



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 de la vie

**MEMOIRE DE MASTER**

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière** : Biologie appliquée

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

**Thème:**

**Recherche de l'activité antimicrobienne  
des souches d'actinomycètes d'origine  
lacustre**

Présenté par

**Melle :**

Boufker Roumaissa

**Melle :**

Taib Hanan

**Devant le Jury:**

Dr . Boukoucha . M  
Dr . Mme enhadj .M  
Mr . Menacria .T

M.C.B Université de Tébessa  
M.C.B Université de Tébessa  
M.A.A Université de Tébessa

Président  
Promotrice  
Examineur

**Date de soutenance : 23Juin 2019**

## المخلص

إن التطور المستمر لمقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية و ظهور أمراض معدية جديدة هذا ما يبرر ضرورة البحث عن جزيئات المضادات الحيوية الجديدة ،

الهدف من هذا العمل في سياق تسليط الضوء على قدرة les actinomycètes لتصنيع جزيئات مضادة للبكتيريا و أخرى مضادة للفطريات ضد كائنات حية أخرى للفحص

من أجل هذا تم اختيار 8 سلالات des actinomycètes من مجموعة بمخبر عنابة يتم فحصها ضد 10 أنواع بكتيرية ( *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC25293, *Micrococcus luteus* DSM1790, *Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC8799, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella* ATCC42238, *Pseudomonas aeruginosa* Isolat clinique, *Pseudomonas* sp Isolat clinique *Candida sp*. ICF18, ) و ضد 8 سلالات من فطر الخميرة ( *Candida sp* ICF19, *Candida sp* ICF43, *Candida sp* ICF44, *Candida sp* ICF65, *Candida Para Krusei* , *Rhodotorullasp* (psilosis, *Candida Krusei* , *Rhodotorullasp*) et contre 7 souches des champignons (*Paecilomyces lilacinu* (Pa.li), *Aspergillus calidosus*, *Aspergillus flavus*, *Scedosporium* sp, *Fusarium solani*, *Lichterniasp*, *Fusarium oxysporum* ).

يتم فحص النشاط ضد البكتيريا بطريقة قرص الجلوز ( agar ) أما بالنسبة لنشاط ضد الفطريات يتم استخدام طريقة الطبقة المزدوجة، نتيجة اختبارنا هذا تؤكد وجود نشاط ضد البكتيريا ضد الفطريات من طرف بعض les actinomycètes من بين السلالات الأكثر نشاطا هما S450 S406

و في النهاية انهينا اختبارنا باستخلاص الجزيئات الحيوية انطلاقا من زراعة للسلالات الأكثر نشاطا في الوسط الزراعي GYEA بطريقة الحفر في الجلوز وأقراص الورق.

الكلمات المفتاحية: الأكتينومييسات، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات، الجزيئات الحيوية، الاستخلاص.

## *Abstract*

The constant evolution of bacterial resistance to antibiotics and the emergence of new infectious diseases justify the urgency of having new antimicrobial molecules.

The aim of this work is to highlight the ability of Actinomycetes to produce antibacterial and antifungal molecules against microorganisms-tests.

For this, 8 strains of Actinomycetes selected from an Annaba laboratory collection are tested against 10 bacterial germs (Staphylococcus aureus ATCC 25293, Staphylococcus aureus ATCC 43300, Micrococcus luteus DSM1790, Escherichia coli ATCC25922, Escherichia coli ATCC8799, Bacillus subtilis ATCC6633, Salmonella ATCC42238, Pseudomonas aeruginosa Clinical isolate, Pseudomonas sp Clinical isolate, Klebsiella pneumoniae) and against 8 yeast strains (Candida sp.ICF18, Candida sp ICF19, Candida sp ICF43, Candida sp ICF44, Candida sp ICF65, Candida Parapsilosis , Candida Krusei, Rhodotorula sp) and against 7 strains of fungi (*Paecilomyces lilacinu*, *Aspergillus calidosus*, *Aspergillus flavus* , *Scedosporium* sp, *Fusarium solani*, *Lichtheimia* sp , *Fusarium oxysporum*).

The antibacterial activity test is performed by the agar disk method, as regards the test of antifungal activity against yeasts and filamentous fungi was tested by the double layer method. The result shows that certain strains of Actinomycetes have antibacterial and antifungal activity, among these active strains, strains S406 and S450 considered more active strains.

Ultimately, we completed our work by extracting biomolecules from ISP2 solid cultures of two selected strains S450 and S406, using the disk method and the well method.

**Key words:** Actinomycetes, antibacterial, antifungals, biomolecules, extraction

## **Résumé**

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotiques et

L'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de la mise en évidence l'aptitude des Actinomycètes à produire des molécules antibactériennes et antifongiques contre microorganismes-tests.

Pour cela, 8 souches d'Actinomycètes choisissent parmi une collection de laboratoire de Annaba sont testées contre 10 germes bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC25293, *Micrococcus luteus* DSM1790, *Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC8799, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella* ATCC42238, *Pseudomonas aeruginosa* Isolat clinique, *Pseudomonas* Isolat clinique, *Klebsiella pneumoniae* isolat clinique) et contre 8 souches des levures (*Candida sp.* ICF18, *Candida sp.* ICF19, *Candida sp.* ICF43, *Candida sp.* ICF44, *Candida sp.* ICF65, *Candida Para psilosis*, *Candida Krusei*, *Rhodotorula sp.*) et contre 7 souches des champignons (*Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus calidosus*, *Aspergillus flavus*, *Scedosporium sp.*, *Fusarium solani*, *Lichtheimia sp.*, *Fusarium oxysporum*).

Le test d'activité antibactérienne est réalisé par la méthode des disques d'agar, en ce qui concerne le test d'activité antifongique contre les levures et les champignons filamenteux a été testé par la méthode de double couche. Le résultat montre que certains souches d'Actinomycètes ont une activité antibactérienne et antifongique, parmi ces souches actifs, les souches S406 et S450 considérés comme les souches plus actifs.

En fin de compte, nous avons terminé notre travail par l'extraction des biomolécules à partir des cultures solides sur GYEA de deux souches sélectionnées S450 et S406, par la méthode des disques et la méthode des puits.

**Mots clés :** Actinomycètes, Activité antibactérienne, activité antifongiques, biomolécules, extraction.

# *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut.....*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, la reconnaissance.*

*Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce modeste travail*

*A deux personnes les plus chers au monde **mes parents**, qui m'ont donné beaucoup de soutien et d'encouragement, symbolisant pour moi le sacrifice et la source d'où naît la lumière qui éclaire ma vie, et pour qui aucune dédicace ne m'exprime la profondeur de mon amour.*

*A mes chères sœurs : **Abir, Wissal, Assil, Iline, Arwa.***

*Pour leurs véritables et sincères amours, je les souhaite une vie pleine de succès avec beaucoup de bonheur.*

*A **une personne** qui est loin de mes yeux près de moi toute la proximité, tous les remerciements et la gratitude et la promesse de me tenir à mes côtés dans les moments les plus difficiles qui m'ont passé, bien que votre soutien ait toujours été une force pour moi de continuer ce travail.*

*A mes proches amis*

*« **Hanan, kawthar, ikram, faouzia** »*

*Pour les moments forts et agréables que vous avez passés ensemble qui m'aiment et me souhaitent le bonheur et pour leurs encouragement.*

*Sans oublier mes braves Amies de la promotion de microbiologie Master II.*

***Roumaissa***



**Dédicace**

**A mes chers parents**

**Mon papa, ma maman** je vous offre ce travaille, et ma poème d'amour

*Vous m'avez offert la vie et vu grandir de jour en jour,*

*Mes parents vous êtes mes modelés de vie pour toujours*

*Papa je t'aime, maman je t'adore, vous êtes des parents en or.*

*Père et mère, vous êtes pour moi des cadeaux de vie, un trésor*

**A mes frères Kais, Abd El hak.**

*Ma bijou de la maison ma petite sœur kadar.*

*En témoignage de l'attachement, et de l'affection que je porte pour vous.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.*

*A tous mes familles **Zina, Kalthoum** les deux mères pour toujours*

*L'amitié bijou d'amour, l'amitié pour toujours, l'amitié est proche du mot  
amour qu'elle nous unit pour infinité de jour*

*A tous mes amies mes sœur **Roumaissa, faouzia, khawla, Thaldja, Fayrouz**  
**,Dalal** tous les jours ne sont pas oubliable avec vous, les fleurs d'amitié ne se  
fanent jamais. Merci d'être Mes amies.*

**A une personne**

*Est l'une des choses qui me rend les plus heureux dans la vie je dis à toi mille  
mercis.*

**Hanan**

# *Remerciement*

*Avant toute chose, nous remercions ALLAH pour tous les bienfaits qu'il nous a accordés et pour le courage qu'il nous a attribué afin de compléter ce travail et pour la force qu'il nous a donnée afin de passer devant tous les obstacles que nous avons rencontrés.*

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Mme Benhadj***

***Mabrouka**, maître-assistant à la faculté des sciences de la Nature et de la vie,*

*Université Tébessa. Nous tenons vivement à lui exprimer notre profonde gratitude pour nous avoir données la possibilité de réaliser ce travail sous sa supervision et pour le temps qu'elle nous a consacré, sa patience, ses précieux conseils, son soutien tout le long de la réalisation de notre mémoire ainsi que pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.*

*Nos remerciements vont aussi à*

*Notre président **Mr Boukoucha.M**, de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce travail.*

*Notre examinateur **Mr Menasria**, d'avoir ménagé son temps pour examiner et évaluer notre travail.*

*Tous les enseignants de microbiologie qui nous ont fait former.*

***Melle Wardala** technicienne de laboratoire de microbiologie pour leur aide et leur gentillesse.*

*Tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la finalisation de ce travail.*

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>page</b>
<b>01</b>	Répartition des Actinomycètes dans la nature	<b>09</b>
<b>02</b>	Type de paroi chez les actinomycètes	<b>10</b>
<b>03</b>	sucre cellulaire totaux des actinomycètes	<b>11</b>
<b>04</b>	représentation des critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes	<b>12</b>
<b>05</b>	classe, ordre et famille du phylum d'Actinobactéries	<b>14</b>
<b>06</b>	Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique	<b>25</b>
<b>07</b>	Quelques Antibiotiques produites par les actinomycètes	<b>27</b>
<b>08</b>	les antibiotiques produits par le genre Streptomyces	<b>28</b>
<b>09</b>	classification des antifongiques	<b>30</b>
<b>10</b>	Classification des antifongiques selon la cible	<b>31</b>
<b>11</b>	Quelques agents antifongiques produits par les actinomycètes	<b>33</b>
<b>12</b>	le code des souches d'actinomycètes	<b>39</b>
<b>13</b>	Caractéristiques des souches bactériennes tests	<b>40</b>
<b>14</b>	Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 8 isolats	<b>47</b>
<b>15</b>	Les caractères morphologiques des 08 isolats sur les trois milieux ISP2, GYEA et Bennet après 7 jours d'incubation	<b>50</b>
<b>16</b>	Les résultats de culture des bactéries – tests	<b>54</b>
<b>17</b>	résultat de test antibactérien	<b>58</b>
<b>18</b>	Diamètre des zones d'inhibition du test d'activité antifongique contre les levures (mm).	<b>62</b>
<b>19</b>	les diamètres des zones inhibitrices des champignons filamenteux (mm).	<b>64</b>
<b>20</b>	les diamètres des zones inhibitrices après l'extraction	<b>66</b>



## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	une colonie d'actinomycètes La coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec Des hyphes vivants (bleu-vert) et morts (blanc) la figure montre le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospore	<b>08</b>
<b>02</b>	micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries	<b>17</b>
<b>03</b>	morphologies rencontrées au cours de cultures liquides	<b>18</b>
<b>04</b>	représentation schématique du cycle de vie de sporulation des actinomycètes	<b>19</b>
<b>05</b>	Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes	<b>27</b>
<b>06</b>	Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques	<b>29</b>

## Liste des planches

<b>01</b>	Photos représentant les caractères cultureux de quelques isolats sur le milieu ISP2	<b>48</b>
<b>02</b>	photos représentent les couleurs de pigmentation et le mycélium aérien dans les trois milieux de cultures	<b>51</b>
<b>03</b>	photos représentes l'état frais des souches d'Actinomycètes	<b>52</b>
<b>04</b>	Photos des résultats de l'Observations microscopiques après coloration de Gram	<b>53</b>
<b>05</b>	photos représentent quelque zone inhibitrice due à l'activité antibactérienne de souche 406,450	<b>57</b>
<b>06</b>	figure représentent les diamètres des zone inhibitrice dans jours différents	<b>61</b>
<b>07</b>	photos représentent les résultats du test d'activité contre les levures	<b>63</b>
<b>08</b>	photos représentent les résultats du test d'activité anti fongique (champignon filamenteuses).	<b>64</b>
<b>09</b>	photos représentent les résultats des extractions.	<b>65</b>

## Table de matière

ملخص

**Abstract**

**Résumé**

**Dédicace**

**Remerciement**

**Liste des tableaux**

**Liste des planches**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction**

## Partie bibliographique

**Chapitre I : les Actinomycètes**

I/ Historique.....	05
II/ Définition et principaux caractéristiques .....	06
II.1. Définition.....	06
II.2. Les principales caractéristiques.....	06
III/ Morphologie.....	07
IV/ Ecologie.....	08
V/ Taxonomie et identification.....	09
V.1. Les critères morphologiques.....	09
V.2.Critères chimio taxonomique.....	10
V.3.Critères physiologiques.....	11
V.4. Critères moléculaire.....	13
VI/ Classification.....	13
VII/ Culture et morphologie.....	16
VIII/ Cycle de développement.....	18
IX/ Importance des actinomycètes .....	20
<b>Chapitre II : les molécules bioactives produite par les Actinomycètes</b>	
I/ Définition de métabolites secondaire.....	22

I.1. Les Antibiotiques.....	22
I.1.1.Définition.....	23
I.1.2.L'origine des antibiotiques.....	23
I.1.3.Action des antibiotiques sites et mécanismes.....	23
I.1.4.Classification des antibiotiques .....	24
I.1.5.Les critères de classification.....	24
I.1.6.Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'activité.....	24
I.1.7.La classification on fonctions Du mode d'action .....	24
I.1.8.Classification en familles d'antibiotiques .....	25
I.1.9.Résistance aux antibiotiques.....	26
I.1.10.Les antibiotiques produits par les actinomycètes.....	27
I.2.Les Antifongiques.....	28
I.2.1.Historique.....	28
I.2.2.L'origine des substances antifongique.....	29
I.2.3.Classification des antifongiques.....	29
I.2.4.Mode d'action des antifongiques.....	31
I.2.5.Mécanisme de résistance des substances antifongique.....	32
I.2.6.Les antifongiques produits par les actinomycètes.....	33

### **Partie expérimentale**

I. Objectif.....	37
II. Cadre de l'étude.....	37
III. Matériels utilisés .....	38
III.1.Matériels non-biologique .....	38
III.1.1.Grands matériels.....	38
III.1.2.Petits matériels.....	38
III.2.Matériels biologiques.....	39
III.2.1/ Les actinomycètes.....	39
III.1.2/ Les germes cibles.....	39
III.1.2.1/ Les bactéries test.....	40
III.2.1.2/ Souches fongiques tests.....	40

III.3.Milieux de cultures.....	41
III.4.Les solutions et colorants utilisés.....	41
IV. Méthode de travail.....	41
IV.1. Origines des souches.....	41
IV.3. Etude des caractéristiques morphologiques des actinomycètes.....	42
IV.3.1 Etudes macromorphologique.....	42
IV.3.2. Etude microscopique .....	42
IV.3.2.1.Technique à l'état frais.....	42
IV.3.2.2.Technique de coloration de Gram.....	42
IV.4.Mise en évidences de l'activité microbienne des souches d'actinomycète.....	43
IV.4.1.Etude de l'activité antibactérienne.....	43
IV.4.2. Etude de l'activité antifongique.....	44
IV.4.3.1.Recherche de l'activité des extraits.....	44
IV.4.3. Extraction des molécules bioactives.....	44
V. Résultat et discussion .	
V.1.Repiquage et purification des isolats d'actinomycètes.....	47
V.2.Etude des caractéristiques morphologiques des actinomycètes.....	49
V.2.1. Etudes macromorphologique.....	49
V.2.2. Etude microscopique.....	52
V.2.2.1. Technique à l'état frais.....	52
V.2.2.2. Technique de coloration de gram.....	53
V.3.Recherche de l'activité antimicrobienne des Actinomycètes .....	54
V.3.1.Recherche de l'activité antibactérienne.....	54
V.3.1.1.Test d'activités antibactériennes.....	55
V.3.1.2.Recherche de l'activité antifongique.....	62
V.3.1.2.1.Recherche de l'activité anti candida.....	62
V.3.1.2.1 Recherche de l'activité contre champignon-filamenteuses.....	63
V.1.3. Extraction préliminaire des molécules bioactives.....	65
V.1.3.1. Extraction des molécules antibactériennes.....	65

**V.1.3.2. Extraction des molécules anti fongique (levure, champignon).....66**

**Conclusion.**

**Référence bibliographique.**

**Les annexes**



# **Introduction**



## Introduction générale

---

Les microorganismes sont omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**).

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes sont doués d'un potentiel d'activité biologique très diversifié. Parmi lesquels des substances à visé thérapeutique ; tels les antibiotiques et les antifongiques ; employés dans divers domaines : la médecine humaine et vétérinaire, l'agriculture et l'industrie pharmaceutique (**Grafe, 2000**).

