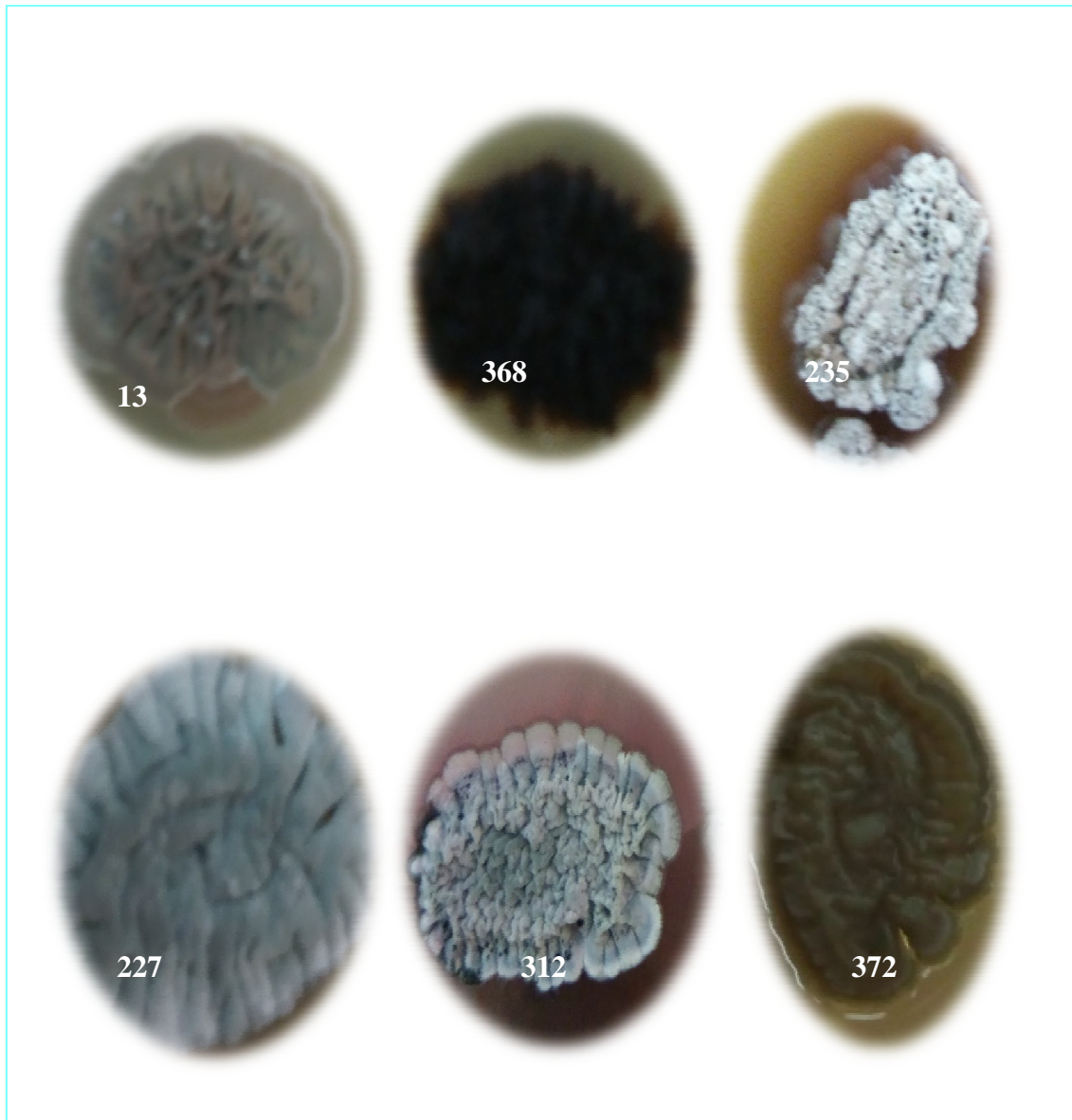
- : absence pigmentation

++: Croissance moyenne

+++ : Croissance importantes



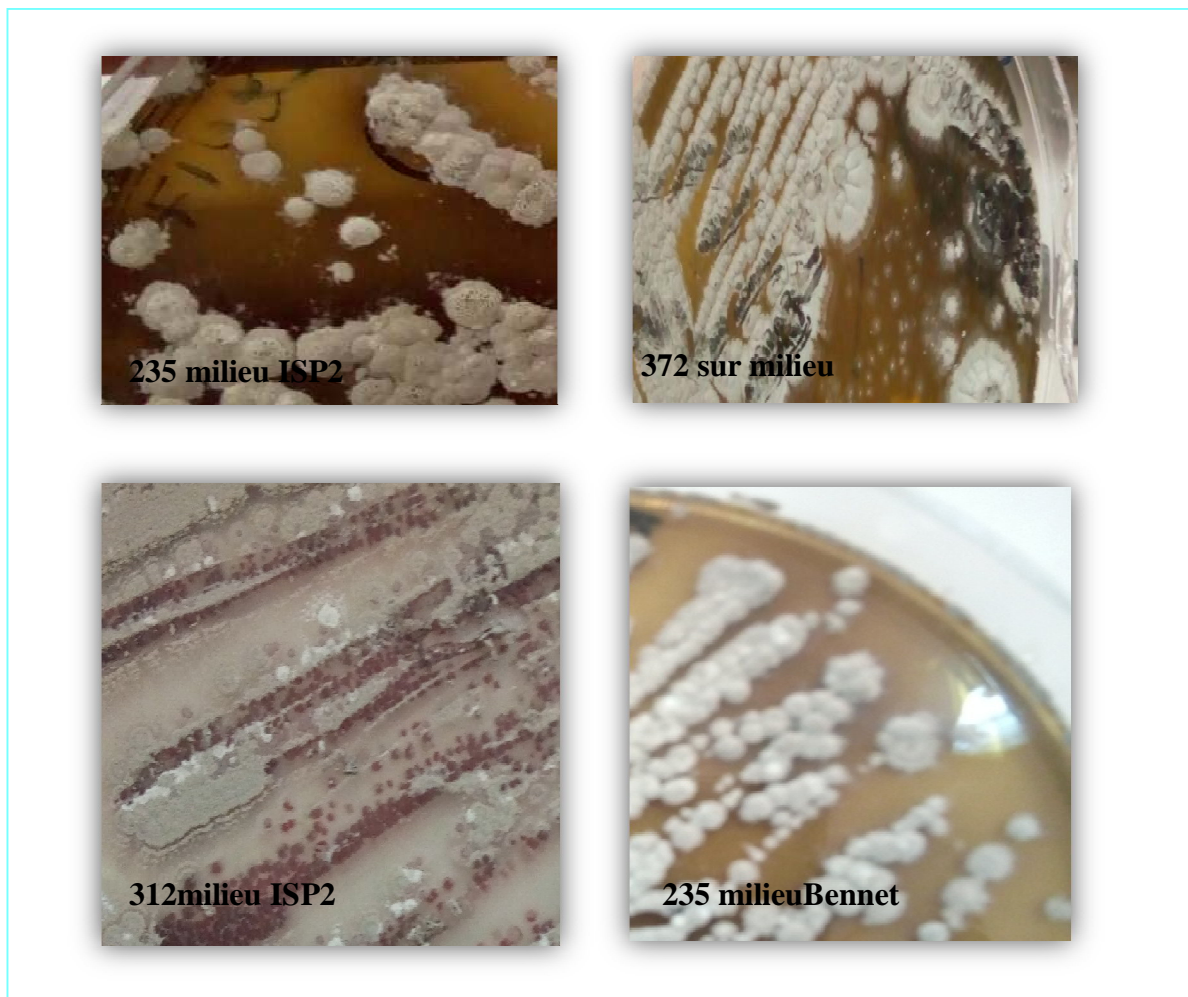
**Planche n°2** :Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur les milieux Bennet et ISP<sub>2</sub>



**Planche n°3 :** Photos de l'observation sous loupe binoculaires de quelques isolats ensemencé par touche sur le milieu ISP<sub>2</sub>

La production des pigments est une caractéristique très importante pour les Actinomycètes, (**Shirling et Gottlieb, 1972**) l'on considère comme une clé pour la classification. La pigmentation diffusible produite par ces isolats d'Actinomycètes peut être des substances bioactives et ceci d'après (**Margalith, 1992**) qui rapporte que les Actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. Dans notre étude l'élaboration de pigment diffusible a été remarquablement sur le milieu ISP<sub>2</sub> et le milieu Bennet parallèlement par l'isolat S235, par contre pour la S312 et S372 sont produites

seulement dans le milieu ISP<sub>2</sub>. Les autres souches n'ont élaboré aucun pigment sur les deux milieux d'étude (**planche n°4**).



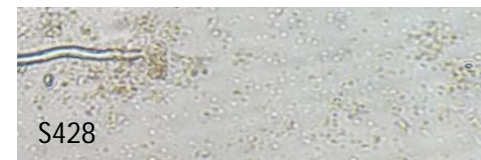
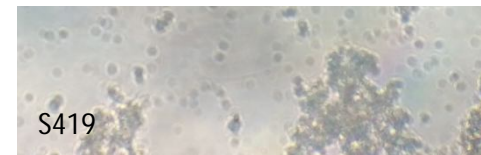
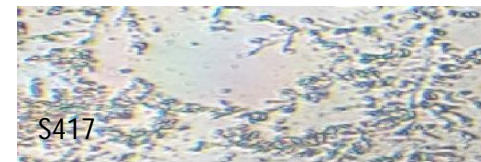
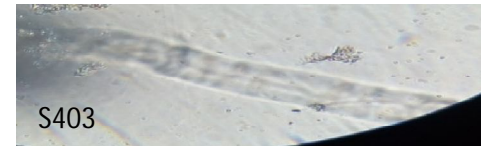
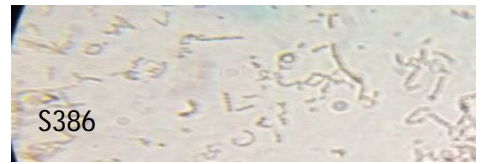
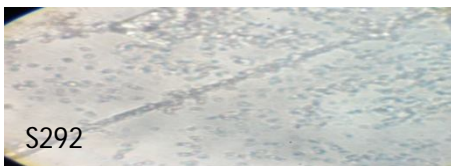
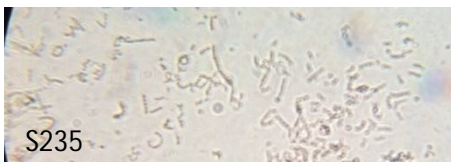
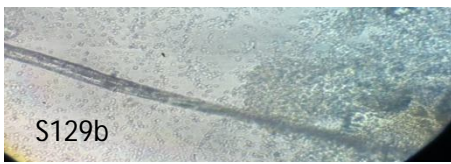
**Planche n°4** : Photos des isolats produites des pigments sur le milieu Bennet et ISP<sub>2</sub>

### V.2.2. Etude microscopologique

Cette étude permet de déterminer les caractéristiques et les chaînes de spores (nombre, forme et morphologie) par examen direct au grossissement X100 (**Planche n° 5**), l'observation nécessite des cultures matures. Les caractères montrent la présence de spore et la fragmentation du mycélium caractéristiques pour chaque souche (**Williams et al., 1983**).



## Résultats et Discussion



**Planche n° 5:** Photo des résultats de l'Observations microscopiques d'état frais de quelques isolats

## Résultats et Discussion

Les résultats des observations microscopiques des isolats après coloration de Gram nous a permis d'apprécier un certain nombre de caractères des Actinomycètes (**Tableau n°7 et Planche n°6**), ces caractères montrent la morphologie des filaments et l'agencement des spores, sachant que tous les isolats des Actinomycètes sont des bactéries à Gram positif.

**Tableau n°7:** Résultat des caractères micromorphologiques de quelques isolats

<b>N° de souche d'Actinomycètes</b>	<b>Observation microscopique après coloration de Gram</b>
<b>S 129a</b>	Longue fragment de filament lineaire, avec des spores isolees
<b>S 227</b>	Absence de filament, avec des spores en courte chaine
<b>S 235</b>	Filament finne , et des spores isolée
<b>S 312</b>	Filament finne , avec des spores regroupe en amas, et a longue chaine
<b>S372</b>	Court filament, avec des spores en courte chaine
<b>S 386</b>	Des Longues filament fines , et des spores isolees
<b>S 403</b>	Courte filament, et des spores isolees
<b>S417</b>	Court filament, avec longue chaine de spores
<b>S 418</b>	Longue filament, et des spores isolees
<b>S 419</b>	Longue filament, avec des spores regroupe en amas, et a longue chaine
<b>S 429</b>	Longue filament, et des spores isolees
<b>S428</b>	Absence de filament, et la presence des spores isolees
<b>S430</b>	Longue filament, et des spores isolees

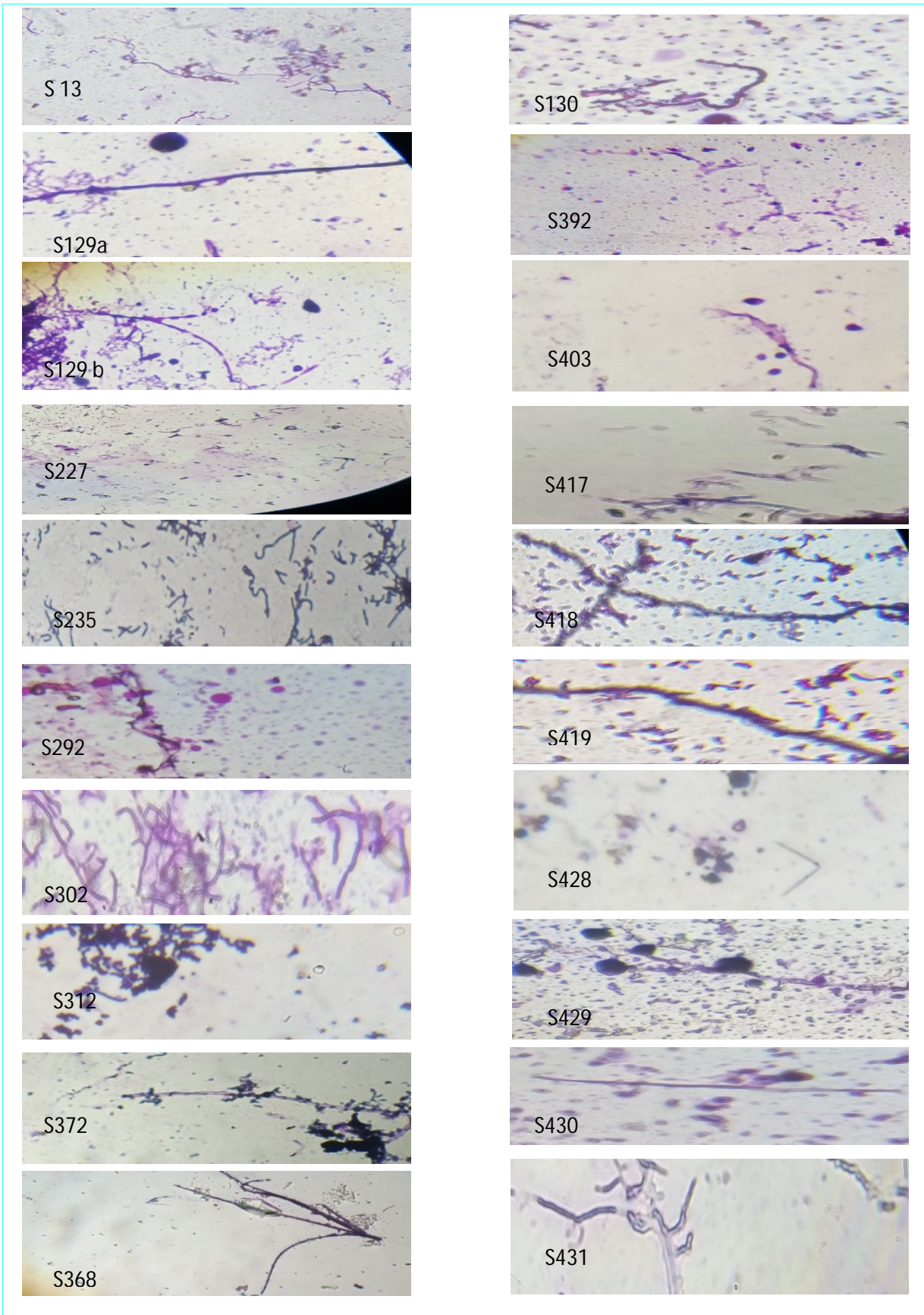


Planche n° 6: Photos des résultats de l'Observations microscopiques après coloration de Gram

La micromorphologie des isolats d'Actinomycètes , d'une part, diffère d'un espèce a l'autre par la présence du mycélium aérien , et d'autre part, par la forme de spores (**Ara et al., 2008**).

D'après les résultats obtenus après l'observation direct et la coloration de Gram on résume que tous les isolats présentent un aspect filamenteux avec présence des spores et parfois des chaines des spores ce qui confirmé leur appartenance aux groupe majeure des Actinomycètes où ces membres proche au genre *Streptomyces* tel S450 et S130 et d'autre genre rare tel *Micromonospora* comme S129a, S129b et S418.

### V.3.Recherche de l'activité antimicrobienne des Actinomycètes

#### V.3.1.Etude des caractéristiques des levures-tests

##### V.3.1.1.Etude macromorphologique

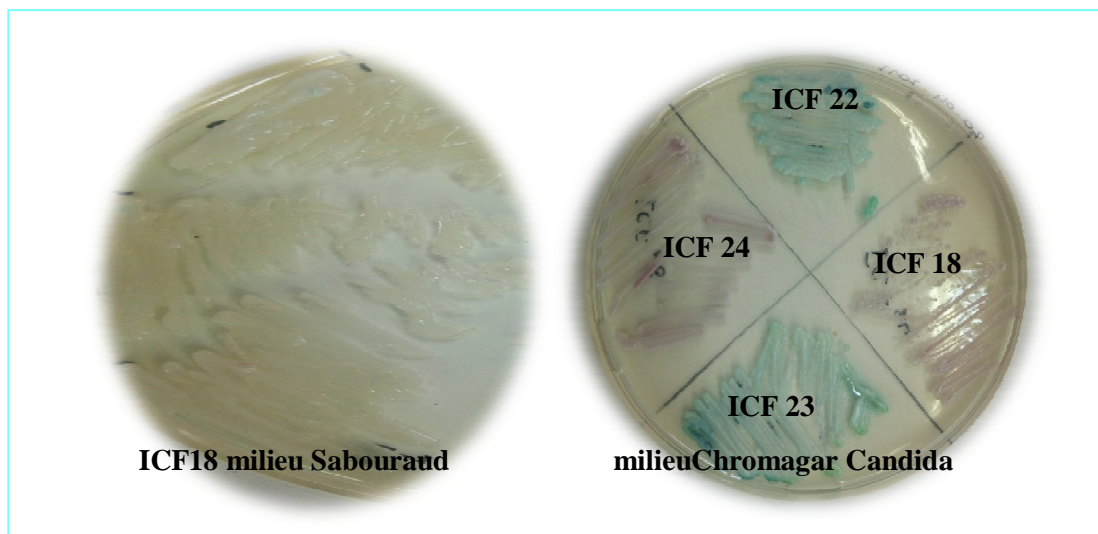
Les *Candida* ;des levures peu exigeantes sur le plan nutritif, elles ont la capacité de croitre sur différents milieux de cultures, à savoir Sabouraud, Chromagar *Candida* et milieu RAT.

Les cellules de ces champignons unicellulaires sont caractérisées par des aspects déférents, on peut trouver des cellules sphériques, ovoïdes, allongées, en ellipse ou même sous forme de bouteille. Leur texture aussi est variable, elle peut être crémeuse, muqueuse ou coulante. La couleurs des colonies est variable selon le milieu de culture. D'après les résultats observés nous pouvons déduire que :

- ✎ Les ICF18, ICF19 ,ICF20 , ICF21, IC22 ,ICF23 et ICF24 présentent une croissance abondantes sur les trois milieux après une incubation de 48h à 30C°.
- ✎ Sur le milieu Sabouraud tous les IC de ICF18 jusqu'au ICF24 possèdent les même critères phénotypiques ; des colonies rondes crémeuses et blanches.
- ✎ Sur le milieu RAT les colonies de tous les ICF apparent de couleur blanche.
- ✎ Sur le milieu Chromagar*Candida* les colonies de tous les ICF apparaissent crémeuses mais de couleurs déférentes où les ICF18, ICF20, ICF21 et ICF24 sont colorées en roses et les ICF19, ICF22 et ICF23 sont colorées en vert.