Parmi ces microorganismes, les actinomycètes ont acquis une importance particulière, car ils sont la source la plus importante pour la production d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires bioactifs (**Sudo et al., 1995** ; **Sanglier et al., 1996** ; **Takahashi et Omura, 2003** et **Kitouni et al., 2005** ; **Valan et al., 2008**), ils sont connus pour être à l'origine de la production d'environ 80% des antibiotiques commercialisés (**Bérdy, 2005**), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (**Islam et al., 2009**).

Les actinomycètes sont des bactéries gram positive filamenteuses ramifiées à mode de sporulation complexe, ont été retrouvés dans plusieurs écosystèmes aquatiques, marins et lacustres. Ces germes est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisés en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (**Jyotish et al., 2008**). En particulier le genre *Streptomyces* qui est à l'origine d'environ 70 % des molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Mais d'après certains auteurs, les ressources en molécules d'intérêts pharmaceutiques à partir des *Streptomyces* ont été largement exploitées, et actuellement parmi les métabolites du genre *Streptomyces* découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs (**Berdy, 2005**).

C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressées à la recherche d'activités antimicrobiennes d'actinomycètes d'origine lacustre, dans le premier temps fait de rechercher les molécules bioactives produite par un groupe d'actinomycètes, dans un second temps on fait l'extraction de ces molécules.

## **Introduction générale**

---

Cette recherche est divisée en deux parties, la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique où on décrit des généralités sur les actinomycètes, leur classification et taxonomie, leur écologie, leurs molécules bioactives antibactériennes et antifongiques et leur importance.

La seconde partie dite expérimentale comprend matériels et méthodes et la mise en évidence l'activité antimicrobiennes des actinomycètes, les résultats obtenus ainsi qu'à leurs discussions suivi par une conclusion générale.

# Chapitre I

## Les actinomycètes

## I/ Historique

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir source humaines (**Williams et al., 1984**). Pendant longtemps, on considéré les actinomycètes comme des champignons (**Mariat, 1962**) mais l'histoire des actinomycètes peuvent être divisés en 5 grandes périodes :

**La première période** de 1877 à 1890 pourrait être nommée, la période « médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on Leur attribuait (**Baldacci, 1962**).

**La seconde période** (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol : avec les travaux **d'OrlaYensen** (1909) qui créa la famille des Actinomycetacees qui comprend un seul genre *Actinomyces*, par la suite, de nombreuses espèces telluriques furent isolées et décrit. Buchanan (1917) créa l'ordre des Actinomycetales. Les espèces qui composant le genre *Actinomyces*, étaient très différentes, certains auteurs ont commencés par scinder ce genre en plusieurs autres (**Messaoudi, 2013**).

**L'époque suivante** est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Waksman lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomycesgriseus*. Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites. Ainsi, **la période suivante** peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques.

**Enfin**, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood puis de génomique a révolutionné la classification des espèces puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes (**Bleyagoubi, 2014**).

## II/ Définition et principaux caractéristiques

### II.1. Définition

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « *Aktis* » qui veut dire rayon et « *mykes* » qui veut dire champignon (**Gottlieb, 1973**). Les Actinomycètes ou *Actinomyces* sont des Bactéries filamenteuses (**Dominique, 1998**) dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique le nom de « champignons rayonnant ». Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons (eucaryote), du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leurs morphologies fongoides. Mais actuellement ils sont classés définitivement parmi les bactéries (**Messaoudi, 2013**).

### II.2. Les principales caractéristiques

- Les *Actinobactéries* sont des microorganismes contenant de l'acide mycolique, réagissant positivement à la réaction de Gram (**Ripert, 2013**). Les Actinomycètes représentent un pourcentage en G + C supérieur à 50 % (**Lee et al., 2008**).
- La plupart sont saprophytes, aérobie, neutrophiles et utilise une variété de sources d'énergie ce qui permet de les caractériser comme chimioorganotrophes mais certains sont des chimioautotrophes (**Mariatet Seballd, 1990 ; Enseigna et al., 1993**), les actinomycètes anaérobies sont des microorganismes à Gram positif se présentant sous la forme de filaments en branche (**Ripert, 2013**).
- Caractérisés par une croissance lente et souvent par une production importante d'antibiotiques. Plusieurs d'entre eux produisent des spores non mobiles (*Streptosporangium*). Leur morphologie est variée entre les différents genres deux formes Cocci comme *Micrococcus*, bâtonnets (*Mycobacterium*) et polymorphes (*Nocardia*) jusqu'aux filaments ramifiés qui se décomposent en cellules sphériques ou qui donnent un mycélium aérien avec de longues chaînes de spores. Ce sont des micro-organismes essentiellement telluriques qui sont distribués largement dans des écosystèmes naturels. (**Erikson, 1949**).

- La plupart des actinomycètes sont non immobiles (**Djaballah ,2010**), la mobilité est présente chez les spores libérés par les sporanges et qui sont flagellés caractéristique présentes chez les actinoplanes (**Benouagueni ,2015**).
- le temps de génération moyenne est environ 2 à 3 heures. (**Messoudi ,2013**).
- La composition de la paroi des actinomycètes ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diamminopimélique et leur cytologie est comme celle des bactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).
- La petite sous unité 16S codant pour les ARN ribosomique des actinomycètes est utilisée pour classer les espèces (séquençage nucléotidique des gènes de l'ARNr 16S) (**Ripert,2013**).
- Les actinomycètes jouent un rôle actif dans la décomposition des litières beaucoup synthétisent des antibiotiques (**Pierre ; 1995**).

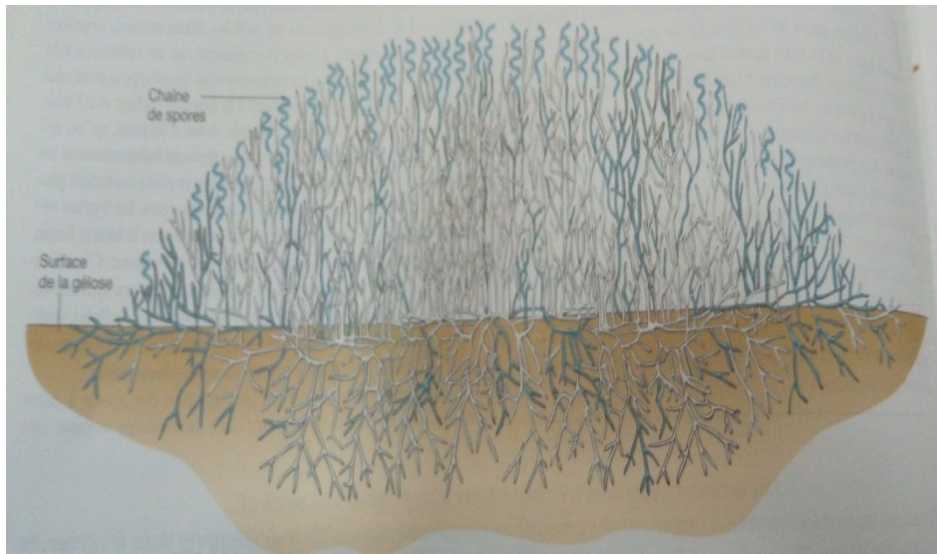
### III/ Morphologie

Les actinomycètes possèdent une structure filamenteuse avec un diamètre des filaments allant de 0.5 à 2µm, ces filaments sont ramifiés en mycélium et présentent des septums (**Lamari, 2006**). En plus des filaments ramifiés, des bacilles et aussi des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (**Messoudi,2013**). Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien. On distingue trois cas :

Soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*), croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique : il renferme Cytoplasme commun multi-nucléoïde, et est donc dépourvu de septum.

Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûri en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.

- Soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachés au substratum par des crampons. (Bleyagoubi, 2014).
- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur. La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture (Nouredine, 2006).



**Figure 1** : une colonie d'actinomycètes la coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec Des hyphes vivants (bleu-vert) et morts (blanc) la figure montre le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaines de conidiospore (Prescott & al, 2010).

#### IV/ Ecologie

Les actinobactéries ont une distribution très large dans la nature : sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, le pollen, les abeilles mellifères, les plantes (endophytes), les lichens et plusieurs autres substrats (Tableau1) (Benzekhroufa, 2018).

Les actinomycètes ont aussi une grande importance écologique. Ils peuvent dégrader un nombre et une variété énorme de composés organique et ils sont extrêmement importants pour la minéralisation de la matière organique. Bien que beaucoup d'actinomycètes soient des microorganismes vivant librement, quelques-uns

sont pathogènes chez l'homme ; chez d'autres animaux et chez certain végétaux (Prescott *et al.*, 2010).

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries mésophiles avec croissance optimale située entre 25° et 30°C. Toutefois, il existe des souches thermophiles isolées à une température située entre 50° et 60°C (Edwards, 1993). Pour ce qui est du pH, la plupart des Actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles. Leur croissance est meilleure à pH compris entre 6 et 9, avec un maximum autour de la neutralité. Cependant, certaines souches de *Streptomyces* ont été isolées à partir des échantillons de sol acide (pH 3,5) (Loqman, 2009).

**Tableau n°1 : Répartition des Actinomycètes dans la nature (Williams *et al.*, 1984).**

Actinobactéries	Habitats
<i>Actinoplanes</i> spp	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia</i> spp.	Nodules racinaires des non-légumineuses, sol.
<i>Micromonospora</i> spp.	sédiments, sols (humides ou non). Boues activées.
<i>Nocardia amaræ</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Foin moisi, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> .	Compost, sol..
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, litière végétale, eau
<i>Streptomyces</i> spp	

## V/ Taxonomie et identification

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères



physiologiques et moléculaires (ex. hybridation ADN/ADN) séparent les espèces (Loucif, 2011).

### V.1. Les critères morphologiques

La couleur et le type du mycélium aérien (MA) et/ ou du mycélium de substrat (MS), Les spores sont très importantes aussi dans la taxonomie des Actinobactéries, « les spores forment sur le mycélium de substrat ou le mycélium aérien et des autres cas il présente dans des vésicules spéciales (le sporange) », la production et la couleur des pigments « pigments de la mélanine » (Ait baraka et al., 2016), la mobilité, sont les critères morphologiques les plus importants à étudier chez les actinomycètes (Badji, 2006).

### V.2. Critères chimio taxonomique

Le principal caractère sur lequel est basée, la chimio taxonomie est la composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides.

**Tableau n°2** : Type de paroi chez les actinomycètes (Prescott et al., 2010).

Type de paroi	Isomère de l'acide diaminopimélique	Glycine dans le pont interpeptidique	Sucres caractéristique	Genre représentatifs
I	L, L	+	NA	Nocardioides, Streptomyces
II	méso	+	NA	Micromonospora, pilimelia, Actinoplanes,
III	méso	-	NA	Actinomadura, Frankia
VI	méso	-	Arabinose, galactose	Saccharomonospora, Nocardia.

**NB** : NA non applicable non déterminé

-Les deux acides aminés pariétaux les plus importants taxonomiquement sont l'acide Diaminopimélique (DAP) qui peut être remplacé parfois par la lysine ainsi que la glycine qui peut être présente ou non.

-Les sucres ayant une importance taxonomiquement sont principalement les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose », « rhamnose-galactose » ou encore le madurose (Tableau 03).

**Tableau n°3** : sucre cellulaire totaux des actinomycètes. (Prescott et al ; 2010)

Type de composition en sucre	Sucre caractéristiques	Genre représentatifs
A	Arabiose, galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Dermatophilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

-Les lipides cellulaires tels que les phospholipides, les acides mycosiques pariétaux qui peuvent être présent ou absents ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi d'une grande importance dans l'identification des actinomycètes.

### V.3. Critères physiologiques

Les caractères physiologiques sont une base pour l'identification des espèces qui consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques protidiques et des polymères complexes ainsi que tolérance à certains agents physiques (pH, température) et chimiques (phénol, tellurite de potassium, antibiotiques, ...etc.) (Lamari, 2006). Dans le tableau 04 quelques caractères physiologiques (chimique) des espèces pathogènes.

**Tableau n°4 :** représentation des critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes (Ripert, 2013)

	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Actinomadura (Streptomyces) madurae</i>	<i>Actinomadura (Streptomyces) pelletieri</i>	<i>Streptomyces (Nocardia) somaliensis</i>
Acido-résistance	+	+	-	-	-
Hydrolyse de la caséine	-	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	-	+	+	+	+
Hydrolyse de l'ovalbumine	-	-	+	+	+
Hydrolyse de la paraffine	+	+	-	-	-
Utilisation de :					
Urée	+	+	+	+	-
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	+	+	-	-	-
NO <sub>3</sub> K	+	+	-	-	-
Utilisation de :					
Xylose	-	-	+	-	-
Galactose	-	+	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	+
Amidon	-	-	+	-	-
Mannitol	-	+	+	-	-

#### V.4. Critères moléculaires

Actuellement il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par leur analyse génétique. Ces études génétiques ont permis de tracer toute l'aphylogénie des actinomycètes, de grouper ou de séparer des espèces entre elles ou fusionner des genres entre eux (**Zitouni, 2005**).

Les principales techniques moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes sont :

- **L'analyse de séquence de l'ADN codant pour l'ARNr 16S** : est aujourd'hui largement utilisée pour établir les relations phylogéniques entre deux groupes bactériens et déterminer les positions taxonomiques de nombreux organismes (**Boubetraet Biskri, 2013**).
- **Hybridation ADN/ADN** : les études des réassociations ADN/ADN sont également utilisées dans la classification des actinomycètes pour déterminer les espèces. (**Boubetraet Biskri, 2013**).
- **Le coefficient de Chargaff ou GC%** : C'est un critère important non seulement dans l'identification des genres mais aussi des familles d'actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% (**Badji 2006**).

#### VI/ Classification

Les actinomycètes sont classés actuellement dans le règne des *Procaryotae*, (**Harir, 2018**). La classification des actinomycètes est proposée par **Stackebrandt et al., 1997** regroupe les actinomycètes dans la classe des *Actinobacteria*.

Les Actinobacteria sont classés depuis 2012, dans l'ordre 15,43 familles et 203 genres dans le plus récent sont représentés dans le tableau.

Tableau n°5 : classe, ordre et famille du phylum d'Actinobactéries (Goodfellow et al.2016)

Classes	Ordre	Famille
Actinobacteria	<i>Actinomycétales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae,</i> <i>Actinospiraceae.</i>
	<i>Cornynebactéria</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae,</i> <i>Mycobacteriaceae, Nocardiaceae,</i> <i>Segniliparaceae,</i> <i>Tsukamerullaceae.</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae,</i> <i>cryptosporangiaceae,</i> <i>Geodermatophilaceae,</i> <i>Nokamurellaceae.</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae.</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kinesporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae,</i> <i>Beutenbergiaceae</i>
	<i>Micromonosporales</i>	

	<p><i>Propionibactériales</i></p> <p><i>Pseudomonocardiales</i></p> <p><i>Streptomycetales</i></p> <p><i>Streptosporangiales</i></p>	<p><i>Bogoriellaceae,</i></p> <p><i>Brevibacteriaceae,</i></p> <p><i>Dermabacteriaceae,</i></p> <p><i>Dermacoccaceae,</i></p> <p><i>Dermatophilaceae,</i></p> <p><i>instrasporangiaceae, jonesiaceae,</i></p> <p><i>Microbacteriaceae.</i></p> <p><i>Micromonosporaceae</i></p> <p><i>Propionibacteriaceae,</i></p> <p><i>Nocardiodaceae,</i></p> <p><i>Pseudonocardiaceae</i></p> <p><i>Streptomycetaceae</i></p> <p><i>Streptosporangiaceae,</i></p> <p><i>Nocardiopocaceae,</i></p> <p><i>Thermomonosporaceae</i></p>
Acidimicrobia	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>
Nitriliruptoria	<p><i>Nitriliruptorales</i></p> <p><i>Euzebyales</i></p>	<p><i>Nitriliruptoraceae</i></p> <p><i>Euzebyaceae</i></p>
Rubrobacteria	<i>Rubobacterales</i>	<i>Rubobacteraceae</i>

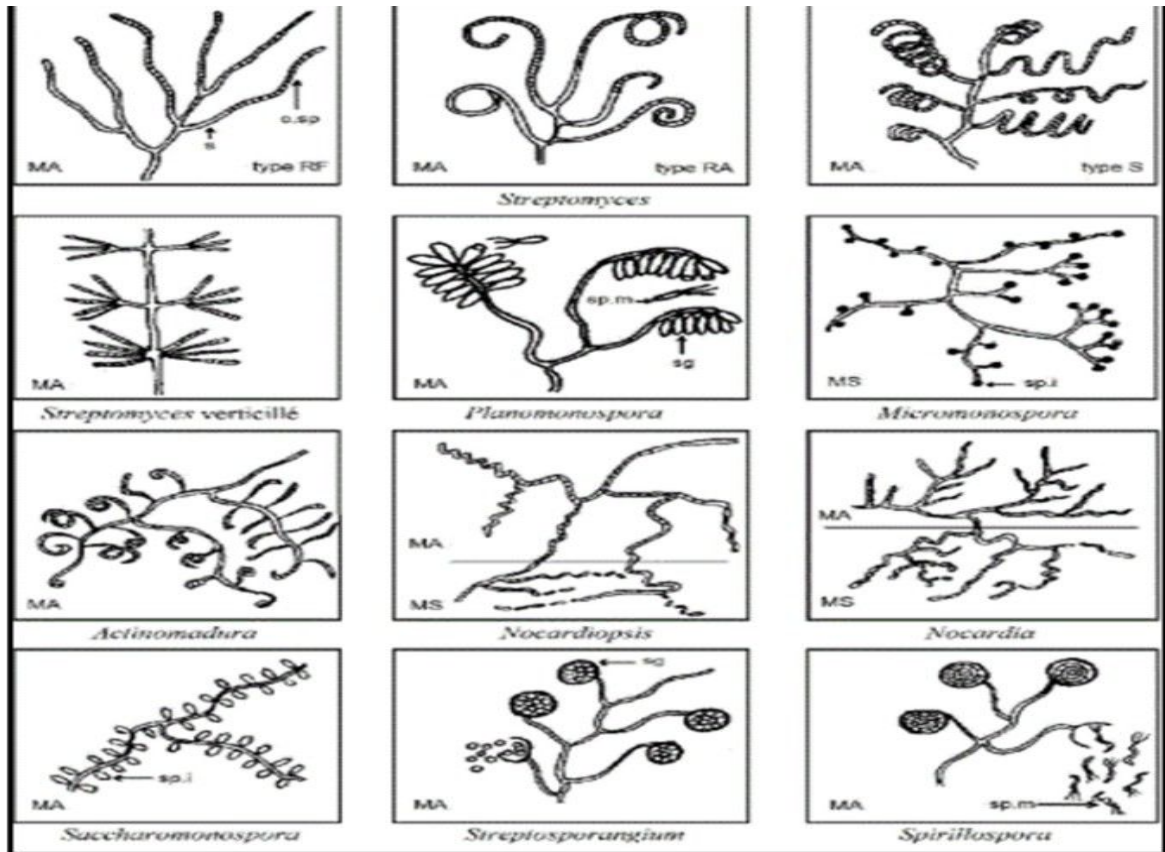
Thermophilia	<i>Thermophiles</i> <i>Solirubrobacterales</i>	<i>Thermophilaceae</i> <i>Solirubrobacterales</i> , <i>conexibacteraceae</i> , <i>Patulibacteraceae</i>
--------------	---	--

## VII/ 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.

Sur un substrat solide comme la gélose le réseau ramifié d'hyphe formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif (**Prescott et al., 2003**) ou mycélium primaire mycélium de substrat ou mycélium intra-matriciel, c'est un ensemble de filaments multi-nucléaires formés à partir du tube germinal (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**).