Les colonies en vert susceptible d'être de *Candida albicans* alors que les colonies en rose peut être des *Candida kkefyf* . D'après (**Coignard , 1998**) qui indique que la différenciation de couleurs des colonies produites par des réactions d'enzymes spécifiques utilisant des substrats chromogènes contenus dans la gélose.

Les caractéristiques culturaux des quelques ICF de *Candida* illustré dans la **figure n°7**.



**Figure n°7:** Caractéristiques culturaux de quelques isolats sur milieu Sabouraud et chromagar *Candida*

### V.3.1.2. Etude micromorphologique

#### V.3.1.2.1. Coloration de bleu de méthylène

Les résultats de l'observation microscopiques des ICF après coloration au bleu de méthylène montrent des cellules plus grandes comparées à celles des bactéries caractérisant par une forme ronde soit isolé ou groupé.

#### V.3.1.2.2. Recherche de pseudofilamentation

Bien que la seule caractéristique commune des *Candida* et l'état unicellulaire, nombreux d'entre elles sont aussi capables de former dans certaines conditions un pseudomycélium tel que *Candida albicans*.

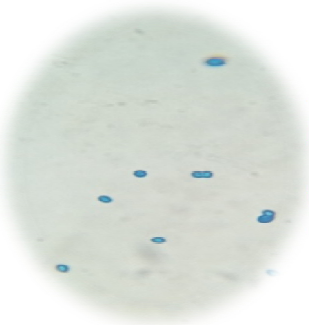
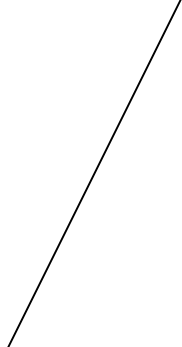
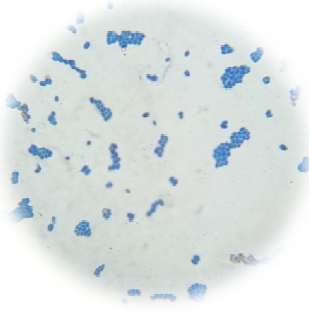
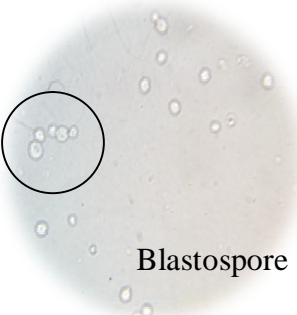

Lorsqu'on utilise le milieu RAT dans la recherche de pseudofilamentation, le pseudomycélium forme des chlamydozoïdes. Les Chlamydozoïdes sont des structures terminales ou latérales arrondies. Elles sont formées par épaissement du thalle, mesurent deux fois la taille du blastospore et possèdent une paroi plus épaisse. Les chlamydozoïdes sont la forme de résistance de *Candida albicans*.

Les résultats montrent après une observation microscopique la présence de pseudofilaments pour les trois souches ICF19, ICF22 et ICF23 ce qui oriente vers l'espèce

*Candida albicans*. Tandis que les ICF18, ICF20, ICF21 et ICF24 sont dépourvues de pseudomycélium.

Le **tableau n°8** résume les résultats observés pour les 2 ICF représentatif ICF18 et ICF19.

Tableau n°8 : Résultats des caractères microscopiques des 2 ICF représentatifs

N° de l'ICF	Coloration au bleu de méthylène		Recherche de pseudofilamentation	
	Observation microscopique	Photo d'observation	Observation microscopique	Photo d'observation
ICF18	Colonies rondes isolées		Absence dans le milieu RAT et le sérum	
ICF19	Colonies rouges regroupé		Présence de pseudomycélium et chlamydoportes	 <p>Blastospore</p>  <p>Chlamydoporte</p>

### V.3.2. Etude des caractéristiques des bactérie-tests

#### V.3.2.1. Etude morphologique

Le taux d'isolement de 9 souche de *Staphylococcus* à partir des cultures est positives. Sur le milieu de cultures Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus*. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche (Carbonnelle, 1990). Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C (Figure n°8). L'aspect microscopique caractéristique du staphylocoque, montre la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin (Figure n°9).

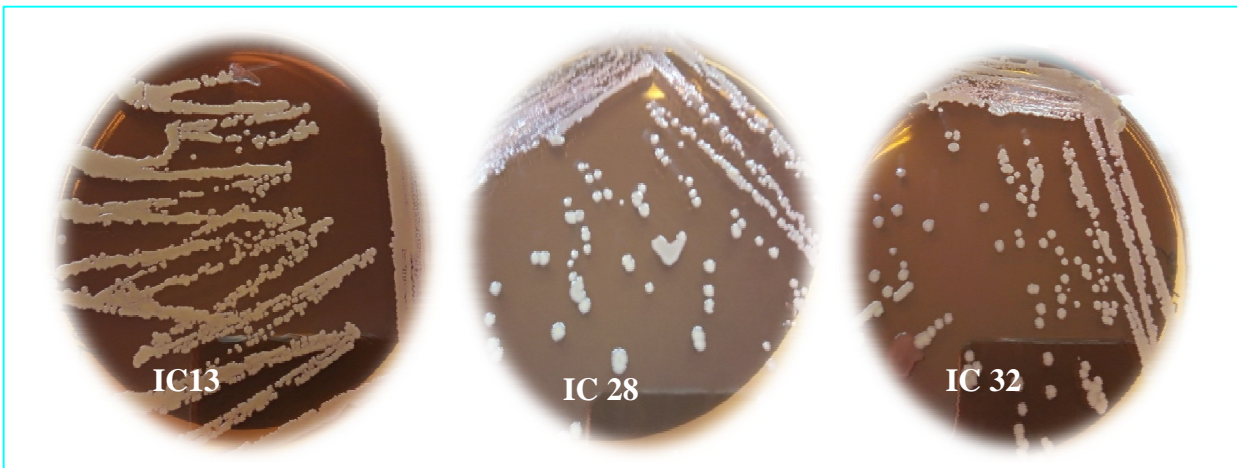


Figure n°8: Aspect des colonies des quelques isolats de *S. aureus* sur milieu Chapman

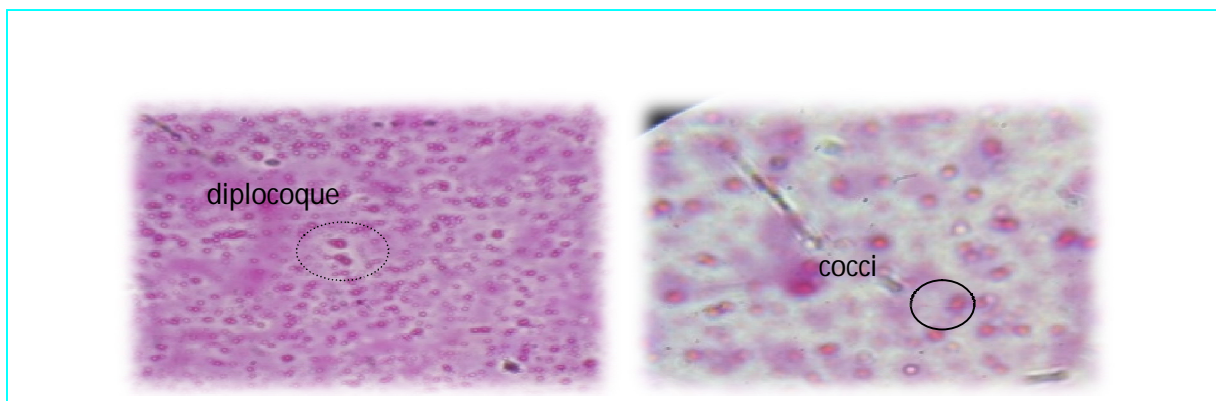
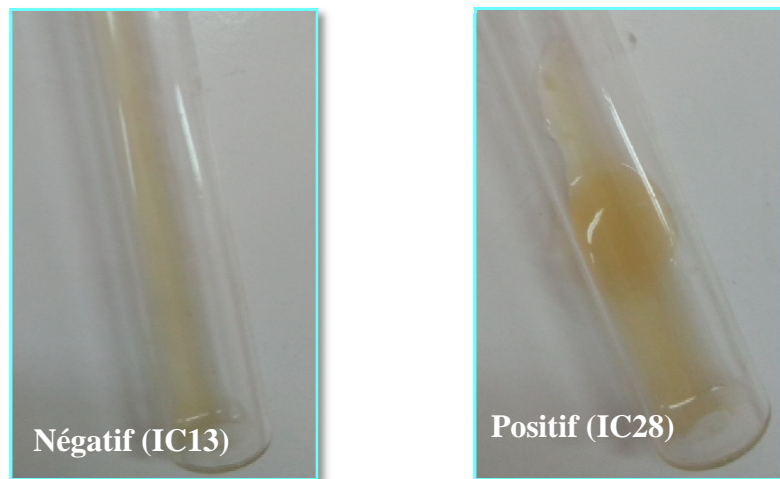


Figure n°9: Photos de résultats d'observation microscopique des quelques isolats de *S.aureus* après coloration de Gram



### V.3.2.2. Teste de Staphylocoagulase

Les souche Staphylocoque (Staphe 1, IC28 ,IC29 ,IC30 ,IC32 et IC33 ) qui produit la coagulas libre provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation ( **Figure n° 10**). La mise en évidence de l' activité coagulas libre chez une souche de *Staphylococcus* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine.



**Figure n° 10** : Résultats de test de Staphylocoagulase de quelques isolats cliniques

### V.3.3. Recherche de l'activité antibactérienne

Dans ce cadre, le spectre d'activité antibactérienne des souches Actinomycétales purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar, méthode de diffusion en milieu gélosé, vis-à-vis de neuf souches de la bactérie *Staphylococcus aureus* .

La concentration de l'inoculum de bactérie-test dans cette méthode reconnue comme un des facteurs intervenant dans l'augmentation de la sensibilité de la technique pour cela dans notre étude elle a été fixée à une densité optique qui ne dépasse pas 0.04 dans une longueur d'onde de 600 nm. Cette méthode est parfaitement cohérent avec celle utilisé par (**Reghioua et al ., 2006**). Après incubation, la croissance de la bactérie-testensemencée sur la gélose, permet de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Les résultats obtenus dans cette étude montre d'une part que l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie Actinomycétale à l'autre et d'autre part que pour la même souche d'Actinomycètes l'activité antibactérienne diffère d'un jours à un autre où sur 20 isolats

seules 10 souches d'Actinomycètes soit 50% ont montré une activité antibactérienne contre au moins un des germes cibles testés et au moins dans une des deux répétition dans le premiers test qui est effectué dans le J3. Tandis que, pour le test qui est effectué dans le J7 le pourcentage des souches actives est élevé pour atteindre 75% soit de 15 isolats. Pour le J10 et le J14, le nombre de souche active atteindre respectivement 16 soit 80% et 18 soit 90%. Ce pourcentage de souches actives se montre plus élevé par rapport à d'autres pourcentages de souches actives décrites dans des études de criblage concernant les souches d'Actinomycètes, tel que dans l'étude de (Belyaagoubi, 2011) qui a trouvé que sur 38 souches d'Actinomycètes isolées de différents sol, seulement 23 souches (60,5 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible.

Les résultats présentés dans la **figure n°11** montrent que dès le premier test effectué dans le J3 la souche S450 possède une activité contre toutes les bactéries testées avec des zones d'inhibitions varient entre 10 et 22 mm où la bactérie-test IC 30 présente comme la souche la plus sensible. Cela concorde avec les résultats obtenues (Aouiche et al., 2014), qui a montré que l'isolat PAL 111 qui est proche phylogéquement de genre *Streptomyces* a une activité contre *S.aureus* ATCC 25293 avec un diamètre de 18 mm. Les souches S129a, S129b, S227, S235 et S372 présentent un spectre d'activité antibactérienne faible dans les deux répétitions avec une zone d'inhibition ne dépasse pas le 10 mm vis-à-vis des quelques isolats testées tel que Staphé 2 qui possède une zone d'inhibition de 9 mm sous l'effet de la souche S129a seulement dans la répétition 1. Cependant les souches S130 et S428, sont actives respectivement contre Staphé 2 et IC13 avec des zones d'inhibition comprise entre 13 et 15 mm. Tandis que les autres isolats d'Actinomycètes ne révèlent aucune activité antibactérienne détectée.

Le test effectué dans le 7<sup>ème</sup> jours (**Figure n°12**) montrent une augmentation important non seulement de pourcentage des souches actives mais aussi dans les diamètres des zones d'inhibition qui s'élève au 34 mm avec la souche S450, la plus grande zone d'inhibition obtenues (**Planche n°7**). Les valeurs d'inhibition obtenues par l'isolat S130 sont aussi connus une élévation remarquable où ils sont comprise entre 14 et 26 mm dans les deux répétition contre les neuf bactérie-tests (**Tableau n°9**). Ceci a été également comparables avec les travaux de (Şahin et Uçur, 2003) qui ont isolé des souches de *Streptomyces* du sol de la Turquie avec une activité vis-à-vis de *S. aureus* de 11 à 30 mm, et de (Oskay et al., 2004) qui révèlent l'activité antibactérienne des souches d'Actinomycètes du même origine ou elles possèdent une inhibition entre 08 et 16mm.

Par ailleurs, Les valeurs des zones d'inhibition ont commencé à décliner pour la plupart des isolats dans les tests effectués dans le J10 et J 14 malgré l'apparition des souches actives seulement dans cette période ont cité l'exemple de la S386. Ces souches sont caractérisées par des zones d'inhibition faibles. (Les résultats des tests de J10 et J14 sont illustré respectivement dans **les figures n° 13 et n°14**).

La souche S130 possède une activité antibactérienne particulière apparaisse dans le J7 avec des zones d'inhibition importantes contres tous les bactéries-tests, le remarquable que cette activité importantes est disparaît complètement dans le J10 et apparaisse une autre fois dans le J14 avec des zones d'inhibition plus au moins importantes contre quelques isolats seulement où la plus grande zone d'inhibition est observé contre Staph 2 et IC 31 et comprise entre 10 et 16 mm (**Planche n°7**). Cette production biphasiques est comparable à celle observés dans les travaux de de (**Janice ,1989**) qui a mentionné la production biphasique d'actinorhadin par *Streptomyces coelicolor*, et ( **Boubetra , 2013**) ou une nouvelle espèces de *Saccharotrix* produites biphasiquement un antibiotique dithiopyrrolones.

Tableau n°9 : Résultats des tests d'activité antibactérienne

Souches D'Actinomycètes	Diamètresde la zones d'inhibition en mm																		
	Staphe 1		Staphe 2		IC13		IC28		IC29		IC30		IC31		IC32		IC33		
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
13	-	-	11(J10)	-	-	-	-	-	-	8 (J10)	11(J10)	12(J10)	14(J10)	9(J7)	-	-	-	12(J7)	-
129a	-	-	9(J3)	-	-	20(J7)	8(J10)	9(J10)	10(J3)	10(J3)	10(J3)	9(J3)	-	-	-	-	-	-	-
129b	-	-	-	-	9(J10)	-	8(J10)	9(J10)	8(J10)	9(J10)	9(J3)	9(J3)	-	-	-	-	8(J14)	-	-
130	19(J7)	19(J7)	21(J7)	22(J7)	21(J7)	15(J7)	24(J7)	22(J7)	26(J7)	15(J7)	14(J7)	15(J7)	15(J7)	18(J7)	17(J7)	15(J7)	18(J7)	19(J7)	-
227	-	10(J7)	12(J14)	12(J14)	-	-	-	-	-	14(J14)	10(J14)	-	10(J7)	-	9(J14)	-	8(J14)	-	-
235	-	10(J7)	10(J7)	9(J7)	11(J10)	10(J10)	-	10(J3)	10(J10)	10(J10)	12(J10)	13(J10)	10(J7)	-	11(J7)	9(J7)	9(J7)	-	-
292	-	-	-	-	9(J3)	-	-	-	9(J14)	9(J14)	15(J7)	14(J7)	14(J14)	-	-	15(J14)	14(J7)	16(J7)	-
302	-	-	10(J10)	-	-	-	-	-	15(J14)	14(J14)	15(J14)	17(J14)	13(J7)	-	13(J7)	13(J7)	9(J7)	-	-
312	14(J10)	-	-	-	-	-	-	12(J7)	15(J10)	15(J10)	17(J10)	12(J10)	10(J7)	-	10(J7)	-	19(J7)	20(J7)	-
372	9(J7)	12(J7)	11(J14)	11(J14)	10(J3)	-	-	-	13(J14)	14(J14)	-	-	10(J7)	12(J7)	10(J7)	-	8(J14)	-	-
386	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(J10)	9(J14)	-	15(J14)	17(J14)	17(J14)	16(J14)	-	-	-
403	-	-	-	-	-	-	8(J14)	-	95(J14)	-	12(J14)	-	-	-	-	-	-	-	-
417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(J7)	10(J7)	8(J7)	-	8(J10)	-	-
418	-	-	-	-	-	-	-	-	12(J14)	10(J14)	-	-	-	-	10(J14)	18(J14)	-	-	-
419	10(J7)	9(J7)	-	-	-	-	-	-	-	10(J10)	-	-	9(J7)	10(J7)	-	11(J14)	-	-	-
428	9(J14)	-	9(J14)	9(J14)	9(J14)	10(J14)	-	-	-	-	-	-	10(J10)	10(J10)	10(J7)	9(J7)	-	-	-
429	10(J7)	9(J7)	8(J10)	-	8(J7)	-	-	-	-	-	-	8(J10)	9(J7)	10(J7)	9(J7)	-	-	-	-
430	9(J10)	-	-	-	16(J14)	24(J14)	-	-	-	-	8(J10)	9(J10)	-	-	8(J7)	9(J7)	-	-	-
431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(J14)	-	9(J3)	-	-	-	-	-	-
450	32(J10)	29(J10)	27(J10)	26(J10)	30(J7)	30(J7)	30(J7)	30(J7)	32(J10)	33(J10)	32(J7)	34(J7)	25(J10)	26(J10)	25(J10)	17(J10)	32(J10)	34(J10)	-