Sur un mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Elles sont généralement pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe (**Djaballah, 2010**).



**Figure 02:** micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries(Harir,2018).

MA : Mycélium aérien ; MS : Mycélium du substrat ; RF : RectusFlexibilis ;

(Chaines de spores droites à flexueuses) ; RA, *RetinaculumApertum* (chaîne en crochets ou en boucles) ; S, *Spira* (chaîne spiralées) ; s, sporophores ; c.sp. Chaîne de spores ; sp.i, spores isolés ; sp.m. Spores mobiles ; sg, sporange.

La croissance sur un milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation et ou/par l'injection d'air ou oxygéné. Le *Streptomyces* exposés à ces conditions, peuvent croître par élongation des filaments et présenter par la suite trois types de morphologie soit : se forme de pelote, ou bien sous forme de mycélium libre ou encore par enchevêtrement du mycélium (Djaballah, 2010).



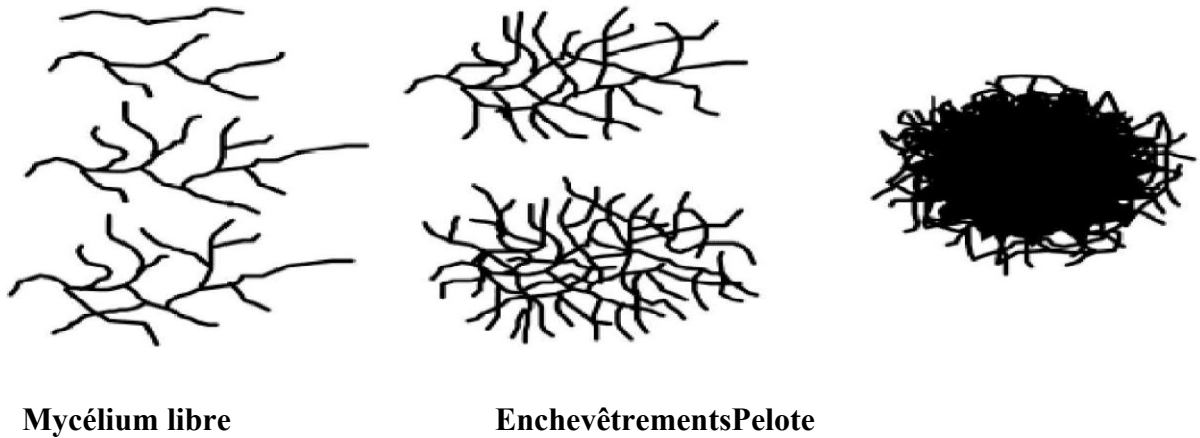


Figure03 : morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah et al., 2000)

### VIII/ Cycle de développement

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores, processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (Messaoudi ,2013)selon la représentation de suivants

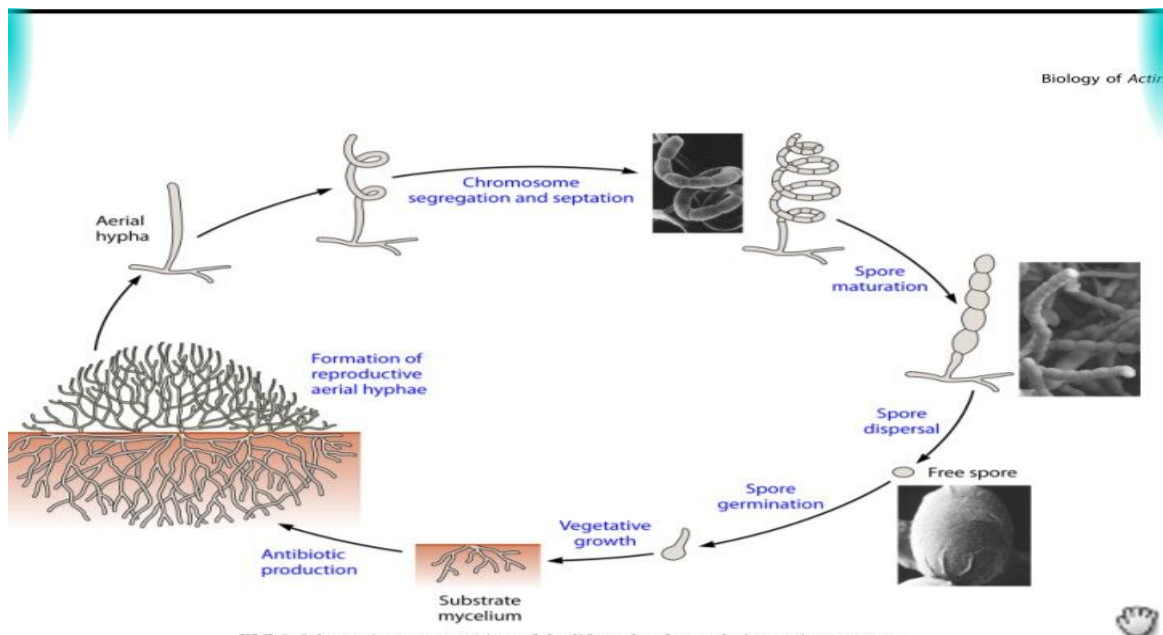


Figure 04: représentation schématique du cycle de vie de sporulation des actinomycètes.(Ait Barakaetal., 2016).

Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien ; c'est à ce moment –là que les composés médicalement utiles sont synthétisés comme la physiologie des actinomycètes bascule de cellules végétatives en croissance active vers ce type spécial de cellules, on appelle souvent ces composés des métabolites secondaires (**Prescott & al, 2010**).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriment). Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinomycètes sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplanes, Spirillospora...etc.*) (**Prescott & al, 2010**).

## **IX/ Importance des actinomycètes**

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'environnement marin qui sont la source de la production d'antibiotiques (**Donadio et al., 2010 ; Meena et al., 2013**). Ils jouent un rôle considérable dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et l'amélioration des paramètres physiques (**Dastager et al. , 2013**).

Plusieurs genres d'actinomycètes peuvent produire des métabolites secondaires (**Manivasagan et al., 2013**). En effet ils sont capables de synthétiser de nombreux produits naturels y compris les alcaloïdes, les peptides, les stérols et autres. Ces produits naturels ont des potentialités de lutter contre certaines maladies majeures comme le cancer, le HIV, l'infections du protozoaire et d'inflammations sévères (**Hassan et al., 2017**).

Chapitre II  
les molécules bioactives  
produite par les  
Actinomycètes

## Les métabolites secondaires produits par les actinomycètes

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes filamenteux (Zerizer et al., 2006).

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

### I/ Définition de métabolites secondaire

De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

Parmi les microorganismes producteurs de métabolites secondaires possédant une activité anti cellulaire, 70% appartiennent au groupe des Actinomycètes et parmi eux, on trouve 95% de *Streptomyces*. Environ 21% de ces métabolites présentent une activité antifongique se répartissant également entre substances de structure polyénique et nonpolyénique (Bastide et al, 1986).

#### I.1. Les Antibiotiques

Le terme « Antibiotique » qui nous est familier a été proposé par Selman Waksman en 1953. La découverte de l'actinomycine en 1940, premier composé antitumoral isolé (mais trop toxique) (Boubetra et Biskri, 2013), et la découverte de la streptomycine, antibiotique qui a joué un rôle important dans le traitement de la tuberculose. (Madigan & Martinko, 2002).

Avec ses étudiants et collègues, Selman A. Waksman a isolé de nombreux antibiotiques sécrétés par des actinomycètes : actinomycine (1940), clavacine, streptothricine (1942), streptomycine (1943), griséine (1946), néomycine (1948), fradicine, candicidine, candidine, etc... (Procópio et al., 2012).

### **I.1.1.Définition**

Du grec *anti*: «contre» et *bios*: «la vie». Au sens strict, les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique ; qui, à basse concentration, peuvent inhiber la croissance des micro-organismes. Ils sont élaborés par des microorganismes, champignons et diverses bactéries. Les produits employés actuellement sont des dérivés semi-synthétiques préparés par modification de produits de base naturels (Ndiaye, 2005).

### **I.1.2.L'origine des antibiotiques**

Les antibiotiques sont obtenus par deux voies

- Naturelles (produits par des microorganismes)

Sur 8100 molécules qui ont été recensées vers la fin de l'année 1999, 45,6% ont été produites par le genre *Streptomyces*, 16,0% par des actinomycètes autres que *Streptomyces*, 16,9% par d'autres bactéries et 21,5% par des champignons (Demain et Lancini, 2006).

- Semi-synthétiques ou héli synthétique : Ils résultent de la transformation chimique des composés naturels.
- Les antibiotiques artificiels : obtenus par synthèse chimique (Agregé et al., 2015).

### **I.1.3.Action des antibiotiques sites et mécanismes**

Un antibiotique interfère de diverses façons avec une fonction physiologique normales dans une cellule sensible.

- Les principaux mécanismes d'action des antibiotiques incluent :
- Le blocage de la synthèse de la paroi cellulaire
- La destruction des membranes cellulaires
- L'interférence avec divers aspects de la synthèse des protéines et des acides nucléiques(Perry, 2004).

#### **I.1.4. Classification des antibiotiques**

Actuellement, il existe un nombre très important d'antibiotiques. Il est plus facile pour le praticien, en vue d'une prescription, d'avoir un classement rigoureux des molécules existantes. Une famille d'antibiotiques regroupe des composés dont les structures chimiques sont proches. Les modes d'action, ainsi que les spectres d'action, sont aussi semblables. Cette famille pourra ensuite être subdivisée en groupes et en sous-groupes. Cependant, il faut noter qu'il existe des antibiotiques « orphelins », n'appartenant à aucune famille tels que l'acide fusidique, la fosfomycine (Agregé et al., 2015).

#### **I.1.5. Les critères de classification**

##### **Selon l'origine**

\*Naturelle

\*Semi-synthétique

\*Artificiel

#### **I.1.6. Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'activité**

Le spectre d'activité d'un anti-infectieux correspond à l'ensemble des espèces bactériennes qui lui sont sensibles. Lorsque le spectre d'activité est limité à un certain nombre d'espèces bactériennes, il est dit « étroit », tandis qu'un antibiotique actif sur de nombreuses bactéries est dit à spectre « large ». (Bastide et al., 1986).

Enfin, une bactérie insensible à un antibiotique est définie comme étant résistante. Un antibiotique à spectre large agit sur un grand nombre de bactéries (sur les bacilles et coques Gram + et Gram -. Un antibiotique à spectre étroit agit seulement sur les bacilles et coques Gram + ou Gram - (Agregé et al., 2015).

#### **I.1.7. La classification en fonction du mode d'action**

Les antibiotiques agissent sur la membrane, paroi, génomes. ( par exemple : Les sulfamides agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des

bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique (Agregé et al., 2015).

### I.1.8. Classification en familles d'antibiotiques

Cette classification est la plus utilisée car, fondée sur la structure chimique de base d'un chef de file, premier d'une série, elle regroupe « en familles » ou « classes » des produits ayant des caractéristiques communes: de structure, de spectre d'activité, de cible moléculaire bactérienne, de sensibilité à des mécanismes de résistance (résistances croisées) et d'indications cliniques (Agregé et al., 2015).

**Tableau n°06 :** Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique. (Berdy et al., 1987)

Famille	Principale sous famille	Exemples d'antibiotiques
Antibiotique contenant des glucides.	Glucides purs- Aminoglycosides Glycopeptides.	Nojiromicines- Streptomycine- Gentamycines- kanamycine- Vancomycine— Risotocétines.
Lactones macrocyclique	Macrolides-Polyénes- Macrolactames.	Erythromycine-Spiromycine- Nistatine, amphotéricine- Mayatansine.
Quinones et antibiotiques apparentés	Composés polycycliques linéairement accolés- Anthraquinones- Naphtoquinones- Benzoquinones	Tétracyclines-anthracyclines- Rubomycine-Mitomycine, Saframycine.
Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés- Homopeptides-Peptides- Lipopeptides.	Pénicilline, cyclorine- Bactiracine-valinomycine- Polymyxines.
Antibiotiques hétérocycliques contenant de	Hétérocycliques non accolés- Hétérocycliques accolés	Mildiomycine-Phénazines- Monensine.

l'azote. Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène.	Dérivées du furanes- Polyéthers.	Monensine.
Antibiotiques aromatiques	Composés benzéniques- Composés Aromatiques accolés-autre dérivés	Chloramphénicol- Griséofulvine-Novobiocine.
Antibiotiques alicyclines	Dérivés du cyclo-alcane- Terpènes-Oligoterpènes	Cycloheximide-Acide Marasmique- Acides fusidiques.
Antibiotiques aliphatiques	Dérivés alcanes-Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques – composés contenant du phosphores.	Elaiomycine-cérulénine- fosfomycines

### I.1.9. Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques ont été efficaces pour le traitement de nombreuses maladies qui étaient un fléau pour le genre humain.

La résistance microbienne à un antibiotiques, à un agent chimio thérapeutique ou d'autre produits chimio thérapeutique ou à un produits chimique comme les métaux lourds peut survenir pour plusieurs :

#### ✓ Résistance naturelles

L'organisme peut perdre la structure que l'antibiotique inhibe, comme le cas par les mycoplasmes qui perdent les parois cellulaires et ne sont donc pas affectés par la pénicilline. La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné. Habituellement, le support de cette résistance est chromosomique (Peyrou, 2001).

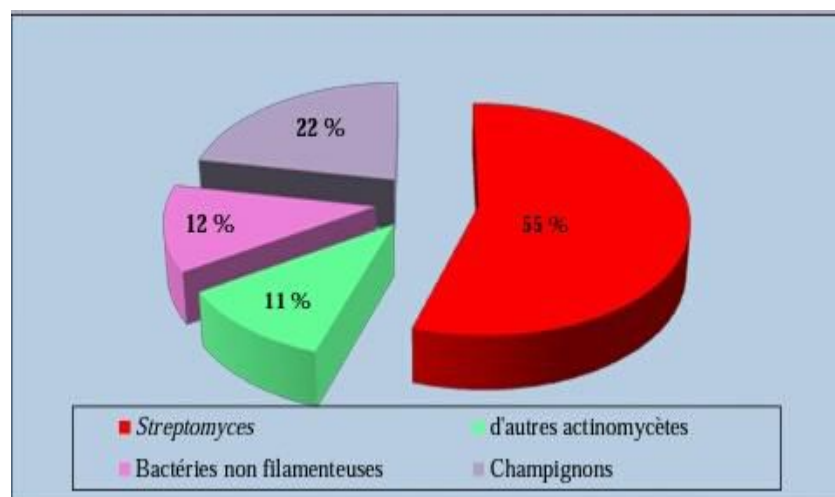


### ✓ Résistance acquise

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène (Peyrou, 2001).

#### I.1.10. Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Ces molécules peuvent être synthétisées par plusieurs microorganismes tels que les bactéries non mycéliennes qui couvrent près de 12 % puis les champignons avec un pourcentage de 22% et la grande proportion est prise par les actinomycètes avec un pourcentage de 66% (chez lesquelles le genre *Streptomyces* domine avec 55% (Berdey *et al.*, 2005).



**Figure05:** Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes (Berdy, 2005).

**Tableau n°07 :** Quelques Antibiotiques produites par les actinomycètes(Loucif, 2011).

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques
<i>Micromonosporasp.</i>	<i>Clostrymicine</i>
<i>Streptomycesgriseus</i>	<i>Candicine</i>
<i>Streptomyceslydicus</i>	<i>Streptolydigne</i>
<i>Streptomycelindensis</i>	<i>Rétamycine</i>
<i>Marinisporasp</i>	<i>Marinomycine</i>
<i>Verrucosisporasp.</i>	<i>Abyssomycine</i>

De plus, *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale : antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), anti tumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) En particulier, ce genre est remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (Watve et al., 2001).