NB :le jour indiqué est le meilleur jour de production

- : indique l'absence de l'activité

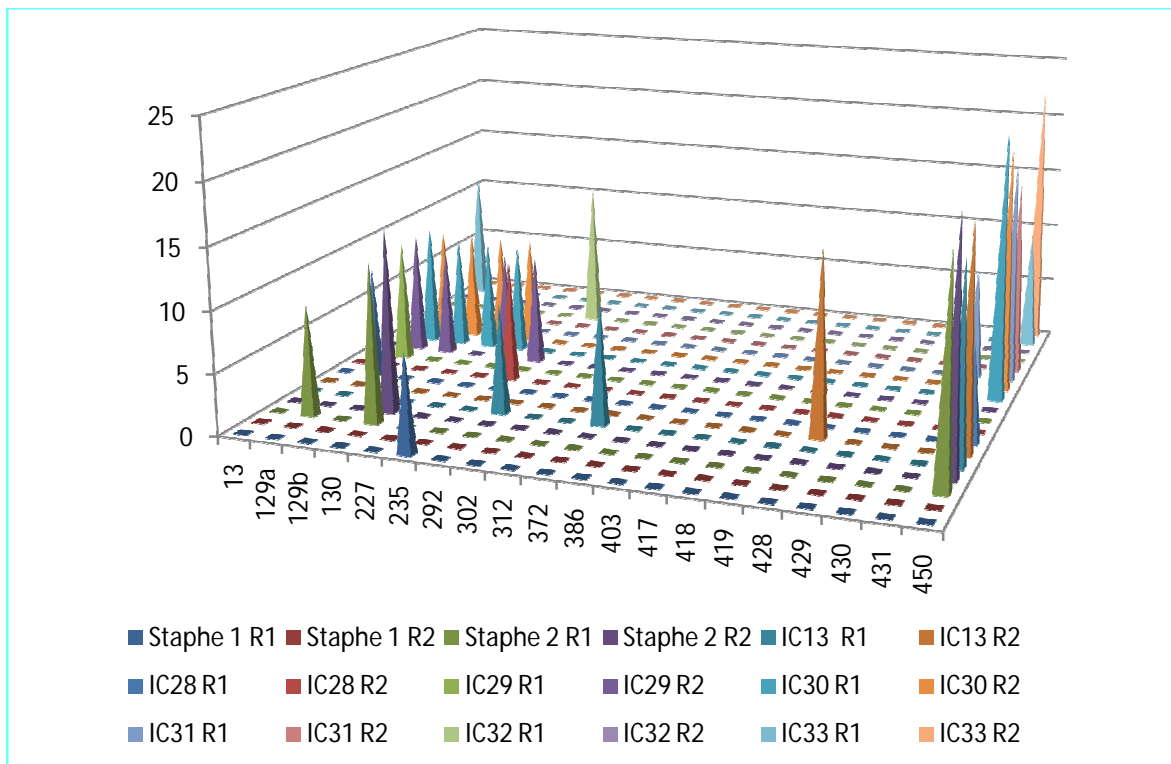


Figure n° 11 : Activité antibactérienne de J3 des 20 isolats d'Actinomycètes

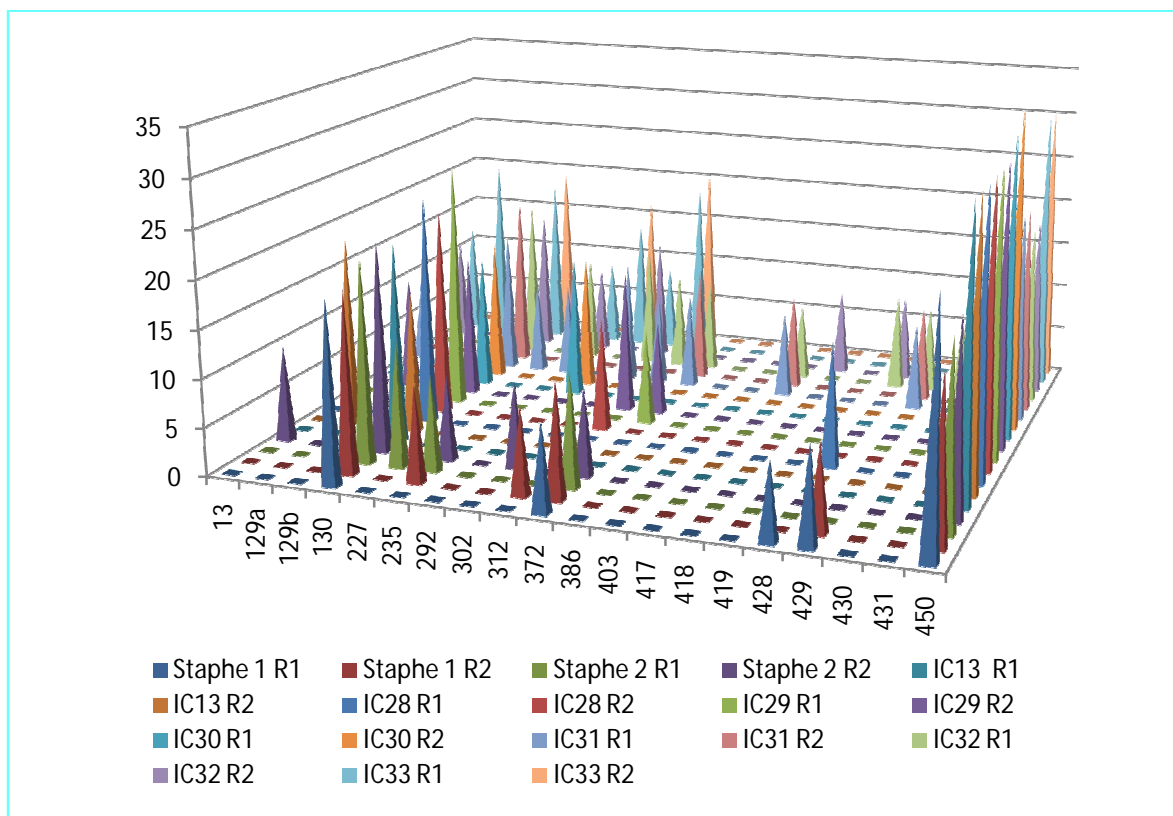


Figure n° 12 : Activité antibactérienne de J7 des 20 isolats d'Actinomycète

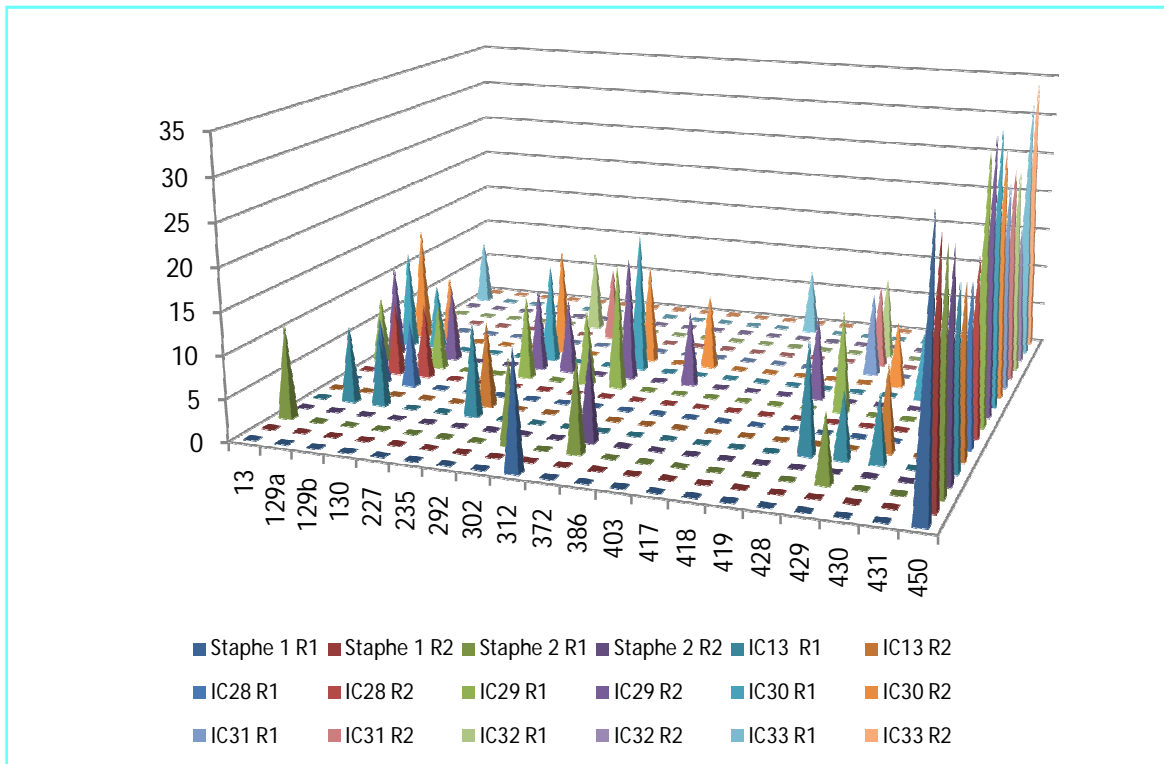


Figure n°13 : Activité antibactérienne de J10 des 20 isolats d'Actinomycètes

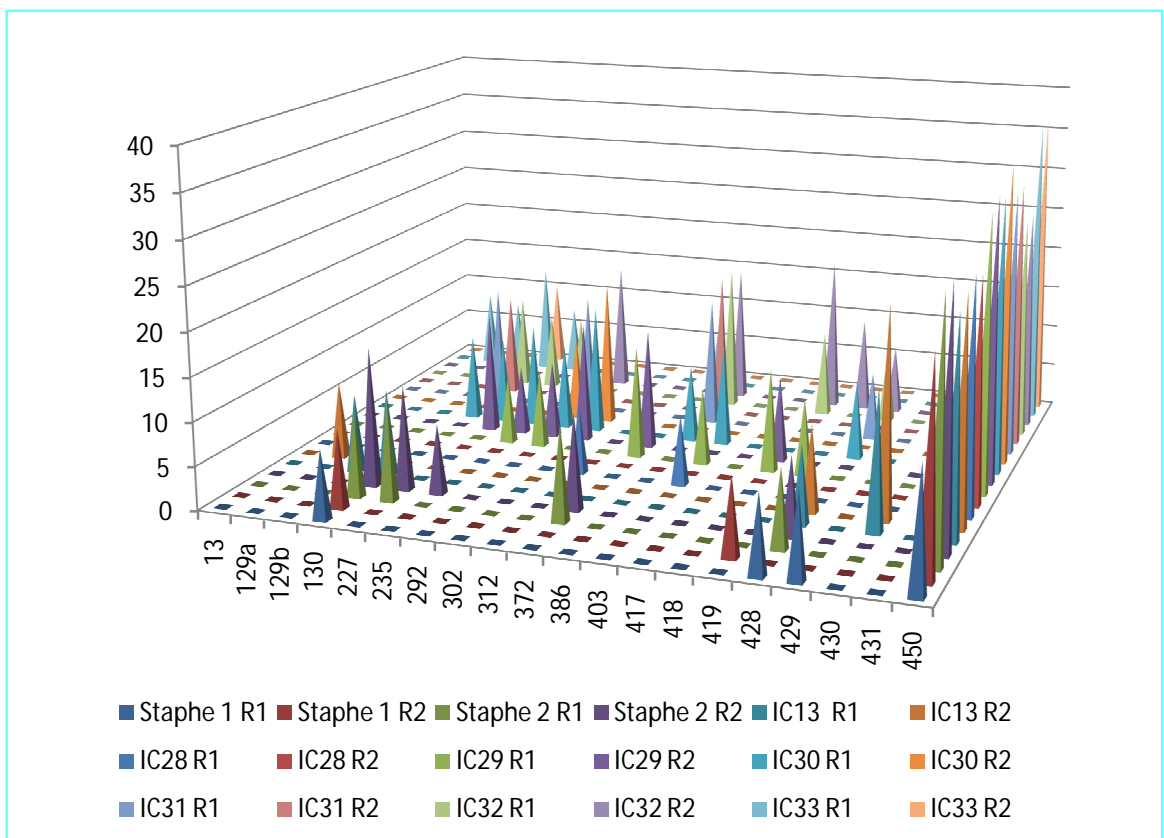
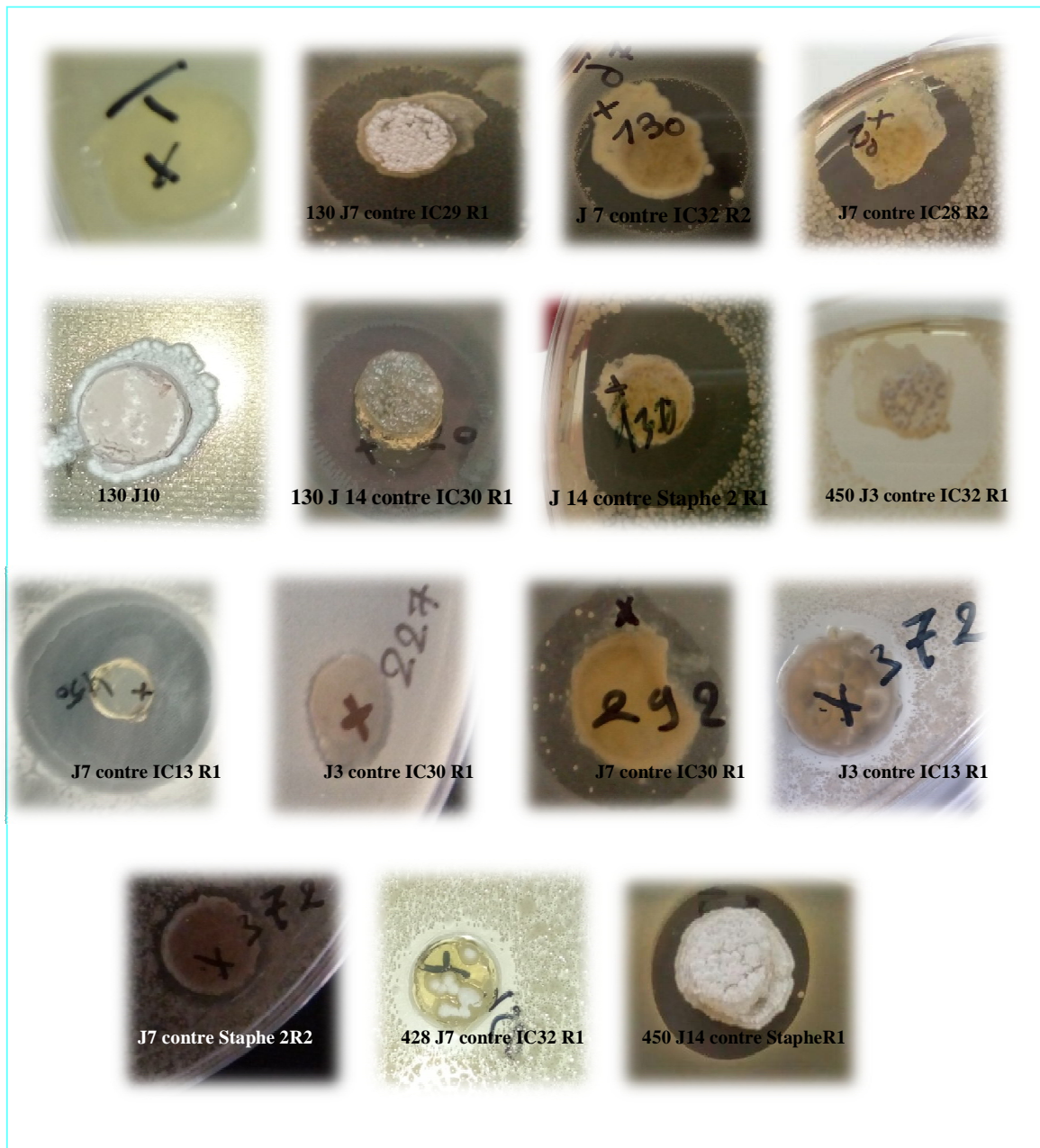


Figure n°14: Activité antibactérienne de J14 des 20 isolats d'Actinomycètes



**Planche n°7 :** Photos des résultats de test d'activité antibactérienne de quelques isolats

En ce qui concerne les performances des souches étudiées, nous notons que la souche S450 qui fait partie du genre *Streptomyces* montre une activité contre tous les bactéries-tests avec des zones d'inhibition importantes dès le J7 au J14. Ces résultats confirment que les *Streptomyces* sont les microorganismes les plus importantes lorsqu'il s'agit de la production des molécules bioactives.

### V.3.4. Recherche de l'activité antifongique

#### V.3.4.1. Recherche de l'activité anti *Candida*

Le profil de résistance des *Candida* non seulement aux antifongiques couramment utilisés mais aussi contre les nouvelles classes d'antifongiques créant un véritable problème thérapeutique (Dannaoui et al., 2012).

La recherche de l'activité anti-*Candida* a été réalisé par la méthode de stries serrées et celle de cylindre d'Agar. Ces techniques permettent de mettre en évidence les zones d'inhibition résultant de la synthèse des molécules biactives par l'apparition des zones claires a proximités ou autour de la souche Actinomycatale testé.

##### V.3.4.1.1. Recherche de l'activité anti *Candida* par la Technique de stries croisées

Cette technique simple permet de tester l'activité d'une souche d'Actinomycète sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de Pétri, cependant, l'ensemencement des souches tests qui se fait par strie sur le milieu ISP<sub>2</sub> qui n'est pas sélectif à tous les microorganismes diminue la reproductibilité des résultats (Walstad et al., 1974).

Les résultats de ce teste contre les souches indicatrices des *Condida* apparait le rendement très faible de cette technique cela est indiquée par l'absence des zones d'inhibition, et si la zone existe le diamètre faibleattendre au maximum 3mm (Figure n°15) on citons l'exemple de l'isolat S403 et S386 contre ICF23, S 417 contre ICF21 et S129b contre ICF18.

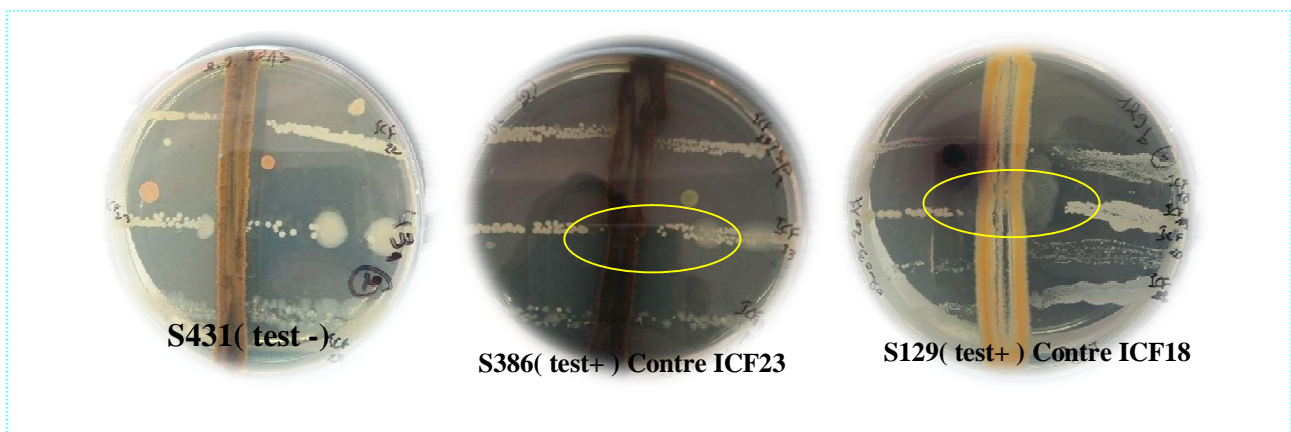


Figure n°15 : Photos des résultats de test anti-*Candida* par la technique stries croisées de quelques isolats



### V.3.4.1.2. Recherche de l'activité anti *Candida* par la technique de cylindre d'agar

L'évaluation de l'activité anti-*Candida* par la méthode de cylindre agar révèle des zones d'inhibition entre 20 et 34 mm pour deux souches parmi les 20 testés dans le test effectué le J3 (**Figure n°16**), et des zones comprise entre 9 et 17 mm pour 15 souches dans le test effectué le J7( **Figure n°17**). Ces résultats obtenues sont comparable avec celles obtenues par (**Slavica et al., 2005**) qui ont mentionné que des souches Actinomycétales appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition comprise entre 11 et 31mm vis-à-vis de *C.albicans* ATCC10231.

La synthèse des molécules antifongiques par les deux souches Actinomycetales S386 et S450 se fait très rapidement probablement parce que les cellules possèdent les enzymes et/ou les précurseurs nécessaires pour leur synthèse où elles les produisent rapidement au 3<sup>ème</sup> jours d'incubation.

Pour le J10, les zones d'inhibition révélés connes une élévation importante surtout pour les deux souches S129a et S418. Le diamètre d'inhibition atteindre 35 mm contre *C.albicans* "ICF19" sous l'action inhibitrice de la souche S129a et 34 mm contre la même levure-test sous l'action de la souche S418 (**Figure n°18**), on note que ces résultats sont approche aux résultats des expériences réalisées par (**Lemriss et al., 2003**) qui on mentionnées que parmi les 110 Actinomycètes d'origine clinique, 42 sont actives contre *C.albicans* CIP 884.65 avec des diamètres des zones d'inhibition varient entre 03 et 52 mm. L'isolat S386 montre une activité importante dans ce test où on a marquée l'apparition des zones d'inhibition varié entre 10 et 30mm contre la pluparts des ICF après avoir presque perdu sa propriétés inhibitrice dans le test effectué le jour précédents (**Planche n°8**). Le test de J14 caractérisé par l'apparition des faibles zones d'inhibitions sauf pour les souches S129a, S418, S386 et S450 contre quelques isolats tel ICF19 et ICF23 (**Figure n°19**).

On constate que plusieurs souches montrent des activités intéressantes notamment S129a, S386 et S450. D'autres souches au contraire n'ont montré aucun antagonisme vis à vis des germes utilisés. Ces résultats indiquent aussi que les levure-test ICF19 et ICF23 sont les plus sensibles, c'est pour cette raison que la suite des tests (l'extraction) se fera à son en contre ( le **tableau n°10** résume les résultats les plus significatives de test d'activité antifongique).

**Tableau n°10 : Résultats des tests d'activité antifongique**

Souches D'Actinomycètes	Diamètresde la zones d'inhibition en mm													
	ICF 18		ICF 19		ICF 20		ICF 21		ICF 22		ICF 23		ICF 24	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
129a	-	-	35(J10)	32(J10)	-	-	-	-	33(J10)	30(J10)	24(J10)	26(J10)	13(J10)	17(J10)
129b	9(J7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130	9(J10)	13(J10)	-	-	-	14(J10)	10(J10)	14(J10)	-	-	-	-	12(J10)	11(J10)
227	-	-	-	-	-	-	9(J7)	-	-	-	-	-	-	-
235	-	-	29(J10)	19(J10)	-	-	-	-	24(J10)	14(J10)	-	22(J10)	-	-
292	20(J10)	17(J10)	17(J10)	21(J10)	-	-	-	-	17(J10)	15(J10)	25(J10)	27(J10)	9(J10)	-
302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11(J7)	10(J7)
312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(J7)	12(J7)	11(J10)	-
372	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
386	25(J3)	17(J3)	21(J3)	30(J3)	-	-	-	-	22(J10)	27(J10)	23(J3)	34(J3)	9(J7)	12(J7)
403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9(J7)	12(J7)	12(J7)	8(J7)
418	-	-	34(J10)	28(J10)	-	-	9(J14)	9(J14)	25(J10)	19(J10)	25(J10)	21(J10)	11(J10)	13(J10)
419	-	-	-	-	-	-	9(J14)	9(J14)	-	-	-	-	-	-
428	-	-	9(J7)	9(J7)	11(J7)	-	9(J14)	9(J14)	-	-	10(J7)	10(J7)	9(J7)	9(J7)
429	-	-	-	-	-	-	9(J14)	9(J14)	-	-	-	-	-	-
430	-	-	-	-	-	-	9(J14)	9(J14)	-	-	-	-	-	-
431	-	-	-	-	-	-	9(J14)	9(J14)	-	-	-	-	-	-
450	25(J3)	25(J3)	22(J3)	23(J3)	25(J3)	25(J3)	20(3)	22(J3)	25(J3)	25(J3)	26(J3)	28(J3)	15(J7)	15(J7)

NB : Le jour indiqué est le meilleure jour de production

■ : indique l'absence de l'activité

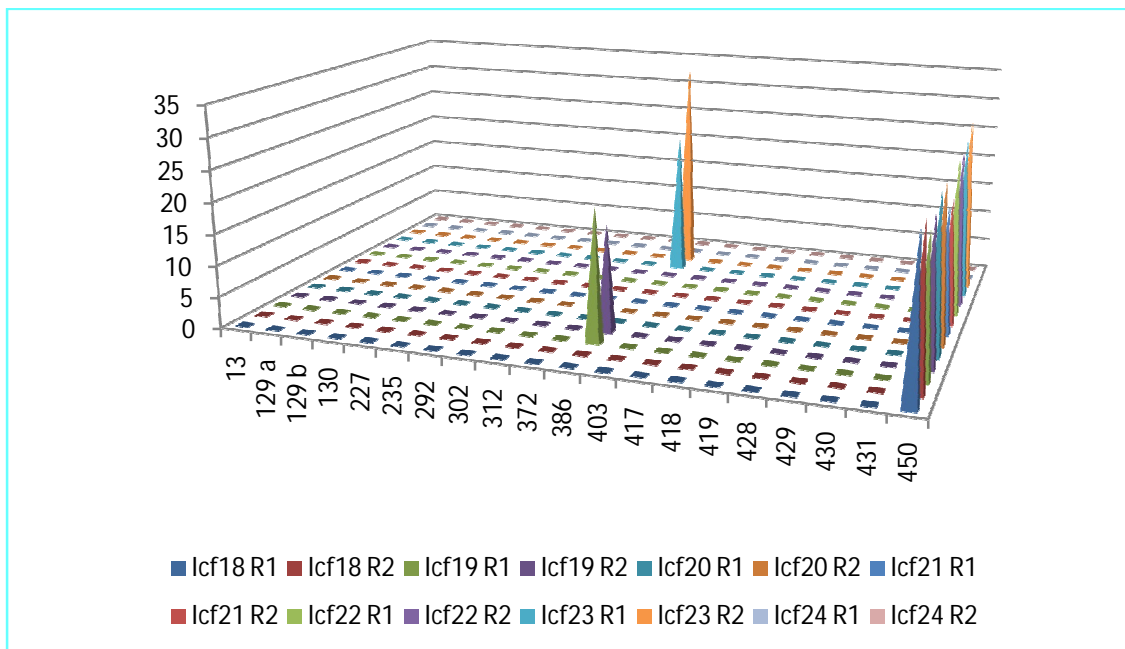


Figure n°16 : Activité antifongique de J3 des 20 isolats d'Actinomycètes

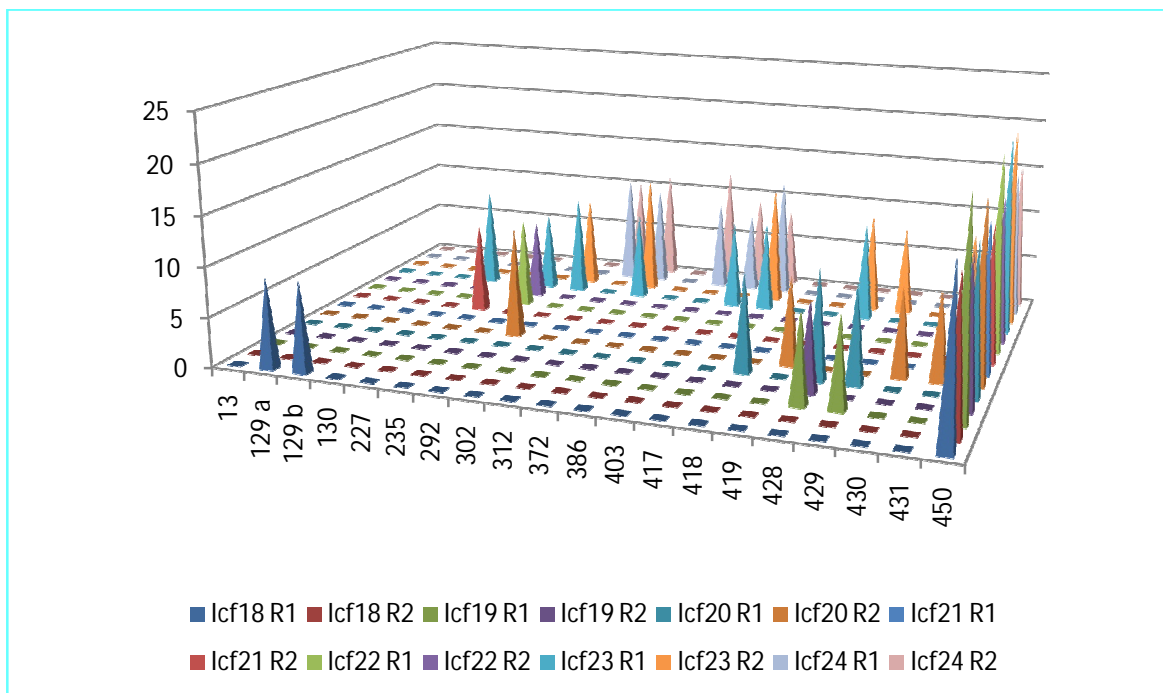


Figure n°17 : Activité antifongique de J7 des 20 isolats d'Actinomycètes

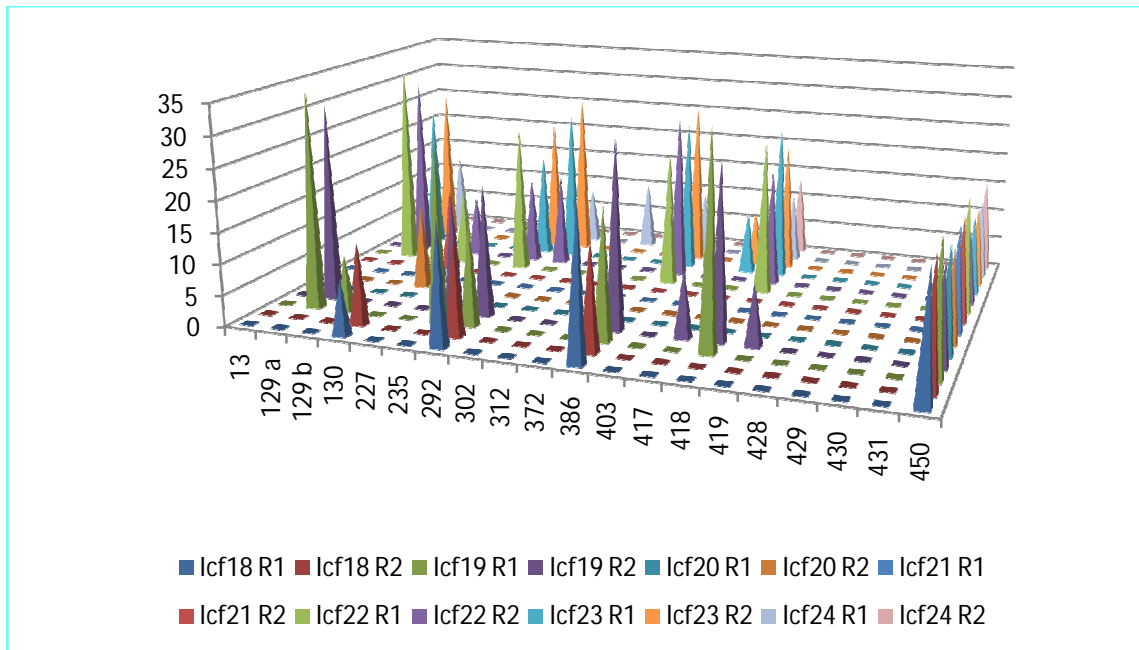


Figure n°18 : Activité antifongique de J10 des 20 isolats d'Actinomycètes

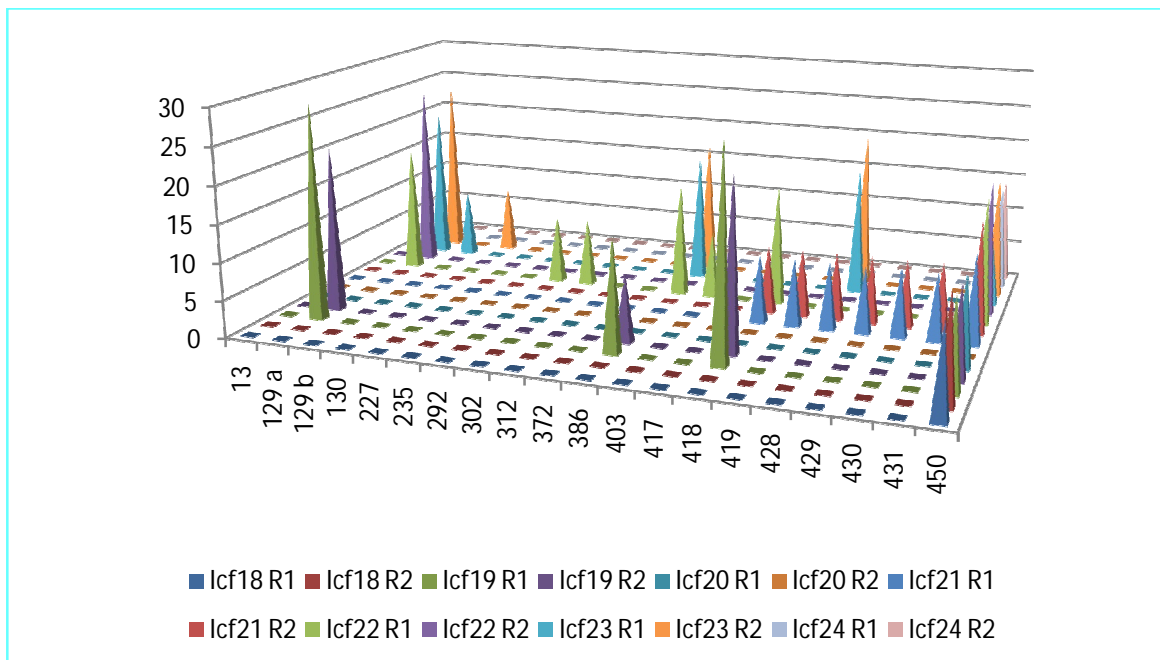


Figure n°19 : Activité antifongique de J14 des 20 isolats d'Actinomycètes

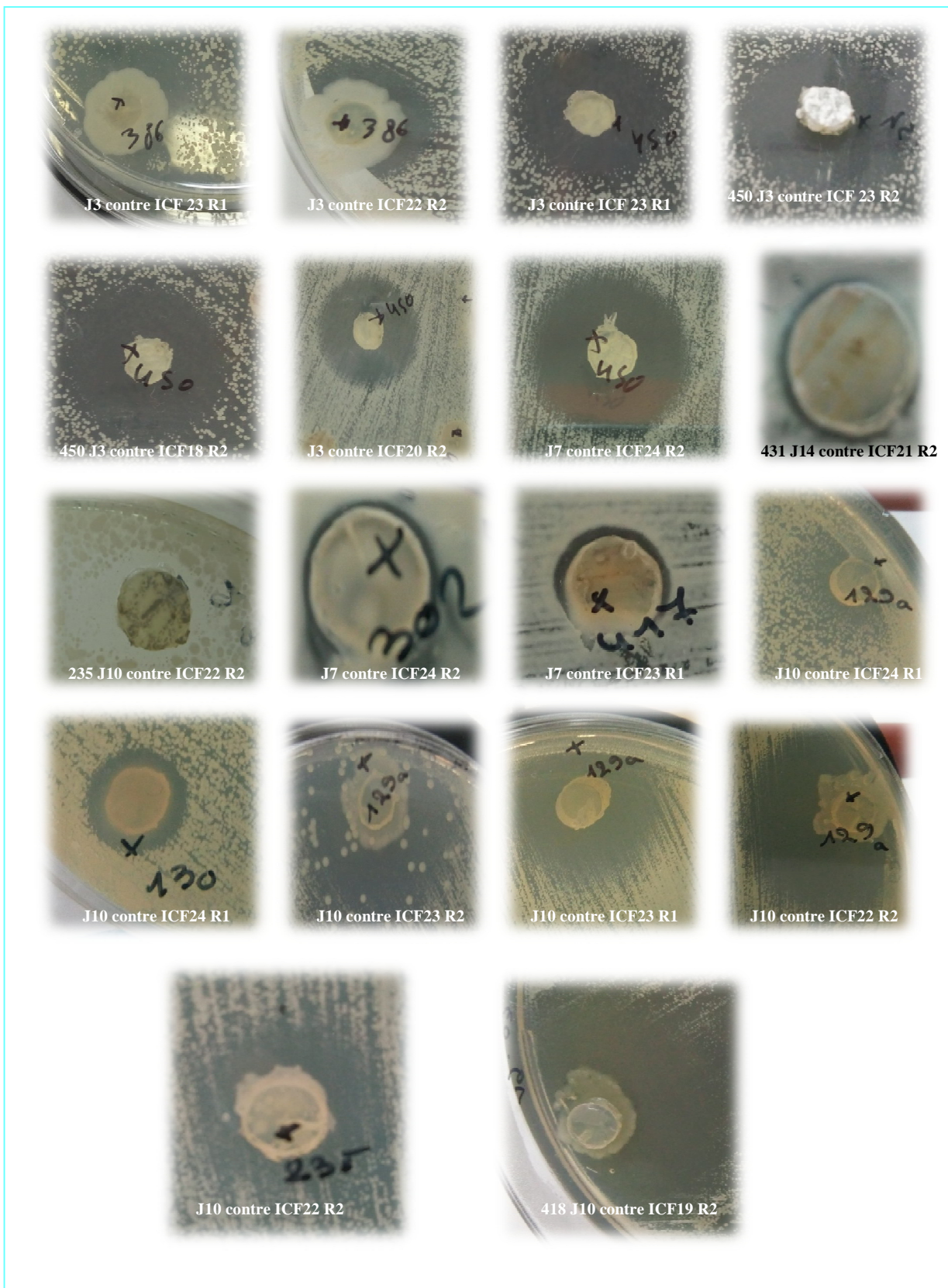


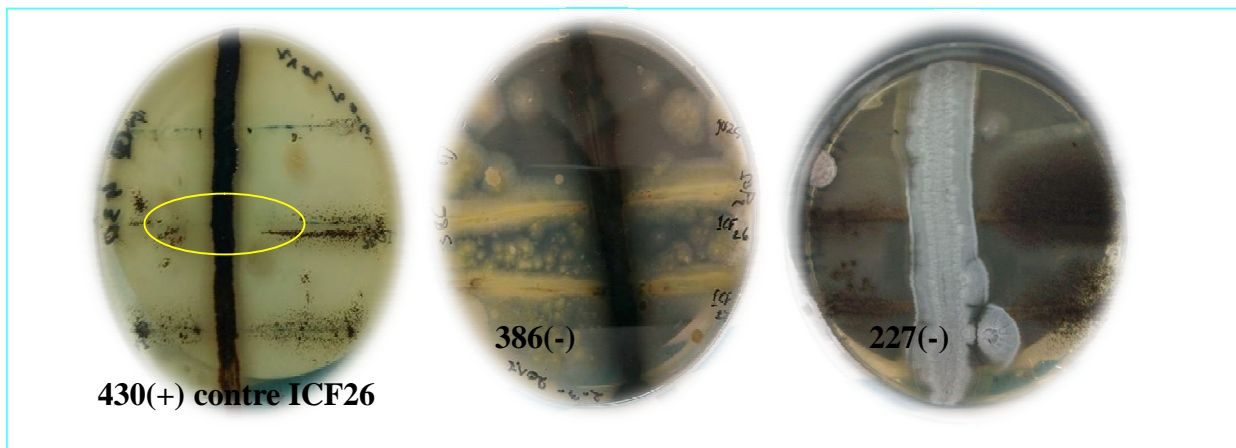
Planche n°8 : Photos des résultats de test d'activité antifongique de quelques isolats

En ce qui concerne la meilleure technique de la révélation de l'activité anti-*Candida*, la méthode de cylindre d'agar a prouvé qu'elle a occupé la place la plus intéressante puisque elle donne une distribution uniforme des levures sur toute la gélose. Cette résultats est confirmés par plusieurs études qui ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie où la cylindre d'agar donne les plus importantes résultats (Kang et al., 2010 ; Mendes et al., 2013).

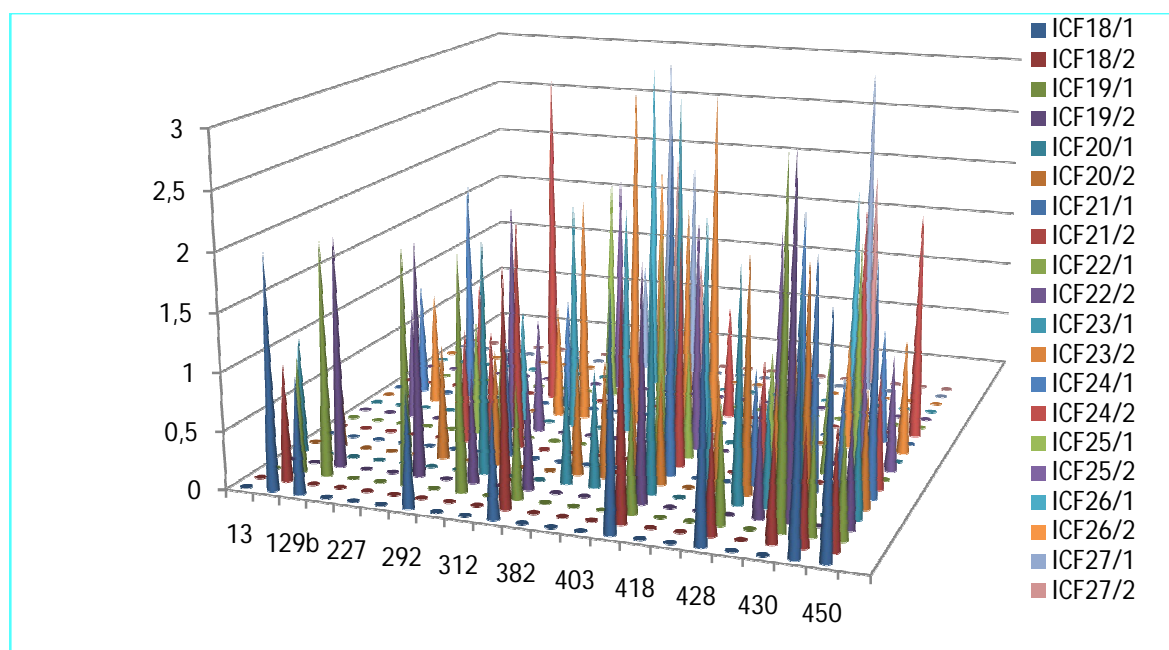
### V.3.4.2. Recherche de l'activité anti *Aspergillus*

#### V.3.4.2.1. Recherche de l'activité anti *Aspergillus* par la technique stries croisées

Les résultats mentionnent tout d'abord l'absence d'activité de la plupart des souches d'Actinomycètes sur *Aspergillus*, les souches actives donne des résultats moins fiables (Figure n°20) semblable aux résultats de test anti-*Candida* (Figure n°21), ceci montre que les souches tests filamenteuses appartenant au genre *Aspergillus* insensibles aux molécules bioactives d'Actinomycètes.