**Tableau n°08 :** les antibiotiques produits par le genre *Streptomyces*.

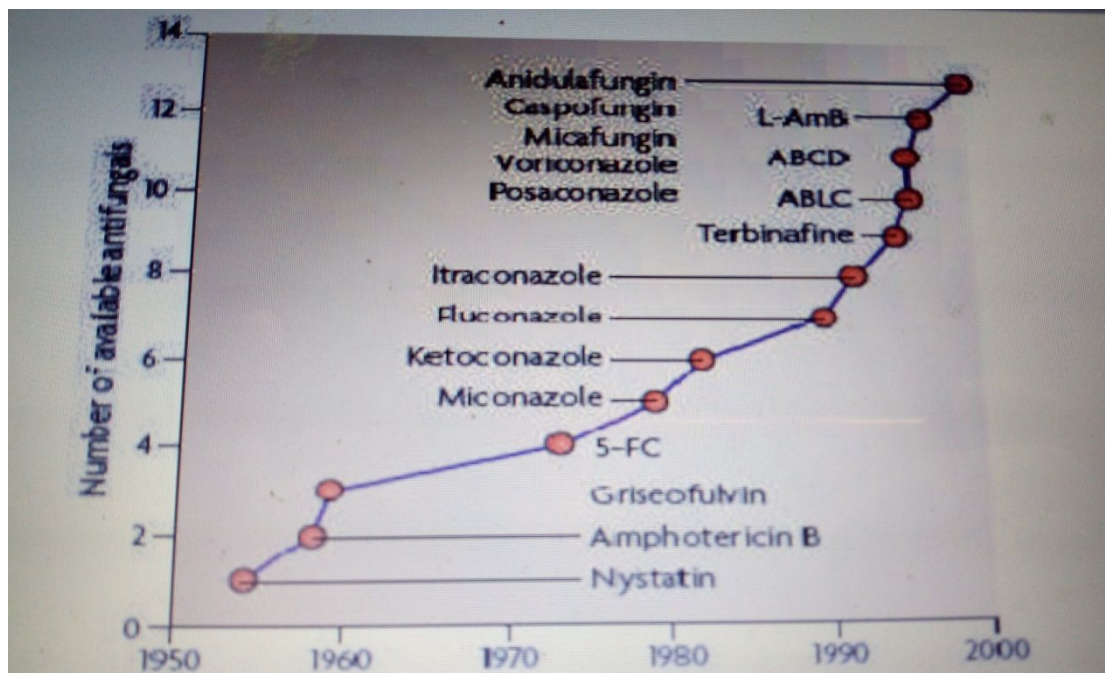
Nom	Bactéries productrices	Références
Streptomycines	<i>Streptomycesgriseus</i>	<b>Jana et Deb (2006).</b>
Néomycine	<i>Streptomycesfradiae</i>	<b>Jana et Deb (2006).</b>
Acide clavulanique	<i>Streptomycesclavuligerus</i>	<b>Reading et Cole (1977).</b>
Tétracycline	<i>Streptomycesaureofaciens</i>	<b>Tanaka et al. (1972).</b>

## I.2. Les Antifongiques

### I.2.1. Historique

La découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, qui est un polymère à activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique. Depuis, plus de 200 molécules antibiotiques polyénique furent découvertes. Mais des problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité n'ont permis l'utilisation que d'un nombre restreint de ces composés en thérapeutique (Tighidet, 2011). Le développement de molécules antifongiques pour la médecine humaine n'a réellement débuté que vers 1980 (Boubetra-Biskri, 2013).

La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la Figure ci-après.



**Figure 06:** Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques. (Tighidet, 2011).

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux : en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongique systémique ou topique), dans l'industrie alimentaire (conservateur) et alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou autre matériaux (Tighidet, 2011).

### I.2.2.L'origine des substances antifongique

Ces substances antifongiques ont deux origines : ce sont soit produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse (Tighidet, 2011). Selon la nature des molécules antifongiques, nous distinguons deux groupes :

Les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques des structures non polyéniques pouvant être antifongiques uniquement ou plus souvent antifongiques antibactériens à la fois. (Boubetra-Biskri, 2011).

### I.2.3. Classification des antifongiques

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les Polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008).

Tableau n°09 : classification des antifongiques.

Antifongique de synthèses chimique	Antifongiques naturels
<p><b>Les azolés :</b> Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Vandeputte, 2008).</p> <p><b>Les fluoropyrimidines :</b> Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (Vandeputte, 2008).</p>	<p><b>Les antifongiques polyéniques :</b></p> <p><b>a- Les Polyènes :</b></p> <p>Les antifongiques polyéniques sont des lactones macrocycliques. (Boubetra – Biskri, 2011).</p> <p>Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre <i>Streptomyces</i>, ont une activité antifongique. (Vandeputte, 2008).</p>

	<p><b>b- Les échinocandines :</b></p> <p>Parmi les échinocandines, on peut citer la caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de <i>Glarealozoyensis</i>. Cette molécule est le premier d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs de la synthèse du <math>\beta</math>_(1,3) D-glucan,composant, essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes.(Tighidet, 2011).</p> <p><b>Les antifongiques non polyénique :</b></p> <p>Ces molécules possèdentdes structures chimiques très variée.</p> <p>Ils sont moins importants en thérapie que les Polyènes sauf pour quelques-uns comme Aminoglycosides (kasugamycine), les quinones (anthracyclines), les hétérocycles azolés (blastacidine), aromatiques (griséofulvine), les composés alicycliques (Cycloheximide). Leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans l'agriculture est parfois courante (Zitouni, 1995).</p>
--	--

### I.2.4. Mode d'action des antifongiques

Les différents modes d'action résumés dans le tableau suivants :

**Tableau n°10** : Classification des antifongiques selon la cible (Geursen et al., 2008).

Structure	Mode d'action	Exemple
<b>Azoles</b>	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Imidazoles, kétonazole, Triazoles, fluconazoles, Itraconazole
<b>Allylamines</b>	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Terbinafine, butenafine
<b>Pyradone</b>	Rupture de la membrane et de la paroi	Ciclipiroxolamine
<b>Morpholine</b>	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Amorolfine
<b>Pyrimidine fluorée</b>	Inhibition de la synthèse de Thymidylate.	Flucytosine
<b>Echinocandine</b>	Inhibition de la synthèse du glucane.	Caspofungine, Anidulafungine
<b>autres</b>	Anti-mitotique, rupture du fuseau cellulaire.	Griséofulvine

### I.2.5. Mécanisme de résistance des substances antifongiques

#### ✓ Les polyènes

Les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe. Ils

échappent ainsi à une éventuelle métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux, dont l'hyperactivité est à l'origine de la majorité des résistances aux antifongiques azolés. Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible, l'ergostérol. Ce dernier étant nécessaire à l'intégrité de la membrane et donc à la survie cellulaire, les alternatives permettant de le substituer sont en nombre limité (Vandeputte, 2008).

#### ✓ La résistance aux échinocandines

Est un événement relativement rare ; On estime à plus de 99% le taux d'isolats sensibles à ces antifongiques chez les espèces du genre *Candida*. Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une résistance aux échinocandines et déterminé le mécanisme moléculaire à l'origine de cette résistance, en particulier chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Dans tous les cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS. L'analyse de l'ensemble des mutations ponctuelles détectées a permis de définir deux régions dont l'intégrité est indispensable à l'activité de l'enzyme, appelées "hot spots". Chez les autres espèces, des mutations dans les "hotspots" ont également été mises en évidence, c'est notamment le cas chez *C. glabrata*. La résistance innée aux échinocandines chez *C. neoformans* n'est pas liée à une mutation des gènes FKS1 et FKS2. En effet, la  $\beta(1-3)$ -glucane synthétase de *C. neoformans* est inhibée par les échinocandines, bien que cet organisme soit capable de croître en présence de fortes concentrations de l'antifongique (Vandeputte, 2008).

#### ✓ Les Azolés

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés ont été largement étudiés, principalement chez les levures du genre *Candida* et *S. cerevisiae*, être répartis en quatre catégories :

Une diminution de l'affinité des azolés pour leur cible peut être à l'origine de la résistance. Ainsi, une mutation ponctuelle du gène ERG11, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 $\alpha$ -méthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme. De nombreuses mutations, dont le rôle dans la résistance a été démontré expérimentalement, ont été identifiées, notamment chez *Cryptococcus neoformans*.

La résistance aux antifongiques azolés peut également résulter d'une multiplication du nombre de copies de la 14a déméthylase. Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14a déméthylé. Ainsi, la surexpression du gène ERG11, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance.

Un mécanisme moins fréquemment observé chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés est le blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de l'enzyme codée par ERG11.

Enfin, la résistance peut être la conséquence d'une diminution de la concentration intracellulaire en antifongique, par surexpression des protéines d'efflux. Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires très ubiquitaires qui ont pour rôle de rejeter en dehors des cellules une grande variété de substances (Vandeputte, 2008).

### I.2.6. Les antifongiques produits par les actinomycètes

Quelques agents des antifongiques produits par les actinomycètes présentent dans le tableau suivant :

**Tableau n°11** : Quelques agents antifongiques produits par les actinomycètes.

<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacétate
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B



**partie expérimentale**

# Materiels et Méthodes

### I. Objectif

De nombreux antibiotiques ont été isolés dans une variété de microorganismes et ont été employés dans beaucoup de domaines : l'industrie, l'agriculture, science vétérinaire et pharmaceutique (Oskay et *al.*, 2004). Les actinomycètes représentent les principales sources de métabolites secondaires à activité anti cellulaire. Ce groupe produit plus de 3.000 antibiotiques à activité antibactérienne ou antifongique (Belyagoubi, 2014).

Cette étude « la recherche de l'activité antimicrobienne d'actinomycètes » mène à un objectif principal :

- Dans premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactériennes et l'activité antifongique.
- Dans deuxième étape, nous nous sommes concentrés sur l'extraction des molécules des souches actives

### II. Cadre de l'étude

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de microbiologie de faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie de l'université de Larbi Tébessi –Tébessa, sous la direction de Mme Benhadj M. pendant la période allant du 22 Janvier 2019 au 23 Mai 2019.

### III. Matériels utilisés

#### III.1. Matériels non-biologique

##### III.1.1. Grands matériels

- Agitateur
- Autoclave
- Bain marie
- Balance
- Etuve
- Hotte bactériologique
- Hotte biochimique
- Loupe binoculaire
- Microscope optique
- Plaque chauffante
- Réfrigérateur
- Rhotavape
- Table à niveau
- Vortex

##### III.1.2. Petits matériels

- Anse de platine
- Barreaux magnétique
- Bec bunsen
- Boites de Pétri
- Portoirs
- Entonnoir
- Film photographique
- Lames
- Micropipette
- Papier watman
- Picette
- Pipettes Pasteur
- Spatule
- Verreries: béchers gradués, éprouvettes graduées, tubes à essai stériles, les flacons, et les earlens

### **III.2. Matériels biologiques**

#### **III.2.1/ Les actinomycètes**

Les 08 isolats d'actinomycètes étudiés ont été fournis par notre encadreur Mme Benhadj M. chacune avait un code selon le tableau suivant :

**Tableau n°12** : le code des souches d'actinomycètes.

<b>N° de la souche</b>	<b>Code</b>
<b>S1</b>	<b>S231</b>
<b>S2</b>	<b>S235</b>
<b>S3</b>	<b>S287</b>
<b>S4</b>	<b>S299</b>
<b>S5</b>	<b>S311</b>
<b>S6</b>	<b>S312</b>
<b>S7</b>	<b>S406</b>
<b>S8</b>	<b>S450</b>

#### **III.1.2/ Les germes cibles**

Dans cette étude 10 bactéries sont testées pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes ,8 souches des levures et 7des champignons pour les activités antifongiques.

### III.1.2.1/ Les bactéries test

L'activité antibactérienne a été testée contre les bactéries rapportées dans le tableau suivant :

**Tableau n°13** : Caractéristiques des souches bactériennes tests.

Souches bactériennes	Gram des souches	code
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	Positive	ATCC 43300
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	Positive	ATCC 25293
<i>Micrococcus luteus</i>	Positive	DSM1790
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	Isolat clinique
<i>Pseudomonas sp</i>	Négative	Isolat clinique
<i>Klebseillapneumonea</i>	Négative	Isolat clinique
<i>Bacillus subtilis</i>	Positive	ATCC6633
<i>Salmonella</i>	Négative	ATCC42238
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC8799

### III.2.1.2/Souches fongiques tests

#### \*les levures

- Candida sp.* ICF18
- *Candida sp*ICF19
- *Candida sp*ICF43
- *Candida sp*ICF44
- *Candida sp*ICF65
- Candida Para psilosis*
- Candida Krusei*

#### -*Rhodotorulla sp*

#### \*les champignons

- Paecilomyceslilacinu (Pa.li)*
- Aspergilluscalidosus (As.cal)*
- Aspergillus flavus (As.flu)*
- Scedosporum sp (Sced.api)*

-*Fusariumsolani*(*F.sol*)

-*Lichterniasp*(*Lich.cor*)

-*Fusariumoxysporum*(*F.ox*)

### III.3.Milieux de cultures

- ✓ Bennet
- ✓ Chapman
- ✓ GYEA
- ✓ LB liquide
- ✓ LB molle
- ✓ LB solide
- ✓ Mac conkey
- ✓ ISP2
- ✓ ISP2 molle
- ✓ Sabouraud

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

### III.4.Les solutions et colorants utilisés

- ✓ L'eau distillée stérile
- ✓ L'eau physiologique stérile
- ✓ Violet de Gentiane
- ✓ Lugol
- ✓ Alcool
- ✓ Fuchsine
- ✓ Huile à immersion
- ✓ Méthanol

## IV. Méthode de travail

### IV.1. Origines des souches

Les 8 souches d'actinomycètes étudiées dans ce travail proviennent d'une collection de souches d'Actinomycètes isolée d'un système lacustre (lac Fed Zara) Annaba (**benhadj et al,2018**)

### IV.2.Repiquage et purification des isolats d'actinomycètes

La première étape dans notre travail est la purification des souches d'actinomycète étudiées. Cette étape est très essentiel, elle permet de donner des colonies isolés et pure. Le repiquage des souches se fait par la méthode d'ensemencement par stries d'épuisement dans des boites pétri contenant le milieu ISP2, ces boites sont incubées à

une température 30°C pendant 7 jours, car les actinomycètes ont une croissance lente (Eriskon, 1949).

### IV.3. Etude des caractéristiques morphologiques des actinomycètes

#### IV.3.1 Etudes macromorphologique

L'étude des caractères macromorphologiques des actinomycètes permet de déterminer la présence ou l'absence de mycélium aérien et sa couleur, aussi la couleur de mycélium du substrat, ces caractéristiques ont été notées sur le milieu ISP2 par la méthode d'ensemencement par strie d'épuisement, et sur les milieux (ISP2, GYEA, Bennet) par la méthode d'ensemencement de strie serrées après 7 jours d'incubation. il est important de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (Shirling et Gottlieb, 1966).

#### IV.3.2. Etude microscopique

##### IV.3.2.1. Technique à l'état frais

La morphologie des souches a été observée par une technique de culture sur boîte Pétri. À partir d'un milieu solide d'identification, une préparation microscopique d'une culture jeune par la méthode de strie croisée a été réalisée et observée directement par microscope à grossissement (x100), cette technique permet d'observer les chaînes des spores et l'aspect des filaments.

##### IV.3.2.2. Technique de 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. Elle est observée sur milieu ISP2, à l'aide d'un microscope optique. Cette technique elle consiste à voir :

- ✚ les Actinomycètes sont des bactéries Gram +.
- ✚ La morphologie du spore.
- ✚ Aspect des filaments (Cross, 1989; Wink, 2001).

Elle se fait par les étapes suivantes :

- préparer le frottis.
- fixer le frottis à la chaleur.
- Recouvrir la lame de violet de Gentiane pendant 1 minute, laver à l'eau
- distillée.



- Recouvrir du lugol pendant 1 minute.
- Décolorer à l'alcool puis laver à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée pendant 30 secondes puis laver à l'eau.
- sécher par papier buvard.
- Observer au grossissement (X100) d'un microscope optique (**Funke, 2003**).

### IV.4. Mise en évidence de l'activité microbienne des souches d'actinomycète

#### IV.4.1. Etude de l'activité antibactérienne

- Préparation de culture des bactéries test dans les milieux solides  
Pour le test d'activité antibactérienne des actinomycètes contre les bactéries suivantes : «*Staphylococcus aureus* ATCC 43400, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Micrococcus luteus* DSM1790, *Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* ATCC8799, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella* ATCC42238, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC ». A l'aide d'une anse de platine ces bactéries sont ensemencées par la méthode de strie d'épuisement sur les milieux Chapman, LB solide, et MacConkey, puis incubé à 30°C et 37°C selon la bactérie pendant 24h pour vérifier leur pureté.
- Préparation de l'inoculum  
Après l'incubation de 24h sur les milieux cités précédemment, un inoculum est préparé pour chaque bactérie test en milieu Luria-Bertani (LB) liquide puis les incubent pendant 24h.
- Technique des disques d'agar (**Tortorant et al., 1979**)  
Cette méthode consiste à ensemencer les 8 souches d'actinomycète à tester sur les milieux (ISP2, GYEA, Bennet) en stries serrées. Dans le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, à l'aide des cônes bleus stériles, les cylindres d'agar portant des colonies d'actinomycètes, de 07 mm de diamètre sont découpés à partir de ces milieux, et déposés à la surface du milieu LB molle préalablement ensemencées avec les différentes bactéries « 200µl de l'inoculum prélevé à l'aide de micro pipette est ajouté au 10ml de milieu LB molle ». Les boîtes ensemencées sont maintenues au réfrigérateur pendant 30min avant d'être incubé, pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant la croissance des bactéries, puis incubée à 30°C et 37°C (selon la bactérie) pendant 24h (**Kitouni, 2007**). Ce test a été répété pour des cultures des Actinomycètes de 7j et 10j d'incubation. Les diamètres des zones

d'inhibition apparues sont mesurés autour des cylindres d'agar (Shomura et al., 1979; Saadoun et Al moumani, 1997; Petrosyan et al., 2003; Boudjelal et al., 2011).

#### IV.4.2. Etude de l'activité antifongique

- ❖ Préparation de culture des levures et des champignons filamenteux test dans le milieu solide :

Pour le test d'activité antifongique des isolats d'actinomycètes vis-à-vis les levures « *ICF18, ICF19, ICF43, ICF44, ICF65, Candida Para psilosis, Candida Krusei, Rhodotorulla* » et les champignons filamenteux (*Pa.li, As.cal, As fla, Sced.api, F.sol, Lich.cor, F.oxy*). Ces germes cibles sont ensemencés par la méthode de strie d'épuisement sur le milieu sabouraud à l'aide d'anse de platine puis les incubent à 25°C pour les levures et 30°C pour les champignons filamenteux.

- ❖ Préparation de suspension des germes cibles

Après l'incubation des levures et les champignons filamenteux sur le milieu solide, pour chaque germe la suspension est préparée, à l'aide de pipette pasteur on prélève des colonies de levure et de champignons filamenteux, on les met dans 500µl de l'eau physiologie stérile.

- ❖ Application de test antifongique

Le test d'antagonisme vis-à-vis des germes cibles utilisés a permis de mettre en évidence l'activité de ces souches contre les levures et les champignons filamenteux par la méthode de double couche (Vidaver et al., 1972). Les isolats d'actinomycète à tester sont ensemencés au centre de la boîte petri préalablement coulé par le milieu ISP2 et GYEA puis incubent à 30°C pendant 7 jours. 200µl de la suspension des souches cibles est ensemencé en masse dans 10 ml de milieu ISP2 molle pour les levures et les champignons. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h pour les levures et à 37°C pendant 24h à 48h pour les champignons filamenteux (Bastide et al., 1986). Le résultat se traduit par la présence ou l'absence de croissance de la souche test autour de la colonie d'actinomycète.

#### IV.4.3. Extraction des molécules bioactives

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

Les souches d'actinomycètes déterminées sont ensemencées par stries serrées à l'aide des écouvillons sur milieu GYEA. Après l'incubation de 10 jours à 30°C, la gélose est fragmentée puis répartie dans des earlens contenant 80ml de méthanol. Après une agitation pendant 2 heures le liquide est filtré 2 fois puis évaporé par le rotavape.

### IV.4.3.1. Recherche de l'activité des extraits

Les extraits obtenus sont testés par la méthode des disques et des puits:

#### 1/ Méthode des disques

Les disques de papier Watman (6mm de diamètre) stériles sont déposés sur la gélose LB solide et MH préalablement ensemencés par les bactéries tests (*Staphylococcus aureus* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Bacillus subtilis* ATCC6633), et sur le milieu sabouraud préalablement ensemencés par les levures (*Candida sp*ICF43, *Candida Parapsilosis*, *Rhodotorula*) et les champignons filamenteux (*Sced. api*, *Lich. car*, *F. oxy*) les disques sont ensuite imbibés par 20µl des extraits et sont séchés sous la haute bactériologique.

Les boîtes ensemencées par les bactéries incubées à 37°C et les boîtes ensemencées par les levures et les champignons tests sont incubés à 30°C.

La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation.

#### 2/ Méthode des puits

A l'aide des cônes bleus stériles, les puits de 7mm de diamètre sont réalisés sur le LB solide, MH et sabouraud, un aliquote de 50µl de l'extrait est prélevé stérilement puis introduit dans ces puits, les boîtes ensemencées par les bactéries incubées à 37°C et les boîtes ensemencées par les extraits antifongiques incubés à 30°C.

# Résultats et Discussions

## V. Résultat et discussion

### V.1. Repiquage et purification des isolats d'actinomycètes

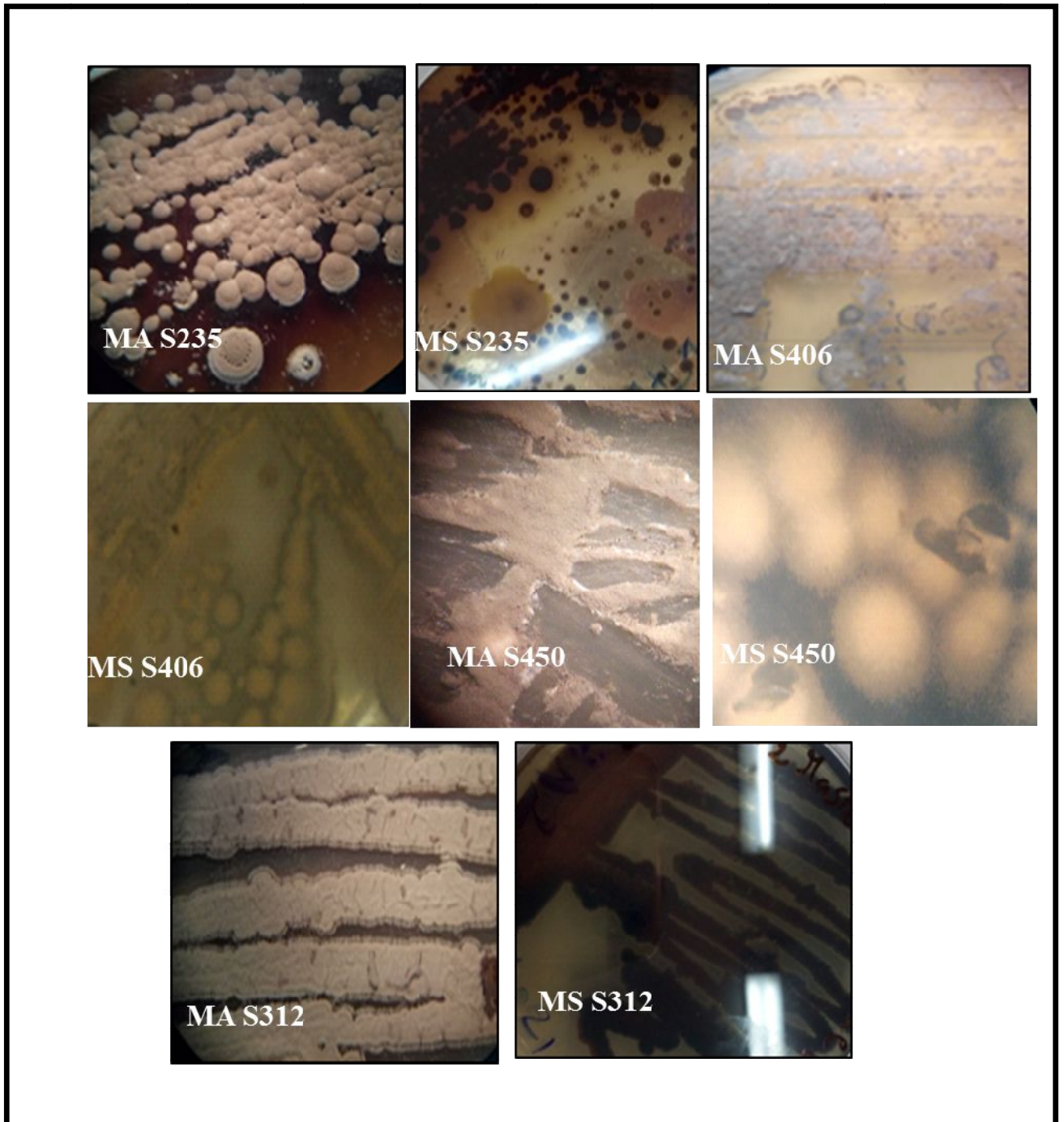
Après le repiquage des souches d'actinomycètes sur le milieu ISP2 par la méthode d'épuisement les résultats montrent que les isolats purs ont un mode de croissance différent, sauf les souches S287, S235 et S299 qui ont une croissance faible.

La croissance des souches est moyenne dans le 3<sup>ème</sup> jour, tandis que la croissance est importante du 7<sup>ème</sup> jour jusqu'à dix jours.

La croissance est différente d'une souche à une autre et la couleur de mycélium de substrat et le mycélium aérien varie également le tableau 14 illustre les résultats (**Planche 1**).

**Tableau n° 14:** Résultats de repiquage et vérification de la pureté de 8 isolats.

numéro de la souche d'actinomycètes	Mode de croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	pigmentation
S 231	Important	gris	Marron	Marron et orange
S 235	Important	gris	Vert devient noir	Vert foncé
S 287	faible	vert	beige	absence
S 299	faible	gris	beige	absence
S 311	Important	vert	blanc	absence
S 312	Important	violé	Vert et violé	Violé et gris
S 406	Important	beige	Gris et vert	Gris et vert
S 450	Important	blanc	gris	absence



**Planche n°1** : Photos représentant les caractères culturels de quelques isolats sur le milieu ISP2MA ; Mycélium aérien MS : Mycélium de substrat.

## **V.2. Etude des caractéristiques morphologiques des actinomycètes**

### **V.2.1. Etudes macromorphologique**

Les actinomycètes comme tous les autres microorganismes ont des caractéristiques morphologiques (aspect des colonies, couleur de mycélium aérien et du substrat, mode de croissance...) différentes d'une souche à une autre. Ces caractéristiques l'une des critères de classification des actinomycètes et utiliser dans la taxonomie microbienne.

La base de l'étude macroscopique c'est l'observation des caractères culturels des isolats des actinomycètes après leur ensemencement sur les milieux gélosés Bennett, ISP2 et GYEA. Les caractéristiques morphologiques sont : l'aspect des colonies, couleur de mycélium aérien et du substrat, mode de croissance, la présence ou l'absence de pigmentation.

Après l'ensemencement des isolats des actinomycètes sur les trois milieux gélosés (GYEA, Bennett, ISP2) les colonies apparaissent au bout de la 3<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30°C. Les premiers signes de croissance consistent en l'apparition des colonies pâteuses.

On observe que les colonies de certains isolats des actinomycètes forment des hyphes entre la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> jours. Par contre certains souches 287, 235, 299 présentent une mode de croissance faible ou nulle dans cette période.

**Le tableau n°15** et la **planche n° 2** illustre les différents aspects morphologique pour les isolats d'Actinomycètes sur les milieux Bennett, GYEA et ISP2. Dans la planche n°2 les deux souches S311 et S312 présentent des pigmentations différentes dans chaque milieu ce qui explique que le changement de milieu de cultures n'ont pas un impact sur l'aspect morphologique mais sur les caractères physiologiques par exemple la couleur de mycélium aérien de la souche 406 est invariable dans les trois milieux tandis que la pigmentation des souches S311 et S312 est différente d'une souche à une autre et d'un milieu à un autre pour la même souche.

**Tableau n°15** : Les caractères morphologiques des 08 isolats sur les trois milieux ISP2, GYEA et Bennet après 7 jours d'incubation.

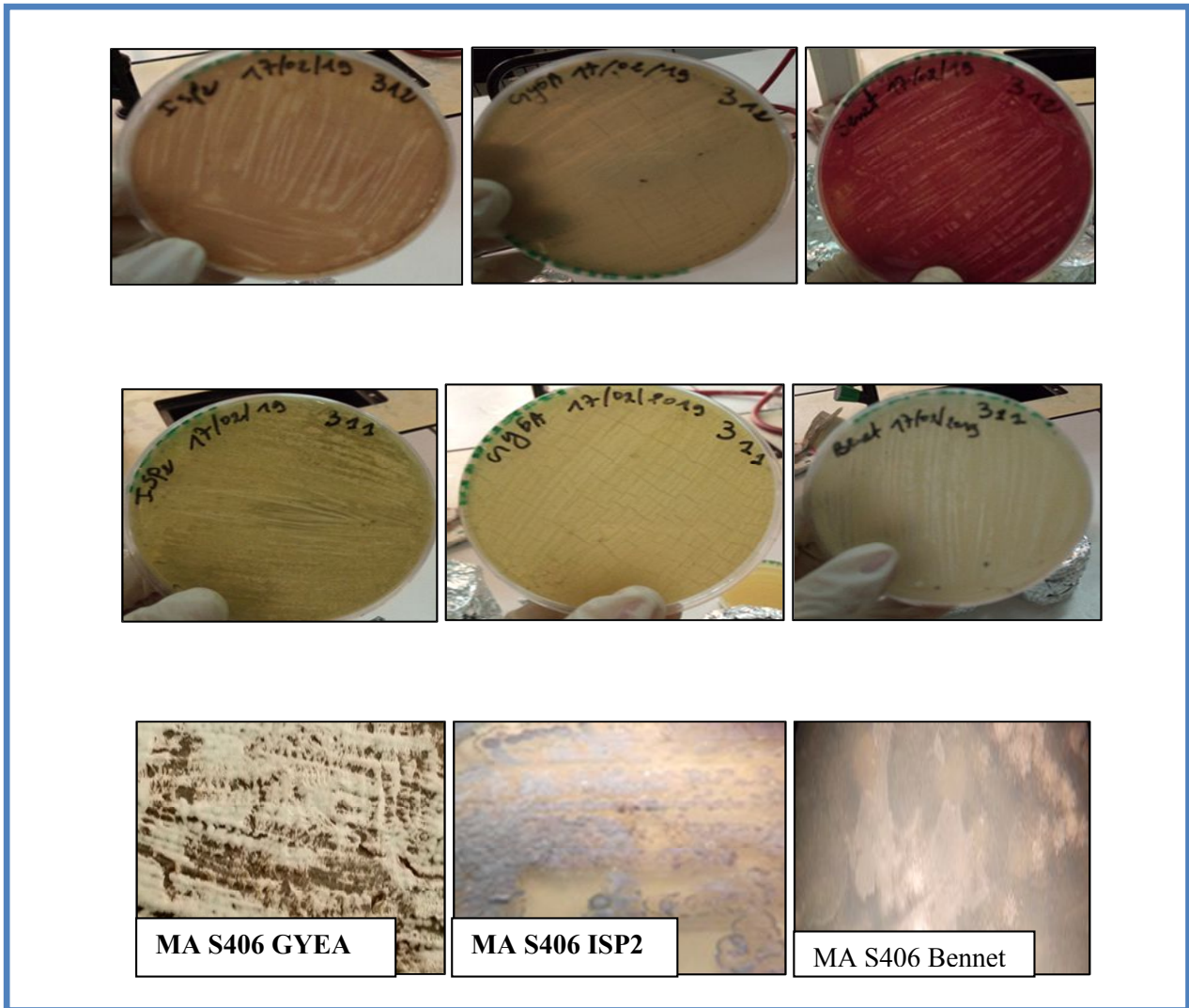
N° Souche	Milieu de culture											
	ISP2				GYEA				Bennet			
	Cr	MA	MS	P	Cr	MA	MS	P	Cr	MA	MS	P
S231	+++	gris	Marron	+	+++	Gris	Marron	+	++	Gris	Marron et rouge	+
S235	++	gris	Vert devient noir	+	+++	Gris	Vert devient noir	++	+	Gris	Vert	-
S287	+	vert	beige	-	++	Vert	Beige	-	+	Vert	Beige et blanc	-
S299	++	Gris	Beige	-	+++	Gris	Beige	+	++	Gris	Beige	+
S311	+++	Vert	Blanc	-	+++	Vert-blanc	Blanc	+	+	Vert-blanc	Blanc	+
S312	++	Violé	Vert et violé	+	+++	violé	Vert	+	++	Violé	Vert et violé	-
S406	++	Beige	Gris et vert	-	+++	beige	Gris et vert	-	++	Beige	Gris	-
S450	+++	Blanc	Gris et beige	-	+++	Blanc	Gris et beige	-	+++	Blanc	Gris et Blanc	-

+ : croissance faible    - : absence pigmentation

++: Croissance moyenne

+++ : Croissance importantes



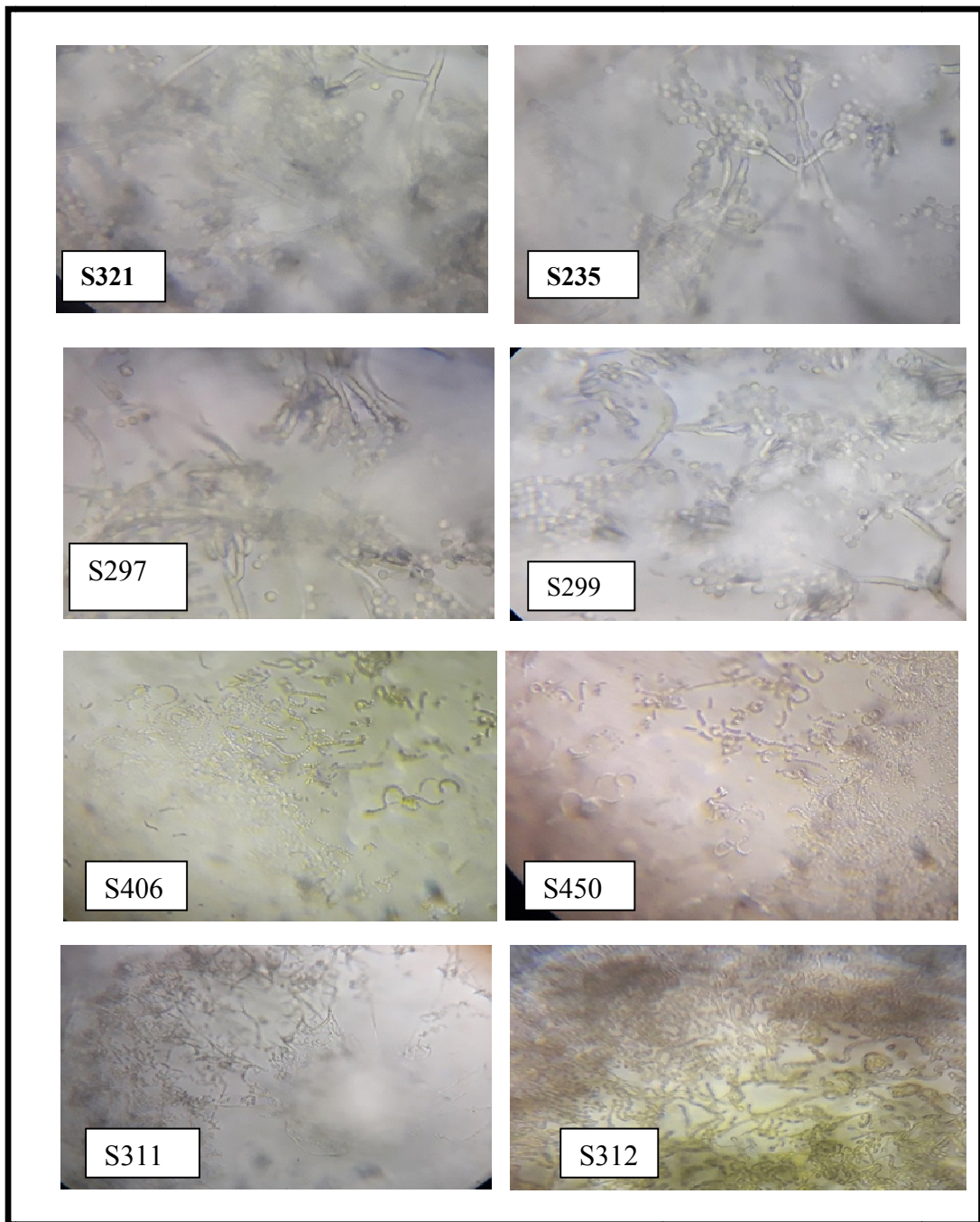


**Planche n°2** : photos représentent les couleurs de pigmentation et le mycélium aérien dans les trois milieux de cultures.