**Figure n°20:** Photos des résultats d'activité antifongique des souches d'*Aspergillus niger* par la technique stries croisées de quelques isolats

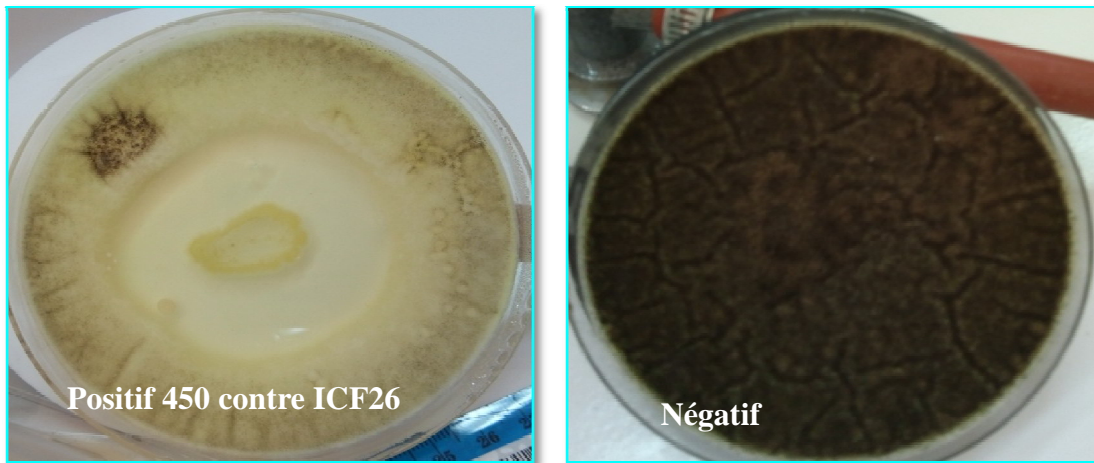


**Figure n° 21:**Activité anti-*Candida* et anti-*Aspergillus* par la technique stries croisées

#### V.3.4.2.2. Recherche de l'activité anti *Aspergillus* par la technique double couche

Dans cette étude, l'esprit de l'activité antifongique des souches Actinomycetales testées a été mis en évidence par la technique de double couche, elle permet une meilleure diffusion des champignons ensemencés en masse dans la gélose molle. Cette technique voisine de celle utilisée par (Peterso, 1954 ; Bastide, 1986 ; Zheng, 2000) a l'inoculum est préalablement connue ainsi une meilleure comparaison entre les résultats est possible , dans cette méthode les résultats plus fiables.

Après incubation, la croissance de champignon-test ensemencée sur la gélose, permet de découvrir la présence ou l'absence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition ou non d'une zone d'inhibition au niveau de la zone de diffusion. Seul la souche S450 est active contre *Aspergillus niger* (ICF26) donne des valeurs de diamètres d'inhibition importante 45mm, alors qu'aucune activité est détecté par les autres isolats (Figure n° 22) .Ces résultats comparables avec celle obtenue par l'étude de (Augustine, 2005 ; Boughachiche, 2012) qui ont trouvé que les souches des Actinomycètes sont faiblement actives contre les champignons filamenteux comme *A. niger*.



**Figure n°22** :Photos d'activité anti-*Aspergillus* par la technique de double couche

Du point de vue quantitatif et qualitatif, on remarque que la souche **S450** est la meilleure d'une part, par le plus grand diamètre d'inhibition obtenu dans notre étude et d'autre part, par la variété atteinte de son molécule bioactive. Les molécules bioactives produites par la **S450** peut être de la même nature à effet différente ou des molécules distinctes, cette hypothèse est comparable avec l'hypothèse donnée par (**Aidoucha et al., 2014**) qui montre que la souche PAL114 susceptible d'appartienne au genre *Streptomyces* possède une activité antifongique et antibactérienne où ces molécule bioactive peut être la même à deux effets différentes ou deux molécules distinctes.

#### **V.4. Extraction préliminaire des molécules bioactives**

Afin d'étudier les extraits organiques, l'activité de chacun est testée par la méthode des disques et la méthode des puits sur la souche la plus sensible, les bactérie-tests IC28 pour **S130** et IC30 pour la **S450**, les levure-tests ICF23 pour **S386** et **S450** et **ICF19** pour **S129a**.

##### **V.4.1. Extraction des molécules antibactériennes**

Les résultats de test des extraits organiques de l'activité antibactérienne sont représentés dans la **planche n°9** et les **figures n°23** et **n°24**:



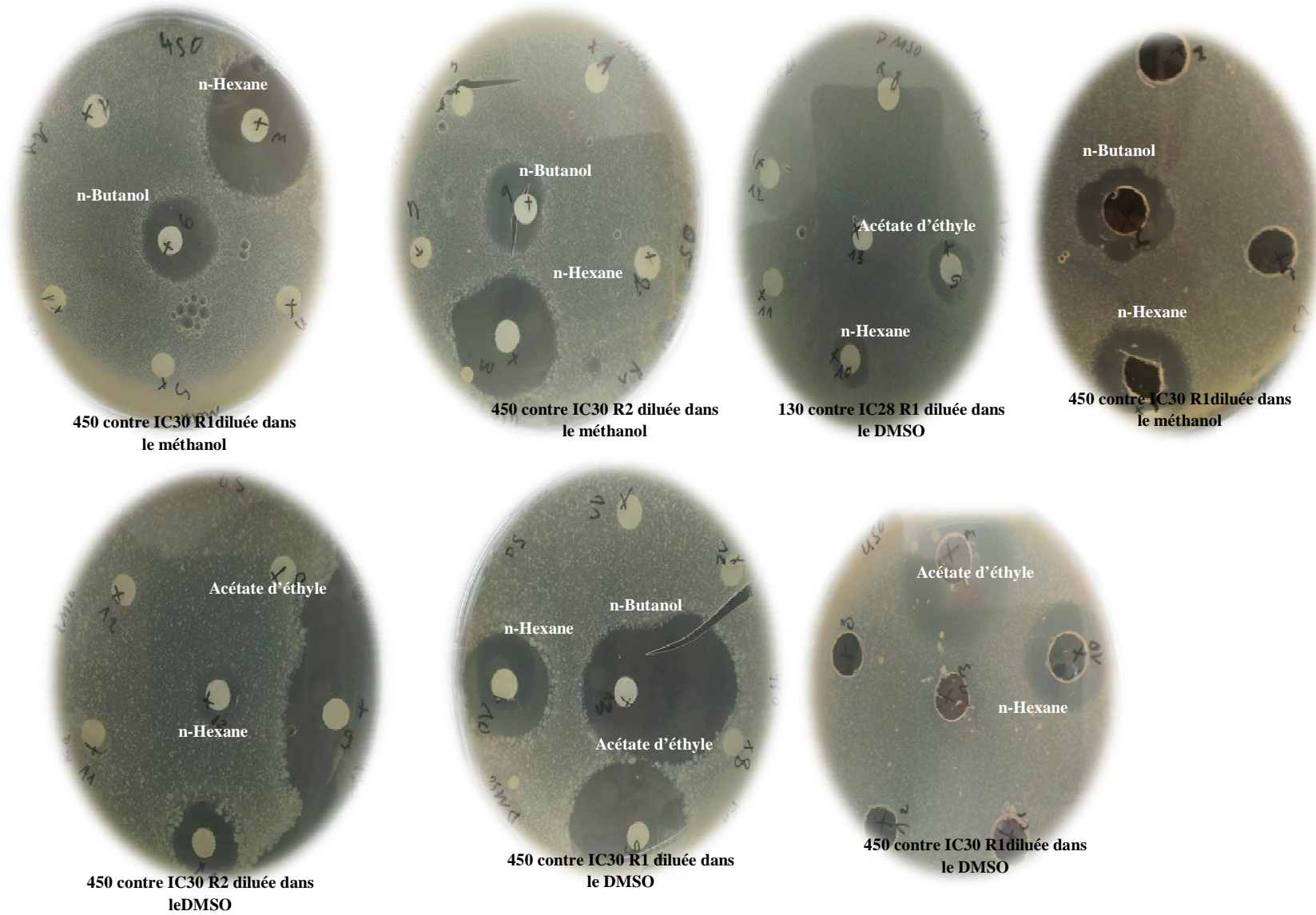
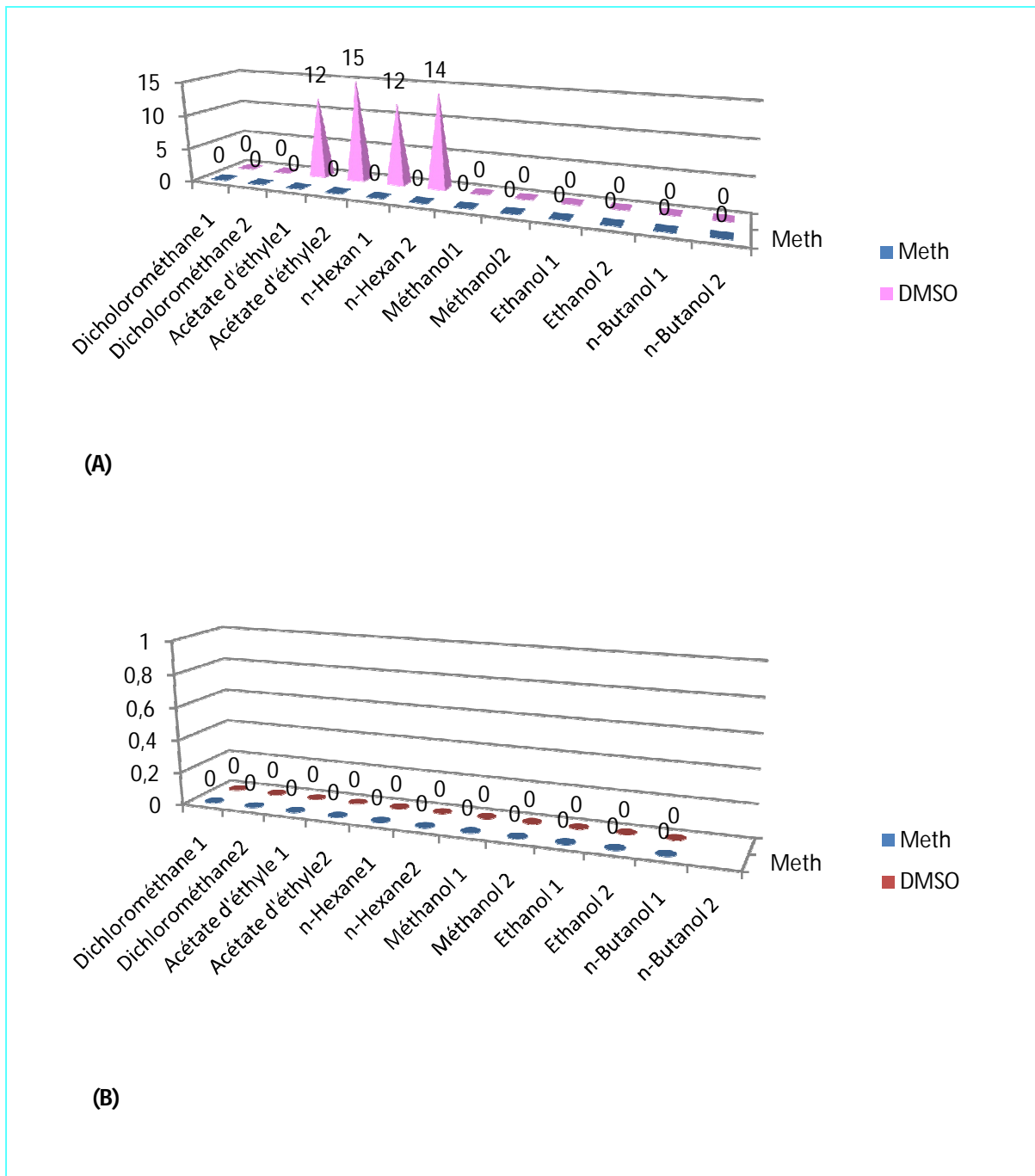


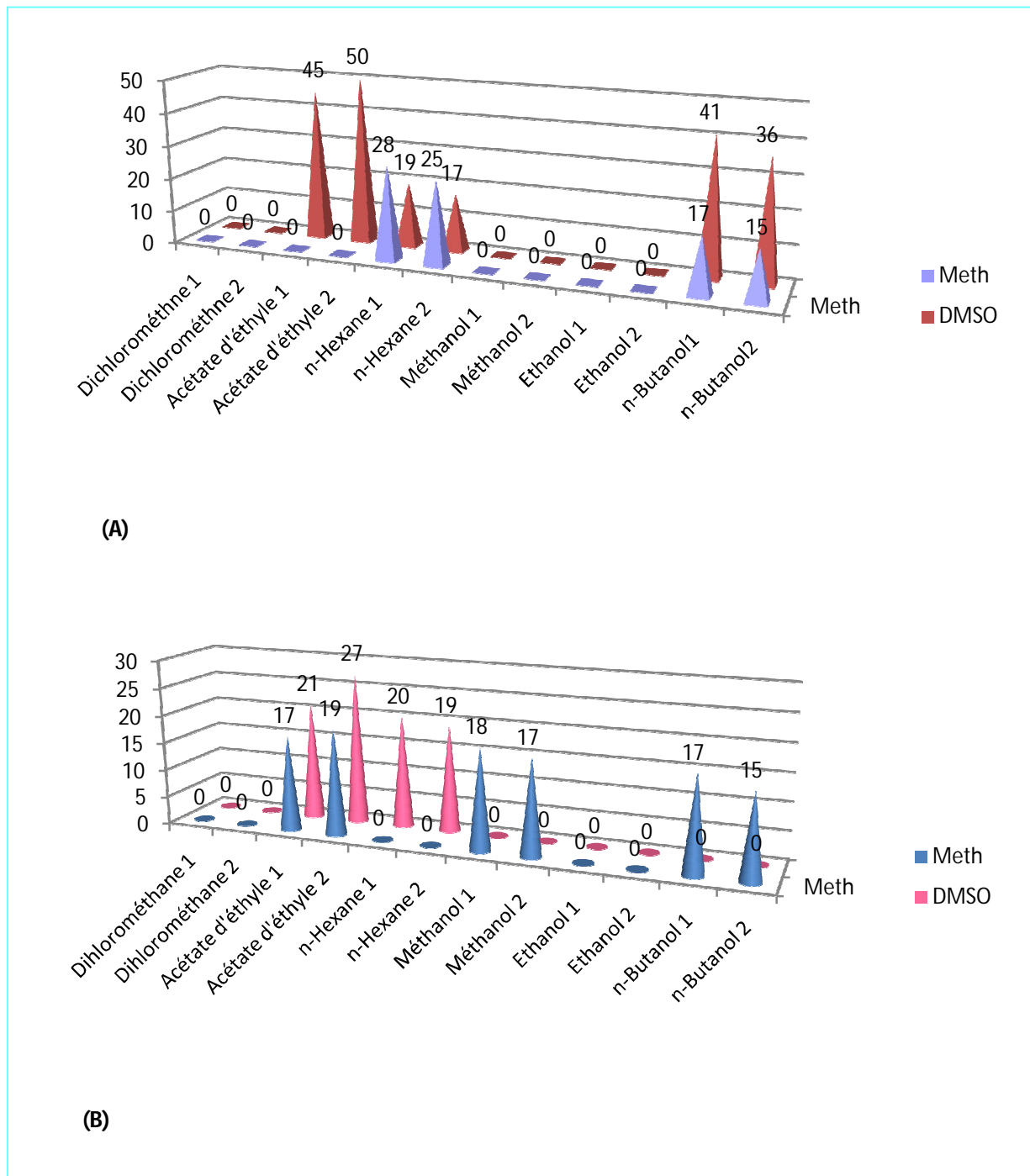
Planche n°9 : Photos de quelques résultats de l'extraction antibactérienne



**Figure n°23:** Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la souche S130 extrait avec différents solvants

A : Méthode des disques

B : Méthode des puits



**Figure n°24:** Diamètre des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne de la souche S450 extrait avec différents solvants

A : Méthode des disques

B : Méthode des puits

Les résultats obtenus avec les extraits à dichlorométhane et à l'éthanol des deux souches S130 et S450 ne présente aucune activité inhibitrice que ce soit par la méthode des disques ou celle des puits.

Le dichlorométhane ; un solvant très peu soluble dans l'eau mais miscible avec la plupart des solvants organiques. Selon **Sacramento** et ses collaborateurs (2004) , le dichlorométhane extrait des composés non peptidiques et selon (**Mahmoudi** , 2013) l'éthanol est préférables pour l'extraction des molécules polyphénoliques, ce qui peut donner une indication sur la nature éventuelle de la biomolécule. Donc dans un premier temps on peut dire que les molécules bioactives produites par S130 et S450 sont de nature peptidique non poly phénoliques.

Dans la méthode des disques, Il est à signaler que les extraits méthanoïques diluée dans le méthanol et le DMSO à 10% des deux souches n'ont présenté aucune activité. En revanche, l'activité antibactérienne apparait avec l'extrait butanolique et l'extrait au n-hexane diluée dans le méthanol absolue pour la souche S450 avec des zones d'inhibitions comprise entre 15 et 28 mmet avec les extraits butanoliques, au n-hexane et au acétate d'éthyle diluées dans le DMSO à 10% avec la même souche où les zones d'inhibition peut atteindre 50mm de diamètre (**Planche n° 9**).

On peut noter à partir de ces résultats que la biomolécules produites par la S450 est soluble dans l'eau beaucoup plus que le méthanol. De même, vu que le butanol est un solvant qui extrait les polyènes cette molécules est de nature polyénique, cette observation est parfaitement cohérente avec celle de (**Lamari**, 2006). En revanche, l'apparition de l'activité antibactérienne dans un solvant polaire (le butanol) et un de polarité moyenne (acétate d'éthyle) et un autre non apolaire (le n-hexane), suppose qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien une ou plusieurs molécules solubles dans des solvants variés. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon (**Guernet et Hamon** , 1981), les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers.

La plus grande zone d'inhibition obtenue par l'extrait de la S450 (50 mm dans la R2 et 45 mm dans la R1) est obtenue par l'acétate d'éthyle, dans une étude similaire (**Oskay**, 2011) a indiqué que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules

antibactériennes et antifongiques de la souche *Streptomyces* RM42. Ainsi, pour la molécule antibactérienne produite par la souche S130 l'acétate d'éthyle est le meilleur solvants d'extraction avec des zones d'inhibition atteindre 15 mm .

L'extrait butanolique ne possède qu'une activité contre la bactérie-test IC28, donc la molécule produite par la S130 est une biomolécule de nature non-polyénique.

Dans la méthode des puits, tous les extraits de la souche S130 ne possède aucune activité que ce soit celle diluées dans le méthanol ou dans le DMSO à 10% (**Figure n° 23**). Par contre, les extraits butanolique, au méthanol et au acétate d'éthyle diluée dans le méthanol et les extraits au acétate d'éthyles et au n-hexane diluées dans le DMSO à 10% de la souche S450 possèdent une activité antibactérienne caractérisée par des zones d'inhibition faible dont l'acétate d'éthyle est le meilleur solvants d'extraction avec des zones d'inhibition comprise entre 17 et 27mm (**Planche n°9** et **Figure n°24**).

En plus de la purification primaire de la molécule bioactive, les résultats de ce screening montrent aussi que l'activité antibactérienne des extraits des souches d'Actinomycètes testées dépend de la méthode utilisée. Ainsi, nos résultats montrent une différence dans les zones d'inhibition ou même l'apparition de l'activité pour les extraits des mêmes solvants qui en diluée aussi dans le même solvant en fonction de la méthode utilisée, (**Lemriss , 2003**) Il s'est révélé que par rapport à la méthode des puits, la méthode des disques se prête mieux à la détermination de l'activité antibactériennes des extraits organiques produites par les souches d'Actinomycètes testée.