## V.2.2. Etude microscopique

### V.2.2.1. Technique à l'état frais

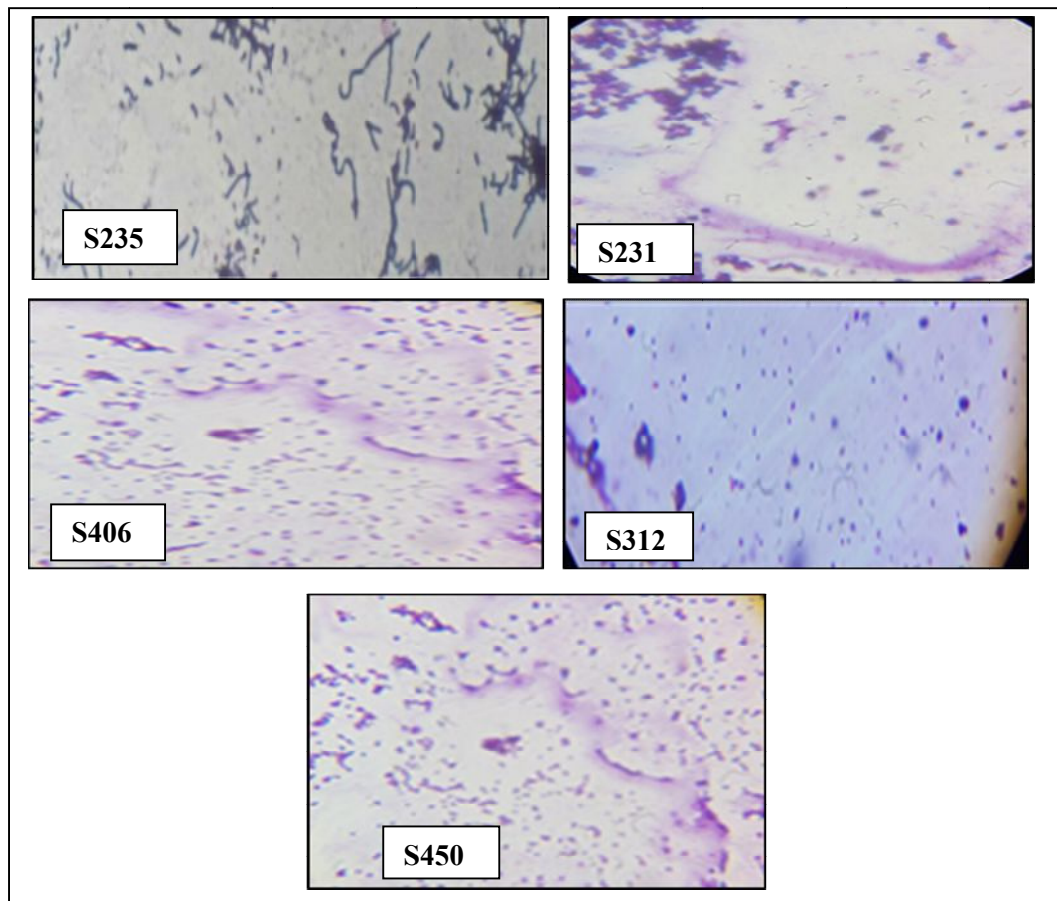
Cette étude est basée sur la méthode de l'observation directe des boîtes sous microscope après l'ensemencement des souches par la méthode de stries croisées formant des carrés permettant de déterminer les chaînes filamenteuses et des spores à l'aide d'un examen direct au grossissement X100. Les résultats illustrés dans **la planche n°3**.



**Planche n°03** : photos représentes l'état frais des souches d'Actinomycètes.

### V.2.2.2. Technique de coloration de Gram

Après la coloration du Gram les observations microscopiques donnent des résultats lie à la morphologie des filaments et des spores, sachant que toutes les souches ont un Gram positif. Les résultats illustrés dans la **planche n°4**.



**Planche n°04:** Photos des résultats de l'observations microscopiques après coloration de Gram.

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

#### V.3.1. Recherche de l'activité antibactérienne

Après l'encemencement des bactéries test sur des milieux gélosés différents(chapman,Mac konkeyet LB solide ) par la méthode des stries d'épuisements.

Les résultats sont obtenues dans le tableau suivant :

**Tableau n°16** :Les résultats de culture des bactéries – tests.

La bactérie	Le milieu de cultures	La température d'incubation	La résultats micro et macromorphologiques
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300.	Chapman	37°C	Coloniessont arrondies pigmentés le milieu devient de couleur jaunes. Des coques Gram positif.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293.			
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922.	Mac konkey		Des colonies rose bacille Gram négatif.
<i>Escherichia coli</i> ATCC8799.			
<i>Salmonella</i> ATCC42238.			
<i>Klebseilla pneumonea</i> isolats clinique.			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolat clinique.	LB solide	30°C	Des bacille Gram négatif de couleur vert.
<i>Pseudomonas sp</i> Isolat clinique.			
<i>Bacillus subtilis</i> 6663.			Des bacilles Gram positif. Des coccis Gram positif.
<i>Micrococcus luteus</i> Dsm 1790.			

### V.3.1.1. Test d'activités antibactériennes

Le spectre d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes retenue, a été recherché par la méthode de cylindres d'agar vis-à-vis de dix souches de bactéries Gram+ et Gram-.

Les résultats de cette étude montrent que l'activité est différente selon les bactéries Actinomycétales (résultat différent d'une souche à une autre) et la bactérie test a un

effet (les bactéries Gram positif ou négatif), aussi pour la même souche Actinomycétales le résultat est différent d'un jour à un autre (3<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> jour), et les milieux de cultures des souches d'actinomycètes influencent sur les résultats du test d'activité antibactérienne.

Dans le troisième jour (J3), 5 souches d'Actinomycètes c'est-à-dire 62,5% ont une activité antibactérienne contre au moins une bactérie-test dans deux milieux différents. Tandis que le test effectué dans le 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour le pourcentage des souches actives et l'activité antibactérienne est de 80 %. Le pourcentage des souches actives est élevé que le pourcentage des souches actives dans l'étude de **(Bleyagoubi, 2011)**, qui trouve 38 souches d'Actinomycètes isolées de différents sols, seulement 23 souches (60,5 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible, et le même pourcentage dans l'étude de **(Harir, 2018)**, qui trouve 4 souches actives de 6 souches.

Le pourcentage d'activité des souches d'actinomycètes est élevé lorsque les disques d'agar proviennent du milieu GYEA et Bennet par contre le pourcentage de l'activité diminue lorsque le milieu est ISP2. Ce résultat confirme que le meilleur milieu de culture des actinomycètes pour trouver un bon résultat est GYEA et Bennet, notre résultat est différent que le résultat trouvé par **(Boubetra-Biskeri, 2013)** le milieu ISP2 est le meilleur que le milieu Bennett pour la production des antibiotiques si on se réfère aux inhibitions maximales observées chez *Bacillus subtilis* (31mm sur ISP2 et 27mm sur Bennett). 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 est la production de pigmentation peut être expliquée par la production des molécules bioactives.

Les résultats du test d'activité antibactérienne expliquent la présence des molécules bioactives c'est-à-dire la présence des antibiotiques agissant par contre des bactéries à Gram positif et Gram négatif.

Les deux souches S235 et S 231 ont un spectre d'activité vis-à-vis de toutes les souches des bactéries soit testées (Gram positif ou négatif)

Les souches S299 et S311 ont un spectre d'activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

Les autres souches S287, S312, S406 et S450 ont des activités différentes sur les germes cibles soit à Gram positif ou négatif.



Les résultats confirment que les bactéries à Gram positif sensibles aux antibiotiques produites par les actinomycètes plus que les souches bactérienne Gram, résultats concordent avec de **(Boubetra-Biskri, 2013)** qui trouvent que l'activité des molécules produits par les souche *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les Gram positif ,et parfois contre les champignons et rarement contre les Gram négatif , ce résultat est expliquée par la composition chimique de la membrane des Gram positif par le peptidoglycane et l'absence de couche lipopolysaccharide (LPS) qui est présente chez les bactéries Gram négatif cette couche rend la membrane cellulaire imperméable aux substances lipophiles **(Kim et al.,1994)**, nos résultats sont similaires ceux trouvé par d'autres auteurs évoquant la sensibilité des bactéries à Gram positif aux sécrétions d'actinobactéries par rapport aux bactéries à Gram négatif (**Sabaou et al.,1998 ; Prescott et al., 2002**).

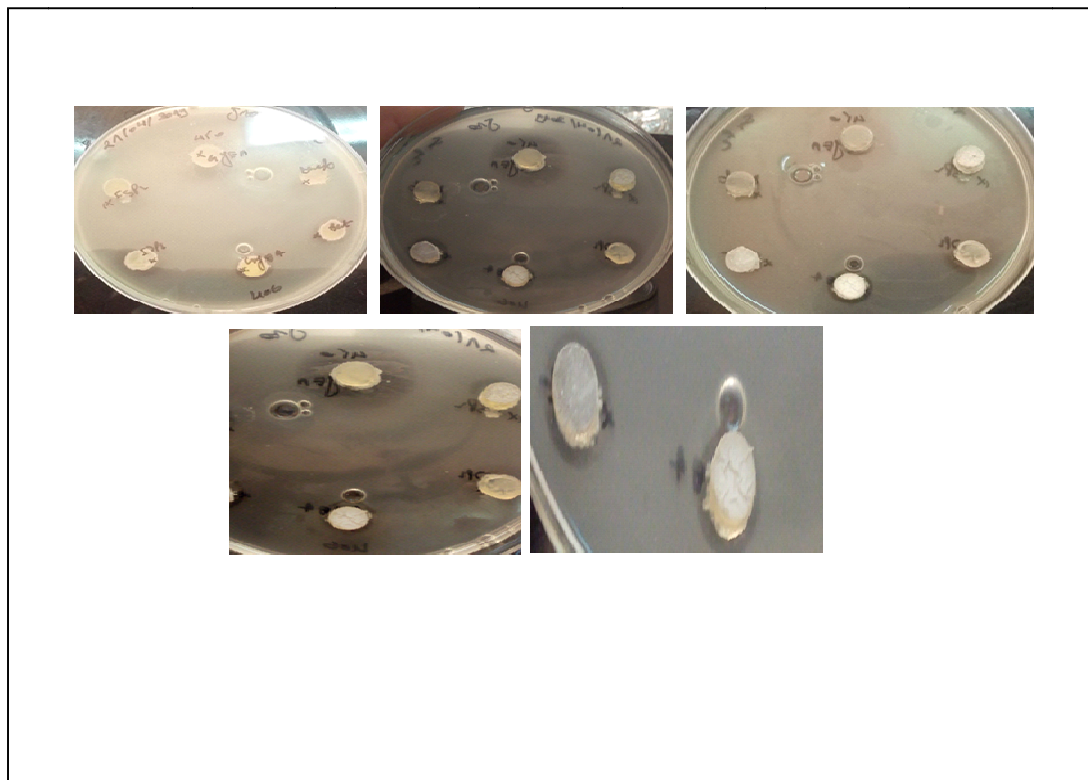
La souche 406 a une activité contre la bactérie *Bacillus subtilis ATCC6633* dans le 7ème jour et le diamètre est 11mm dans ISP2 et GYEA par contre dans le milieu Bennett aucune activité détecté. Le même résultat a été noté pour la bactérie la présence d'une activité dans le 7ème jour le diamètre de la zone d'inhibition est dans le milieu GYEA est 12mm et le Bennett 19mm. La différence est dans le milieu ISP2 qui ne présente aucun résultat, ce dernier peut expliquer notre changement du milieu de culture (GYEA, ISP2 et Bennett), par ce que chaque milieu a des différentes compositions peut influencer sur la production des antibiotique, nos résultats sont comparable à des résultats de l'étude de **(Boubetra-Biskri, 2013)** qui trouve que l'activité des trois souches des *Saccharothrix* s'avère plus intéressante sur le milieu ISP2, ceci n'empêche pas qu'elle varie d'un isolat à un autre suivant le milieu de culture, pour certaines ,c'est le milieu ISP2 contient l'extrait de malt, pour l'autre le milieu Bennett qui contient du peptone.

Dans le **Tableau n°17** le diamètre de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne de la souche 450 contre la bactérie test *Bacillus subtilis ATCC6663* est présent dans les trois milieux GYEA 11mm,ISP2 11mm et Bennet 12mm seulement dans le 7ème jour mais aucune activité détectée dans le 3ème jour et aussi dans le 10ème jour, par contre l'activité de la souche 450 contre *Staphylococcus aureus ATCC25293* est présente dans le 7ème jour par les diamètre suivant ISP2 11mm, Bennett 12 mm et dans le 10 ème jour par les diamètre GYEA 24 mm, Bennett 11mm. Ce résultat justifié l'utilisation de différent jour dans notre test d'activité antibactérienne, et la différence des diamètres d'un jour à un autre explique la présence d'un

meilleur jour de production des molécules bioactive par les actinomycètes. En générale, la production des métabolites secondaire par les microorganismes lieu durant les phases de

ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinomycètes cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et déclin (**Boubetra -Biskri,2013**).

Nos résultats illustrés dans **la planche n°05** qui présentent la meilleure zone inhibitrice dans notre étude de l'activité antibactérienne.



**Planche n°05** : photos représentent quelque zone inhibitrice due à l'activité antibactériennes de souche 406et450.

L'absence de l'activité antibactérienne peut être expliquée par le développement d'une résistance contre les molécules bioactives (substances antibactériennes), en effet la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques d'Actinobactéries peut être attribuée à l'inactivation enzymatique de antibiotiques ou à la perméabilité membranaire des bactéries (**Harir, 2018**).

**Tableau n°17** : résultat de test antibactérien

Les sources	Mili eu	J3									J7							J10										
		S2	S3	S4	S2	S3	S3	S3	S2	S3	S2	S3	S3	S3	S3	S2	S3	S2	S3	S2	S3	S2	S3	S2	S3	S2	S3	
SA.R1	GYEA	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ISP2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Benett	7	7	10	7	7	7	7	7	7	12																	
SA.R2	GYEA	7	7	7	7	7	7	7	7	15																		
	ISP2	7	7	7	7	7	7	7	7	7																		
	Benett	13	15	25	7	7	7	7	7	10																		
SAL.R3	GYEA	7	7	7	7	7	7	7	7	12																		
	ISP2	7	7	13	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Benett	7	7	7	7	7	7	7	7	11	17	7	17	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7



<b>E.coli R4</b>	GYEA	7	7	7	7	7	7	7	7	17	15	12	7	15	12	7	7	12	12	7	7	7	13	14	7
	ISP2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	15	7	7	7	7	7	10	10	7	7	7	7	7	7
	Benett	22	11	7	7	10	7	7	7	16	15	15	15	13	13	7	7	14	12	22	7	15	13	7	7
<b>E.coli.R5</b>	GYEA	20	7	7	11	12	7	7	7	22	15	7	18	20	7	7	7	20	25	7	7	7	15	7	7
	ISP2	7	12	7	7	7	7	7	7	10	7	7	7	7	7	7	7	7	12	7	7	7	7	7	7
	Benett	7	12	7	7	7	7	7	7	12	10	14	15	15	7	7	7	13	13	15	7	7	10	7	7
<b>Bacillus RO</b>	GYEA	17	7	7	7	12	7	7	7	15	17	10		12	14	11	11	14	14	17	18	14	14	7	7
	ISP2	7	7	7	7	14	15	7	7	7	7	7	7	7	13	11	15	13	12	7	7	7	7	7	7
	Benett	12	14	7	7	14	14	7	7	12	17	14	7	7	16	7	12	10	10	14	7	10	12	7	7
<b>KP</b>	GYE A	7	12	7	7	7	13	7	7	15	15	7	12	7	13	7	10	13	14	7	7	7	7	7	7

	ISP2	12	13	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	14	7	7	10	7	7	7
	Benett	12	18	7	7	14	19	7	7	11	15	13	15	15	7	11	10	13	13	7	7	7	7	7	7
<b>Icps</b>	GYE A	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ISP2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Benett	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<b>Micro R7</b>	GYE A	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ISP2	7	19	7	7	7	10	7	7	7	7	13	15	16	15	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Benett	15	17	7	7	7	12	7	7	13	17	12	15	14	10	7	7	7	7	15	7	7	13	7	7
<b>PS</b>	GYE A	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	ISP2	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Benett	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

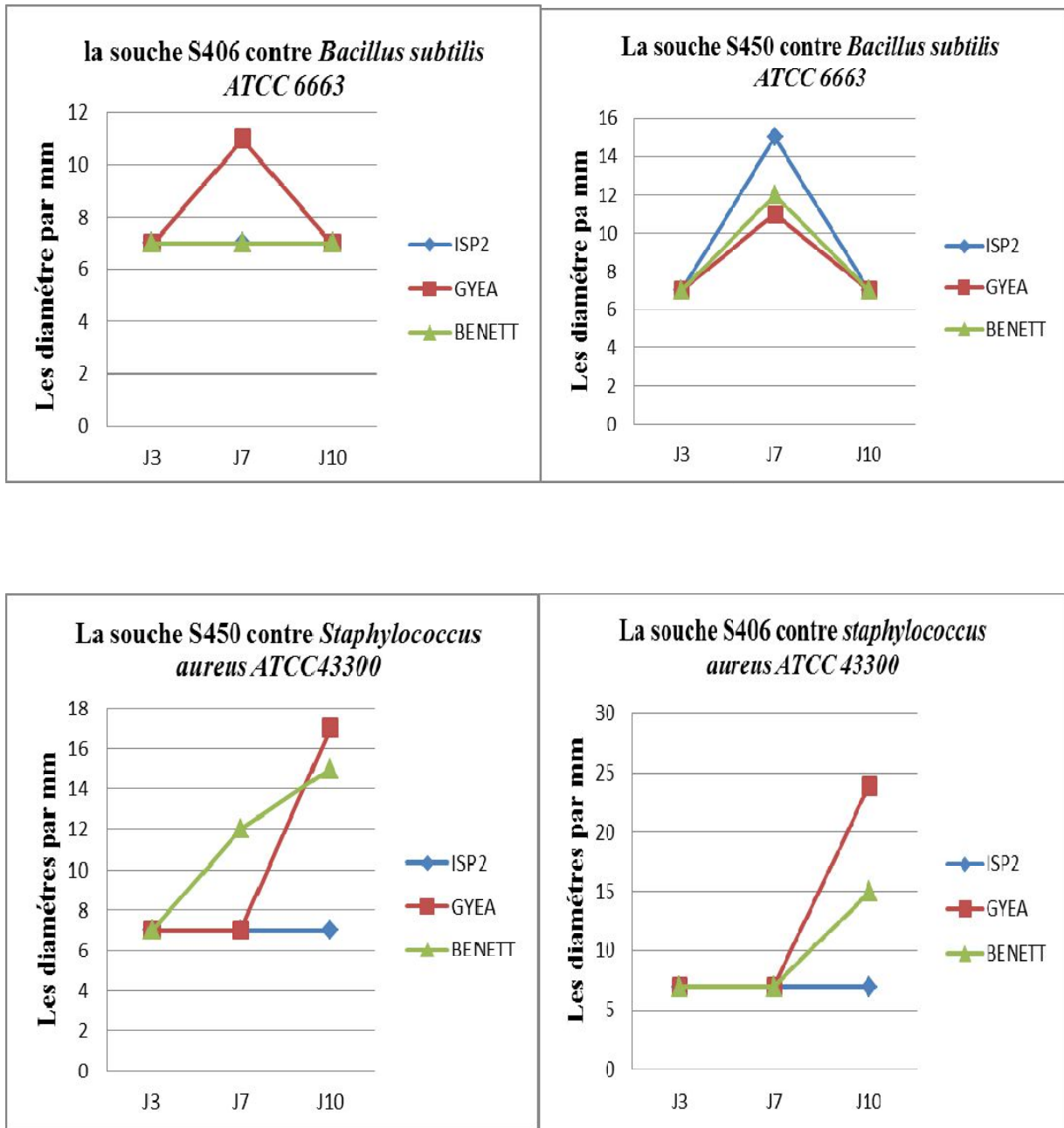


Planche n° 6: figure représentent les diamètres des zone inhibitrice dans jours différents.

### V.3.1.2. Recherche de l'activité antifongique

#### V.3.1.2.1. Recherche de l'activité anti *Candida*

L'étude du spectre d'activité antifongique des souches d'actinomycètes vis-à-vis de 8 souches de *candida* a été mise en évidence par la méthode de double couche par. Cette méthode est mieux adaptée pour les levures et moisissures elles permettent une meilleure diffusion du champignon (levure, filamenteux) ensemencer dans la masse de la gélose molle.

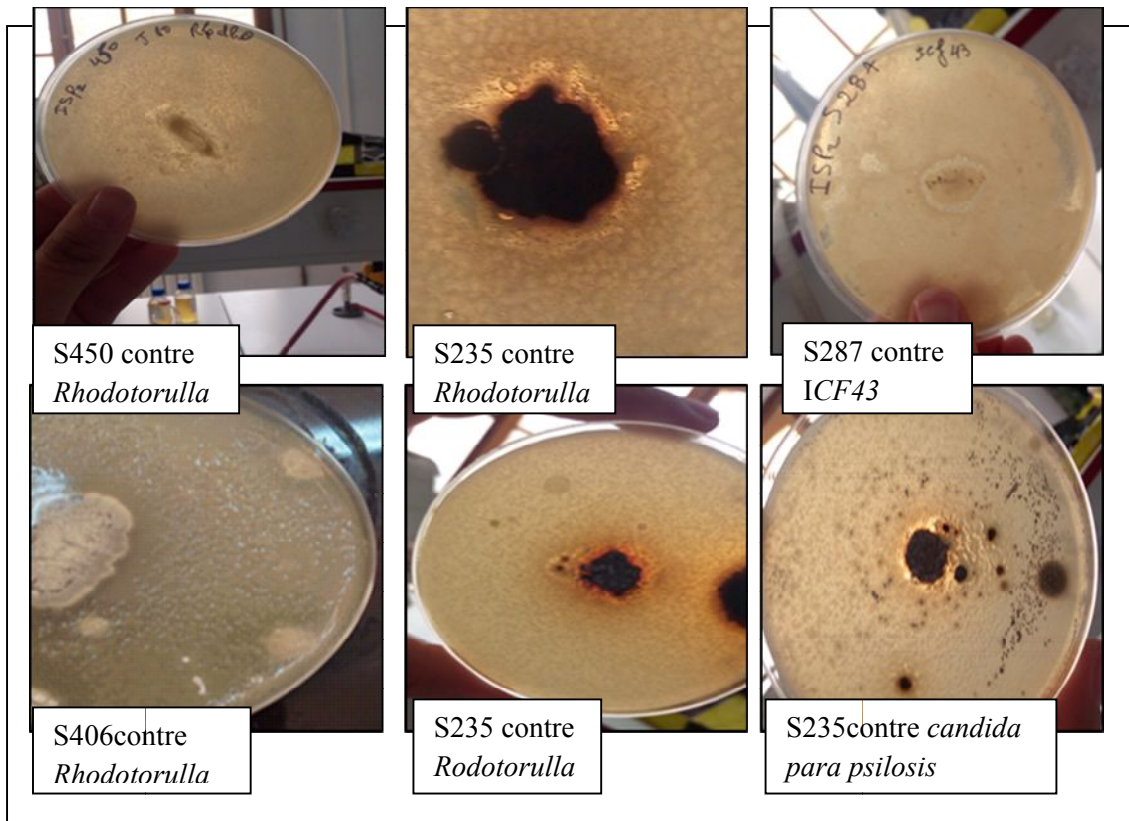
La croissance des levures-test ensemencé sur la gélose permet l'observation de la présence ou l'absence des zones d'inhibitions. Les résultats du test d'activité antifongiques du 10<sup>ème</sup> jour expliquent la présence ou l'absence des substances antifongiques spécifiquement anti *Candida*, **Laplanche n° 07** présente la zone d'inhibition la plus claire observé est due à l'activité de la souche 287 contre ICF43, la souche 235, 450 et 406 contre *Rhodotorulla*. Les diamètres des zones inhibitions varient entre 12 mm et 38 mm alors qu'aucune activité n'est détectée par les autres isolats. Ces résultats comparables avec celle obtenue par l'étude de (**Benouagueni, 2014**) qui ont trouvé que les souches des Actinomycètes sont faiblement actifs contre les *Candida* (levure)

Les résultats du test d'activité anti *Candida* sur le milieu ISP2 sont résumés dans le tableau n°18, les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés par mm.

**Tableau n°18** : Diamètre des zones d'inhibition du test d'activité antifongique contre les levures (mm).

	ICF18	ICF19	ICF43	ICF44	ICF65	Rhodo	Para	condida
<b>S231</b>	-	13	-	-	-	-	-	-
<b>S235</b>	-	35	-	-	20	17	12	-
<b>S287</b>	25	-	25	-	-	-	-	-
<b>S299</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>S311</b>	-	-	20	-	30	35	30	-
<b>S312</b>	20	-	-	15	-	12	-	-
<b>S406</b>	35	-	38	25	35	35	35	-
<b>S450</b>	-	-	-	-	-	25	20	-

- : indique l'absence de l'activité.



**Planche n°07:** photos représentent les résultats du test d'activité contre les levures.

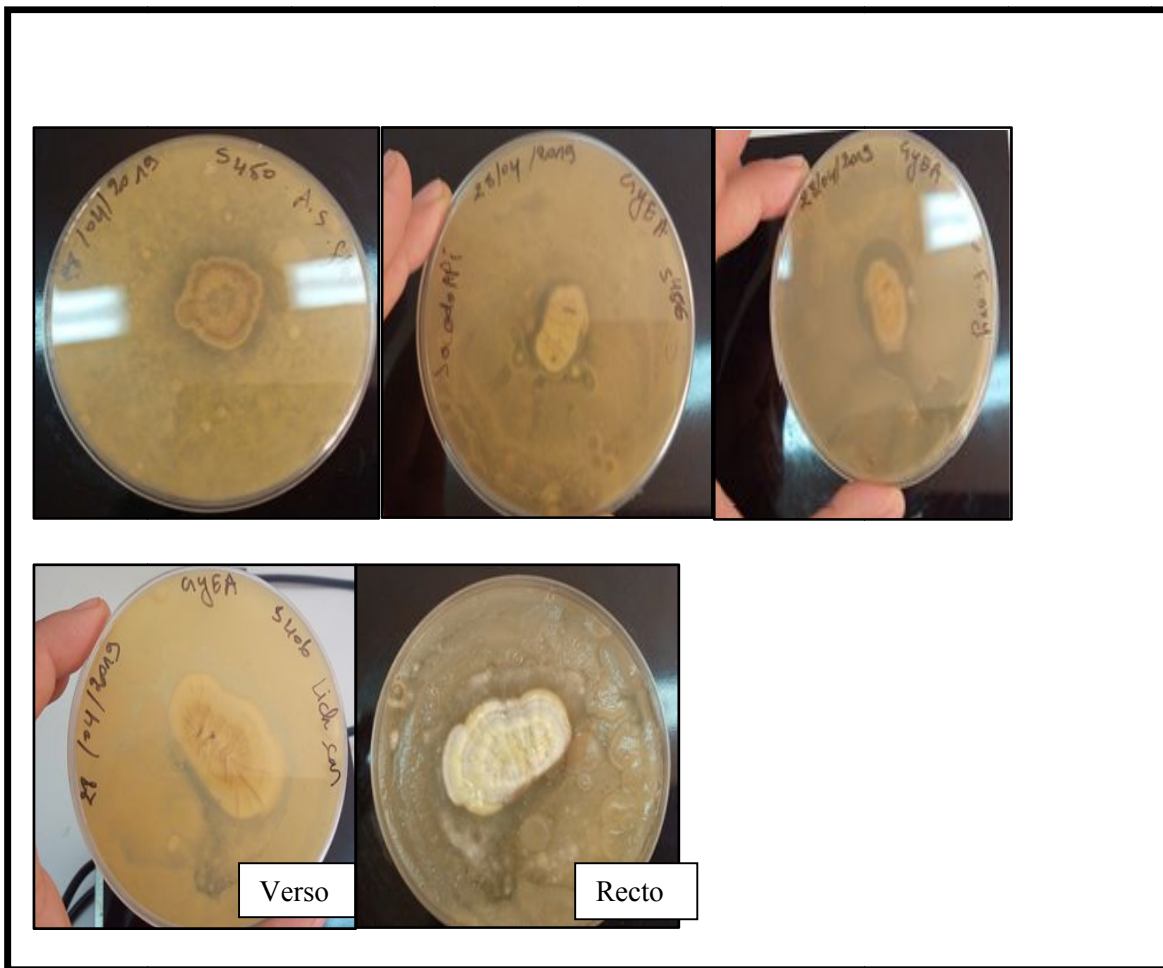
Nos résultats montrent que les souches S406 et S450 ont une bonne activité antifongique les résultats précédent c'est-à-dire la présence d'une meilleur activité antibactériennes et une meilleur activité anti fongique. Ces résultats peuvent être dus à l'activité des molécules bioactives peut être ont la même nature mais les effets différentes, cette hypothèses est comparable par cette hypothèse est comparable avec l'hypothèse donné par (Aouaichia 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 lamême a deux effet déférentes ou deux molécules distinctes.

### V.3.1.2.1 Recherche de l'activité contre les champignon-filamenteux

Après l'étude de l'activité anti *Candida* on étudie les souches d'actinomycètes vis-à-vis de 7 souches de champignons filamenteux. Cette étude a été mise en évidence par la méthode de double couche .Les résultats montrent que les deux souches 406et 450 ont une activité contre 4 souchesde champignons filamenteux mais aucun résultat observé lorsque les souches d'actinomycètes sont ensemencés le milieu ISP2, mais un bon résultat observé dans le milieu GYEA,(planche n°7). Ces résultats expliquent que le meilleur milieu de production des molécules bioactive par les souches d'actinomycètes est le milieu GYEA, les diamètres des zones d'inhibition résumé dans le tableau suivant :

**Tableau n°19** : les diamètres des zones inhibitrices des champignons filamenteux (mm).

	AS,Fla	F,oxy	Sced,Api	Lich,car	F,sol	AS,cal	Pa,li
<b>S450</b>	20	0	0	0	0	0	0
<b>S406</b>	20	20	20	30	0	0	0



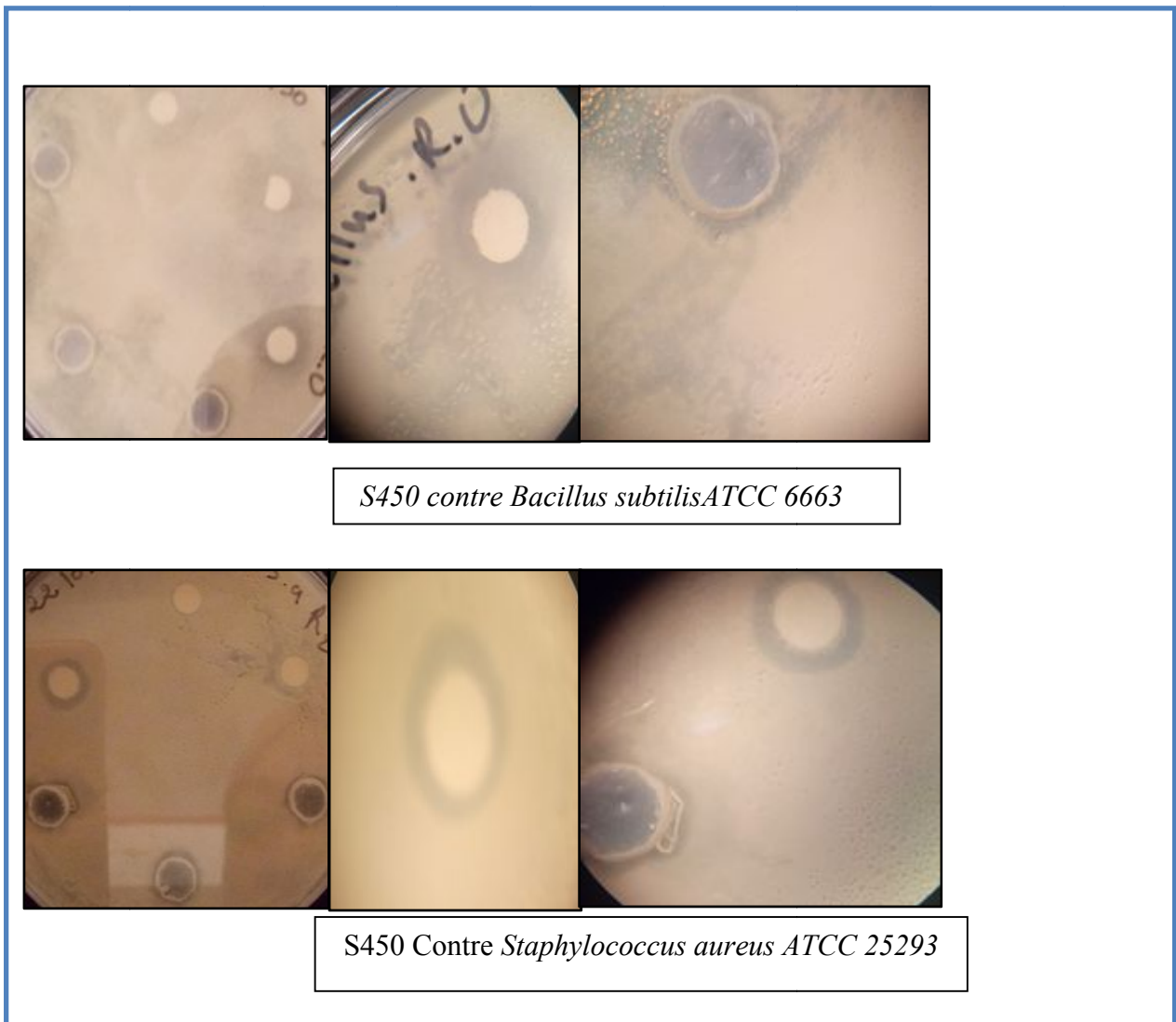
**Planche n°08** : photos représentent les résultats du test d'activité anti fongique (champignon filamenteuses).