### V.4.2.Extraction des molécules antifongiques

Les résultats de test des extraits organiques de l'activité antifongique sont représentés dans la **planche n°10** et les **figures n°25** et **n°26** et **n°27**:

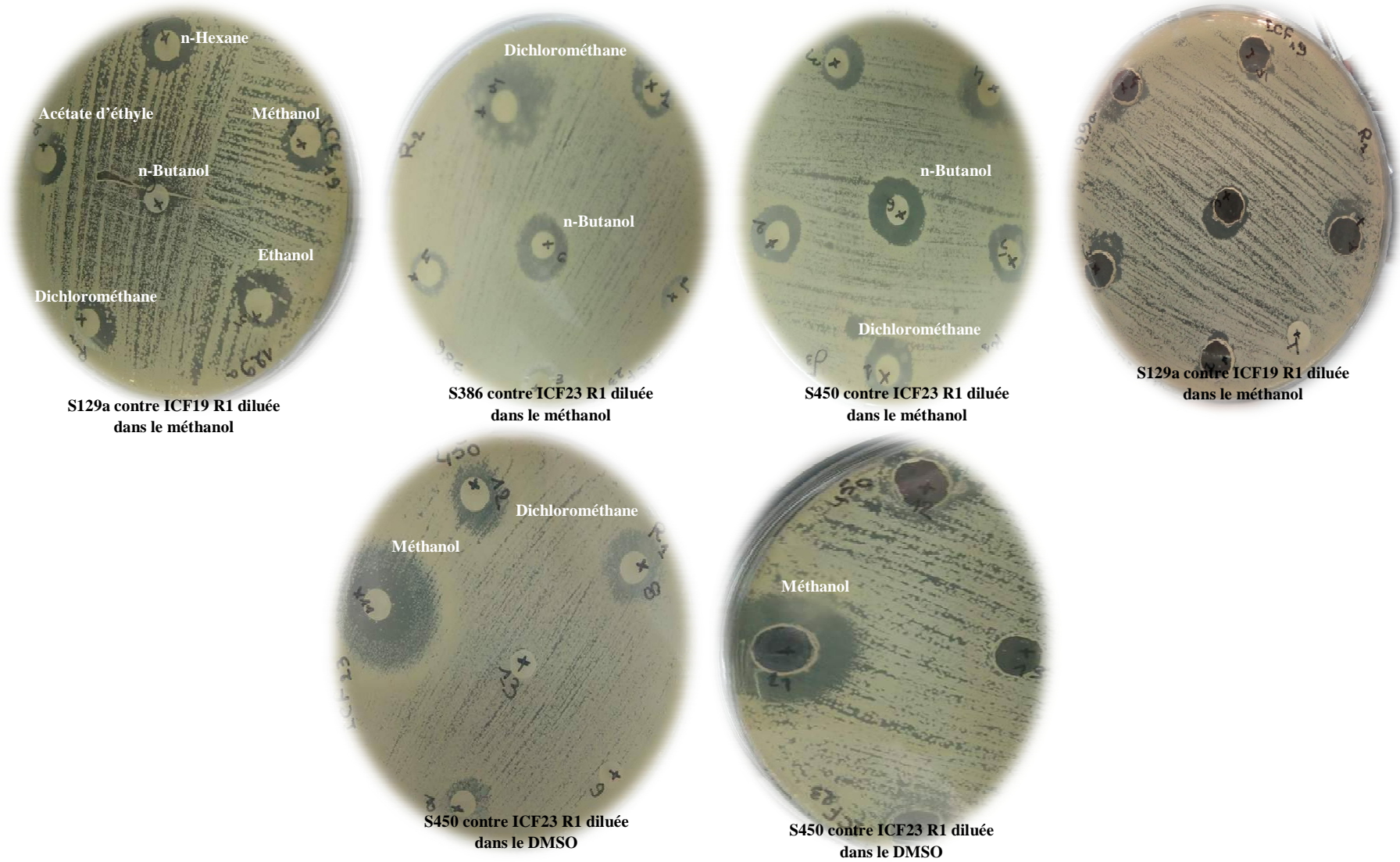
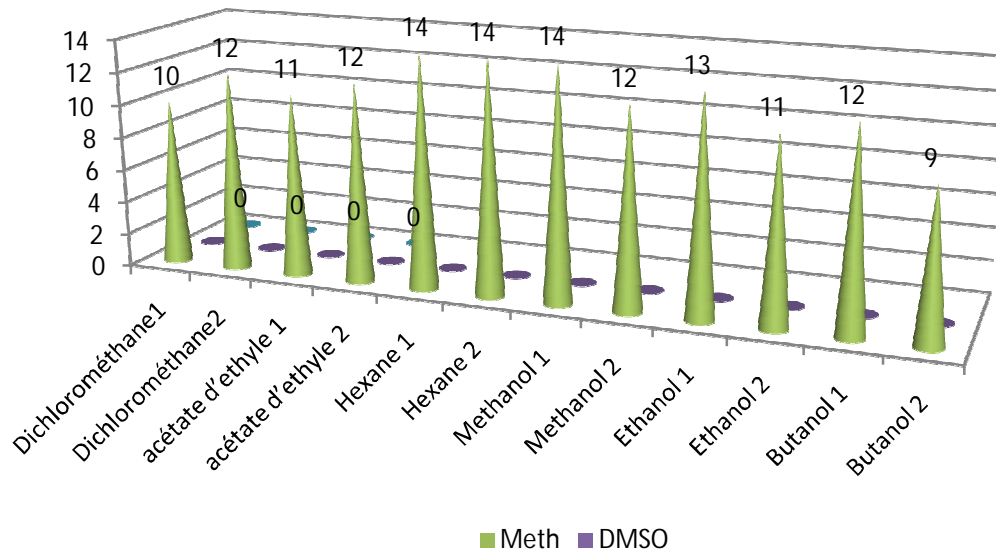
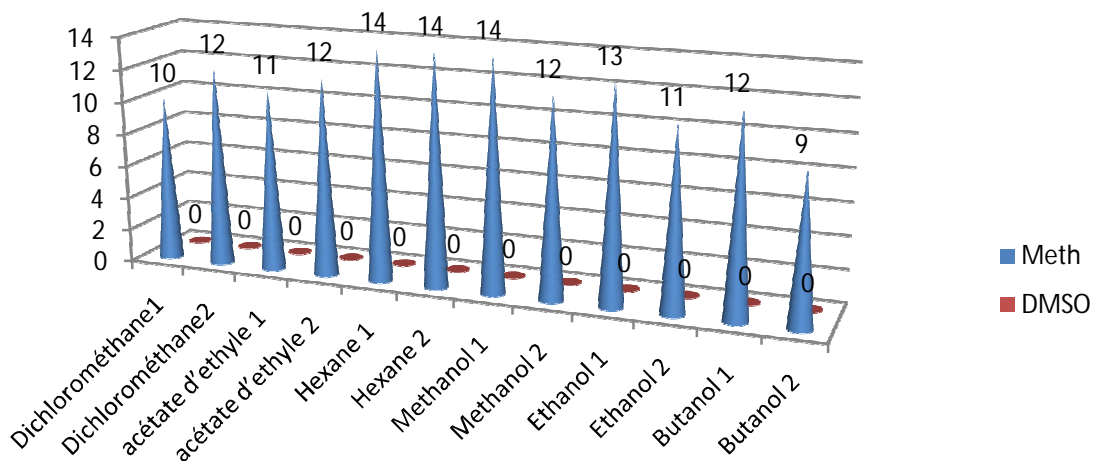


Planche n°10 : Photos de quelques résultats de l'extraction antifongique



(A)

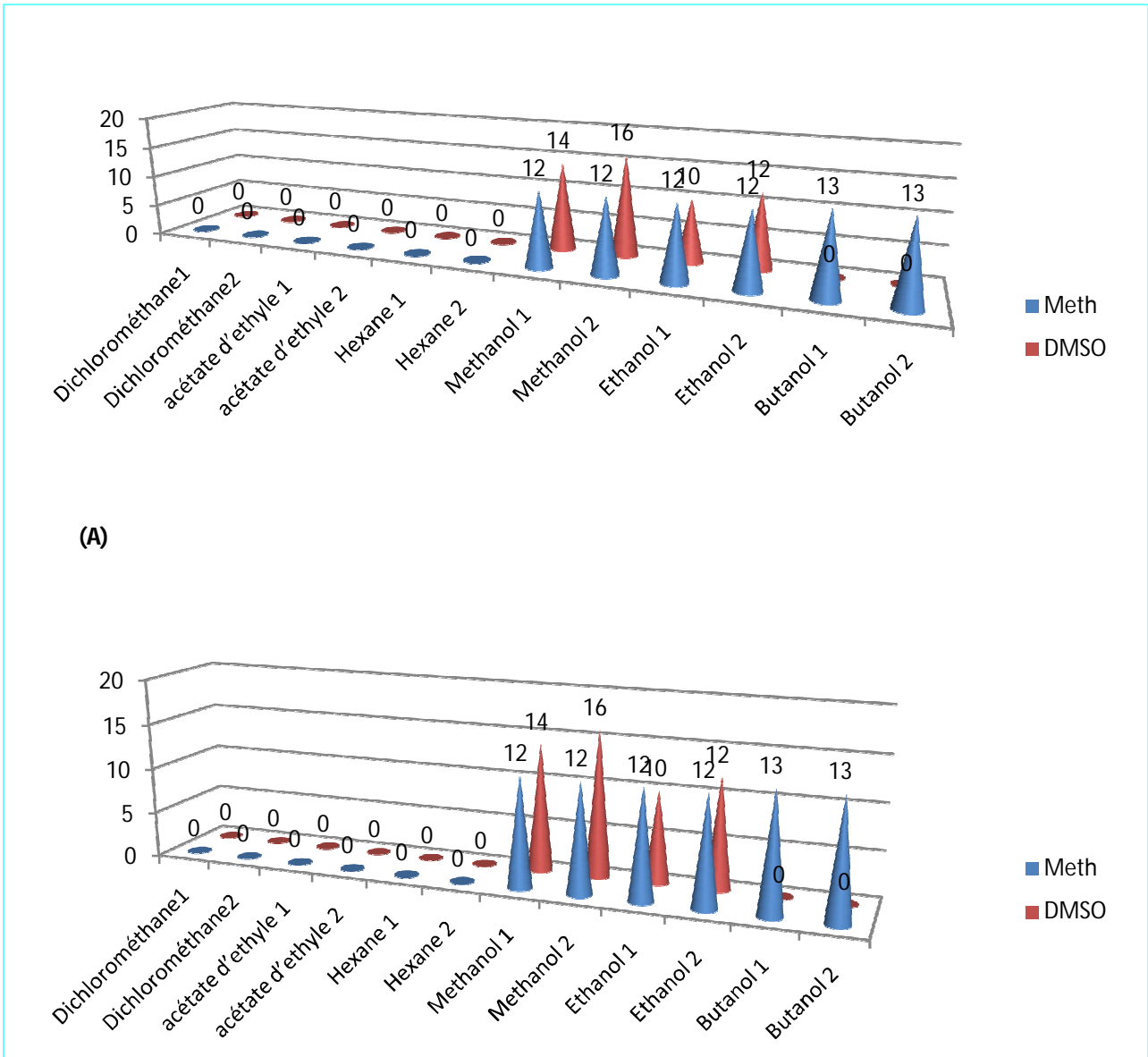


(B)

**Figure n°25** : Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de la souche S129a extrait avec différents solvants

A : Méthode des disques

B : Méthode des puits

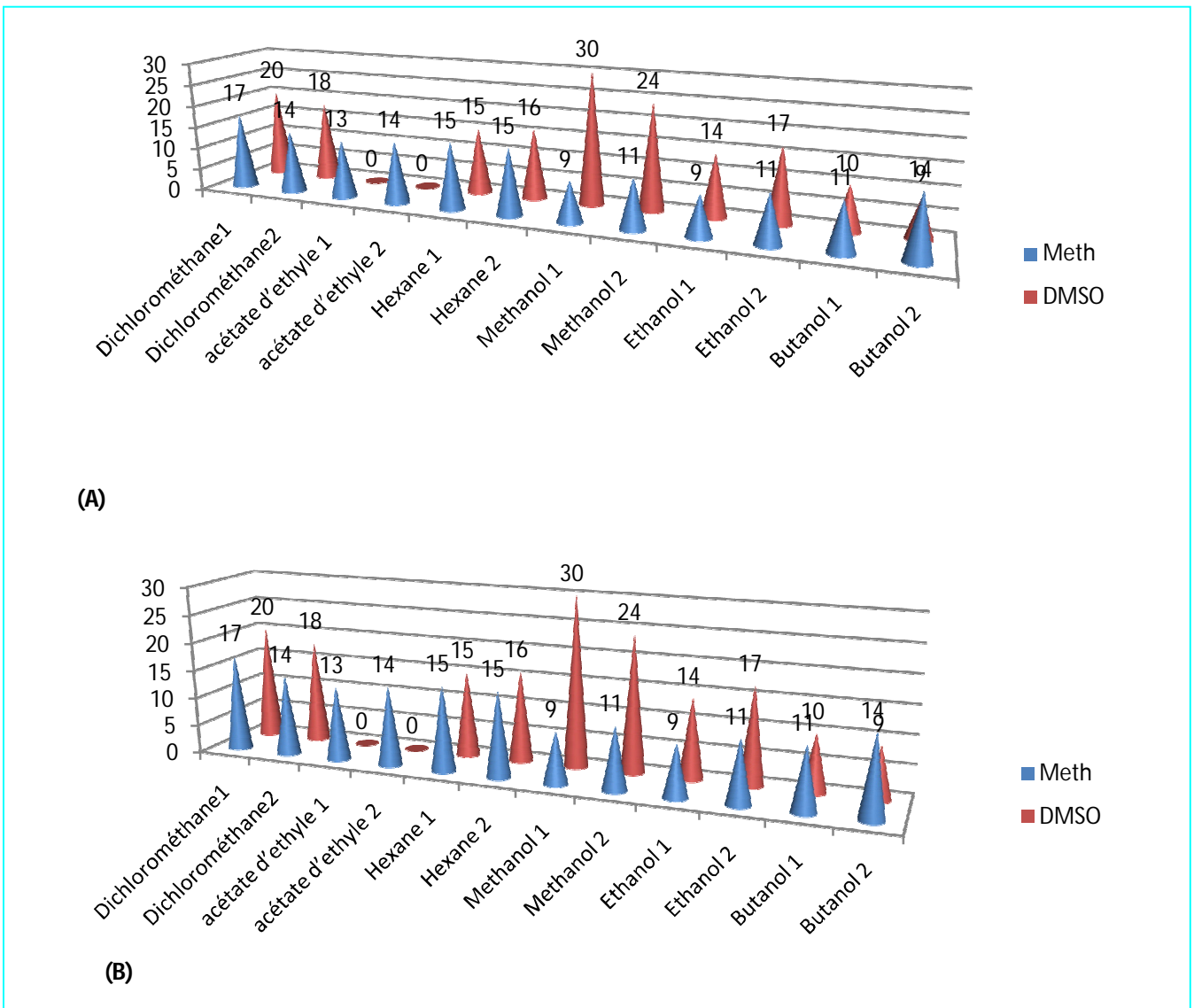


**Figure n°26:** Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de la souche S386 extrait avec différentes solvants

A : Méthode des disques

B : Méthode des puits





**Figure n°27 :** Diamètre des zones d'inhibition de l'antifongique de la souche S450 extrait avec différents solvants

A : Méthode des disques

B : Méthode des puits

Les extraits testés de la S129a ne montrent aucune activité lorsque ils sont dilués dans le DMSO à 10% que ce soit dans la méthode des disques ou la méthode des puits, cela indique que la ou les biomolécules extraits sont hydrophobes (**Figure n°25**). En revanche, les extraits dilués dans le méthanol que ce soit testé par la méthode des disques ou celle des puits donnent des zones d'inhibition comprise entre 9 et 15 mm de diamètre dont le méthanol est le meilleur extracteur (**Planche n°10**).

A partir de ces résultats, en principe la molécule produites par la S129a est de nature non-peptique, polyphénolique, polyénique.

Les extraits au dichlorométhane, au acétate d'éthyle, au n-hexane, au méthanol et au n-butanol dilués dans le méthanol de la souche S386 testée par la méthode des disques montre une activité inhibitrice comprise entre 7 et 14 mm de diamètre, alors que les mêmes extraits dilués dans le DMSO à 10% ne montre aucune activité inhibitrice (**Figure n°26**), à partir de ces résultats on peut conclure que la molécule produite par cette souche est plus soluble dans le méthanol que dans l'eau en plus elle est complexe comprennent des caractères polaires et apolaires selon (**Guernet et Hamon, 1981**) entraînant une affinité pour des solvants très divers. En plus Cette biomolécule de nature polyénique non-peptidique.

Dans la méthode des puits seul les extraits de méthanol, éthanol et n-butanol qui possède des zones d'inhibition atteindre au maximum 13mm. Ceci confirme que la méthode des disques est la meilleure pour la vérification des activités des extraits selon (**Lemriss, 2003**).

L'activité antifongique testés par la méthode des disques apparait des zones d'inhibitions comprise entre 11 et 16 mm avec les extraits de dichlorométhane, acétate d'éthyle, n-hexane, éthanol, n-butanol dilués dans le méthanol absolue de la souche S450 (**Planche n°10 et Figure n°27**) sauf l'extrait de méthanol ne présente aucune activité inhibitrice par cette méthode. Les extraits a n-hexane, au méthanol et au éthanol dilués dans le DMSO à 10% présentent une activité inhibitrice peut atteindre un diamètre de 28 mm (**Figure n° 27**). L'activité antifongique des tous les extraits organique dilués dans le méthanol de la même souche testé par la méthode des puits donne des zones d'inhibition comprise entre 9 et 17 mm de diamètre. En revanche, sauf les extraits a dichlorométhane, a n-hexane, au méthanol, au éthanol et au n-butanol dilués dans le DMSO à 10% donne des zones d'inhibition important atteindre 30 mm de diamètre (**Planche n°10**). L'extrait

méthanoïque démontré le meilleur rendement d'extraction des molécules bioactives puisque la plus grande zone d'inhibition est obtenue par celle-ci.

Vu que le butanol extrait les molécules polyneiques et le dichlorométhane extrait les moécules non-peptidiques la molécule produitepar la S450 est une biomolécule de nature polyléniqque et non- peptidique. A partir de ces résultats on peut dire en principe que la S450 produites de molécules bioactives déférentes la première de nature peptidique a effet antibactérienne et l'autre de nature non-peptidique a effet antifongiques.

### V.5.Etude biochimique des souches Actinomycétal représentatives

Les résultats des déférents caractères biochimiques des isolats S129a, S130, S386 et S450 sont résumés dans le **tableau n°11**. Ces résultats nous fournissons des éléments essentiels pour la classification de nos souches.

**Tableau n°11** : Résultat de test de biodégradation des souches représentatives

test souche	amidon	caséine	gélatine	Activité sur tween 80	Lait écrémé	hémolyse
S129a	-	+	-	+	-	$\beta$
S130	+	+	+	-	-	$\gamma$
S386	+	+	+	+	-	$\beta$
S450	+	+	+	+	-	$\gamma$

(+) : présence

(-) : absence

D'après les résultats exprimés dans le tableau n°11, il apparait une biodiversité métabolique remarquable pour les souches Actinomycatal. Tous les quatre souches possèdent une activée caséinolytique où après une période d'incubation de 7 jours dans un milieu à base de caséine (voir l'annexe) les résultats positive sont indiqués par l'apparition des zones claires autour des colonies (**Planche n°11A**). Ces résultats comparables aves celle de (**Gulve et Deshmukh, 2011**) qui ont montré dans le cadre de la recherche de l'activité enzymatiques d'Actinomycètes que divers genres possèdent une

activité caséionolitique. Par contre, les résultats de tableau n°11 montrent qu'aucune souche de ces quatre possède une coagulation de lait écrémé (**Planchen°11A**).

D'après Ces résultats, on observe aussi que les trois souches (S130, S368, S450 ) sont capable d'hydrolyser l'amidon, , donc ces isolats sont des Actinomycètes amylolytique sauf S129 a (**Planche n°11 A**) où après l'ajoute de lygol l'apparition d'une couleur brune dans tout la boîte traduit par l'incapacité de cette souche à dégrader l'amidon cela montre qu'elle a dépourvue de l'amylase (**chao et wen, 2007**).

En ce qui concerne le test de gélatinasse, Après 7 jours, la liquéfaction de la gélatine se traduit par décollement de la couche supérieur du film cela observer par les souche (S130, S368, S450) ( **Planche n°11 A**) donc ces isolats sont des Actinomycètes possèdent un gélatinasse, sauf dans le cas del'isolat S129a, la couleur de bandelette ne change pas comme dans le cas du témoin négatif durant la période d'incubation. Ce test a été confirmé par le résultat de l'Api 20E. En revanche, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies des souches (S129a ,S386, S450) se traduit par la présence des estérases et par conséquence la dégradation des acides gras (**Planche n°11 B**).

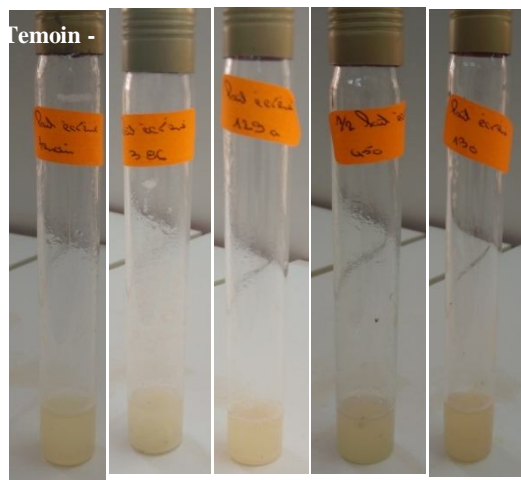
Les zones d'hémolyse sur la gélose au sang (Cos) d'après les résultats apparaissent chez les isolats (S129a et S386) sous forme d'une zone claire de type  $\beta$  hémolytique, ces résultats sont similaires a ceux représentés par (**Guérin et al., 1992**) qui ont montré que la production de l'enzyme hémolysine est observé par des souches  $\beta$  hémolytique *Actinomyces pyogènes*. Par contre on note l'absence de ces zones chez isolats restants (S130 et S450) (**Planche n°11 B**).

La production de pigment meilanoïdes sur milieu ISP<sub>7</sub> et ISP<sub>6</sub> n'a pas observés par aucune souche (**Planche n°11 B**).

Test de caséine

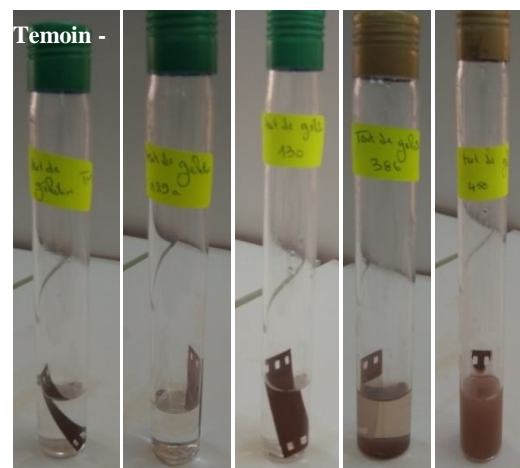


Test de l'action sur lait écrémé



-

Test de gélatinasse



-

+

Test amidon

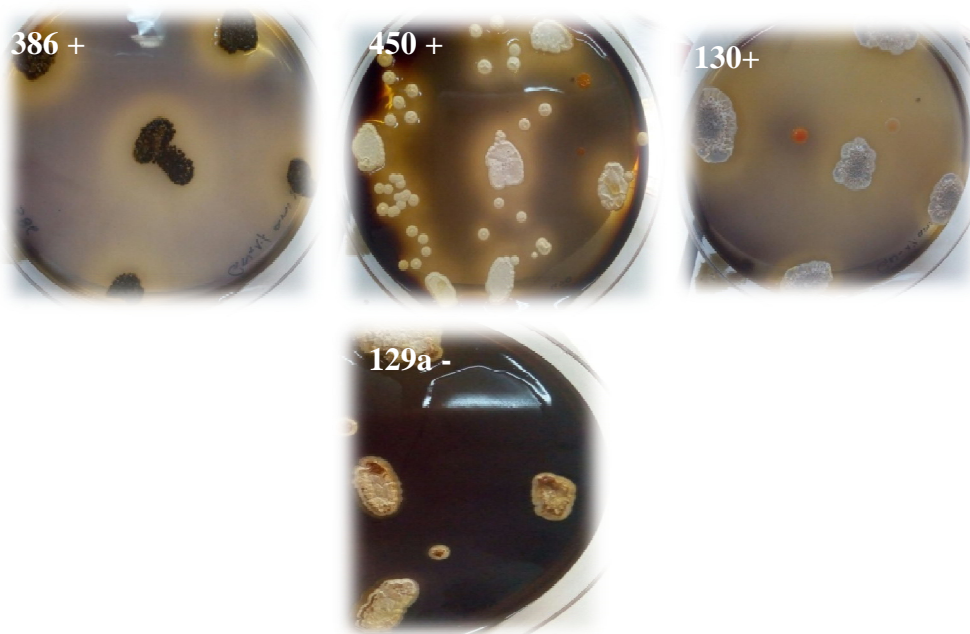
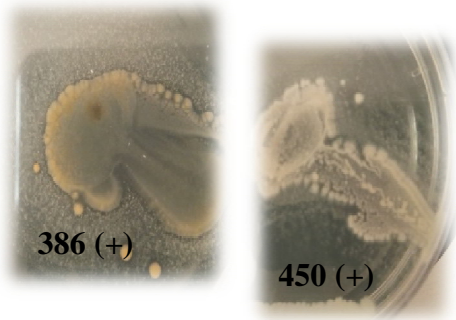
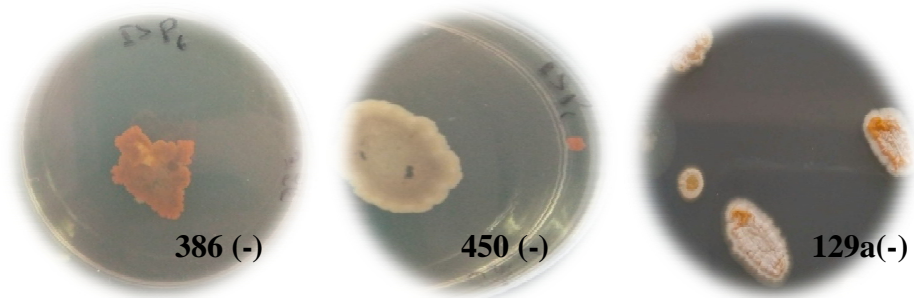


Planche n°11 A : Photos de résultats de différentes test métaboliques

Test d'estérase



Test de pigmentation mélonoïde



Test d'hémolyse

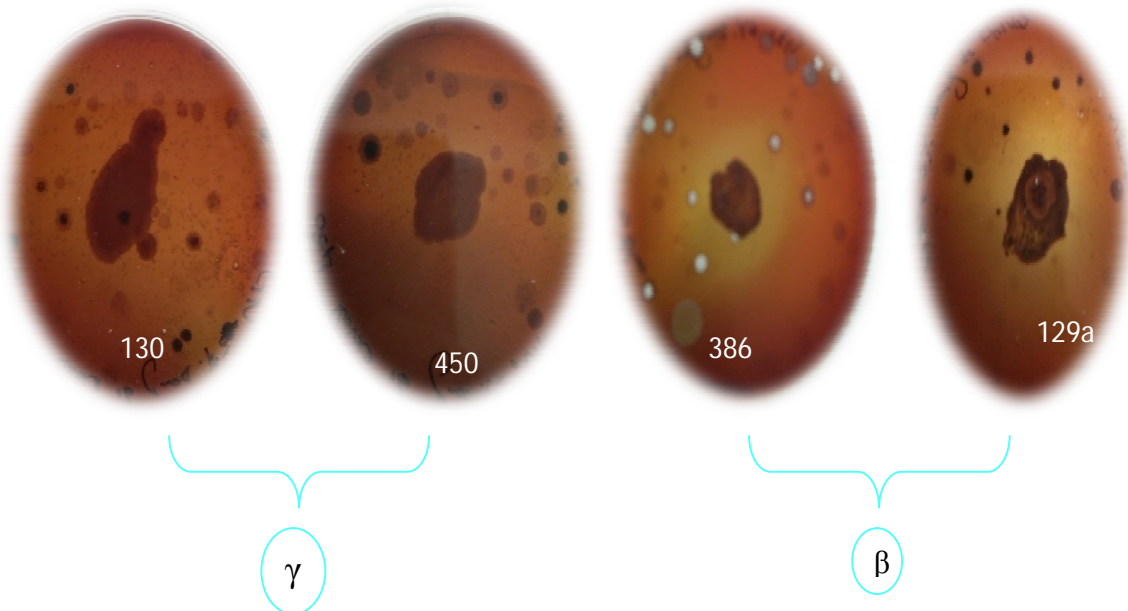


Planche n°11 B : Photos de résultats de différentes test métaboliques

Les tests de biodiversité enzymatique ainsi l'assimilation de certains sucres sont confirmés par le système Api 20E. Les résultats de la galerie biochimique sont reportés dans le **tableau n°12** et la **figure n°28**. Ces derniers montre que les quatre souches testé on la capacité d'assimiler le glucose et de réduire le nitrate et que aucune de ces souches a la capacité d'utilisé le inositol, le sorbitol, le rhamnose, le saccharose et le melibiose. Ainsi que, d'un pourcentage varie entre 25 et 75% des souches productrices des enzymes. Ces résultats sont similaires avec ceux qui trouvent dans les travaux de (**Ghannam ,2009**) qui utilisent le système Api 20E où trouvent que les différentes souches identifiées des Actinomycètes sont capables de produire des différents enzymes pour leurs métabolismes.

A partir de ces résultats, on peut conclue que l'Actinomycètes n'ont pas seulement une importance remarquable dans le domaine d'activité antimicrobienne mais aussi dans le domaine de la production des enzymes utilisés dans les divers secteurs biotechnologiques on citons les estérases qui jouent un rôle majeur dans la dégradation des polluants industriels, voir, les déchets de céréales, matières plastiques, elles sont également employées dans l'industrie laitière,(**Choi et Lee, 2001 ; Panda et Gowrishankar, 2005 ; Xin et Hui-Ying, 2013**), les gélatinasses sont aujourd'hui très importante notamment dans l'industrie alimentaire et la fabrication des nouveaux détergents (**Najafi et al., 2005 ; Thumar et Singh, 2007**), les  $\alpha$  amylases ont une large application en industrie alimentaire et dans la fabrication de papiers, de textiles, de détergents et dans l'industrie pharmaceutique (**Aiyer, 2005 ; De Souza et Magalhães, 2010**).



**Figure n°28** : Photos des résultats de systèmes API 20E des souches représentatives





# Conclusion générale et perspectives

## Conclusion générale et perspectives

La capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques et les antifongiques est l'une des caractéristiques importantes des Actinomycètes qui synthétisent les deux tiers des molécules bioactives (**Madigan et Martinko, 2007**).

Dans ce présent travail, qui entre dans le cadre de l'axe de recherche de métabolites secondaires biologiquement actifs produites par 20 souches d'Actinomycètes, nous nous sommes intéressés à la recherche et l'extraction des biomolécules ainsi que d'étudier la diversité biochimiques des quatre souches représentatives. Trois parties ont été développées :

- ✎ Dans la première partie, on s'est intéressé à la recherche des activités antibactériennes et antifongiques contre divers souches-test dont la bactérie *Staphylococcus aureus*, la levure du genre *Candida* et le champignon *Aspergillus niger* à partir d'une collection des Actinomycètes par la méthode de diffusion sur milieu gélosé « cylindre d'agar », par la méthode de stries croisées et celle de la- double couche.
- ✎ Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons effectué l'extraction des molécules bioactives en question par différents solvants organiques à partir de milieu solide ISP<sub>2</sub> afin de les caractérisées partiellement.
- ✎ En troisième et dernière partie, on a sélectionné quatre souches Actinomycétales **S129a**, **S130**, **S386** et **S450** pour l'étude de leurs caractères biochimiques.

Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches Actinomycétales étudiées présentent une activité antibactérienne et antifongique contre au moins une souche-test. Les plus grandes zones d'inhibitions ont été observées avec les souches **S130** (23 mm) contre la bactérie-test *Staphylococcus aureus* IC28, **S450** (33 mm) ,contre la bactérie-test *Staphylococcus aureus* IC 30 et (27 mm) contre la levure-test *Candida albicans* ICF23 et (45mm) contre le champignon-test *Aspergillus niger* ICF26, **S129a** (33,5mm) contre la levure-test *Candida albicans* ICF19 et la souche **S386** (28,5mm) contre la levure-test *Candida albicans* ICF23.

Ces résultats permettent de confirmer que le groupe des Actinomycètes par ces différents genres que ce soit *Streptomyces* (**S450** et **S130**) ou autre genre rare (**S129a** et **S386**) sont les meilleures producteurs des molécules bioactives.

La souche **S450** semble être la meilleure concernant la variété des activités détectées (100% des bactéries et des levures-tests sont sensibles).

Le test d'activité des extraits organiques indique que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules à activités antibactérienne car il permet d'exprimer les plus larges spectres d'action à l'égard des germes cibles testés et que le méthanol et le dichlorométhane sont les meilleurs extracteurs des molécules antifongiques. Ces tests nous donnent aussi un regard sur la nature de molécules qui diffère selon le solvant extracteur.

L'étude des caractères métaboliques des isolats représentatifs a révélé leur pouvoir de biodégradation de différentes molécules.

Dans ce travail on peut conclure que nos souches des Actinomycètes possèdent des propriétés significatives d'une part la synthèse de très nombreux métabolites bioactives et d'autre part une diversité biochimique importante ce qui leur permet à se développer sur divers substrats et coloniser différents niches écologiques.

Notre étude n'est qu'une ébauche et nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi car plusieurs perspectives peuvent être envisagées par exemple :

- ✕ L'étude de l'influence des facteurs nutritionnels sur la production des molécules bioactives en utilisant plusieurs autres milieux de production telle le GYEA et le Bennet.
- ✕ L'étude de la production des biomolécules en milieu liquide.
- ✕ L'étude de la cinétique de la production en milieu liquide et solide.
- ✕ L'extraction des molécules biologiquement actives par d'autres méthodes.
- ✕ La purification des molécules bioactives par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- ✕ La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antimicrobiennes secrétées (CMI).
- ✕ L'identification de la molécule produite par la technique spectroscopique RMN.
- ✕ Le test *in vivo* de la toxicité des biomolécules produites.
- ✕ L'étude de la diversité phylogénétique des Actinomycètes les plus performantes par les analyses moléculaires.

# Références Bibliographiques

## Références Bibliographiques

### A

- ✂ A. Aouiche a , C. Bijani b , A. Zitouni a , F. Mathieu c , N. Sabaou .2014.  
*Antimicrobial activity of saquayamycins produced by Streptomyces spp. PAL114 isolated from a Saharan soil . Vol 29; N° 2. P 7*
- ✂ Aiyer, P.V. 2005. *Amylases and their applications. Afri. J. Biotechnol. 4:1525- 1529.*
- ✂ A.Pandey.A.shukla .S.K.Majumdar.2005.*Utilisation of carbon and nitrogen.P:576*
- ✂ A. Bastide, M. Andriantsoa, M. Laget . 1986. *Isolement et s lection de souches d'actinomyc tes productrices de substances antifongiques de structure non-poly nique . Laboratoire de Microbiologie, Facultd de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 . France .P453-466*
- ✂ Abouwarda A. et Abu El-Wafa W.M. 2011. *Production of anti-microbial agents by egyptian Streptomyces isolates. Int.J.Microbial.Res.2 (1).P: 69-73.*
- ✂ Alexander M.1977. *Introduction to soil Microbiology. Krieger Publishing Company, Malabar: 467-468.*
- ✂ Andriambololona T. 2010 . *Etude bibliographiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la foret d'ANKAFOBE. Memoire de recherche pour l'obtention du Diplome d'etudes approfondies de biochimie. Université d'ANTANANARIVO, Madagascar . P:5,6 .*
- ✂ Aouiche A. 2011.*Activité antimicrobienne de Streptomyces sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. Journal De Mycologie Médicale, France :2p*
- ✂ Ara I., Matsumoto A., Abdul Bakir M., Kudo T., Omura S. and Takahashi Y. 2008.
- ✂ *Actinomadura bangladeshensis sp. nov. and Actinomadura chokoriensis sp. nov. Int. J. Syst.Evol. Microbiol. 58: 1653–1659.*
- ✂ Ashir Kumar. David A. Charles F. Manuel c. 1991.*actinomycosis of the thigh presenting as a soft-tissue neoplasm . volume 23.N° 2. pages :187 -188*

## B

- ✎ *B. Badji , A. Riba , F. Mathieu , A. Lebrihi , N. Sabaou . 2005. Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale 15 .P : 211–219.*
- ✎ *Badji Boubekeur , Zitouni Abdelghani , Lebrihi Ahmed, Le Faou Alain , Sabaou Nasseridine . 2010. Molécules bioactives sécrétées par Nonomuraea sp. NM94 (Actinomycetales) d'origine saharienne . Vol 37 . N° 3. P: 25-36 .*
- ✎ *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.*
- ✎ *Benzeggouta N. 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Thèse Présentée en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine. P :22.*
- ✎ *Belyagoubi Larbi . 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen .P :114-127.*
- ✎ *Bérdy J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. A Personal View. J Antibiot. 58(1): 1–26*
- ✎ *Boiron, P. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can. J. Microbiol 49: 669-6771.*
- ✎ *Boucheffa Karima. 2011. Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits . Université Abderrahmane .Bejaia. P :35-45.*
- ✎ *Boughachiche F, Reghioia S. Zerizer H, Oulmi L, Boudemagh A, Kitouni K, Boulahrouf A. 2005. Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une Actinomycetale isolée de Sebka de Ain Mlila (Algérie). J. Gen. Microbiologique. 7 : 234-238 .*
- ✎ *Boughachiche Faiza. 2012. Étude de molécules antibiotiques sécrétées par des souches appartenant au genre Streptomyces, isolées de Sebka. Thèse de doctorat . Université Mentouri de Constantine. Algérie . P :58-81.*

- ✂ *Bouizgarne B., Lanoot B., Loqman S., Sproer C., Klenk H.P., Swings J. et Ouhdouch Y. 2009 ..Streptomyces marokkonensis sp. nov., isolated from rhizosphere soil of Argania spinosa L. Inter J Syst Evol Microbiol. 59: 2857-2860.*
- ✂ *Bu'lock J. D. 1965. The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism . Mc Graw-Hill, New-York .*

## C

- ✂ *Calamita H.G., Doyle R.J. 2002. Regulation of autolysins in teichuronic acid Containing Bacillus subtilus cells. Mol Microbiol. 44: 601-606.*
- ✂ *Cavalla M, Eberlin T . 1994. Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron, 19:13-17.*
- ✂ *C.L.Doumbou. M.K.Hamby . D.L.Grawfodrd .et C .Beaulieu .C.2001.Actinomycetes promising tools to control plant diseases and to promote plant growth phytoprotection .82(3).P85-102 .*
- ✂ *Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G. and Vargues R. 1990. Bactériologie médicale «Techniques usuelles» 3ème tirage SIMEP. Paris. 105-108.*
- ✂ *Chabasse D, Contet-Audonneau N, Bouchara J.P, Basile A.M. Moisissures, dermatophytes, levures : Du prélèvement au diagnostic. Edition Biomérieux. 2008. ISBN-10: 291716204X.*
- ✂ *Chaphalkar S.R. et Dey S.1996.Computer assisted identification of Streptomyces species with high extracellular protease activity. Actinomycete. 7(2): 47-54.*
- ✂ *Croos T. 1989.The actinomycètes II, Growth and examination of actinomycetes some guidelines , In S. T. Vol 4.N<sup>0</sup> 2. Baltimore. P : 2340-2343.*

## D

- ✂ *Demain A.L. and Solomon N.A.1985. Biology of industrial microorganisms. Edition: The Benjamin/ Commings Publishing Company, London, p. 291–357.*
- ✂ *Djaballah C. 2010.Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants a isolés se la sebkha de Ain M'Lila. Memoire de l'obtention du Diplome de Magister en Micbiologie. Université Mentouri Costantine : 102p.*
- ✂ *Djinni I.2009. Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Mémoire De Magister en Microbiologie Appliquée, Université A. Mira deBejaia .P 154.*
- ✂ *Dommergues Y., et Mangenot F. 1970. Ecologie microbienne du sol. Masson et*

Cie (Eds.), Paris.P 3.

- ✂ Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L. et Beaulieu C. .2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82(3): 85-102.
- ✂ Duraipandiyar, A.H. Sasi, V.I.H. Islam, M. Valanarasu, S. Ignacimuthu. 2010. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya .*J. Mycol. Med.*20 (22). P: 15–20

## E

- ✂ Euzeby, J.P.2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 307–334.