### V.1.3. Extraction préliminaire des molécules bioactives

Afin d'étudier le deux extraits organiques de deux souche les plus actives, l'activité de chaqu'un est testée par la méthode des disques et la méthode des puits sur les souches les plus sensibles.

#### V.1.3.1. Extraction des molécules antibactériennes

Les résultats de test de l'extrait organique de l'activité antibactérienne sont représentés dans la planche n°09.



**Planche n°09** : photos représentent les résultats des extractions.

Les résultats obtenus avec les extraits au méthanol de la souche 450 présentent une activité inhibitrice que ce soit par la méthode des disques ou celle des puits contre les bactéries *Bacillus subtilis* ATCC6663 et *staphylococcus aureus* ATCC 25293, aucun résultat détecté pour la bactérie *saR1* les diamètres compris entre 7mm et 14mm. Par contre la souche 406 ne présente aucune activité contre les bactéries tests. Ce résultat expliqué par la sensibilité des bactéries à molécules produites par les actinomycètes et aussi ces molécules bioactives sont soluble dans le méthanol, l'absence de l'activité explique la non solubilité des molécules bioactives (les antibiotiques).

**V.1.3.2. Extraction des molécules anti fongique (levure, champignon)**

Les résultats du test d'activité montre que Les deux souches S406 et S450 ne présentent aucun résultat contre les *Candida*-test et champignon filamenteux –test ce qui explique la non solubilité des molécules anti fongique dans le méthanol.

**Tableau n°20** : les diamètres des zones inhibitrices après l'extraction.

	<i>staphylococcus aureus</i> ATCC43300	<i>staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6663	ICF43	<i>candida parapsilosis</i>	<i>rhodotorula</i>	<i>Sced. apicola</i>	<i>F. oxysporus</i>	<i>Lich. caryophyllacearum</i>
<b>S 406</b>	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>S 450</b>	6	20	9	6	6	6	6	6	6

On conclue que les molécules antibactériennes (les antibiotique) soluble dans le méthanol par contre les molécules anti fongique (anti *Candida* et anti filamenteux) devient non soluble dans le solvant organique. Notre étude est comparable à l'étude de (Bleyagoubi, 2014) qui trouve que le méthanol est le meilleur solvant ou les molécules anti fongique devient soluble par contre notre étude qui trouve que les molécules anti fongique non soluble dans le méthanol, et le même résultat de (Bleyagoubi, 2014) qui trouve que les molécules antibactériennes soluble dans le méthanol.



**conclusion**

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure (Bleyagoubi, 2014).

Afin d'étudier l'activité antimicrobiennes d'actinomycètes d'origine lacustre, le présent travail vise la production et l'extraction des molécules bioactives produites par huit souches d'actinomycètes ainsi que la mise en évidence de leurs activités antibactériennes et antifongiques.

Pour cela deux parties ont été développées :

Dans la première partie nous sommes intéressés à la recherche des activités antibactériennes par la méthode de disque d'agar et des activités antifongiques par la méthode de la double couche.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons effectué l'extraction des molécules bioactives par méthanol à partir de milieu solide GYEA et les tests d'activités des extraits ont été réalisés par la méthode des disques et des puits.

Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches d'actinomycètes étudiées présentent une activité antibactérienne et antifongique contre au moins une souche test. Les plus grandes zones d'inhibitions ont été observées avec la souche S406a une activité contre la bactérie *staphylococcus aureus* ATCC 43300 (24mm) et contre *staphylococcus aureus* 43300

Dans le test d'activité antifongique la zone plus grande remarquable avec la souche 406 contre tous les souches sauf la souche ICF19, le diamètre entre (25mm et 38mm) et S450 (25mm) contre *Rhodotorulla* et *Candida Para psilosis*

Ces résultats permettent de confirmer que les deux souches d'actinomycète (S450 et S406) sont les meilleurs producteurs de molécules bioactives.

Le test d'activité d'extrait organique indique que le méthanol est le meilleur extracteur des molécules à activités antibactérienne.

Dans ce travail, on peut dire que nos souches d'Actinomycètes possèdent des propriétés significatives dans la production des trèsnombreux métabolites bioactives que ce soit antibactériennes ou antifongiques.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ L'étude de l'activité sur une large gamme de bactéries tests.
- ✓ L'étude de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de souche pathogènes dont le mécanisme de résistance aux antibiotiques est connue.
- ✓ L'étude de l'influence de plusieurs milieux de culture milieux de cultures sur la production des métabolites antifongiques et antibactériennes.
- ✓ Extractions des biomolécules avec plusieurs solvants de polarité différentes.
- ✓ L'extraction des molécules biologiquement actives par des techniques de séparation comme de chromatographie sur couche mince et la bioautographie.

**référence bibliographique**

*A*

- **Agregé S., Belguith J., Hadji R. (2015)** .Generelités sur les Anti-infectieux, en medicine Vétérinaire. Ecole Nationale de medicinevétérinaire Sidi thabet. p13-14.
- **Amanullah, A., Justen, P., Davies, A., Paul, G.C, Nienow, A.W., Thomas C.R. (2000)**.Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng J*, 5 (2): 109–114.

• *B*

- **Badji, B. (2006)**. Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226p.
- **Baldacci, (1962)** .Tendances actuelles de la classification des actinomycètes Doyen de l'institut de phytopathologie, université de Milan, Italie .Ann .Soc. Belge. Méd .Trop, 4, pp : 633-646.
- **Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget& G. Duménil., (1986)**. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyeniquemircen *J. 2* : 453-466.
- **Benhadj , M ,Gacemi , D , Maxime ,T, Laurence , Cyril ,B , Raphaél , E , Bertrand , A , Pierre , L( 2018)** . Diversity and anti microbial activites of *Streptomyce* Isolates from Fetzara lake , northe eastern Algeria . *Annales de biologie clinique* ,76 (1) .
- **Benzekhroufa, A (2018)** ; Contribution à l'étude cinétique des extraits enzymatiques de quelques de *Streptomyces* isolées du sol de la région de Mostaganem. Thèse de doctorat. Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- **Berday J.,Aaszalos A. and Mc Nitt K.L.(1987)**-CRC Handbook of antibiotic compounds.vol.XIII.Microbialmetabolites.par 1,2,3.Florida,USA.CRC Press,Boca Raton.
- **BerdayJ,Aaszalos A. and Mc Nitt K.L (1987)** ;CRC Hand book of antibioticcompounds.vol.XIII.Microbialmetabolites.par 1,2,3.Florida,USA.CRC Press,Boca Raton.
- **Berdy J., (2005)**. Bioactive microbial metabolites. *J antibiot.* 58 :1-26.Biological studies of halophilic*streptomyces* sp. Isolated from saltpan environment. *Am j Biotechnol.* 8 (13): 3007-3017.

- **Berdy J., (2005).** Bioactive microbial metabolites. J antibiot. 58 :1-26. Berday J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987)-CRC Handbook of antibiotic compounds. vol. XIII. Microbial metabolites. par 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- **Bleyagoubi.L (2014)** ; Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat Biologie, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
- **Boubetra-Biskeri, A (2013),** Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix* SP. SA 198. Thèse de doctorat en science Agronomique. Ecole Nationale supérieure Agronomique.

• **C**

- **Colombié,V. (2005).** Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.
- **Croos T. 1989.** The actinomycetes II, Growth and examination of actinomycetes some guidelines, In S. T. Vol 4. N0 2. Baltimore. P : 2340-2343. Geursen R., Heer P., Kirkness B., Loewenstein P., Mees S., Muschart J M., Pickaert M. (2008). Mycoses. Des médicaments au service de l'humanité : 1-3.

• **D**

- **Dastager. S.G, Damare,S (2013).** Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Choroa Island, Goa, India. Cur Microbiol. 66(5): 421-427.
- **Demain,A.L ; Lancini,G(2006).** Bacterial Pharmaceutical Products in Prokaryotes, 1,
- **Dominique, L ; (1998).** Encyclopédie des sciences. La pochothèque Garzanti. Éducation : Encyclopédie. La France, p : 28, ISBN 13 :9782253130208. Repéré à <http://www.b-ok.cc/book.com/451283/23f80>.
- **Donadio. S, Maffioli. S, Monciardini. P, Sosio. M, Jabes. D (2010).** Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. J. Antibiot. (2010); 63: 340–423.

• **E**

- **Edwards C, (1993).** Isolation properties and potential application of thermophilic actinomycetes. Biotechnology and Applied Biochemistry 42, 161-179.
- **Erikson(1949).** The morphology, cytology and taxonomy of the actinomycetes. Annual Review of Microbiology. (1949); 3: 23-54.
- **Essaid Ait Baraka, ParulVsta, Lisa Sanchez, Nathalie Gaveau- Vaillant, Cedric Jacquard, Hans-Peter**

**Klenk, Christophe Clément, Yder Ouhdouch, Gilles P, Van Wezel. (2016).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews American Society for Microbiology ; 80 (1) ; p: 44.

• **F**

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

• **G**

- **Geursen, R, Heer P, Kirkness B, Loewenstein P, Mees S, Muschart J M, Pickaert M (2008).** Mycoses. Des médicaments au service de l'humanité : 1-3.
- **Goodfellow, (2012),** phylum XXXVI. Actinobacteria phyl, Nov In : Goodfellow et al, (Editions). Bergy Manuel of systematic of bacteriology. the actinobacteria, second édition, Vol, V, part A. New York Dodrecht, Heidelberg, London, Pp 1-28.
- **Gottlieb, D (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G.S. Ykes and F.A. Skinner Academic Press, London, New York.
- **Grafe U (2000).** Secondary metabolites: from past to present. In: Drug discovery from nature. Grabley, S., R. Thiericke (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 117-123.

• **H**

- **Harir, M ; (2018),** caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'Algérie Thèse de Doctorat en biotechnologie, Université Ahmed ben Bella, Oran. 221 I

• **J**

- **Jana, S., Deb, J.K. (2006)** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl Microbiol Biotechnol, 70(2): 140–150.
- **Jyotish Yadav, Upendra Thapa Shrestha, Kiran Babu Tiwari, Gyan Sundar Sahukhland Vishwanath Prasad Agrawal (2008).** Streptomycin-Like Antibiotic from Streptomyces spp. Isolated from Mount Everest Base Camp. Nepal Journal of Science and Technology 9 : 73-77.

• **K**

- **Kim C, leek, kwono, yool and shimaz, leek, kwono, yool and shimazia A (1994),** selective isolation of actinomycetes by physical pretreatment of soil Korean journal of Applied microbiological and biotechnology, 22, 222-225.
- **Kitouni. M, Boudemagh .A, Oulmi. L, Reghioua .S, Boughachiche. F, Zerizer. H, Hamdiken. H, Couble. A, Mouniee .D, Boulahrouf. A and Boiron .P.** Isolation of

actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the northeast of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*. (2005); 15: 45–51.

- **Klein.D.A.(2003)**. Microbiologie. Deboeck&Larcier France.

• *L*

- **Lamari, L. (2006)**, Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Tizi Ouazou (Algérie).
- **Lechevalier M.P. Lechevalier H., (1985)**. Biology of actinomycetes not belonging to genus streptomyces in biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. 315-360
- **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.
- **Loqman, S. (2009)**. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 216p. 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.
- **Loucif, k. (2011)**, Recherche de Substances Antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire de Magistère, en Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne, Université Mentouri-Constantine.

• *M*

- **Mouniee .D, Boulahrouf.A and Boiron .P.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the northeast of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*. (2005); 15: 45–51. 812–833.
- **Manivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim.S.K.** Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol. Res* (2013); 168(6): 311–332.



- **Mariat, F ; 1962.** Critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes. Institut Pasteur. Paris : service de mycologie Ann.Soc.Belge.Trop 4, p 651-672.
- **Mariat, F ; 1962.** Critères de détermination des principales espèces d'actinomycètes aérobies pathogènes. Institut Pasteur. Paris : service de mycologie Ann.Soc.Belge.Trop 4, p 651-672.
- **Mariat, F. et Seballd, M. (1990).** Actinomycètes In : Bactériologie Médicale. **Le Minor LManivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim.S.K. Marine actinobacterialmetabolites:currentstatus and future perspectives. Microbiol.Res (2013) ; 168(6): 311–332.**
- **Meena. B, Rajan. L.A, Vinithkumar. N.V, Kirubakaran. R.Novel marine actinobacteria frome merald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceuticalbyproducts. BMC microbial, (2013);13(1): 1.**
- **Messaoudi. O (2013) ;** Contribution à la caractérisation de souche d'actinomycètes de métabolites antibactériennes isolées de la Sebkhia Kenadesa (Bechar). Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée, Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen.
- **Michael Madigan, John Martinko.(2007).**biologies des micro-organisme,édition :Pearson Education,France 47 bis, rue des Vinaigries 75010 Paris ; pp :1047, ISBN :978-2-7440-7209-
- **Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. 2000. Streptomycetes: A new model to studycelldeath. J. Cell. Biol. 3: 153–158..etVéron M. (Eds), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949. Mighélez E.M., Hardisson C. and Manzanal M.B. 2000. Streptomycetes: A new model to studycelldeath. J. Cell. Biol. 3: 153–158.**
  - *N*
- **Nouredine. L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Algérie Ouazou (). pp 186.
  - *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*

- **Pescott L.M., Harley J.P. Annual Review of Microbiology. (1949); 3: 23-54.**
- **Pierre, Davet. (1995).** Vie microbienne du sol et production végétale. Edition ; INRA .France.Paris.P :378.
- **Prescott, L., Harley, J.P., Klein, D.A. (2003).** Microbiologie. De Boek Ed (Berlin), 2<sup>ème</sup> édition, pp 539.
- **Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A. 2010.** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition.

• **R**

- **Ripert Christan; 2013.** Mycologie Médicale : Actinomycoses. Lavoisier Librairie. France.
- **Reading, C., Cole M. (1977).** Clavulanic acid: à bêta-lactamase-inhibiting bêta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 11(5): 852–7.

• **S**

- **Sabaou, N. (1988).** Contribution à l'étude des Actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat en Microbiologie des sols. Université des Sciences et de la technologie Houari Boumediene. Alger. 192p.
- **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.N0 2.P: 479-480

• **T**

- **Tanaka, S., Igarashi, K., Kaji, A. (1972).** Studies on the action of tetracycline and puromycin. *JBiolChem*, 247(1): 45–50
- **Tighidet ; S. (2011).** Caractérisation d'antifongiques non polyénique produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production Mémoire de Magister ; Université Abderrahmane Mira. Bejaia.

• **V**

- **Vandeputte. V. (2008).** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata* Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol*, 176(5): 386–90. a. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France). pp 168.

• **W**

- **Williams ST., Lanning S., Wellington EMH. (1984).** Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds: M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. pp. 481–528.

- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *ArchMicrobiol*, 176(5): 386–90.

• **Z**

- **Zitouni. A (2005)**. Taxonomie et antibiotiques de *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri (Tizi ouazou).

**Annexe**

**Annexe I : Milieux de culture**

**Milieu Bennett**

Extrait de levure.....	1g
Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	2g
Glucose.....	10g
Eau distillée.....	1L

PH = 7,2

**ISP2**

-Extrait de Malt .....	10g
-Extrait de levure.....	4g
-Glucose.....	4g
-Agar .....	15g
-Eau distillée .....	1000ml

PH :7.0 à 7.2

**ISP2 molle**

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

PH : 7,2

**Milieu LB solide**

Treptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Na Cl .....	10g

Agar .....20g  
Eau distilles.....1000ml

PH : 7.2

**Milieu LB molle**

Treptone.....4g  
Extrait de levure.....2g  
Na Cl.....2g  
Eau distille .....800ml

PH : 7.2

**Milieu LB liquide**

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

PH : 7.2

**GYEA**

Extrait de levure.....10g  
Glucose.....10g  
Agar.....18g  
Eau distillée.....1000ml

PH : 6,8

**Annexe II : Solutions et Réactifs**

Eau physiologique

NaCl.....9g  
H2O distillée.....1000ml