## F

- ✂ Funke T. 2003. Case, *Introduction a la microbiologie*, Pearson Education. P: 603.

## G

- ✂ 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., Stalon L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. 1990. Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*136. P:19-36.
- ✂ 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.
- ✂ Gottlieb D.1973. General consideration and implication of the actinomycetales. In : *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by G.Sykes and F.A.Skinner Academic Press, London, New York.

## H

- ✂ Hasegawa T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. 1978. New genus of
- ✂ The Actinomycetales: *Actinosynnema* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28(2): 304–310.
- ✂ Hodgson D.A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42:47-238.



- ✎ *Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.P: 2340–2343.*
- ✎ *Hopwood, DA. 2007. Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press.*

## J

- ✎ *Jakimowicz D.2007. Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of Streptomyces. Postepy Hig.Med.Dosw. 61: 565-575.*
- ✎ *J .Jerome. Perry, T. James, Staley, Stephen Lory. 2004. Microbiologie cours et questions de revision (PCEM, PCEP ) 1er cycle / licence, 2ème cycle/Master . Paris. P : 72.249.632.*

## K

- ✎ *Kang, M.J., Strap, J.L., Crawford, D.L. 2010. Isolation and characterization of potent antifungal strains of the Streptomyces violaceusniger clade active against Candida .albicans. J Ind Microbiol Biotechnol, 37(1): 35–41.*
- ✎ *Kitouni M. 2007. Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état Microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, Algérie . P :176.*

## L

- ✎ *Lacey J. 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., 2, 231-51.*
- ✎ *-Lacey J. 1997. Actinomycetes in compost. Ann Agric Environ Med. 4: 113–114.*
- ✎ *Lakshmiathy D.T., Krishnan K. 2009. A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. International Journal of Integrative Biology. 6: 132-136.*
- ✎ *Larpent-Gourgaud M., Larpent J-P. 1997.Mémento technique de microbiologie. Tec & Doc-Lavoisier,..3ème édition. Paris. P :7430-7563.*
- ✎ *Lee SO, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Park DJ, Kim CJ, Kim JC.2008. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to Plasmodiophora brassicae.18(11):1741-6.*

- ✂ Lee S.D., Kang S. O. et Hah Y. C. 2000. *Catellotospora koreesis* sp. Nov., a novel Actinomycete isolated from a gold mine cave. *Inter J Syst Evol Microbiol.* 50: 1103-1111.
- ✂ Lozniewski A., Rabaud C. 2010. *Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risque infectieux. Centre de Coordination de lute contre les infections nosocomiales-Sud Est.*

## M

- ✂ Madigan M. T , Martinko J.M .2007.*Biologie des microorganismes. 11e edition. Pearson Education France. P : 331-423, 686-718.*
- ✂ Madigan M.T., Martinko J.M, Stahl D, Clark D.P. 2012. *brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover. France .P :978-981.*
- ✂ Mahmoudi Fariba , Behzad Baradaran, Alireza Dehnad, Dariush Shanehbandi, Leila Mohamed Khosroshahi &Mahyar Aghapour. 2013.*The immunomodulatory activity of secondary metabolites isolated from Streptomyces calvuson human peripheral blood mononuclear cells. volume 73.N° 2.P: 97-103 .*
- ✂ Mariat F. et SebaldM..1990 . *Les actinomycètes . Dans .Bactériologie médicale. Le Minor . Edition Médecine-Science.Flammarion.France .P :203 .*
- ✂ Martin C. 2008. *Urgences et infections: Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. Wolters Kluwer.France. Arnette Ed. ISBN-978-2-7184-1181-1.*
- ✂ Martin S.M. et Demain A.L. 1980. *Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol Rev.* 44:230-261.
- ✂ Melouah Ratiba Oum Hani.2015. *Production et extraction de quelques principes actifs isolés à partir des actinomycètes. universite kasdi merbah ouargla .P 3,4.*
- ✂ Mendes, T.D., Borges, W.S., Rodrigues, A., Solomon, S.E., Vieira, P.C., Duarte, M.C. Pagnocca, F.C. 2013. *Anti-Candida properties of urauchimycins from Actinobacteria associated with trachymyrmex ants. france. P: 9 .*
- ✂ Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. 2000. *Streptomycetes: A new model to study cell death. J. Cell. Biol.* 3: 153–158.
- ✂ Mimos O. 2003. *Impact des résistances bactériennes. Conférences d'actualisation, Elsevier SAS. P :665 - 672.*
- ✂ M.Oskay, A.U. Tamer, C. Azeri. 2004. *Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey . Afr. J. Biotechnol .P : 441–446.*

- ✎ Mouly S., Sellier P. 2004. *Monitoring thérapeutique des anti-infectieux : des exigences réglementaires au bon usage du médicament* Springer-Verlag .Paris.P 98-92. ISBN-2-287-40684-0.

## N

- ✎ Najafi, M.F.; Deobagkar, D. and Deobagkar, D. 2005. *Potential application of protease isolated from Pseudomonas aeruginosa PD100*. France.P: 197-203.

## O

- ✎ Oskay, M., Tamer, A.Ü., Azeri, C. 2004. *Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey*. *Afr J Biotechnol*, 3(9): 441–446.

## P

- ✎ Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C. et Floress M.E. 2003. *Streptomyces mexicans Nov., à xylanolytic microorganism isolated from soil*. *Int.Jo. Syst.Evol.Microbial*.53 : 269-273.
- ✎ Pfaller M.A. 2012 . *Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment*. *The Am J of Medecine*. 125(1) .Bruxelle.P : 805 – 825 .
- ✎ Philippon A. 2006. *Antibiotiques I. cours de bactériologie Générale. Faculté de médecine COCHIN-POR-ROYAL.. Thèse de doctorat. Université PARIS V.P :23-60*.
- ✎ Polpass Arul Jose, Kunjukrishnan Kamalakshi Sivakala, Pandiyan Rajeswari, and Solomon Robinson David Jebakumar .2014. *Characterization of Antibiotic Producing Rare Actinomycete Nonomurea sp. JAJ18 Derived from an Indian Coastal Solar Saltern . J. Gen. Microbiol.. France. P:7*
- ✎ Prescott, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton .2010. *Microbiologie.3<sup>ème</sup> edition*.Bruxelles.P:589 .
- ✎ Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A. 1995. *Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. P : 506–517*.
- ✎ Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A. 2003. *Microbiologie. France .P :20*.
- ✎ Procópio, R.E., Silva, I.R., Martins, M.K., Azevedo, J.L., Araújo, J.M. 2012. *Antibiotics produced by Streptomyces. Braz J Infect Dis, 16(5): 466–471*.

## R

- ✎ Ravel, J., Willington E.M.H., Et Hillr.T.2000.Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 529-534.
- ✎ Ripert C. 2013. *Mycologie médicale. Tec et Toc Lavoisier édition.France.P :20 .*

## S

- ✎ Samac D., Willert M., McBride M. et Kinkel L. 2003. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl Soil Ecol.* Vol 23.N° 2.P: 55- 66.
- ✎ Singh. S.L; Baruah. I; and Bora. T.C. 2006. Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol.*, vol 5 N° 2.P: 217- 221.
- ✎ Schofield G.M. and Schaal K.P. 1981. A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetales and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 121: 237–259.
- ✎ Shirling E.B. and Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* sp
- ✎ Sheikh N, Jahagirdar V, Kothadia S, Nagoba B. 2013. Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. *Eur J Gen Med.* 10(4): 254-258.
- ✎ Shirling E. B. et Gottlieb D. 1972. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int J Syst Bacteriol.* 22: 265-394.
- ✎ S. Benouagueni a , S. Ranque b,c , D. Gacemi Kirane .2015. A non-polyenic antifungal produced by a *Streptomyces* *yatensis* strain isolated from Mellah Lake in El Kala, North-East of Algeria. *J. Gen. Microbiol.*502. P :9 .
- ✎ sik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. 1999. *Nocardia salmocida* nom. Rev. a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 49, 833-837.
- ✎ Smaoui S. 2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse .France. P :251 ,22.
- ✎ Souza PM, Magalhaes PO. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry—A review. *Braz J Microbiol* 41: 850–861.
- ✎ Sutthinan khamna,Akira yokota ,John F Peberdy,saisamora Lumyong.2009.antifugal activity of *streptomyces* spp.Isolated From rhizosphere of thai medicinal plants .Vol 6. N° 3.P :143-147 .

- ✎ *Stackebrandt E., Rainey F. A. et Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol. Vol.47.N<sup>o</sup> 2.P: 479-480 .*
- ✎ *Staneck, J. L., Roberts, G. D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. Appl Microbiol, 28(2): 226–231.*
- ✎ *S.T. Williams And Cross T.1971, actinomycetes , in méthodes in microbiology booth c.ed ., academic press. London .P :4 ,156,160.*
- ✎ *S. Reghioua F. Boughachiche L. Oulmi H. Zerizer M. Kitouni A. Boudemagh A. Boulahfrouf1 .2008. Separation et caracterisation preliminaire d'antibiotiques produits par une souche representative d'actinomycetes isoles de sol aride de la region de biskra. Université Mentouri Constantine. Algérie. N<sup>o</sup>28. P : 59-64 .*
- ✎ *Spampinato C, Leonardi D. 2013. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. Biomed Res Int. Vol 1.N<sup>o</sup> 13.P: 10.1155.*
- ✎ *. Summers A. O. 2006. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. Animal Biotechnology. 17: 125 - 135.*

## T

- ✎ *Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. Mol Biol Evol. 28: 2731-2739.*
- ✎ *Thomson, C.J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H., Labischinski, H. 2004. Antibacterial research and development in the 21(st) Century-an industry perspective of the challenges. Curr Opin Microbiol . 7(5):445–50.*
- ✎ *Thumar JT, Singh SP . 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, Streptomyces clavuligerus strain MIT-1. Braz. J. Microbiol. 38: 766-772 .*
- ✎ *Tortora G.J., Funke B.R. Et Case C.L. 2012-Introduction à la microbiologie . Edition de Renouveau pédagogique. Québec .P: 152-408.*

## V

- ✂ Valan Arasu M ,duraipandiyanV,Agastian P ,Lgnacimuthu S,Agastian P. 2012. *Characterization and phylogenetic analysis of Bengal india . Asian Pac J Trop biomed .2(10):803-8010 .*
- ✂ Vandeputte. V. 2008. *Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez candida glabrata. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. France.P : 168.*
- ✂ Vaubourdolle M. 2007 . *Infectiologie. Le Moniteur Internat .Edition 3ème . P:40-7*

## W

- ✂ WALCH C. 2000. *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. Vol 4. N°06.P: 775-779.*
- ✂ Wildermuth H. and Hopwood D.A. 1970. *Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor. J. Gen. Microbiol. 60: 51–59.*
- ✂ Willey J.M, Sherwood L, Woolverton C.J,Prescott's .2008. *Principles of Microbiology. McGraw-Hill Higher Education. ISBN-9780073375236.*
- ✂ Williams S.T, Davis F.L. 1965.*Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in soil. J Gen Microbiol. Vol 38.N° 2.P: 251-261.*
- ✂ Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin. 1983. *Numerical classification of Streptomyces and related genera. J. Gen. Microbiol .Vol 30.N° 3.P:1743-1813.*
- ✂ Wink J. 2001. *The Actinomycetales An Order in the Class of Actin Important to the Pharmaceutical Industry (Livre format électronique) .P : 570.*
- ✂ Wright G. D. 2007. *The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. Nature Rev.Microbial. 5: 175 - 186.*

## X

- ✂ Xu Z,Xia J,FengX,Li S ,Xu H,Bo F,Sun Z.2012 .*Genome sequence of streptomyces albulus PD-1,a productive strain for epsilon –poly –L-lysine and poly-L-diaminopropionic acid .Genome Announc.89(1) :71 -78 .*

## Y

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

## Z

- ✎ *Zerizer habiba .2014. Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat .Université Constantine.P4,5 .*
- ✎ *Zmahoun, C. 2005. Evaluation de la sensibilité aux antibiotique des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire- Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M ) .Thèse de doctorat d'état ,Université du Mali. P : 20-90.*

# Annexe



## Annexe

### Annexe I : Milieux de culture

#### I-Composition des milieux utilisés pour l'étude morphologique des Actinomycètes

##### I-1 Les milieux ISP

###### \*ISP<sub>2</sub>

-Extrait de Malt .....	10g
-Extrait de levure .....	4g
-Glucose.....	4g
-Agar .....	15g
-H <sub>2</sub> O distillée .....	1000ml

**pH :7.0 a 7.2**

###### \*L'ISP<sub>6</sub>

-Peptone.....	20g
-Extrait de levure.....	1g
-Citrate ferrique ammoniacal.....	0.5g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
-Thiosulfate de sodium .....	0.08g
-Agar. ....	15g
-H <sub>2</sub> O distillée .....	1000ml

**pH :7.2**

###### \*L'ISP<sub>7</sub>

-Glycérol .....	15g
-L-Tyrosine.....	0.5g
-L-Asparagine .....	1g
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5g
-MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.5g
-NaCl.....	0.5g
-FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O .....	0.01g
-Solution saline standard.....	1ml
-Agar .....	20g
-H <sub>2</sub> O distillée .....	1000ml

**pH : 7.2**

## **I-2 le milieu Bennet**

-Peptone.....	2g
-Glucose.....	10g
-Extrait de viande.....	1g
-Extrait de levure.....	1g
-Agar.....	18g
-H <sub>2</sub> O distillée.....	1000ml

**pH** : 7,3

## **II-Composition des milieux utilisées pour l'étude de la biodégradation**

### **II-1-Milieu amidon 1%**

-GN.....	100ml
-Amidon .....	1g

### **II-2-Milieu caséine 5%**

- H <sub>2</sub> O distille.....	100ml
-Agar .....	2g
-Caseine soluble .....	5g

**pH** : 6 a 6.5

### **II-3- Milieu de test action sur le lait écrémé • 10%**

-H <sub>2</sub> O distillée .....	100ml
-Lait écrémé .....	10g

### **II-4-Milieu de test d'estérase**

-NaNO <sub>3</sub> .....	1g
-Extrait de levure .....	5g
--Solution saline .....	50ml
-Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O.....	0.1g
-Tween 80.....	10ml
-Agar .....	18g
-H <sub>2</sub> O distillée.....	1000ml

**pH** :6 a 6.2

### **II-5-bouillon nitrate**

-Bouillon nitrate .....	21g
-H <sub>2</sub> O distillée .....	1000ml

**pH**: 7.2 a 7.2

## **II-6-Gélose Columbia au sang de cheval • 5% ( COS )**

- Peptone de caseine et de viande (bovin et porcine).....10g
- Hydrolysate de protéine animales ( bovin ou porcine ).....10g
- Peptone de coeur( bovin ou porcine ) .....3g
- Amidon de maïs .....1g
- Chlorure de sodium .....5g
- Agar .....13.5g
- Sang de cheval .....5ml

**pH:** 7.3

**NB :**

- ✓ la stérilisation s'effectue par l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C°
- ✓ l'ajustement du pH pour tous milieux de culture s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH ou une solution d'HCl selon le cas.

## **II-7-Milieu RAT :**

- Extrait de riz déshydraté ..... 2,5 g
- Tween 80 ..... 10 mL
- Agar-agar ..... 10 g
- Eau distillée.....100ml

pH = 6,6

## **III.Composition des milieux utilisés dans les tests d'activité**

### **III-1-Milieu LB solide**

- Tryptone .....10g
- Extrait de levure.....5g
- Na Cl .....10g
- Agare .....20g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 7.2

### **III-2-Milieu LB molle**

- Tryptone.....4g
- Extrait de levure.....2g
- Na Cl.....2g
- Eau distillée .....800ml

pH :7.2

### III-3-Milieu LB liquide

Treptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Na Cl .....	10g
Eau distillée.....	1000ml
pH : 7.2	

### III-4-Milieu Sabouraud

-Peptone.....	10g
-Glucose.....	20g
-Chloramphénicol.....	0,5g
-Agar.....	15g
-Eau distillée.....	1000ml
pH : 6	

### Annexe II : Solutions et Réactifs

#### 1-Solution saline standard

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.25g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.125g
NaCl.....	0.125g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.001g
Mn SO <sub>4</sub> .....	0.001g
Eau distille .....	50ml

#### 2-Solution saline1

FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.1g
Mn Cl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	0.1g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.1g
Eau distille .....	100ml

#### 3-Solution saline 2

CuSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.64 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.11g
Mn Cl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	0.79g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.15g
Eau distille .....	100ml

#### 4-Eau physiologique

NaCl .....8.5 g  
H<sub>2</sub>O distillée.....1000 ml

#### Annexe III : Utilisation de l'Api20E

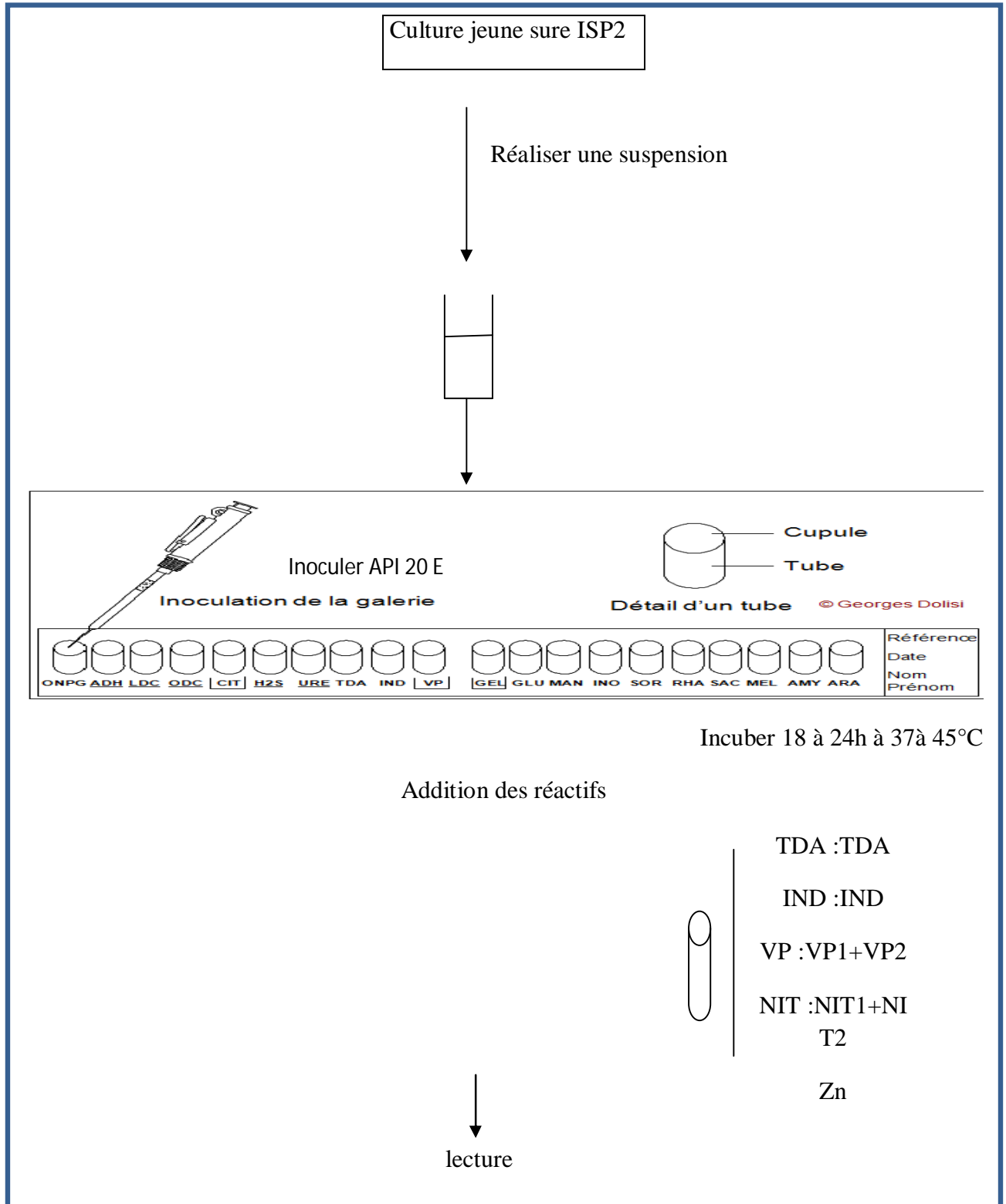



























Figure N° : mode opératoire du système API 20 E

**Tableau :lecture du système API 20 E**

<b>TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E</b>						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		 
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte	