

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجبالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de **Master** en
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité: Microbiologie Appliquée

Etude de l'activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes isolés du sol

Présenté par :

M^{elle} : Ouazene Fatiha

M^{elle} : Ouazene Nassira

Soutenu le : 29 Juillet 2019, Devant le jury:

| | | | |
|----------------------|---------------------------|------------|--------------------------|
| <i>Président</i> | <i>: Mr. AROUS A.</i> | <i>MAA</i> | <i>- Université DBKM</i> |
| <i>Examinatrice</i> | <i>: Mme. SADI F..</i> | <i>MCB</i> | <i>- Université DBKM</i> |
| <i>Examinatrice</i> | <i>: Mme LAÏSSAOUI A.</i> | <i>MAB</i> | <i>- Université DBKM</i> |
| <i>Promotrice</i> | <i>: Mme GHOMARI F.N.</i> | <i>MAA</i> | <i>- Université DBKM</i> |
| <i>Co-Promotrice</i> | <i>: Mme CHABANE S.</i> | | <i>Université DBKM</i> |

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

*Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant qui nous
a donné la force
et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs
remerciements à
notre très chers parents pour leur encouragements incessants
et leur soutien moral aux*

Moments difficiles,

*Nous tenant à remercier très sincèrement M^{me} Ghomari Faiza
Nawel pour nous avoir encadrées, en nous faisant bénéficier de
ces connaissances, de son aide et de ses conseils.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect
et notre remerciement
aux membres de jury :*

*Monsieur. AROUS Ali qui nous à fait honneur par sa présence
en qualité de président de jury.*

Madame SADI Fadhila pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*Nous avons l'honneur par sa participation au jury de ce
mémoire.*

Madame LAÏSSAOUI Aicha qui a accepté d'examiner ce travail et consacrer de son temps pour l'évaluer.

*Notre gratitude, notre profond respect et notre remerciement à
Madame CHABANE Safia..*

Nos remerciements aussi vont à tous les enseignants et les enseignantes qui nous ont fait former durant ces 05 années, en nous préparant pour cette dernière année de master. Merci pour vos encouragements et votre gentillesse.

Nous remercions, particulièrement, Madame Omhani et son mari qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail.

Nous remercions aussi les ingénieurs du laboratoire pédagogique pour leur aide.

Nous remercions nos collègues pour leur soutien et plus précisément Yaakoub, Yazid, Chaima, Bahia, Om Elkeir pour leur aide et leur amitié.

Ces remerciements ne seront pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nous dédions ce travail

*À nos parents les plus chers au monde qui nous ont
mené pas à pas à la réussite et à la concrétisation de
nos objectifs que dieu les protège et les prête toute
une longue et heureuse vie.*

À notre très chère grande mère que Dieu la bénisse.

*À nos adorables sœurs Fatma, Bakhta, Yamina,
Djamila Fatiha et Aicha.*

À nos très chers frères Mohamed et Hadj.

À nos tantes et nos oncles.

*À nos chères amies, Hayet, Soraya, Rabia, Fouzia,
Mouna, Louiza, Houda, Fadhila, Naima, Souad, Cherifa,
Aicha, Amina, Fatima, Sara, Nessrine, Laila et Meriem*

*que nous avons passés avec elles des moments
inoubliables et agréables.*

*À toute la promotion de microbiologie appliquée
2018/2019 sans exception.*

*À tous nos enseignants depuis le primaire jusqu'au
cycle universitaire.*

Enfin, à tous ceux qui nous 'aiment.

À vous...

Fatima @ Nassira

Résumé

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 recherche et le criblage des actinomycètes capables de synthétiser des substances antibactériennes. Pour cela, vingt-six isolats ont fait l'objet de cette étude. Le test de l'activité antibactérienne a été effectué envers six bactéries pathogène pour l'Homme dont quatre à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 21332 et *Bacillus cereus* ATCC 10876) et deux autre à coloration de Gram négative (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Escherichia coli* ATCC 25922) par la méthode des stries croisées et la méthode des cylindres d'agar. La caractérisation morphologique montre que tous les isolats sont des bactéries filamenteuses, Gram positif, caractérisées par un mycélium de substrat formé de longues hyphes fines et ramifiées avec de longues chaînes de spores droites ou en crochets. Ceci qui nous a permis de les assigner au genre *Streptomyces*. Par ailleurs, le test de l'activité antibactérienne montre que la plupart des isolats sont actifs sur les bactéries à Gram positifs que sur les bactéries à Gram négatifs et que la technique des stries croisées a donnée un pourcentage plus important d'isolats actifs par rapport à la technique des cylindres d'agar avec un taux de 77% des isolats vis-à-vis *Bacillus cereus*, 73% vis-à-vis *Bacillus subtilis*, 69% vis-à-vis les deux souches de *Staphylococcus aureus*, 19% envers *K. pneumoniae* et 15% seulement envers *E.coli*. La méthode des stries croisées est souvent employée comme premier screening de l'activité antimicrobienne, c'est une technique simple qui permet de tester l'activité d'une souche d'actinomycète sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de pétri.

Mots clés. Actinomycètes, Activité antibactérienne, bactéries pathogènes, stries croisées, cylindres d'agars.

Abstract

The bacterial resistance to antibiotics and the emergence of new infectious diseases justify the urgency of having new antimicrobial molecules. The objective of this work is research and screen actinomycetes capable to synthesizing antibacterial substances. For this, twenty-six isolates were the subject of this study. The antimicrobial activity test was performed against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Bacillus cereus* ATCC 10876) and Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922) by the crossed streak method and the agar cylinder method. Morphological characterization shows that all isolates are filamentous bacteria, Gram-positive, characterized by a substrate mycelium formed of long, thin, branched hyphae with long chains of straight or square spores. This allowed us to assign them to the genus *Streptomyces*. In addition, the antibacterial activity test shows that most isolates are active on Gram-positive bacteria rather than Gram-negative bacteria and that the cross-streak technique has given a higher percentage of active isolates compared to the technique of agar cylinders with a level of 77% of isolates against *Bacillus cereus*, 73% against *Bacillus subtilis*, 69% against the two strains of *Staphylococcus aureus*, 19% to *K. pneumoniae* and only 15% to *E. coli*. The cross-streak method is often used as the first screening of the antimicrobial activity, it is a simple technique that makes it possible to test the activity of an actinomycete strain on several microorganisms and on the same Petri dish.

Keywords. Actinomycetes, antibacterial activity, pathogenic bacteria, crossed streaks, agar cylinders.

Liste des abréviations

- ❖ **ADN** : L'acide désoxyribonucléique.
- ❖ **ARN** : L'acide ribonucléique.
- ❖ **ATCC**: American type culture collection.
- ❖ **AFLP** : amplified fragment length polymorphism
- ❖ **Aw** : activité d'eau.
- ❖ **°C** : degré Celsius.
- ❖ **g** : Gramme.
- ❖ **G+C**: Coefficient de Chargaff.
- ❖ **ISP**: International *Streptomyces* Project (milieu de culture)
- ❖ **J** : jour
- ❖ **LPS** : Lipopolysaccharides
- ❖ **MA** : Mycélium aérien
- ❖ **MS** : Mycélium du substrat
- ❖ **pH**: Potentiel d'hydrogène.
- ❖ **PCR** : Polymerase chain reaction
- ❖ **RAPD** : Random Amplified of Polymorphism DNA
- ❖ **Rep PCR** : repetitive extragenic palindromic
- ❖ **%** : pourcent.
- ❖ **µm** : micromètre

Liste des figures

| | Page |
|---|-------------|
| Figure 01. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes | 05 |
| Figure 02. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>Streptomyces</i> | 06 |
| Figure 03. Cycle de croissance en milieu solide de <i>Streptomyces</i> | 09 |
| Figure 04. Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide | 10 |
| Figure 05. Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes | 15 |
| Figure 06. Age d'or de la découverte des antibiotiques, d'après | 17 |
| Figure 07. Technique de culture sur lamelle | 24 |
| Figure 08. Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide ISP2 par la technique des stries croisées | 26 |
| Figure 09. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar. | 27 |
| Figure 10. Aspects macroscopiques des isolats d'actinomycètes après 21 jours sur milieu Bennett. | 29 |
| Figure 11. Observation par la loupe binoculaire de quelques isolats d'actinomycètes (G× 04). | 30 |
| Figure 12. Observation sous microscope optique (G× 100) des filaments d'actinomycètes après colorations de Gram. | 31 |
| Figure 13. Observations au microscope optique des cultures sur lamelles des actinomycètes après coloration au bleu de Méthylène (Gx100). | 32 |
| Figure 14. Activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries pathogènes testées par la technique des stries croisées. | 35 |
| Figure 15. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-test Gram + par la technique des stries croisées. | 36 |
| Figure 16. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-test Gram - par la technique des stries croisées. | 37 |
| Figure 17. Récapitulatif des isolats actifs sur la totalité des bactéries testées par la technique des stries croisées. | 37 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figure 18. | Activité antibactérienne par la des technique cylindres d'agar. | 39 |
| Figure 19. | Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-tests Gram+ par la technique des cylindres d'agar. | 40 |
| Figure 20. | Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries-test Gram- par la technique des cylindres d'agar. | 41 |
| Figure 21. | Récapitulatif des isolats actifs sur la totalité des bactéries testées par la technique des cylindres d'agar. | 41 |
| Figure 22. | Nombre d'actinomycètes actifs selon la technique utilisée. | 43 |

Liste des tableaux

| | Page |
|---|-------------|
| Tableau 01. Types de parois des actinomycètes | 07 |
| Tableau 02. Profils des sucres cellulaires totaux des actinomycètes08 | 08 |
| Tableau 03. Habitats de certains actinomycètes | 12 |
| Tableau 04. Référence des bactéries-tests. | 22 |
| Tableau 05. Caractéristiques culturelles des isolats d'actinomycètes sur milieu Bennett. | 28 |
| Tableau 06. Aspect macroscopique et microscopique des bactéries-test. | 33 |

Sommaire

| | |
|------------------------|----|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 01 |

Partie I : Synthèse Bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes

| | |
|--|----|
| 1. Définition et caractéristiques..... | 02 |
| 2. Taxonomie des actinomycètes | 02 |
| 2.1. Systématique | 03 |
| 2.2. Critères actuels d'identification..... | 03 |
| 2.2.1 .Critères morphologiques | 03 |
| 2.2.2. Critères chimio taxonomiques..... | 04 |
| 2.2.3. Critères physiologiques | 08 |
| 2.2.4. Critères moléculaires | 08 |
| 3. Cycle de développement | 09 |
| 4. Ecologie des actinomycètes | 10 |
| 5. Importance des actinomycètes | 11 |
| 5.1. Importance en agronomie..... | 12 |
| 5.2. Importance dans le domaine médical, vétérinaire et industriel | 13 |

II. Métabolismes des actinomycètes

| | |
|---|----|
| 1. Métabolites primaires | 14 |
| 2. Métabolites secondaires | 14 |
| 3. L'activité antimicrobienne des actinomycètes | 16 |
| 3.1. Production des antibiotiques | 16 |
| 3.2. Production des enzymes | 16 |

III. Bactéries pathogènes étudiées

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1. <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 19 |
| 3. <i>Bacillus</i> | 19 |
| 4. <i>Staphylococcus</i> | 20 |

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Période et lieu de stage | 21 |
| 2. Matériel utilisé..... | 21 |
| 2.1. Matériel non biologique | 21 |
| 2.2. Matériel biologique | 21 |
| 3. Méthodes | 22 |
| 3.1. Revivification des isolats d'actinomycètes | 22 |
| 3.2. Etudes morphologique des isolats d'actinomycètes | 22 |
| 3.2.1. Etude macroscopique | 22 |
| 3.2.2. Etude microscopique..... | 23 |
| 3.3. Conservation des isolats d'actinomycètes..... | 25 |
| 3.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne..... | 25 |
| 3.4.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes..... | 25 |
| 3.4.2. Préparation de la suspension bactérienne et standardisation | 25 |
| 3.4.3 Méthode des stries croisées | 25 |
| 3.4.4. Méthode des cylindres d'agar | 27 |

Chapitre 02 : Résultats et Discussions

| | |
|--|----|
| 1. Etudes morphologique des isolats d'actinomycètes..... | 28 |
| 1.1. Etude macroscopique | 28 |
| 1.2. Etude microscopique | 30 |
| 2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne | 33 |
| 2.1. La vérification de la pureté des souches bactériennes | 33 |
| 2.2. Méthode des stries croisées | 35 |
| 2.3. Méthode des cylindres d'agar | 39 |

| | |
|--|----|
| Conclusion | 45 |
| Références bibliographiques | 47 |
| Annexes | |

Introduction

Les actinomycètes sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, généralement saprophytes, hétérotrophes, aérobies, mésophiles et ubiquitaires ; sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels: sols, débris végétaux, sédiments marins, lacs, mers et océans, etc. (**Lacey, 1997**).

Les produits naturels microbiens sont une source importante de médicaments existants et nouveaux. Parmi les producteurs de métabolites d'importance commerciale, les bactéries se sont révélées être une source prolifique avec un groupe étonnamment petit de taxons représentant la vaste majorité des composés découverts jusqu'à ce jour (**Solanki et al., 2008**).

A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associée à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques et d'autres substances bioactives, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques.

De nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques. Parmi ceux-ci, les Actinomycètes sont les procaryotes les plus précieux dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agro-alimentaire (**George et al., 2012**). Les actinomycètes, surtout celles qui ont une structure mycélienne sont réputées pour la production d'antibiotiques (**Solecka et al., 2012**) en particulier le genre *Streptomyces* qui produit jusqu'à 75 % des antibiotiques connus à l'heure actuelle (**Alliouch, 2014**). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par les actinomycètes telles que, les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides, les herbicides (**Genilloud et al., 2012**).

A la lumière de ces travaux et dans le même ordre d'idée, nous avons jugé utile de poursuivre la recherche dans ce domaine un peu délaissé de la microbiologie du sol et d'apporter ainsi une modeste contribution. L'objectif de notre étude s'inscrit tout d'abord dans le cadre d'améliorer la connaissance des communautés d'actinomycètes telluriques et ensuite, la recherche et le criblage de souches capables de synthétiser des substances antimicrobiennes.

Pour cela, notre travail est structuré de deux parties essentielles à savoir :

- Une synthèse bibliographique sur les Actinomycètes.
- Une partie expérimentale traitant deux chapitres, le premier rapporte la méthodologie détaillée du travail, le second est consacré aux résultats obtenus et leurs discussions.
- Enfin, nous présentons une conclusion et des perspectives.

Partie I

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes

1. Définition et caractéristiques

Étymologiquement, le mot actinomycètes du grecs «Aktis», qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon ; « champignons à rayons » ou « champignons rayonnants» (**Lamari, 2006**). Bactéries filamenteuses de Gram-positif, à taux élevé de G+C (compris entre 60-70%), elles ont un mode de vie mycélien et subissent une différenciation morphologique complexe (**Barka et al., 2016**). Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 2 μm (**Larpen et al., 1985**), est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 μm) (**Gottlieb, 1973**).

Les actinomycètes présentent certaines caractéristiques des bactéries, notamment au niveau de leur paroi constituée de peptidoglycane mais jamais de chitine ou de cellulose. Leur organisation cellulaire est de type procaryotique. Ils sont sensibles à certains antibiotiques antibactériens mais pas aux antifongiques (**Reghioua et al., 2006**).

Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (**Le minor, 1989**).

Ils sont caractérisés par une croissance plus lente que celles des bactéries, allant de quelques jours à quelques semaines (**Dejager et al., 2009 ; Saurav et Kannabiran, 2010**). Le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Larpen et Sanglier, 1989**). Plusieurs groupes d'actinomycètes sont immobiles, la mobilité est présente chez les spores libérés par les sporanges, une caractéristique présente chez les Actinoplanes (**Locci, 2015**).

2. Taxonomie

La taxonomie des actinobactéries est extrêmement complexe et la classification utilisant uniquement les méthodes traditionnelles, basées sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques, a conduit à des groupes supra-génériques très hétérogènes. Trois approches principales ont été suggérées pour identifier les espèces d'actinobactéries: la chimiotaxonomie (différenciation des espèces par composition chimique), la taxonomie numérique (différenciation des espèces par le nombre de similarités phénotypiques) et lasystématique moléculaire (utilisation de l'ADN pour différencier les espèces). Une combinaison de trois techniques devient plus complète (**Zucchi et al., 2011**).

2.1. Systématique

Les actinomycètes sont classés dans le Règne des Procaryotes, le Domaine des Bacteria ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria*, la Sous-Classe des *Actinobacteridae* et l'Ordre des *Actinomycetales* (Euzéby, 2011). Les actinobactéries sont classées dans 55 Familles (Goodfellow et Fiedler, 2010). L'Ordre des *Actinomycetales* regroupe à lui seul presque 45 familles et près de 290 genres (Euzéby, 2011).

2.2. Critères actuels d'identifications

2.2.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques font appel aux caractéristiques culturelles et micromorphologiques.

* Caractères macromorphologiques

D'après Bouras (2006) et Boudjella et al. (2007), les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi les caractères culturels importants :

- ❖ La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex : *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus* ;
- ❖ La présence ou non de mycélium de substrat (MS) ;
- ❖ 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.

a/ Mycélium aérien

Le mycélium aérien est habituellement plus épais que le mycélium du substrat. Il montre une différenciation suffisante selon laquelle plusieurs isolats peuvent être séparés en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions bien précises. Ceci est désigné comme l'un des critères les plus importants pour la classification du genre *Streptomyces* espèces, comprenant une structure (cotonnière, veloutée ou en poudre). Une formation d'anneaux ou de zones concentriques et de pigmentation (Harir, 2018).

b/ Mycélium de substrat

Le mycélium de substrat d'actinobactéries a différentes tailles, forme et épaisseurs. Sa couleur varie de blanc ou pratiquement incolore à jaune, marron, rouge, rose, orange, vert ou noir (**Harir, 2018**).

**** Caractères micromorphologiques**

Les critères micro- morphologiques importants selon **Boudjalal (2012)**, sont:

- ❖ La fragmentation ou non du MS.
- ❖ La présence de sporanges sur le MA (*Streptosporangium, Spirillospora, etc.*) ou sur le MS (*Actinoplanes, Dactylosporangium, etc.*), la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.
- ❖ La formation de spores sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement: isolées (*Micromonospora, Saccharomonospora*), par deux (*Microbispora*), par quatre (*Microtetraspora*) ou en chaînes (*Actinomadura, Streptomyces, etc.*).
- ❖ Le mode de sporulation: spores portées par des sporophores (*Streptomyces, Actinomadura, etc.*) ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en spores (*Nocardiosis, Amycolatopsis, Saccharothrix, etc.*).
- ❖ La présence de spores mobiles (*Spirillospora, Actinoplanes, etc.*) ou non mobiles (*Streptomyces, Streptosporangium, Micromonospora, etc.*).
- ❖ L'ornementation de la surface des spores (lisses, rugueuses, épineuses ou chevelues).
- ❖ La formation de structures particulières: synnemata (*Actinosynnema*), faux sporanges (*Kibdelosporangium*), etc.

La micromorphologie des principaux genres et quelques types de chaînes de spores sont donnés respectivement dans les Figures 01 et 02.

2.2.2. Critères chimiotauxonomiques

La composition de la paroi des actinomycètes varie fortement d'un groupe à l'autre. On lui attribue une importance taxinomique considérable. On peut distinguer quatre types principaux de paroi sur la base de trois caractéristiques de la composition et de la structure du peptidoglycane: l'acide aminé en position 3 du térapeptide, la présence de glycine dans les ponts interpeptidiques et le contenu en sucre du peptidoglycane (Tableau 01) (**Prescott et al., 2003 ; Sharma, 2014**).

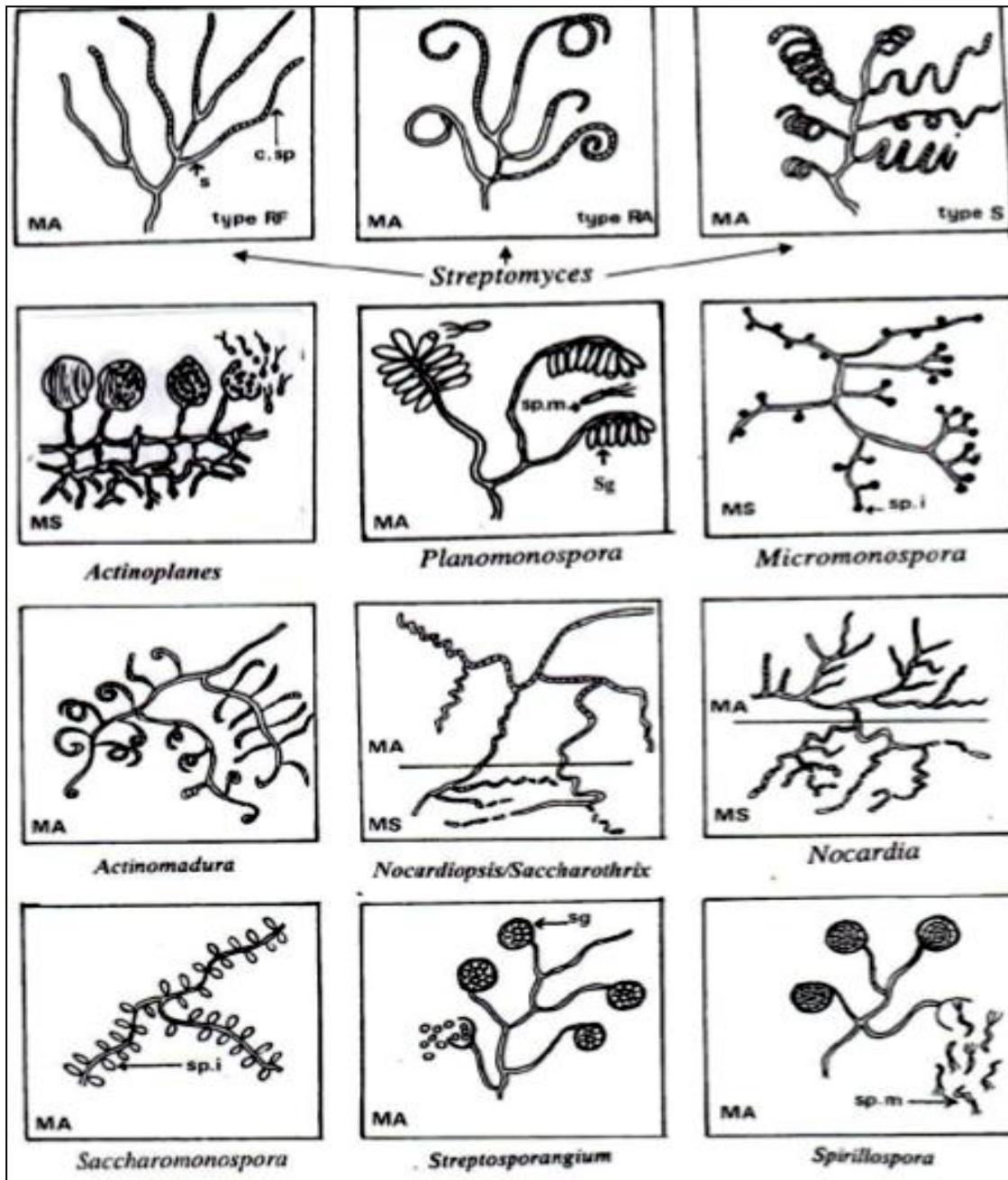


Figure 01. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (Sabaou, 1988).

MA= mycélium aérien ; MS = mycélium du substrat. RF = Rectus-Flexibilis (chaînes de spores droites à flexueuses). RA = Retinaculum-Apertum (chaînes en crochets ou en boucles). S = Spira (chaînes spiralées). s = sporophore. c.sp.= chaînes de spores. sp.i.= spores isolées. sp.m. spores mobiles. sg = sporanges.

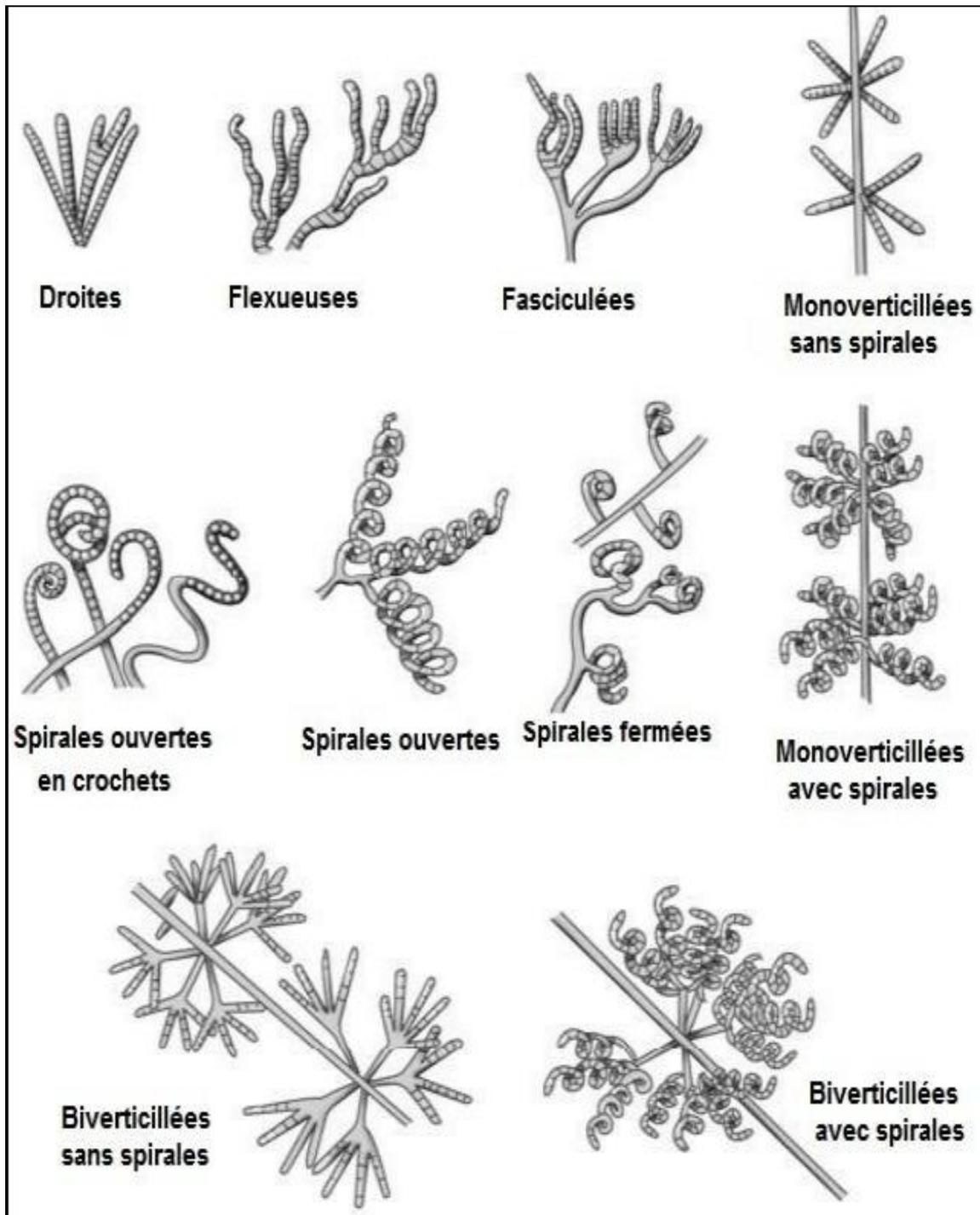


Figure 02. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* (Madigan et al., 2011).

Tableau 01. Types de parois des actinomycètes (Prescott et al., 2013).

| Type de paroi | Isomère de l'acide diaminopimélique | Glycine dans le Pont interpeptidiques | Sucres | Genres représentatifs |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|
| I | <i>L,L</i> -DAP | + | NA | <i>Nocardioides</i> <i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> |
| II | <i>Méso</i> -DAP | + | NA | <i>Pilimelia</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Actinomadura</i> |
| III | <i>Méso</i> -DAP | - | NA | <i>Frankia</i> |
| IV | <i>Méso</i> -DAP | - | Arabinose, galactose | <i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardia</i> |

Na : non applicable ou non déterminé.

a/ Les acides aminés

Le peptidoglycane des actinomycètes aérobies contient, en quantité importante, un acide aminé dibasique: l'acide 2,6- diaminopimélique. Selon la forme isométrique de cet acide aminé, les actinomycètes sont regroupées en deux catégories, celles qui ont la forme LL et celles ayant la forme méso. La glycine, la lysine et l'ornithine sont aussi caractéristiques (Becker et al., 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970).

b/ Les sucres

Les extraits cellulaires des actinomycètes munis d'une paroi de types I, III et IV contient également des sucres caractéristiques, utiles pour l'identification (Tableau 02).

c/ Les lipides

Les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis en trois groupes : les lipides contenant une partie polaire, les ménaquinones et les acides mycoliques (Lechevalier et Lechevalier, 1980; Collin et al., 1977). La caractérisation des lipides est particulièrement informative pour la mise en évidence du genre *Mycobacterium*, qui présente une paroi particulière riche en acides mycoliques.

Tableau 02. Profils des sucres cellulaires totaux des actinomycètes (Prescott et al., 2003).

| Type de composition en sucres cellulaires | Sucres caractéristiques | Genres représentatifs |
|---|-------------------------|--|
| A | Arabinose, Galactose | <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i> <i>Actinomadura</i> |
| B | Madurose | <i>Streptosporangium</i> <i>Dermaphilus</i> |
| C | Aucun | <i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> |
| D | Arabinose, xylose | <i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> |

2.2.3. Critères physiologiques

Les principaux caractères physiologiques utilisés en taxonomie des actinomycètes sont: les optima du pH et de la température de croissance; la sensibilité au chlorure de sodium et aux antibiotiques ainsi qu'à certains agents chimiques; l'utilisation de sources carbonées et azotées ainsi que la dégradation de certains polymères tels que l'amidon, la caséine, la gélatine et la production de mélanine (Shirling et Gottlieb, 1966).

2.2.4. Critères moléculaires

Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage de G+C qui n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de création de nouveaux genres. Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (Stackebrandt et Woese, 1981; Stackebrandt et al., 1997; Kämpfer, 2010).

Aussi, il existe d'autres méthodes d'analyses moléculaires dites «techniques d'empreintes génétiques ou encore de fingerprint », telle que la RAPD, l'AFLP, et la rep-PCR. Elles sont utilisées dans le génotypage où elles permettent de façon rapide et hautement discriminante de caractériser et comparer des souches entre elles.

Ces analyses moléculaires reposent sur une réaction de polymérase en chaîne (PCR), utilisant soit des amorces universelles de bactéries, soit des amorces spécifiques des actinobactéries (Schäfer *et al.*, 2010).

3. Cycle de développement

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie complexe caractérisé par différents stades de croissance dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce, ce qui amène une grande diversité morphologique.

Sur milieu solide, il y aura d'abord la germination d'une spore. Le tube germinatif en croissance se divisera en mycélium branché pour former un mycélium végétatif basal (mycélium du substrat) formé d'hyphes non septés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Chez beaucoup d'actinomycètes, à partir de ce mycélium primaire s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien, ce mycélium prend naissance après autolyse du mycélium de substrat (Locci et Sharples, 1984).

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien (Figure 3). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture, ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Kalakoutskii et Agre, 1976).

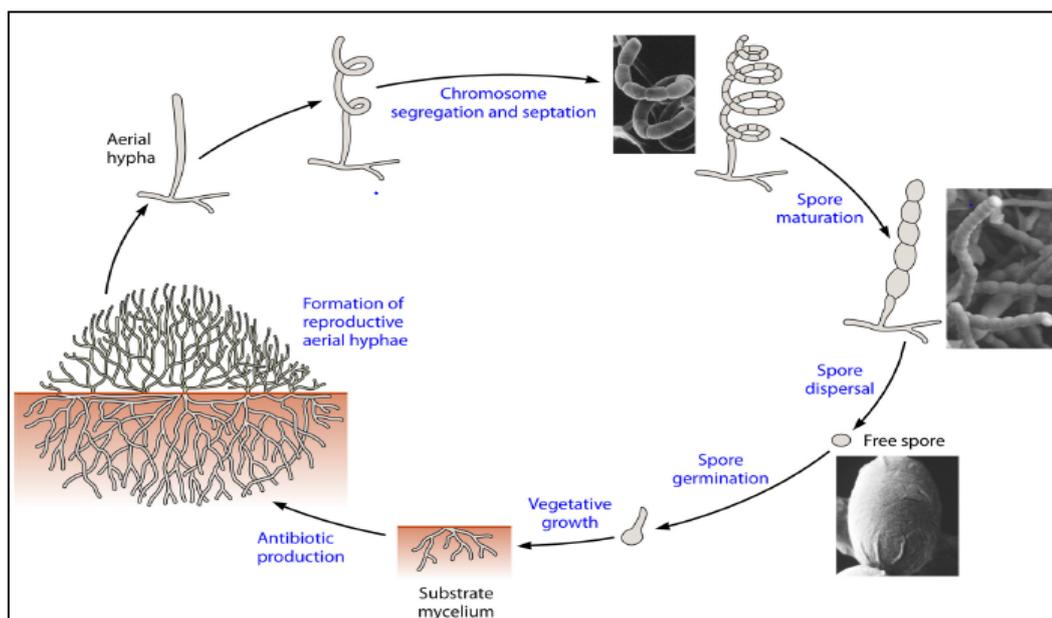


Figure 03. Cycle de croissance en milieu solide de *Streptomyces* (Barka *et al.*, 2016).

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Keulenet *al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former en fin les pellets (Figure 4). La première forme (pellet), est un agrégat de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres ; la seconde forme c'est des hyphes indépendants dispersés (Cox et *al.*, 1998).

Plusieurs de ces bactéries produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Les spores des actinomycètes sont de deux sortes. Les endospores, produites par des actinomycètes thermophiles, proviennent de la cassure de la paroi de l'hyphe. Les exospores ou les spores de « segmentation » naissent par suite de cloisonnements à l'intérieur des hyphes (Waksman, 1959).

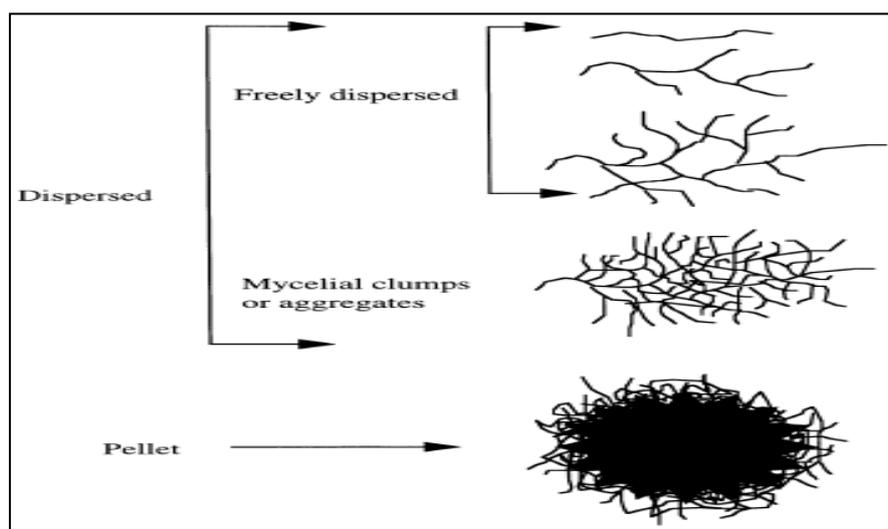


Figure 04. Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Almaris, 2007).

4. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans la plupart des niches écologiques aquatique et terrestre (Barka et *al.*, 2016) (Tableau 03). La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes: air, composts, eaux, fourrages, fumiers, grains de céréales, systèmes d'air climatisé, poussière de maison, foin et pailles, résidus fibreux de canne à sucre, pollen des plantes et bien d'autres substrats (Goodfellow et Williams, 1983).

Tableau 03. Habitats de certains actinomycètes (Goodfellow et Williams, 1983 ; Grigorova et Norris, 1990).

| <i>Actinomycètes</i> | <i>Habitats</i> |
|--------------------------------------|---|
| <i>Actinoplanes</i> | L'eau douce, la litière végétale, le sol. |
| <i>Frankia</i> | Les nodules racinaires des non-légumineuses. |
| <i>Micromonospora</i> | L'eau douce, les sédiments, les sols humides. |
| <i>Nocardiaamarae</i> | Les boues activées. |
| <i>Rhodococcusprophilus</i> | Les déjections animales, l'eau, le sol. |
| <i>Saccharopolysporarectivirgula</i> | Moisi du foin. |
| <i>Streptomyces</i> | Le sol, la litière végétale, l'eau. |
| <i>Thermoactinomyces</i> | Le compost. |

Dans le sol, les actinomycètes sont retrouvés à partir de la surface jusqu'à 2 m de profondeur, la zone la plus riche étant comprise entre 2 et 20 cm (Boudjella, 2007). Ils sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries (Belyagoubi, 2013).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinomycètes (Lacey, 1973 ; Elwan et al., 1985). Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares.

Les actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques : dans les lacs, les rivières et les ruisseaux, dans les mers et les océans et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4 000 m de profondeur (Goodfellow et Williams, 1983).

La plupart des Actinomycètes sont saprophytes mais quelques uns peuvent être pathogènes (l'exemple le plus étudié est *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre) (Lindholm, 1997), ou symbiotes des plantes et des animaux (Goodfellow et Williams, 1983 ; Suzuki et al., 1994).

5. Importance des actinomycètes

Si quelques espèces d'actinomycètes sont pathogènes, la majorité sont cependant très utiles. Leur hétérogénéité métabolique et leur diversité écologique assez exceptionnelles font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules à propriétés très diverses et intéressantes dans le domaine médicale, vétérinaire agronomique et industriel (**Sanglier et al., 1993**).

5.1. Importance en agronomie

Dans la nature, les actinomycètes jouent un rôle important dans le cycle des composés organiques et ont été associés avec la production de la matière organique du sol, y compris la production des pigments noirs appelés mélanine, qui sont liés au sol acide humique (**Silva et al., 2013**), et la production d'un mélange de composés tels que l'acide acétique, l'acétaldéhyde, l'alcool éthylique, l'alcool isobutylique et l'ammoniaque (**Gerber et Lechevalier, 1965; Gottlieb, 1973**). Aussi, les espèces du genre *Streptomyces* produisent en outre un composé gazeux caractéristique, appelé la géosmine, qui donne à la terre fraîche son odeur distinctive de moisi (**Tortora, 2003**).

Les actinomycètes sont capables de dégrader les résidus organiques récalcitrants telles que les ligno-celluloses et la chitine, et contribuent ainsi à la fertilisation des sols. Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinobactéries sont utilisées dans la lutte biologique pour la protection de certaines plantes contre les maladies fongiques et bactériennes (**Bouali et al., 2017**).

Les multiples enzymes lytiques, les antibiotiques et les hormones de croissance produits par ces bactéries leur confèrent la capacité de protéger les plantes contre les phytopathogènes, ainsi que d'accroître le contenu en nutriments des sols (**Sastrahidayat et al., 2011; Kaur et al., 2013**). Comme c'est le cas de la kasugamycine, des polyoxines et de la blasticidine, ces antibiotiques sont utilisés depuis longtemps et à grande échelle dans l'agriculture japonaise, notamment contre certaines maladies du riz (**Misato, 1982**).

Plusieurs actinomycètes sont réputés pour dégrader les substances toxiques et sont utilisés en bioremédiation. Ils sont significativement bien adaptés à la survie dans des environnements difficiles. Certaines peuvent pousser à des températures élevées (> 50 ° C) et

sont essentielles à la méthode de compostage (Sharma *et al.*, 2014), certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore (Crawford *et al.*, 1993).

5.2. Importance dans le domaine médical, vétérinaire et industriel

Les actinobactéries sont la source la plus courante des antibiotiques et constituent une source prometteuse d'un large éventail des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des immunomodifiants et des vitamines (Silva *et al.*, 2013), des herbicides, des pesticides ou des antiparasitaires (Oskay *et al.*, 2004), de facteurs de croissance, de substances probiotiques, anticholestérolémiques, antihistaminiques, anticancéreuses, etc (Buckingham, 1997).

Certaines espèces de *Propionibacterium* jouent un rôle important dans la fermentation d'acide propionique lors de la fabrication du fromage suisse (Tortora, 2003).

Les cellulases sont utilisées en industrie pharmaceutique dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive. Une production significative de ces enzymes est orientée vers trois marchés principaux : l'industrie alimentaire où les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibre cellulosique, l'industrie textile où elles sont utilisées pour le traitement des toiles de coton et dans la fabrication de pâte à papier ou l'addition de cellulase aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de recyclage améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).

II. Métabolisme des actinomycètes

En général, les actinomycètes sont des bactéries chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais, plusieurs espèces sont capables aussi d'une croissance chimio-autotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les métabolismes des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (**Strub, 2008**). Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés (**Delaunay et al., 2003**). Ils sont résumés dans le Tableau 01 en annexe 01.

1. Métabolites primaires

Le métabolisme primaire des actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (**Theilleux, 1993**). Il regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex : acides aminés) en macromolécules (ex : protéine) (**Strub, 2008**).

2. Métabolites secondaires

Le métabolisme secondaire est défini comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, non essentielles mais pouvant procurer un avantage sélectif dans certaines conditions (**Haas, 2015**).

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions : premièrement, il est nécessaire d'avoir des unités cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs doivent être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives (**Voelker et Altaba, 2001**).

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs (**Boucheffa, 2010**).

Les actinomycètes sont particulièrement très intéressants par leur grande capacité à produire des métabolites secondaires avec des structures chimiques diversifiées. Ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques avec près de 70% des molécules actives commercialisées (**Duraipandiyar et al., 2010**). Parmi les molécules élaborées par les actinomycètes, seulement 20% représentent des antifongiques (**Sanglier et al., 1993**).

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), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracycline) et des inhibiteurs d'enzyme (acide clavulanique) (**Demain, 2000**). En particulier, ce genre est remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (**Watve et al., 2001**). La Figure 05 résume les différentes molécules bioactives produites par les actinomycètes.

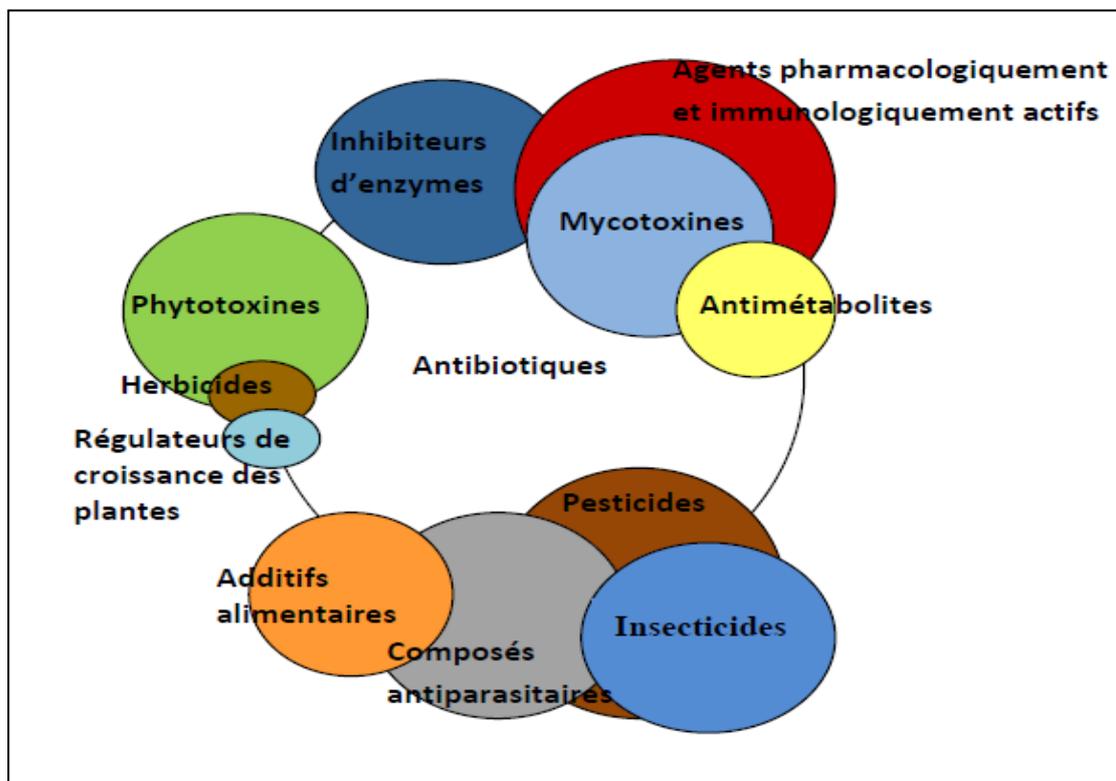


Figure 05. Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (**Conn, 2005**).

3. L'activité antimicrobienne des actinomycètes

Les actinomycètes sont un groupe de micro-organismes produisant des métabolites secondaires précieux tels que des antibiotiques, des vitamines, des acides organiques et des enzymes (**Janaki, 2017**).

3.1. Production des antibiotiques

Le terme désigne tout composé chimique élaboré par un microorganisme (ou produit par synthèse), dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes sensibles. On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (**Prescott, 1995**).

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (**Yala et al., 2001**).

La production d'antibiotiques est relayée par trois groupes microbiens, les actinomycètes représentent les acteurs principaux, avec plus de 75% des molécules antimicrobiennes naturelles ; les champignons, avec près de 15% et enfin les bactéries non filamenteuses confondues qui produisent les 10% restantes (Figure 06) (**Berdy, 2005**).

Streptomyces et *Micromonospora* sont les deux principaux genres d'actinomycètes du sol qui constituent une source importante d'antibiotiques (**Agadagba, 2014**). *Streptomyces* représente environ 80% du total des antibiotiques (**Procópio et al., 2012**) que *Micromonospora* (**Agadagba, 2014**). Ces dernières décennies, l'importance a été donnée aussi aux actinomycètes rares, de ce fait ces derniers sont à l'origine de 25 à 30 % des antibiotiques (**Berdy, 2005**).

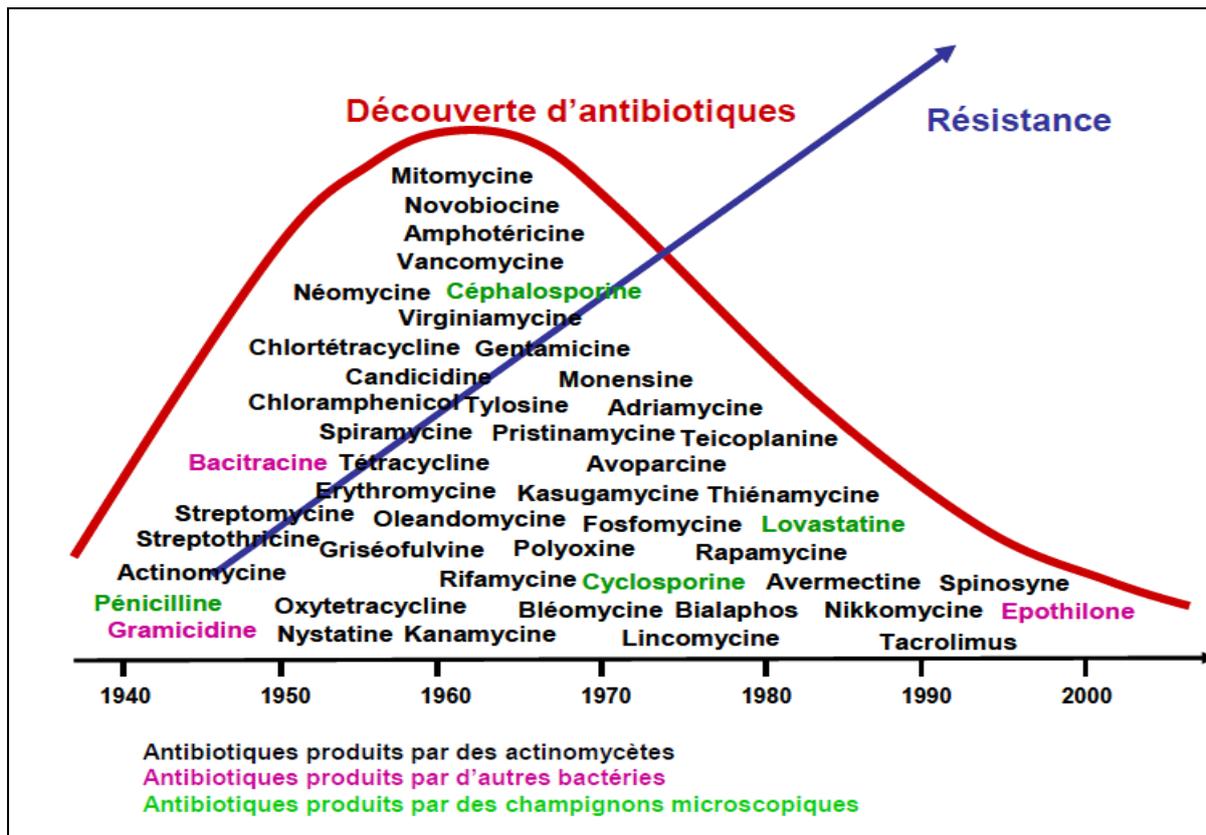


Figure 06. Age d'or de la découverte des antibiotiques, d'après Hopwood (2007).

Les actinomycètes rares produisent les composés les plus singuliers et les plus divers et le plus souvent non toxiques, possédant un excellent potentiel antibactérien (Kurtboke, 2012). Parmi les métabolites produits par ces actinomycètes rares, il y a beaucoup de molécules qui sont très importantes en pratique clinique comme les gentamicines, les erythromycines, la vancomycine et la rifamycine. Ainsi, d'autres molécules comme le ziracine, le dalbavacine et le spynosine sont utilisés en agriculture. Aussi, nous notons que la vancomycine ristocetine est un type complexe de glycopeptide produit, presque en exclusivité, par plusieurs espèces d'actinomycètes rares (Bérdy, 2005).

Plusieurs membres du genre *Nonomuraea* produisent des pigments colorés à la fois solubles et insolubles. Certains de ces pigments possèdent une activité antagoniste contre certains organismes cibles, connus aussi comme pigments antibiotiques tel que la Maduramicine qui est produite par *Nonomuraea rubra* (Rungroch et al., 2013).

3.2. Production d'enzymes

Les actinomycètes constituent le principal groupe de microorganismes du sol qui jouent un rôle majeur dans le recyclage des matières organiques dans l'environnement grâce à la production d'enzymes hydrolytiques (**Rimya et Vijayakumar, 2008**), à savoir : les amylases, les cellulases, les protéases, les chitinase, les xylanases et les pectinases. Les enzymes amylolytiques dégradant l'amidon jouent un rôle majeur dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie agro-alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier (**Pandey et al., 2000**).

Les lipases sont produites à partir d'une variété d'actinomycètes (**Taibi et al., 2012**). Elles ont de nombreuses applications dans les industries des détergents, des produits alimentaires, des procédés oléochimiques, ainsi que dans les domaines pharmaceutiques (**Schmid et Verger, 1998**).

Les connaissances actuelles concernant les protéases d'actinomycètes constituent le groupe le plus important de métabolites secondaires largement exploités (**Limkhada et al., 2010**). 46 souches d'actinomycètes ont été isolées d'échantillons de sol de l'Himalaya du Nord et ont été étudié pour leur production de protéase et leurs effets cytotoxiques sur la lignée de cellules cancéreuses (**Dastager et al., 2008**).

Les actinomycètes sont une excellente ressource pour la production de la L-asparaginase (L-asparagineamino hydrolase). Une gamme d'actinomycètes du sol, *Streptomyces griseus*, *S. karnatakensis*, *S. albidoflavus* et *Nocardiasp.*, ont la capacité de produire cet enzyme (**Janaki, 2016**). Les kératinases sont des enzymes d'importance industrielle produites par un certain nombre de souches d'actinomycètes telles que *Streptomyces* spp et *Actinomadura* (**habbeche et al., 2014**). Ces enzymes sont principalement utilisées pour l'hydrolyse de la kératine.

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

III. Bactéries pathogènes étudiées

1. *Escherichia coli*

Bactérie isolée en 1885 par Theodor Von Escherich et couramment appelée "colibacille". Il exprime les caractères généraux des entérobactéries. Il est en outre lactose +, indole +, acétoïne -, citrate -, H₂S -, gaz +, uréase- (**Khater, 2011**). *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. C'est une bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA. Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (**Tenaillon et al., 2010**).

2. *Klebsiella pneumonia*

K. pneumonia est une entérobactérie appartenant au genre *Klebsiella*, il s'agit d'un bacille à Gram négatif toujours immobile et très souvent capsulé poussant sur milieu ordinaires en atmosphère aéro-anaérobie, oxydase-, fermentant le glucose et le lactose en produisant du gaz, l'indole et l'uréase sont positifs, fermente l'acétoïne et réduit les nitrates en nitrites (**Chikhani, 2012**).

Après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (**Freney et al., 2007**). Elles sont très répandues dans la nature (eaux, sols). Ce sont des commensaux du tube digestif des animaux et de l'homme qui peut également en héberger dans l'oropharynx. Elles sont responsables d'infections urinaires au 2^{ème} rang après *E. coli* et d'infections respiratoires. Les isollements sont beaucoup plus fréquents à l'hôpital (**Khatar, 2011**).

3. *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bactéries Gram + (les cultures âgées peuvent apparaître Gram-), généralement mobiles, aptes à la sporulation. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphériques ou ovale, déformante ou pas selon les espèces. L'aptitude à la coloration peut aussi être mise en évidence par le test de thermo résistance (10 minutes à 80 °C).

Les *Bacillus* sont catalase +, aérobies ou aéro-anaérobies ; la culture des *Bacillus* s'effectue facilement sur milieux de culture classique comme le bouillon nutritif ou gélose nutritive ordinaire (Guiraud, 2003). Tous les *Bacillus* sont hétérotrophes, ils tirent leurs énergies d'une large gamme de composés organiques simples, par respiration ou fermentation. Leurs exigences nutritionnelles sont très diverses : certains ont des besoins complexes et strictes ; d'autres nécessitent simplement quelques acides aminés ou vitamines (Leclers, 1995).

Le genre *Bacillus* représente les bactéries les plus largement répandues dans le sol et les eaux naturelles où ils peuvent contaminer les végétaux et les aliments. Elles font également parties de la flore fécale comme population sous-dominante (Leclers, 1995). En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces du genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxi-infections alimentaires ou, plus rarement, d'infections opportunistes. *Bacillus cereus* est le principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus subtilis* peuvent également être mise en cause (Gaillard, 1989).

4. *Staphylococcus*

Les staphylocoques sont des cellules sphériques qui se divisent sur plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappes de raisin d'où leur nom (en grec staphylos). Ils sont immobiles, non sporulant. Ils sont cultivés sur des milieux contenant 5% de chlorure de sodium et pour certains jusque 10% et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, habituellement catalase +. Chimioorganotrophes, ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique (Leclers, 1995). *Staphylococcus aureus*, l'espèce la plus virulente du genre *Staphylococcus*, a émergé comme l'un des agents pathogènes humains les plus importants, et a été au cours des dernières décennies, une des principales causes des infections hospitalières et communautaires (Lyon et Skurray, 1987).

Ce sont des bactéries qui poussent facilement en 24 heures sur milieu ordinaire (gélose trypticase-soja supplémentée ou non en sang). Ils peuvent également être cultivés en milieu sélectif hypersalé (Chapman). Les colonies sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net. La pigmentation jaune à jaune-orangée n'est pas toujours apparente. Globalement, l'espèce *S. aureus* peut être différenciée des autres staphylocoques par la présence simultanée d'une coagulase (le test de mise en évidence de la coagulase libre est utilisé en routine), d'une activité catalase positive, d'une DNase et par la fermentation du mannitol (Eveillard, 2007).

Partie II :

Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériels et Méthodes

Le présent travail a pour objectif de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de quelques isolats d'actinomycètes d'origine tellurique, par deux techniques différentes. Ceci est étudié vis-à-vis des bactéries (Gram+ et Gram-) pathogènes pour l'homme, dont certaines sont responsables d'infections nosocomiales assez sévères.

1. Période et lieu de stage

Notre étude expérimentale a été réalisée depuis le début du mois de Mars jusqu'au début du mois de Juillet 2019, au niveau des laboratoires pédagogiques de microbiologie et de biochimie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre à l'Université Djillali Bounama de Khemis Miliana.

2. Matériel utilisé

2.1. Matériel non biologique

Le matériel analytique utilisé dans cette étude est rapporté en annexe 02.

2.2. Matériel biologique

*** Isolats d'actinomycètes**

Nous avons travaillé sur 26 isolats d'actinomycètes provenant de différents échantillons de sols d'Algérie et appartenant à la collection de l'année 2017. Ces isolats ont été purifiés puis conservés à 4 °C et -20 °C.

*** Souches bactériennes testées**

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries pathogènes de l'homme, six souches identifiées et référencées (Tableau 04), ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abo Baker Belkayed de Tlemcen.

Tableau 04. Référence des bactéries-tests.

| Bactérie | Gram | Référence |
|------------------------------|---------|-------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | ATCC 25923 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positif | ATCC 43300 |
| <i>Bacillus cereus</i> | | ATCC 10876 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | ATCC 21332 |
| <i>Escherichia coli</i> | Négatif | ATCC 25922 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | ATCC 700603 |

3. Méthodes

3.1. Revivification des isolats d'actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes conservés subissent une revivification pour des tests ultérieurs. Chaque isolat est ensemencé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile par des stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu Bennett (Annexe03). L'incubation est faite à 30°C pendant 21 jours. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine.

3.2. Etude morphologique des isolats d'actinomycètes

3.2.1. Etude macroscopique

✓ Observation à l'œil nu :

L'aspect phénotypique et les caractères culturels sont mis en évidence après culture des isolats d'actinomycètes sur le milieu Bennett.

A l'aide d'une anse de platine stérile, on prélève une colonie pure que l'on ensemence par stries sur le milieu Bennett. Après 07 et 14 jours d'incubation à 30°C, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence de pigments diffusibles dans la gélose autre que les pigments mélanoides sont notés (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

✓ Observation par la loupe binoculaire

Après 21 jours d'incubation à 30 °C, les boîtes contenant des colonies d'actinomycètes, d'aspects bien précis et clairs sont observées à la loupe binoculaire (G x04).

3.2.2. Etude microscopique

Les isolats d'actinomycètes sont observés au microscope optique en utilisant la coloration de Gram et la technique de culture sur lamelle.

✓ Coloration de Gram

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative. Elle permet aussi de préciser la morphologie et le mode de groupement des cellules.

Les frottis sont colorés en premier lieu par une solution de violet de Gentiane qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite les lames sont rincés par une solution iodo-iodurée (Lugol) qui agit comme mordant en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules afin que celle-ci soient contrastées. Sans rincer, les lames sont inclinées à 45°, les frottis sont décolorés par lavage d'alcool. Par la suite, les lames sont rincées à l'eau distillée afin d'arrêter la décoloration. Enfin, les frottis sont recolorés par un colorant basique de couleur rose : la Fuschine, pendant une minute puis rincés abondamment à l'eau de robinet. Une fois séchées, les lames sont examinées au microscope optique à immersion (Gx100). Les résultats sont photographiés à l'aide d'un appareil photographique numérique (**Delarras, 2007; Duraipandiyar et al., 2010**).

✓ Technique de culture sur lamelle

Cette technique consiste à insérer, délicatement, une lamelle stérile dans un milieu gélosé ISP3 (Annexe 03), de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec la surface de celui-ci (Figure 07). Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu. Après 2 à 3 semaines d'incubation à la température optimale (30 °C), la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments des mycéliums de substrat et aérien non-dénaturés. Elle est ensuite déposée sur une lame propre contenant une goutte de bleu de méthylène moins concentré, puis examinée au microscope optique (G x 100) (**Holt et al., 1994**).

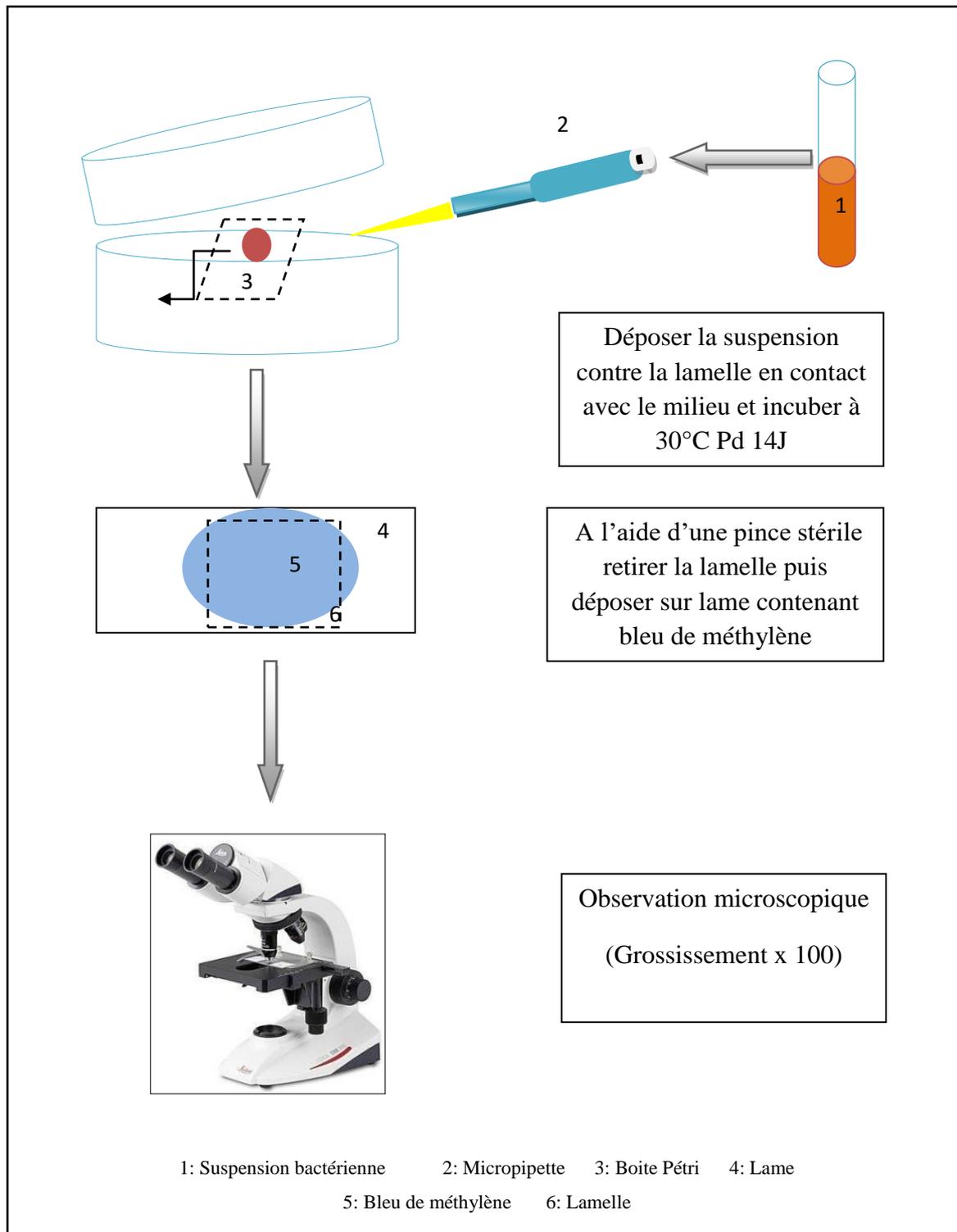


Figure 07. Technique de culture sur lamelle (Holt *et al.*, 1994)

3.3. Conservation des isolats d'actinomycètes

Les colonies d'actinomycètes revivifiées sont ensemencées à nouveau sur milieu ISP3 incliné, incubées à 30°C pendant deux à trois semaines puis conservées à 4°C pour une conservation de courte durée. Un repiquage est réalisé tous les deux mois.

3.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les isolats d'actinomycètes obtenus en culture pure sont testés pour la production de substances à activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries-tests citées précédemment, par deux techniques différents à savoir : la technique des stries croisées et celle des cylindres d'agar.

3.4.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes

Il s'agit d'une observation au microscope optique (Grossissement×100), après coloration de Gram classique.

3.4.2. Préparation de la suspension bactérienne et standardisation

L'inoculum standard des bactéries-testes est préparé comme suit : quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide de l'anse de platine qui est déchargée dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Le tout est homogénéisé et l'opacité de la suspension bactérienne ainsi obtenue doit être équivalente à une densité optique (DO=0,1) (spectrophotomètre GENESYS 10 UV) à une longueur d'onde $\lambda = 610$ nm (**Reghioua, 2006**).

3.4.3. Méthode des stries croisées

Cette méthode consiste à ensemencer les isolats d'actinomycètes en un seul trait à la surface du milieu solide ISP2. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 30 °C. Ensuite, chaque bactérie cible (en suspension), sera ensemencée par une strie croisée perpendiculaire à celle des actinomycètes. L'incubation est faite à 37 °C pendant 24 heures. La production de molécules antibactériennes se traduira par une inhibition partielle ou totale de la souche test (**Oskay, 2009 ; Madigan et al., 2012, Boubetra et al., 2013**). La lecture des résultats s'effectue par la mesure de la distance d'inhibition entre les bordures d'isolat d'actinomycète ciblé et les bactéries testées (Figure 08).

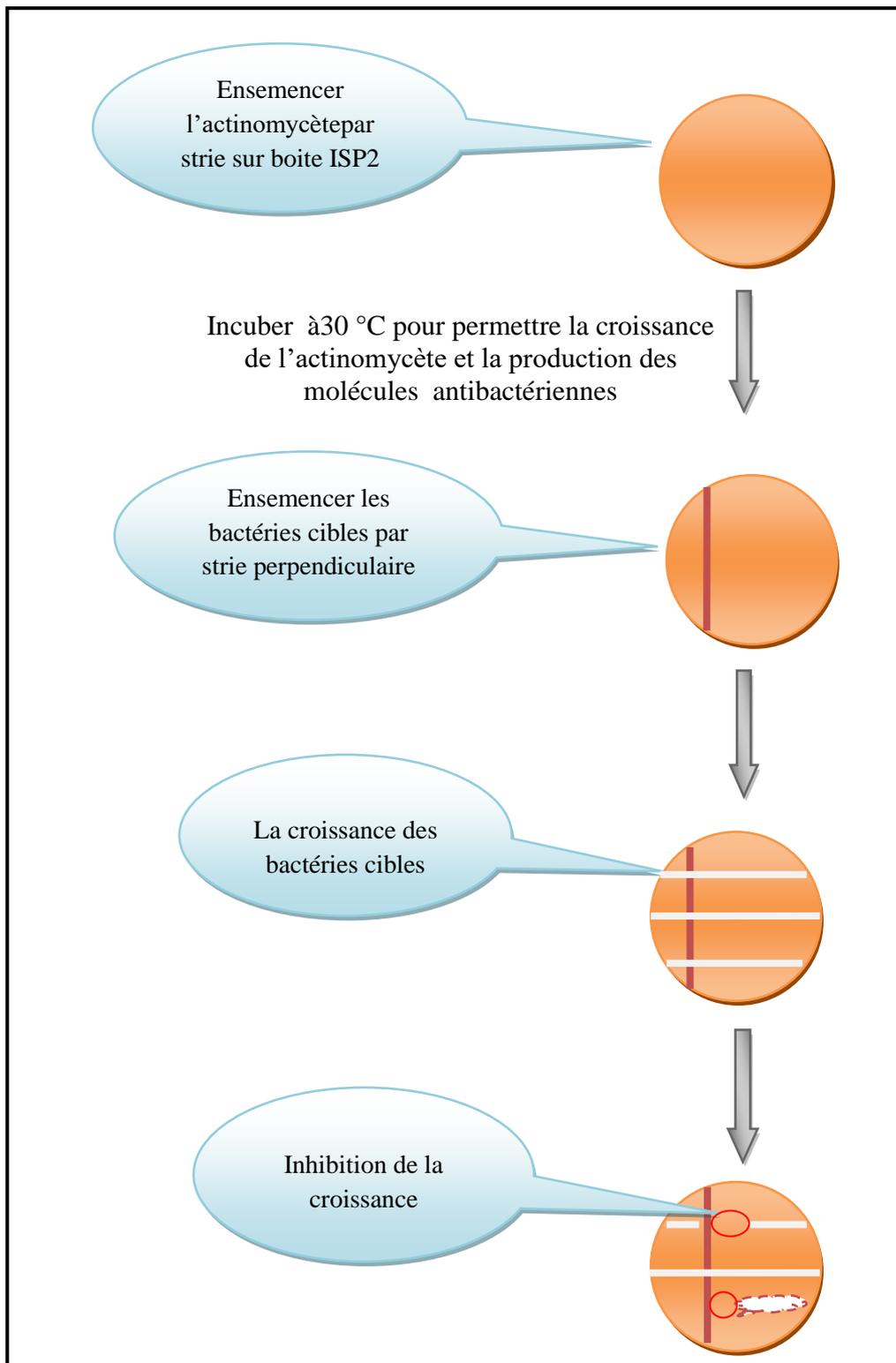


Figure 08. Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu solide ISP2 par la technique des stries croisées (Boubetra et al.,2013).

3.4.4. Technique des cylindres d'agar

Cette technique consiste à ensemencer en stries serrées les isolats d'actinomycètes à la surface du milieu gélosé ISP2. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 21 jours. Après incubation, on prélève à l'aide d'un emporte-pièce stérile des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre et les dépose à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries-tests (Figure 09). Les boîtes ensemencées sont laissées sur la paillasse à température ambiante pendant environ quinze minutes pour permettre une diffusion des molécules actives. Elles sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition apparues entre les bords des cylindres d'agar et les limites des zones où les bactéries-test ne sont pas inhibées sont mesurées (Bastide *et al.*, 1986).

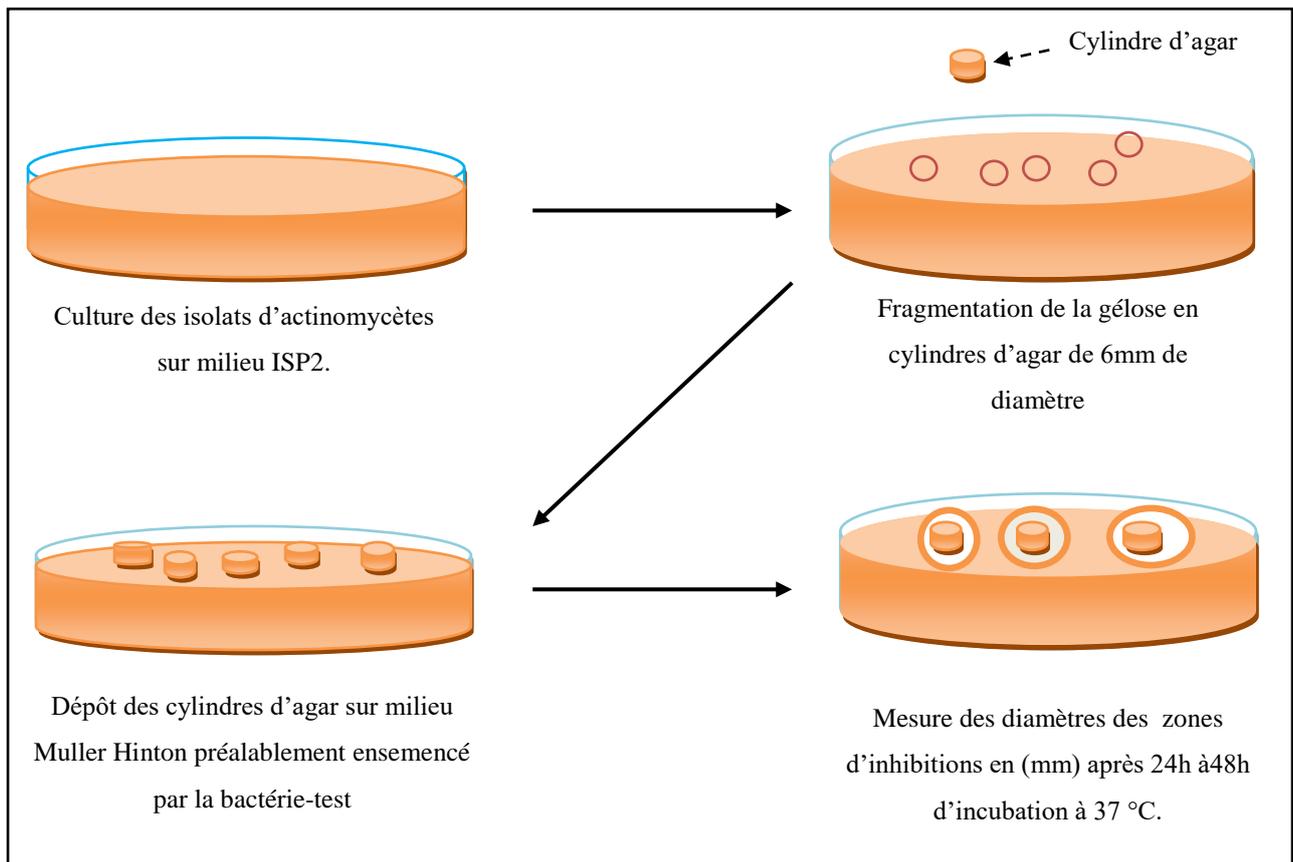


Figure 09. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar (Bastide *et al.*, 1986 ; Lemriss *et al.*, 2003).

Chapitre 02 : Résultats et Discussions

1. Etude morphologique des isolats d'actinomycètes

1.1. Etude macroscopique

Des repiquages successifs sur le milieu de culture Bennett ont été effectués. Après incubation à 30 °C pendant 21 jours, différents caractères macroscopiques à savoir : la croissance, le développement du mycélium aérien et celui du substrat ainsi que la pigmentation sont notés, rassemblés dans le Tableau 05 et illustrés par la Figure 10.

Tableau 05. Caractéristiques culturales des isolats d'actinomycètes sur milieu Bennett.

| Isolat | MS | MA | Pig. Diff. | Aspect de la colonie |
|--------|--------------|---------------|------------|--|
| A1 | Gris | Gris | ± | Plate poudreuse |
| A3 | Beige | Beige | - | Plate poudreuse |
| A4 | Beige | Blanc | - | Plate poudreuse |
| A5 | Beige | Blanc | - | Plate poudreuse |
| A6 | Beige | Beige | - | Plate de petite taille |
| A9 | Gris | Gris | ± | Plate rugueuse |
| A10 | Rose violacé | Violet | + | Légèrement élevée poudreuse |
| A11 | Rose violacé | Beige | - | Elevée rugueuse en chou-fleur |
| A16 | Gris | Gris | - | Poudreuse |
| A19 | Gris | Gris | ± | Plate poudreuse |
| A20 | Beige | Blanc | + | Plate poudreuse |
| A21 | Gris | Gris | - | Incrustée poudreuse |
| A22 | Beige Marron | Beige | ± | Rugueuse élevée en chou-fleur |
| A24 | Beige | Blanc | - | Plate légèrement poudreuse |
| A25 | Beige | Blanc | - | Poudreuse |
| A26 | Beige | Gris | - | Légèrement élevée poudreuse |
| A28 | Gris | Gris | + | Plate poudreuse |
| A30 | Beige | Gris | - | Poudreuse |
| A37 | Gris | Gris verdâtre | ± | Légèrement rugueuse poudreuse |
| A38 | Gris | Gris verdâtre | ± | Légèrement rugueuse poudreuse |
| A39 | Beige | Beige | - | Plate rugueuse |
| A40 | Beige | Blanc | - | Légèrement rugueuse poudreuse |
| A41 | Beige | Beige | - | Plate rugueuse en chou-fleur |
| A42 | Beige | Blanc | - | Incrustée de petite taille poudreuse |
| A43 | Beige | Blanc | - | Rugueuse légèrement élevée en chou-fleur |
| A46 | Beige | Blanc | - | Incrustée légèrement élevée poudreuse |

M.S. : Mycélium de substrat ; M.A. : Mycélium aérien ; **Pig. Diff.**: Pigments diffusibles.

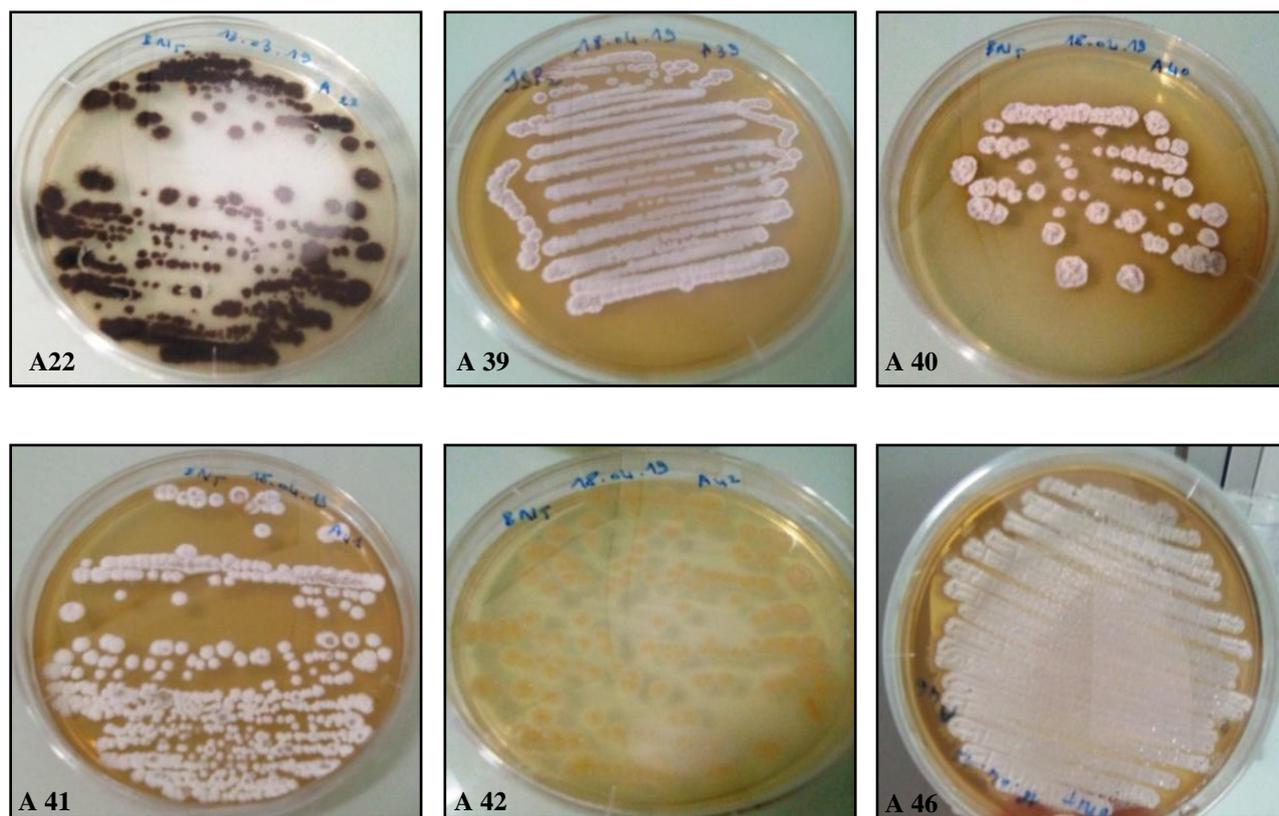


Figure 10. Aspects macroscopiques des isolats d'actinomycètes après 21 jours sur milieu Bennett.

D'après le Tableau 05 et la Figure 10, les isolats des actinomycètes montrent un aspect morphologique très caractéristique. Pour tous les isolats, les premiers stades de la croissance après 3 à 4 jours consistent en l'apparition de colonies pâteuses avec production d'une odeur terreuse. Du 14^{ème} jour jusqu'au 21^{ème} jour d'incubation, la majorité des isolats donnent des colonies poudreuses, crayeuses ou granuleuses de différentes couleurs (blanc, beige, crème, marron, gris, orange et rose), cet aspect est particulier pour les isolats développant un mycélium aérien et ce changement de couleurs correspond à la formation de spores sur les extrémités des hyphes aériens.

L'observation de l'envers de la colonie (dos de la boîte de Pétri) permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat qui peut être (blanc, beige, rouge, orangé, jaune, vert, violet, marron, brun ou noir). Selon **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Les colonies apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, de taille moyenne, poudreuses, régulières ou non, aplaties ou bombées, avec un mycélium moyen aérien et végétatif en général, certains d'entre eux présentent seulement un mycélium de substrat (**Boudemagh et al., 2005**).

❖ Observations par la loupe binoculaire

Pour bien visualiser les structures en place -sans les altérer- (mycélium et fructification) des différentes formes des isolats étudiés, nous avons réalisé des observations par la loupe binoculaire de quelques isolats. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 11.

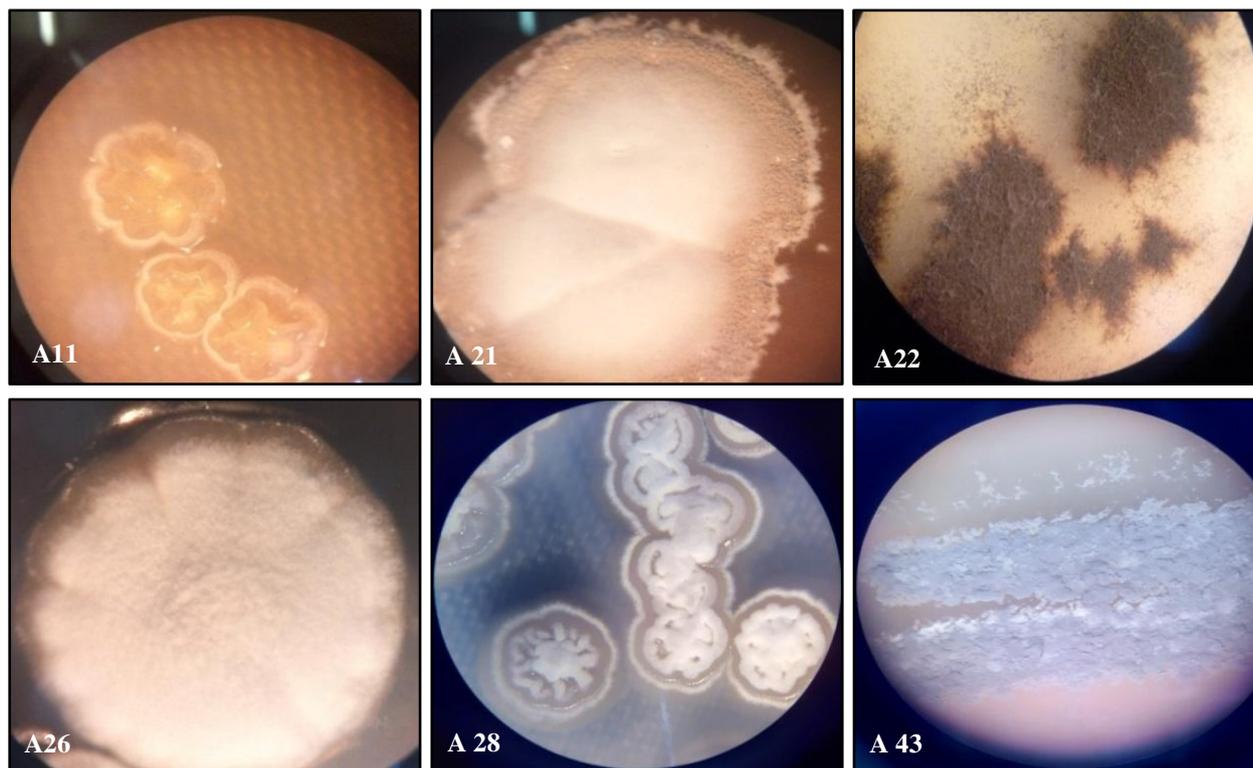


Figure 11. Observation par la loupe binoculaire de quelques isolats d'actinomycètes (G× 04).

Les actinomycètes ensemencés apparaissent de taille moyenne, de forme ronde, de surface sèche, poudreuse, rugueuse,..., d'aspect variable (plate, bombée,...) et de couleurs différentes du mycélium végétatif (beige, marron, jaunâtre, verdâtre) avec une odeur terreuse caractéristique des actinomycètes à croissance lente.

1.2. Etude microscopique

Les isolats d'actinomycètes étaient examinés sous microscope optique à l'immersion pour différencier l'aspect des mycéliums aérien et de substrats et leur organisation après coloration de Gram et culture sur lamelle. L'examen microscopique de quelques isolats est représenté par la Figure 12.

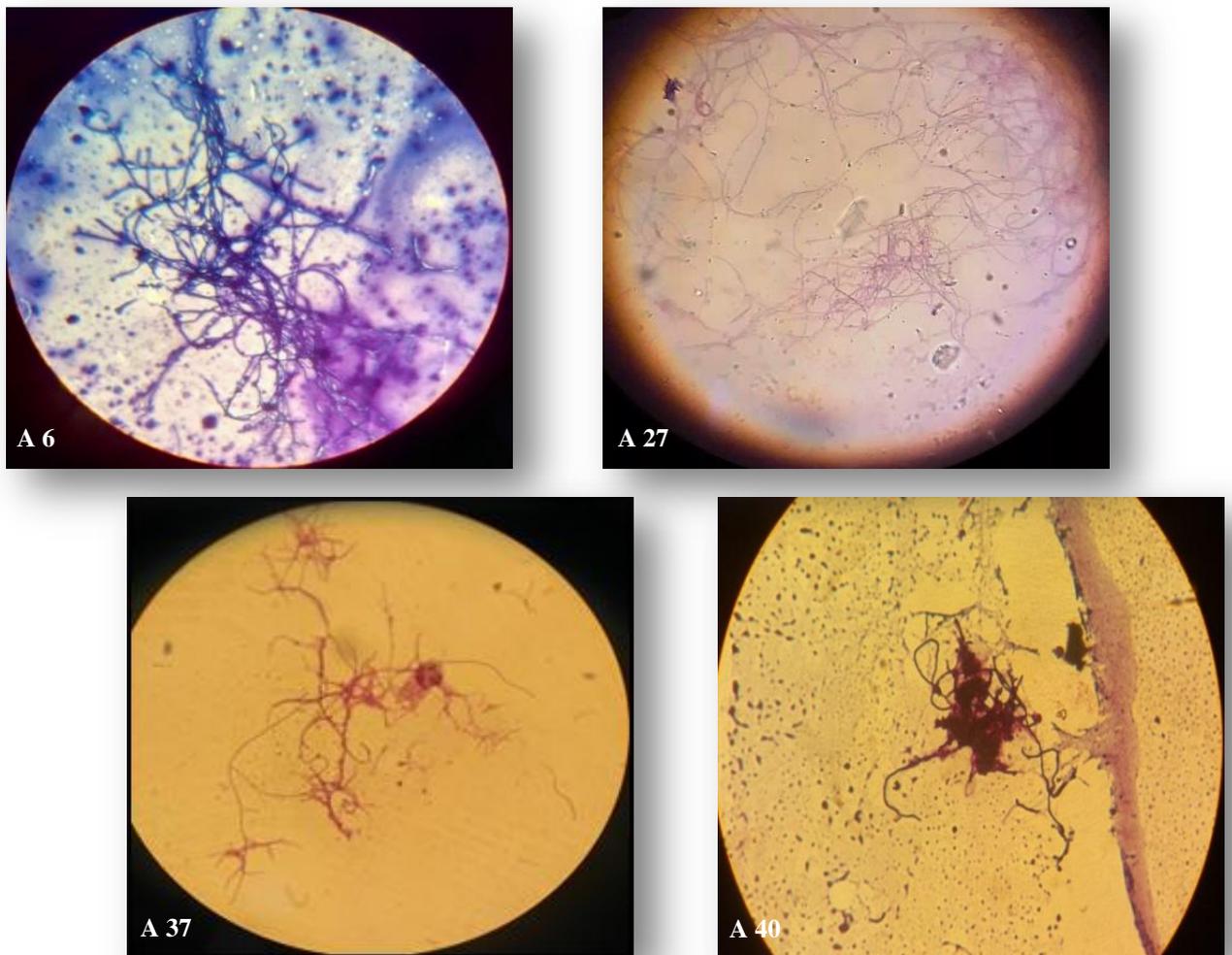
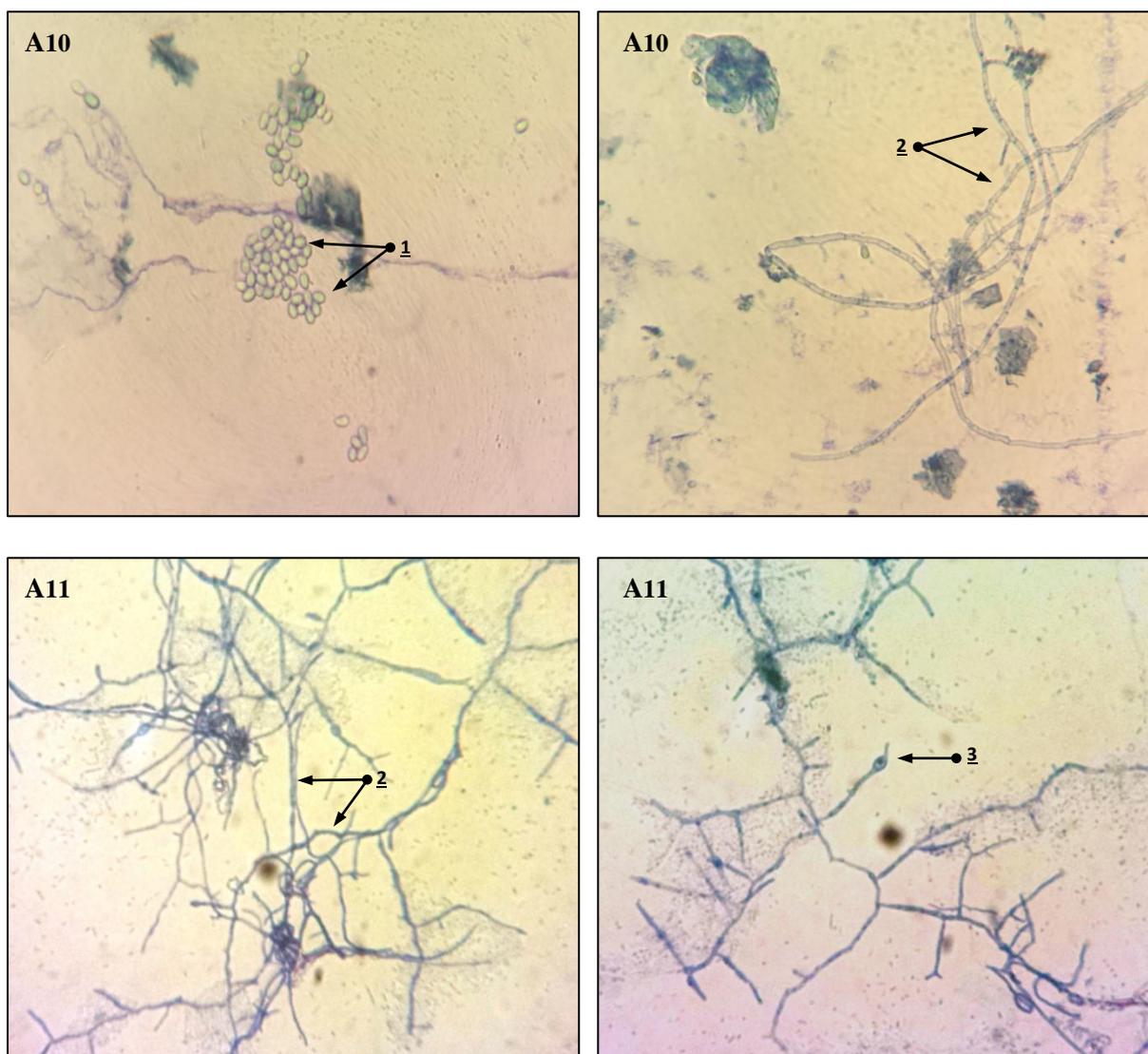


Figure 12. Observation sous microscope optique ($G \times 100$) des filaments d'actinomycètes après colorations de Gram.

L'observation microscopique a révélé que nos isolats d'actinomycètes sont des bactéries Gram+, possédant une forme filamenteuse fines ramifiées et enchevêtrées.

La culture sur lamelle permet une observation du mycélium aérien et de substrat avec les spores sans altérer leurs structures et leurs morphologies. Sur cela, les résultats obtenus après observations au microscope optique, sont représentés par la Figure 13.



1 : Spores d'actinomycètes ; **2** : Filaments d'actinomycètes ; **3** : Formation de spire.

Figure 13. Observations au microscope optique des cultures sur lamelles des actinomycètes après coloration au bleu de Méthylène (Gx100).

La Figure 13 montre que les deux isolats (A10 et A11), développent un mycélium aérien. Ce dernier est épais, plus foncé et moins ramifié que le mycélium de substrat. Il est peu abondant pour l'isolat A10 et très abondant pour l'isolat A11.

L'isolat A11 produit un mycélium de substrat non fragmenté surmonté par un mycélium aérien où l'on note la présence de chaînes de spores (supérieure à 20 spores par chaîne) portées par de courts sporophores. Les chaînes sont disposées en spires (un à deux tours). Les spires peuvent parfois confluer pour former des masses globuleuses.

Les observations microscopiques du mycélium aérien de l'isolat A10 mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés. Tandis que le mycélium de substrat est long, non fragmenté et ne portant pas de spores. Il forme des chaînes de spores où le nombre est supérieur à 20 de forme ovales et ne présentent aucune mobilité.

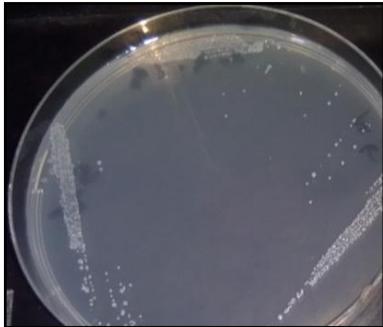
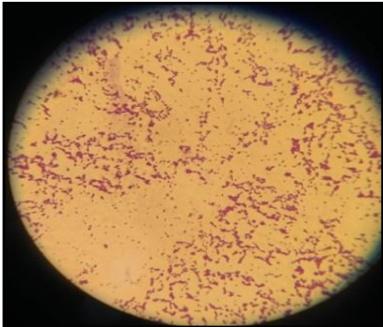
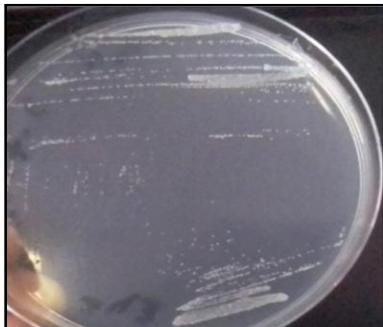
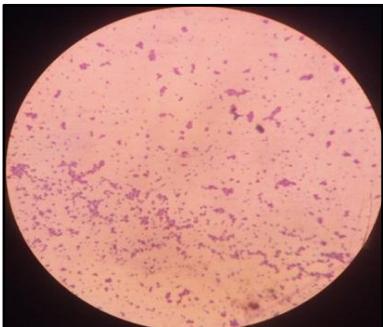
D'après les caractéristiques macros et micro morphologiques ainsi que toutes les spécificités culturales observées pour les isolats, il est possible de les rattacher au genre *Streptomyces*, tel qu'il est rapporté par Goodfellow et al. (2012).

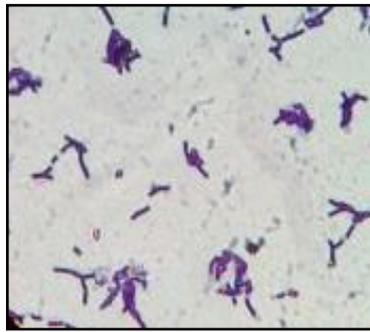
2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

2.1. La vérification de la pureté des souches bactériennes

L'examen macroscopique et microscopique des souches bactériennes testées sont résumés dans le Tableau 06. Les résultats obtenus confirment la pureté de ces dernières.

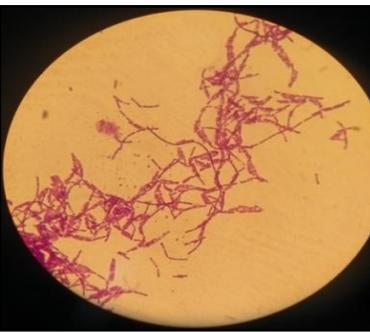
Tableau 06. Aspect macroscopique et microscopique des bactéries-test.

| Aspect macroscopique | Aspect microscopique (Gx100) | Bactérie-test |
|---|---|---|
|  |  | <i>S. aureus ATCC 25923</i> Cocci Gram + regroupés en grappes de raisins |
|  |  | <i>S. aureus ATCC 43300</i> Cocci Gram + regroupés en grappes de raisins |



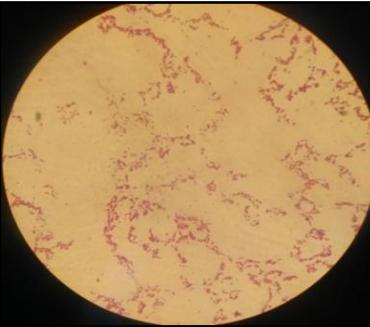
***B. cereus* ATCC 10876**

Grand bacille Gram +
regroupés en chainettes



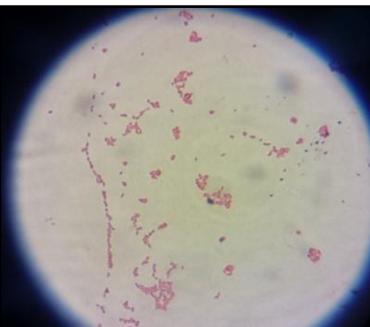
***B. subtilis* ATCC 21332**

Petit bacille Gram +
regroupés en chainettes
sporulés



***E. coli* ATCC 25922**

Coccobacille Gram – de
longueur et diamètre moyen



***K. pneumoniae* ATCC 700603**

Coccobacille Gram –

2.2. Méthode des stries croisées

Le spectre d'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes a été recherché par la méthode des stries croisées vis-à-vis quatre souches de bactéries à Gram positif (*B.cereus*, *B.subtilis*, *S. aureus* 25923, *S. aureus* 43300) et deux souches bactériennes à Gram négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*), afin de sélectionner les isolats les plus producteurs de substances actives. Les résultats sont reportés dans les Figures 14, 15, 16 et 17.

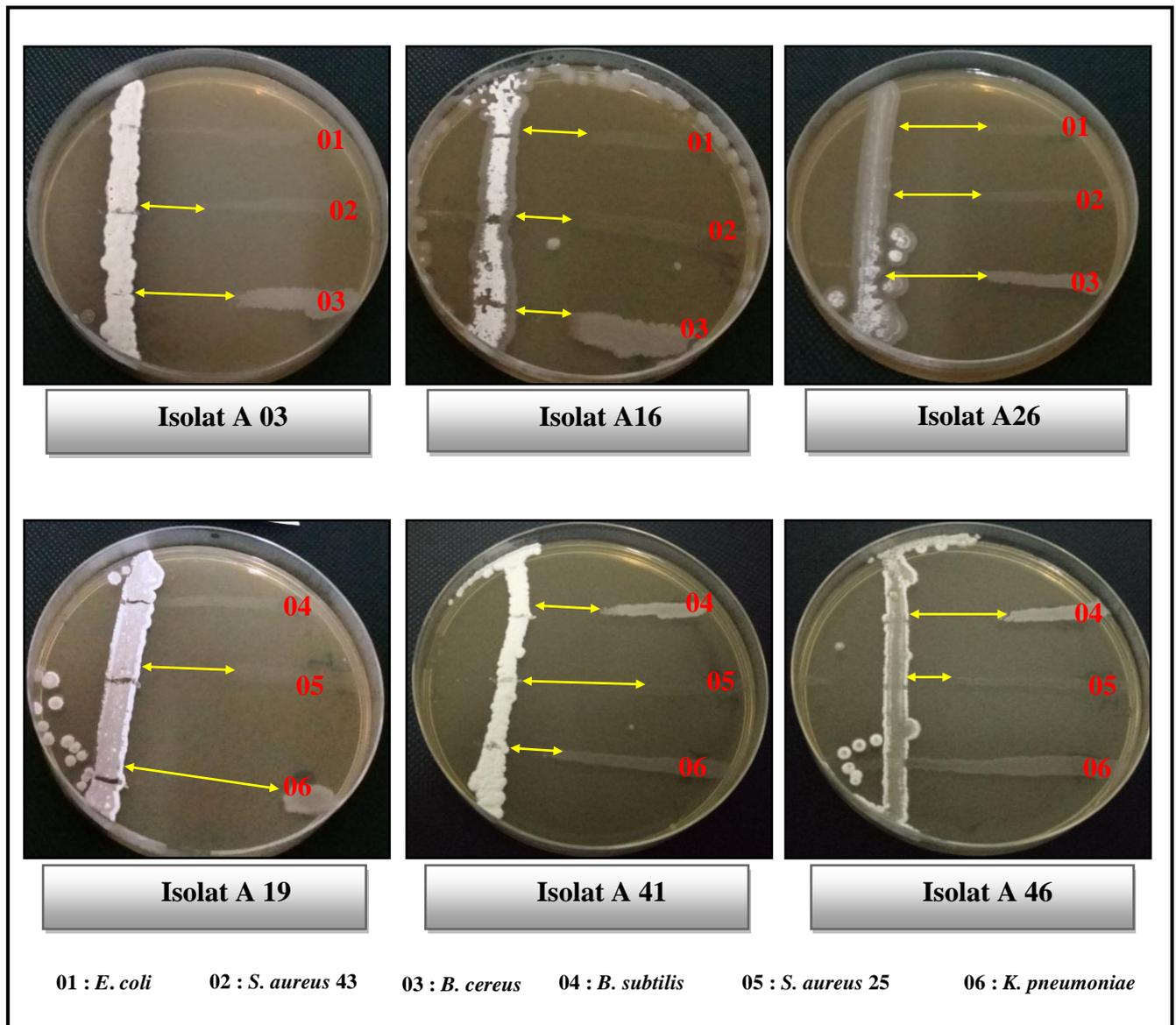


Figure 14. Activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries pathogènes testées par la technique des stries croisées.

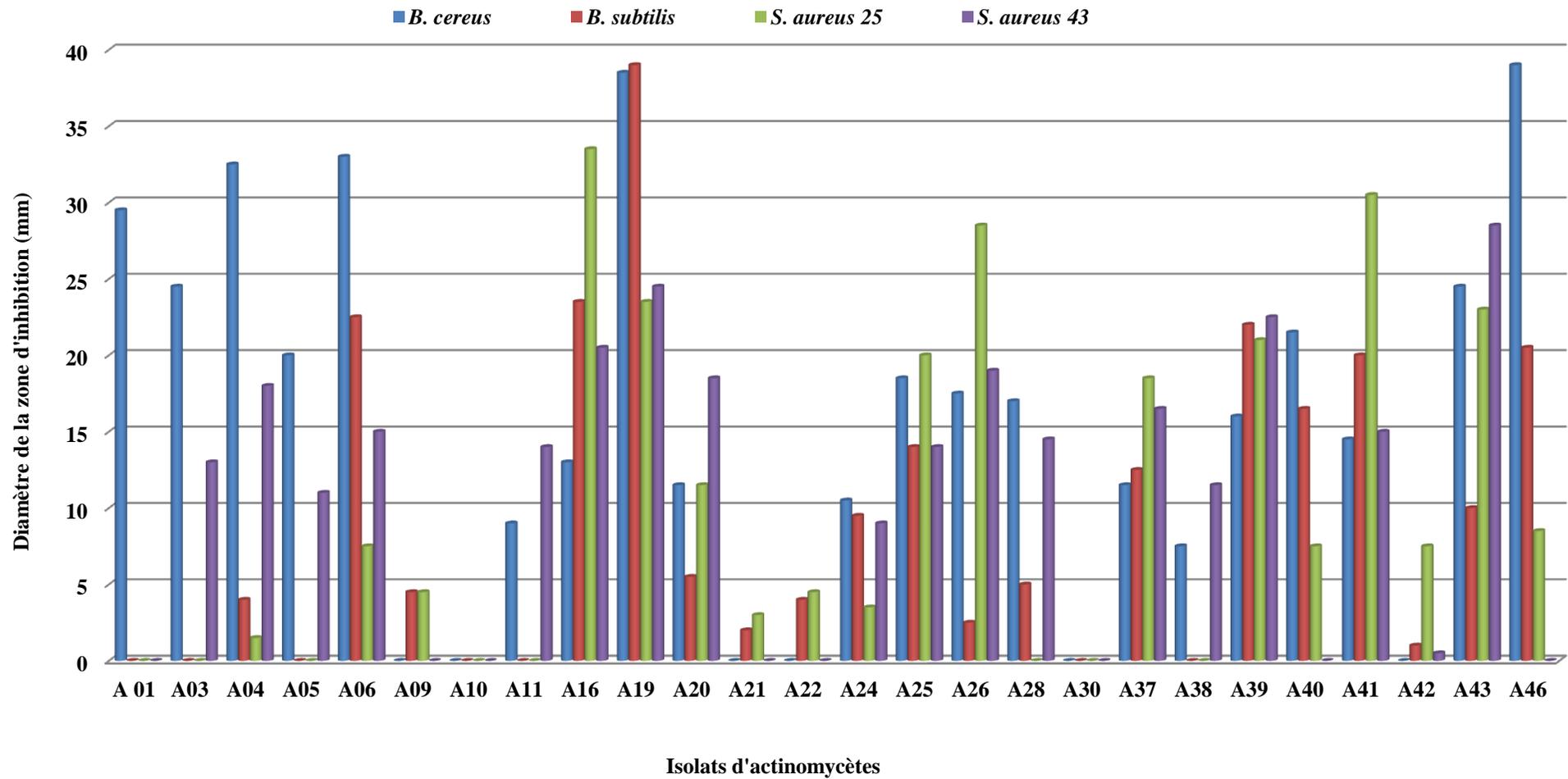


Figure 15. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-test Gram + par la technique des stries croisées.

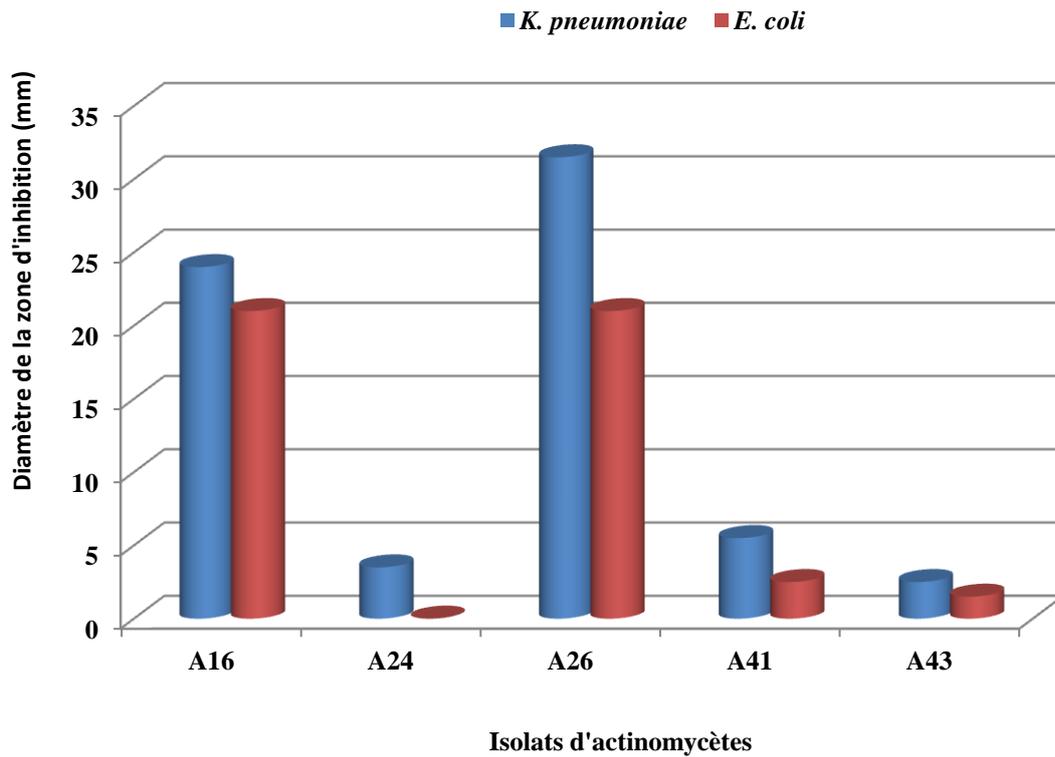


Figure 16. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-test Gram - par la technique des stries croisées.

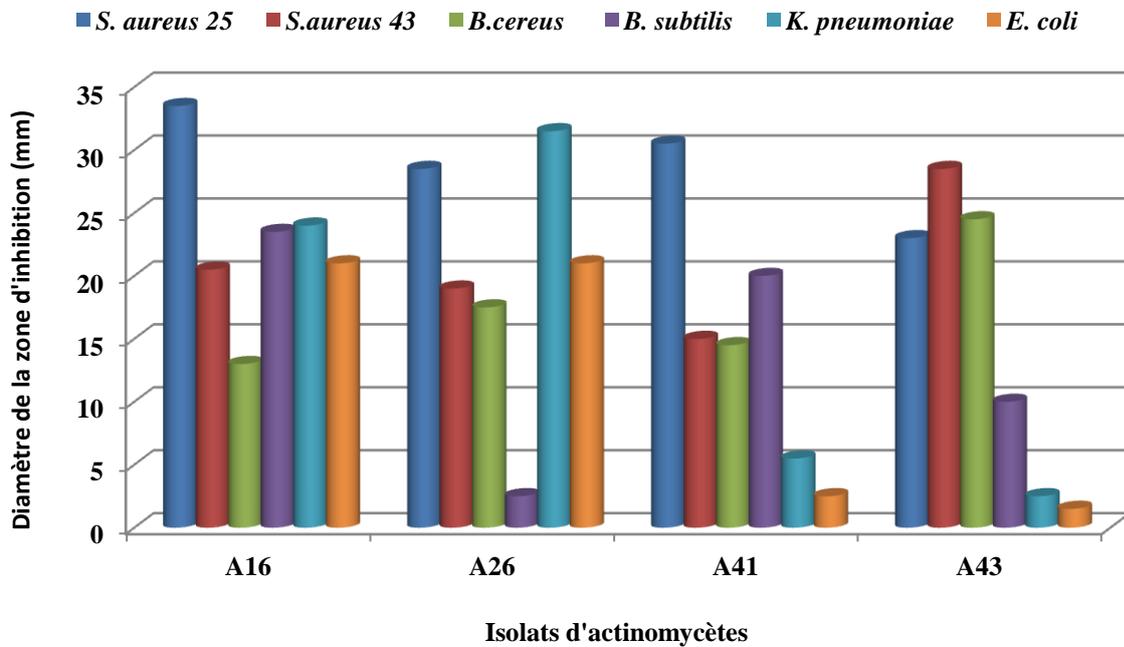


Figure 17. Récapitulatif des isolats actifs sur la totalité des bactéries testées par la technique des stries croisées.

Les résultats obtenus montrent une importante activité antibactérienne vis-à-vis les microorganismes testés par la méthode des stries croisées. Parmi les vingt-six isolats, vingt-quatre se sont montrés actifs envers au moins une bactérie-test avec des zones d'inhibition variables de 0,5 à 39 mm de diamètre, sur le même milieu de culture et d'une bactérie-test à une autre. Tandis que, les deux isolats A10 et A30 n'ont montré aucune zone d'inhibition envers aucune bactérie-test utilisée.

Les douze isolats (A4, A6, A16, A19, A20, A24, A25, A26, A37, A39, A41 et A43) montrent une activité antibactérienne variable sur toutes les bactéries-test à coloration de Gram positive. Alors que, les quatre isolats (A16, A26, A41 et A43) montrent une activité à la fois sur les bactéries-test à coloration de Gram positive et négative. D'autre part, l'isolat A01 produit des molécules bioactives qui ont un spectre étroit et qui agit vis-à-vis une seule bactérie cible *Bacillus subtilis*.

D'après la Figure 15, il apparaît clairement que 20 isolats ont montré une activité vis-à-vis *Bacillus cereus* (soit un pourcentage de 77%), 19 isolats ont montré une activité vis-à-vis *Bacillus subtilis* (soit un pourcentage de 73%) et 18 isolats (69%) vis-à-vis les deux souches de *Staphylococcus aureus*. Ce qui nous amène à dire que *Bacillus cereus* est la bactérie la plus sensible. D'autre part, on note que 05 isolats (19%) présentent une activité envers *K. pneumoniae* et 04 isolats uniquement (soit 15%) envers *E.coli*. On constate donc que nos isolats d'actinomycètes sont plus actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif.

De plus, la plus grande zone d'inhibition (soit 39 mm) est enregistrée par les isolats A19 et A46 vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, respectivement. Par contre, le plus faible diamètre d'inhibition est enregistré par l'isolat A42 (avec 0,5 mm) vis-à-vis *Staphylococcus aureus* 43300. L'isolat A19 montre une forte activité contre les bactéries-test exploitées. Les autres isolats se sont révélés peu efficaces ; certains sont donc fortement ou moyennement actifs, d'autres le sont faiblement.

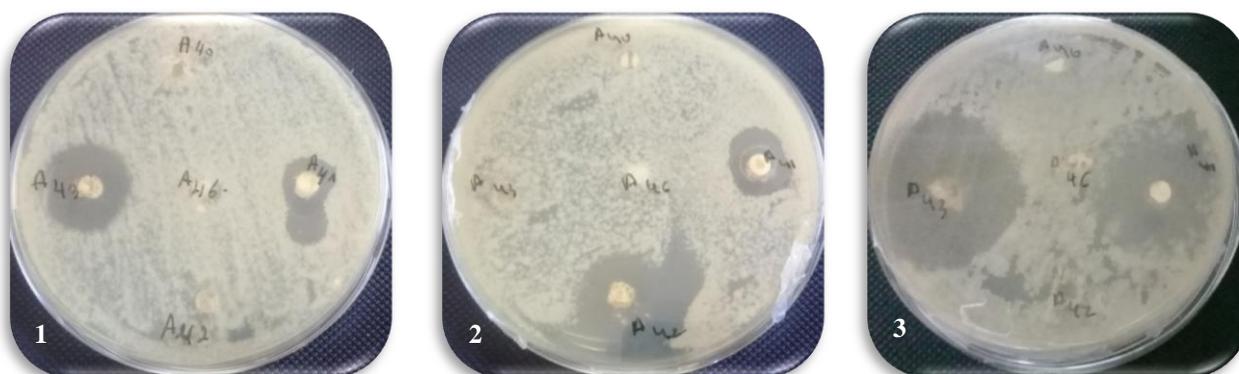
Nos résultats sont semblables avec ceux obtenus par **Elbenday et al. (2018)**, qui trouvent que les bactéries Gram- sont plus résistantes que les bactéries Gram+. Ils sont aussi comparables avec les résultats de **Ghadbane (2014)**, qui prouve que les quatre isolats testés montrent une forte activité contre la plupart des bactéries Gram+. Par contre, les bactéries cibles Gram- se sont montrées plus résistantes. **Boujella et al. (2000)**, trouve que l'isolat *Streptosporangium* possède une meilleure activité contre *B. subtilis* (avec 36 mm de diamètre).

Alliouch-Kerboua1 *et al* (2015), ont étudié l'activité antimicrobienne de l'isolat SM2/2GF isolée du sédiment de la lagune El-Mellah par la méthode des stries croisées et montrent une activité importante contre *B. subtilis* spp. 106094 et une activité modérée contre *S. aureus* SARM ATCC 43300, avec des zones d'inhibitions de 59 et 20 mm de diamètre, respectivement. Les résultats obtenus par Ganesan *et al.* (2016), révèlent que parmi les 106 isolats, l'isolat FMS-20 est le seul qui montre l'activité antimicrobienne la plus élevée contre tous les agents pathogènes (en particulier *B. subtilis*, *S. aureus* et *K. pneumoniae*). Duraipandiyan *et al.* (2012), énoncent que douze souches d'actinomycètes isolées du sol de l'Himalaya et testées pour leur activité antimicrobienne ont montré que 05 isolats sont actifs contre *Bacillus Subtilis*, 04 isolats contre *S. aureus* et 02 isolats contre *E. coli*.

C'est probablement la structure de la paroi cellulaire, constituée principalement de peptidoglycane, qui rend de groupe de bactérie à Gram positif plus sensible aux extraits. Par contre la paroi des bactéries à Gram négatif est formée d'une couche externe composée d'un complexe lipopolysaccharides, des phospholipides et des protéines. Cette couche est une barrière sélective ce qui les rend moins vulnérables aux extraits que les bactéries à Gram positif (Kim *et al.*, 1994 ; Sateesh *et al.*, 2011 et Singh *et al.*, 2016). Plusieurs chercheurs ont aussi observé une résistance remarquable des bactéries à Gram négatif par rapport à leur homologues bactéries Gram positif (Ullah *et al.*, 2012).

2.3 .Technique des cylindres d'agar

Afin de comparer et de confirmer l'activité antibactériennes de nos isolats, nous avons utilisé une autre technique celle des cylindres d'agar. Les résultats de la sensibilité des bactéries testées vis-à-vis les substances bioactives sécrétées par nos isolats sont représentés par les Figures 18, 19, 20 et 21.



1 : *Bacillus cereus* 2 : *Bacillus subtilis* 3 : *Klebsiella pneumoniae*

Figure 18. Activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar.

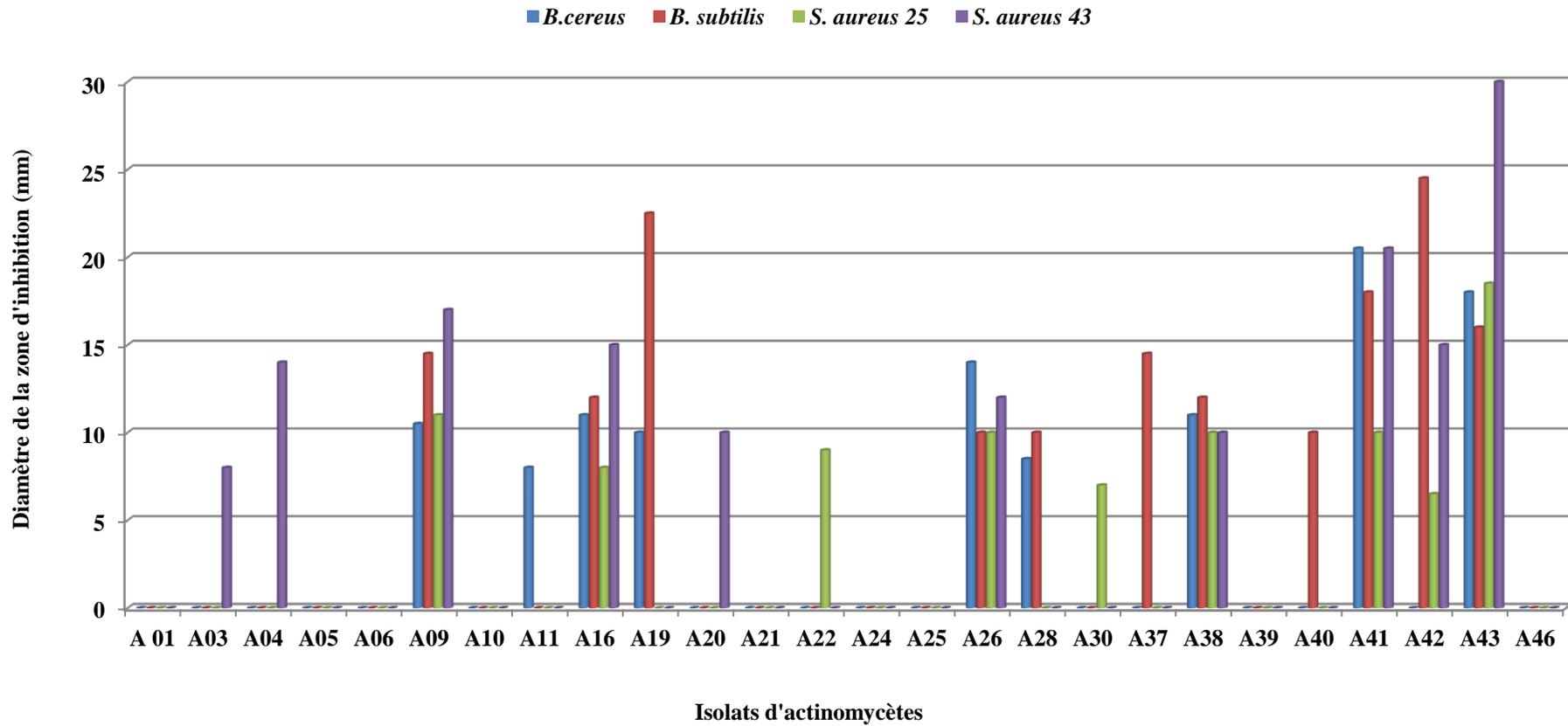


Figure 19. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes sur les bactéries-tests Gram+ par la technique des cylindres d'agar.

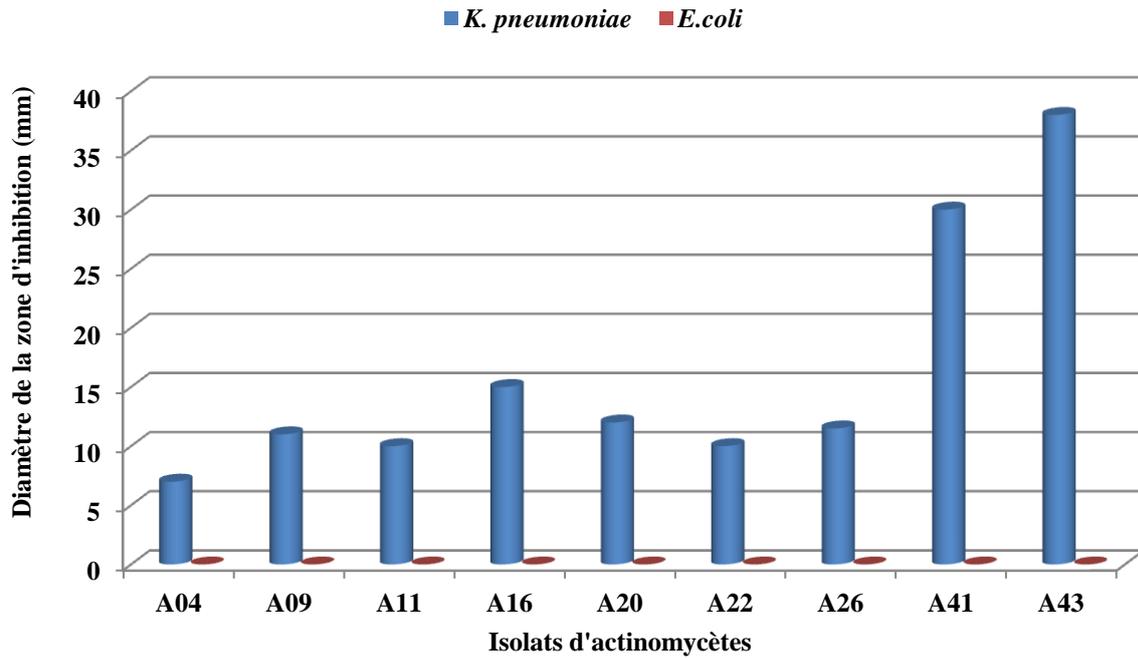


Figure 20. Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries-test Gram- par la technique des cylindres d'agar.

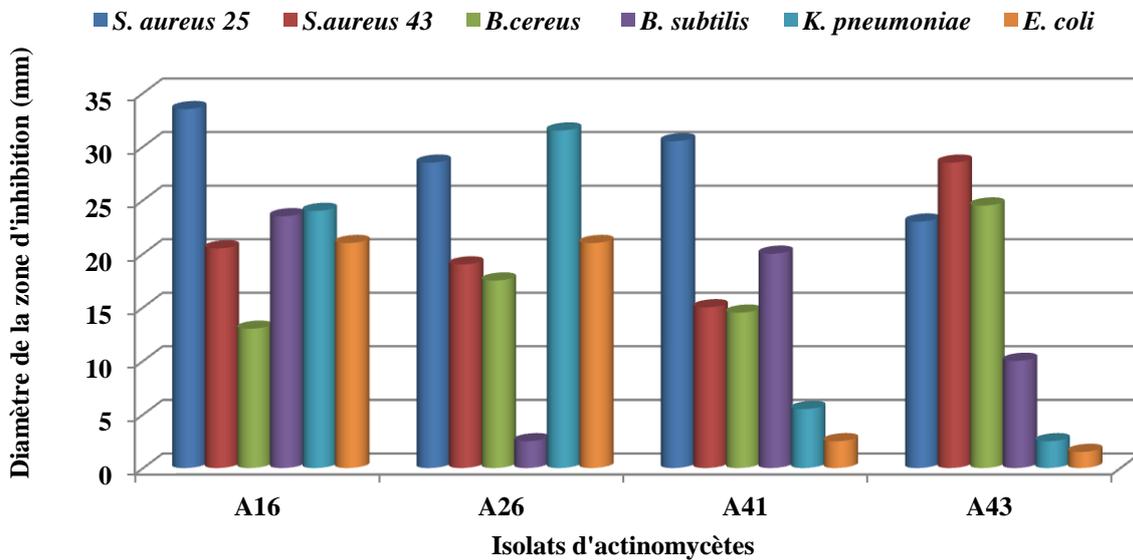


Figure 21. Récapitulatif des isolats actifs sur la totalité des bactéries testées par la technique des cylindres d'agar.

D'après les Figures 19, 20 et 21, les résultats montrent que dix-sept isolats d'actinomycètes parmi les vingt-six; ont une activité antibactérienne sur au moins une bactérie-test avec des zones d'inhibition variables de 6,5 à 38 mm de diamètre, sur le milieu de culture MH. Tandis que, neuf isolats (A01, A05, A06, A10, A21, A24, A25, A39 et A46) ne montrent aucune zone d'inhibition vis-à-vis les bactéries cibles.

D'autre part, six isolats (A09, A16, A26, A38, A41, et A43), montrent une activité antibactérienne variable sur toutes les bactéries-test à coloration de Gram positive. Certains isolats produisent des molécules bioactives avec un spectre étroit qui agit vis-à-vis une seule bactérie cible tels que : A03, A04, A20 sur *S. aureus* 43 ; A11 sur *B. cereus* ; A22, A30 sur *S. aureus* 25 et A37, A40 sur *B. subtilis*.

Il est important de noter que neuf isolats (A04, A9, A11, A16, A20, A22, A26, A41 et A43) inhibent *K.pneumonia* autant que bactérie à coloration de Gram- . En revanche, le pouvoir antibiotique de quatre isolats (A16, A26, A41 et A43) s'étend à toutes les souches bactériennes testées, (Gram + et Gram -) à l'exception d'*E. coli* qui s'avère la plus résistante. Cette action est d'intensité variable selon les souches cibles, ces résultats confirment ceux de la technique des stries croisées. Nous pouvons conclure que ces 04 isolats d'actinomycètes ont un large spectre d'action ce qui rend l'optimisation de la production et de la purification de ces métabolites antibactériens souvent difficile (différentes substance antimicrobienne vis-à-vis de chaque type de bactérie).

On enregistre également la plus grande valeur d'inhibition par l'isolat A43 vis-à-vis *K. pneumoniae* et *S. aureus* 43 avec 38 et 30 mm de diamètre, respectivement. La plus faible valeur est obtenue par les isolats A30 et A42 vis-à-vis *S.aureus* 25 avec un diamètre de 7 et 6,5 mm, respectivement.

Pour cette technique des cylindres d'agar, il apparaît clairement que *Bacillus subtilis* est la bactérie la plus sensible avec un taux de 42% d'isolats d'actinomycètes actifs envers-elle, suivie de *S. aureus* 43 avec un taux de 38 % d'isolats actifs et en dernier lieu *B. cereus*, *S. aureus* 25 et *K. pneumoniae* avec 34 % d'actinomycètes.

Nos résultats sont parfaitement cohérents avec ceux obtenu par **Messaoud (2013)**, qui a isolé 18 actinomycètes à partir de différents échantillons de sol de la sebkha de Kenadsa (Bechar) et qui possèdent une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme test utilisé. Quinze isolats sont actifs contre la bactérie *S. aureus*, suivie par les bactéries *E. faecalis* et *B. cereus* avec 12 isolats actifs pour chacune. Tandis que la plus résistante est *K. pneumoniae* avec cinq isolats actifs seulement.

Harir (2018), montre que sur 32 isolats, 04 isolats présentent le plus important pouvoir inhibiteur antibactérien vis-à-vis des souches indicatrices *S.aureus* et *B.subtilis*. **Valli et al.(2012)**, ont isolé 21 souches d'actinomycètes à partir d'un échantillon prélevé du bord de la mer où tous les isolats étaient capables de produire des substances antimicrobiennes.

Ameur Ghoul et al (2012), ont isolé sept actinomycètes à partir d'un échantillon du sol de Sétif (Algérie), dont une appartient au genre *Streptomyces* et présentent une activité antimicrobienne intéressante. **Gayathri et al. (2011)**, mis en évidence la présence d'activités chez tous les actinomycètes isolés à partir de différents échantillons de sol de la sebkha de Kenadsa et confirment que les actinomycètes isolés à partir des milieux extrêmes en un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des milieux naturels normaux (rhizosphère, eau douce, sol floristique...etc.). **Kitouni (2007)**, annonce que sur les 45 souches d'actinomycètes isolées, seules 17 souches (37,78%) sont actives sur au moins une des bactéries-tests étudiées. Les souches EC1 et EC3 sont actives contre *E. coli* ATCC 12922 seulement et la souche MU 13315 contre *S.aureus*. **Zerizer (2014)**, dit que parmi les 49 isolats cliniques d'actinomycètes aérobies, 45 (soit 91,83 %) sont actifs contre au moins un des microorganismes-tests dont 35 appartiennent au genre *Streptomyces*.

Par comparaison entre la technique des stries croisées et celle des cylindres d'agar, la Figure 22 récapitule le nombre des actinomycètes ayant une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries testées.

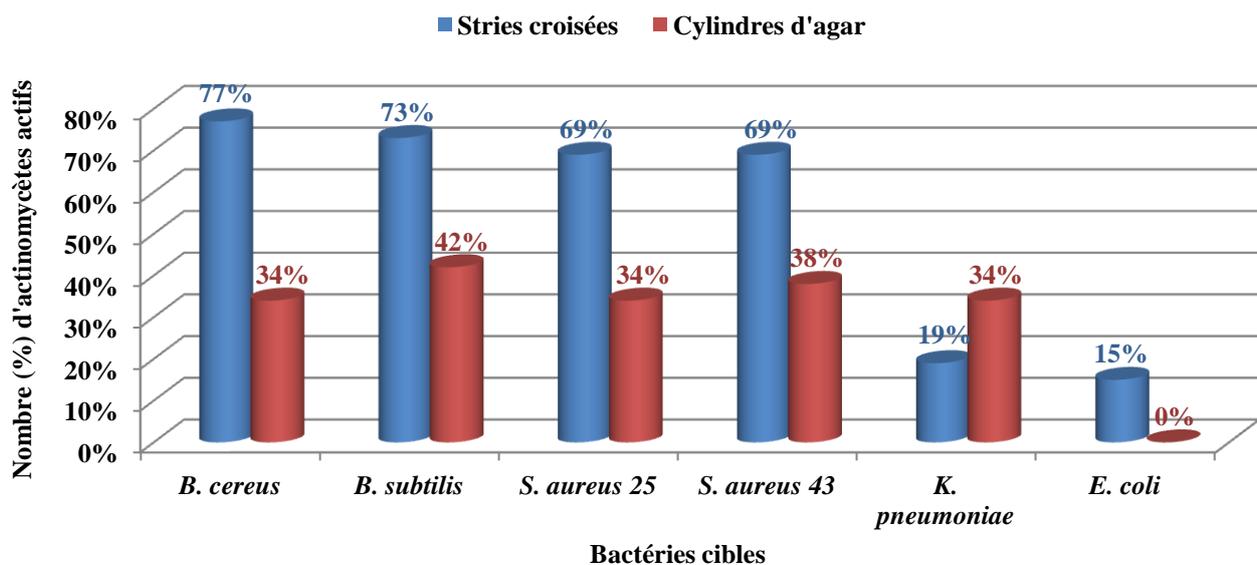


Figure 22. Nombre d'actinomycètes actifs selon la technique utilisée.

Les résultats de la Figure 22 indiquent que la plupart des isolats sont actifs sur les bactéries à Gram positifs (*S. aureus*, *B. cereus* et *B. subtilis*) que sur les bactéries à Gram négatifs (*E. coli* et *K. pneumoniae*) et que la technique des stries croisées a donnée un pourcentage plus important d'isolats actifs par rapport à la technique des cylindres d'agar. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui évoquent 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**). Cette hypothèse peut nous orienter et nous renseigner sur la nature de ces substances antimicrobiennes. Pour ce qui est de la technique utilisée, la méthode des stries croisées est souvent employée comme premier screening de l'activité antimicrobienne selon **Parthasarathi et al., 2010; Ravikumar et al., 2010; Baskaran et al., 2011; Valan Arasu et al., 2012 ; Messaoud, 2013 et Harir, 2018**). C'est une technique simple qui permet de tester l'activité d'une souche d'actinomycète sur plusieurs microorganismes et sur la même boîte de pétri.

Conclusion

Le but de ce travail consiste à sélectionner des isolats d'actinomycètes productrices de substances antibactérienne vis - à- vis des bactéries pathogènes pour l'homme.

Après les tests des propriétés antagonistes de l'ensemble des 26 isolats d'actinomycètes en utilisant des méthodes de criblage : stries croisées sur le milieu de culture ISP2 solide et cylindres d'agar sur milieu Muller-Hinton contre 6 souches de référence dont quatre bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 21332 et *Bacillus cereus* ATCC 10876) et deux autres à Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Escherichia coli* ATCC 25922). Les résultats de l'activité antibactérienne indiquent que la plupart des isolats sont actifs sur les bactéries à Gram positifs, que sur les bactéries à Gram négatifs.

Une intense activité antibactérienne est notée de quatre isolats (A16, A26, A41, A43) qui s'étend à toutes les souches bactériennes testées, (Gram + et Gram -) à l'exception d'*E. coli* qui s'avère la plus résistante par la méthode des cylindres d'agar. Cette action est d'intensité variable selon les souches cibles. Nous pouvons conclure que ces 04 isolats d'actinomycètes ont un large spectre d'action ce qui rend l'optimisation de la production et de la purification de ces métabolites antibactériens souvent difficile.

La technique des stries croisées a donnée un pourcentage plus important d'isolats actifs par rapport à la technique des cylindres d'agar avec 59% et 42%, respectivement. On pourrait donc supposer que la technique des stries croisées est une technique préliminaire pour l'étude de l'activité antimicrobienne surtout lorsqu'il s'agit d'une importante collection de souches à tester. Cette technique devrait être compléter par d'autres techniques telles que la technique des cylindres d'agar, les tests de filtrat de culture,....

Il ressort des deux techniques que : la celle des stries croisées donne uniquement une idée générale des potentialités des isolats d'actinomycètes, leurs résultats sont souvent difficiles à interpréter et considérés comme éléments préliminaires. En revanche, les activités antimicrobiennes des isolats sont mieux exprimées par la méthode des cylindres d'agar. Elles sont d'avantage ciblées et permettent d'apprécier plus précisément le pouvoir antibiotique des isolats d'actinomycètes.

Enfin, l'activité antibactérienne de ces isolats diffère entre les germes cibles utilisés et d'un isolat d'actinomycètes à un d'autre.

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

- L'extraction et la purification des molécules antibactériennes,
- L'identification moléculaire des isolats actifs d'actinomycètes, en particulier l'isolat A16, A26, A41 et A 43.
- L'élargissement des tests antagonistes contre de nombreux germes pathogènes à l'Homme (bactéries ou champignon),

*Références
bibliographiques*

A

- Allouch-Kerboua C, Gacemi Kirane D, La Scola B. (2015). Activité antimicrobienne d'une Actinomycetale isolée d'une lagune en Algérie. *Ann Biol Clin* 73(2) : 176-80 doi:10.1684/abc.2015.1030.
- Agadagba S. K. (2014). Isolation of Actinomycetes from Soil. *Journal of Microbiology Research*, 4(3): 136-140.
- Almaris N. Alonso. (2007). Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytic actinomycete *Thermobifidafusca*. UMI. Pp: 134.
- Ameer H., Ghoul M. et al. (2012). Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in *Streptomyces* sp. SF5. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. Vol 3(3). Pp :545-551.

B

- Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klent HP., Clément C., Ouhdouche Y., et Wezel GP van (2016) Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. *Microbial Mol Biol rev.*, 80 : 1 – 43.
- Baskaran, R. Vijayakumar, R. & Mohan, P. M. (2011). Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 7. N°1. Pp. 26-32.
- Bastide A., De Méo M., Laget M., Duménil G. (1986). Isolation et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyéniques. *Mircen j appl microbiol biotechnol.* 2(4).453-466.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., Lechevalier H.A. (1964). - Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12, 421-423.
- Belyagoubi L. (2013). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen ..
- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. 58(1):1-26.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.-P. and Sabaou N. 2013. *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 549-553.
- Bouali H., Hamza K., Bouras N., Aouiche A., Meklat A., Mokrane S., Hamza K. Et Sabaou N. juin (2017). Effet de milieux de culture sur la croissance et la production de chloramphénicol chez deux souches de *saccharothrix* sppal 54 et pal 42 isolées d'un sol palmeraie de ghardaïa. vol. 7, n°1: 71-83
- Boucheffa K. (2010). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits . mémoire de magister

- Boudjelal-bencheikh .F.(2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus*sp. AH97 .Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Ecole nationale supérieure agronomique .El-harrachalger.
- .Boudjella, H, MostefaouiA,Gaour ,A,etSabaou .(2000).isolement sélectif des actinomycètes des sols sahareines sur trois milieux de culture et recherche des genres *Planomonospora* et *Streptosporangium* ,XIIèmes Journées Nationales de Microbiologie , les 10 et 11 Avril 2000 à constantine .
- Boudjella. H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach – Alger.]
- Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, OulmiL, Reghioua S, et al. (2005) Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south-east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Mycol Med*;15:39—44.
- Bourass, N . (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.

C

- Collins MD., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin DE. (1977). Distribution of menaquinones in Actinomycètes and Corynebacteria. *J Gen Microbiol.*, 100: 221-230
- Conn, V.M. (2005). - Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 29.
- Cox.P. W, Paul. G. C & Thomas. C. R. (1998). Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*. Vol 144. Pp: 817–827.
- Crawford D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps, et M.A. Ousley. (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59:3899–3905.

D

- Astager S, Dayanand A, Li WJ, Kim CJ, Lee JC, Park DJ, et al (2008). Proteolytic activity from an alkalithermotolerant *Streptomyces gulgubargensis* sp. nov. *Curr Microbiol*; 57(6):638–642.
- De Jager D, Sheldon M, S.E. Edwards W. (2009). Modelling growth kinetics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in a pressurized membrane gradient reactor (MGR). *Enzyme and Microbial Technology* .45;449-456.

- Delaunay S., Rondags E. et Germain P. (2003). Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique. J 6 008 1-12.
- Dellaras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, Tec & doc Lavoisier. P: 492
- Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol Adv*, 18(6): 499-514.
- Dommergues Y. F, Mangenot (1970) Ecologie microbienne du sol. 3ème édition Paris. P : 24-28.
- Duraipandiyar V. a, Sasi A.H. , Islam V.I.H., Valanarasu M. , Ignacimuthu S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale* vol 20, 15-20.
- Duraipandiyar V. a, Sasi A.H. Sasi b, V.I.H. Islam a, M. Valanarasu a, S. Ignacimuthu a. (2012). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale* .20, 15—20.

E

- Elbendary A.A., Hessain, A.M. El-Hariri M.D., Seida A.A., Moussa I.M., Mubarak A.S., Kabli S.A., Hemeg, H.A. El Jakee. J.K., Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples, *Saudi Journal of Biological Sciences* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>.
- Elwan, S.H. Diab, A. Al-Gounain, M.Y. 1985. Ecology of the Streptomyces flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:99-104 ..
- Euzéby J.P. (2011). - List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. Genera: *Nocardiosis*, *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Actinobolus*. (<http://www.bacterio.cicct.fr/>).
- Eveillard M. (2007). Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat à université d'Angers.

F

- Freney J, Renaud F, R. Leclercq, and Riegel P. (2007). *Précis de Bactériologie Clinique*. 1001-1014. 649-665.

G

- Gaillard S, Leguérinel L, et Mafart P. (1998). Modelling combined effect of temperature and PH on the heat resistant of spores of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 32: 255-233.

- GanesanPathalam a, Appadurai Daniel Reegana,b, Rajendran Host Antony David a, Munusamy Rajiv Gandhi a, Michael Gabriel Paulraj a, Naif Abdullah Al-Dhabi c, SavarimuthuIgnacimuthu. (2016) .Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. Alexandria Journal of Medicine , 53, 101–110.
- Gayathri A; Madhanraj P; and Panneerselvam A.(2011). Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. Asian J. Pharm. Tech. Vol: 1. N° 3. Pp: 79-81.
- Gerber N.N. and Lechevalier H.A. (1965). - Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. Appl. Microbiol., 13, 935-938.
- Goodfellow, M., Fiedler, H.P., 2010. A guide to successfulbioprospecting: informed by actinobacterialsystematics. Antonie van Leeuwenhoek, 98, 119–142. [
- Goodfellow .M. et Williams S.T. (1983). - Ecology of *actinomycetales*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.
- Goodfellow .M.Stach .J.E.M .Brown.R.Bonda .A.N.Jones .A.L.Mexson .J.Fielder .H.P.Zucchi .T.D.Bull.A.T.Verrucosispora Maris .sp. (2012) .nov.a novel deep .sea .actinomycète isolated from a marine sediment which produces Abyssomicins .Antonie van leeuwenhoek .101.185.193.
- Gottlieb, D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press, London, New York.
- Gottlieb, D. (1976). The production of antibiotics in soil. J. Antibiot. 29: 987-1000..
- Grigorova R.; Norris J. R. (Editors)., 1990. Techniques in microbialecolgy. Methods in Microbiology, Vol. 22. AcademicPress, London, pp: 627.
- Guiraud, J, P. (2003). Microbiologiealimentaire. Paris :Dunod. Pp. 696.

H

- haas.D.(2015).Metabolisme secondaire de streptomycetesambofaciens : Exploration genomique et etude du groupe de genes Dirigeant la synthese du sphydrofurane. Thèse de doctorat . Université paris-sud École doctorale 426 : Gènes génomes cellules
- Habbeche A, Saoudi B, Jaouadi B, Haberra S, Kerouaz B, et al. (2014) .Purification and biochemical characterization of a detergent-stable Keratinase from a newly thermophilicactinomyceteActinomadurakeratinilytica strain Cpt29 isolated from poultry compost. J BiosciBioeng 117: 413-421.
- Hadbane. M, (2014). Microflore rhizosphérique de quelques Fabacées (légumineuses) endémiques dans les régions de Boussaâda et de Biskra (Algérie). Thèse de doctorat.
- Harir. M.(2018).Caractérisation des molécules bioactives produits des souches d'actinobactéries isolées des sols arides e semi arides d'Algérie. Thèse de Doctorat.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determination. Bacteriol. 9th ed.

- Hopwood DA. (2007). Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford Ed.

J

- Janaki T.(2016). Keratinase activity (Feather) of *Streptomyces cacaoi subsp. cacaoi-M20*. Int Journal of PharmaSci and Research, d, 1(2); 25-27.
- Janaki.T. 2017.Enzymes From Actinomycetes – Review . International Journal of ChemTech Research,10(2): 176-182.

K

- Kassis-chikhani.N.(2012).*Klebsiellapneumonia*Pathogene nosocomial resistance et virulence. These de doctorat de L’universite pierre et marie curie paris 6.
- Kalakoutski, L.V. et Agree, N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. Bacterial. Rew; 40: 469-525. π
- Kampf,P ; HJ Busse ; BJ Tindall;MNimtz& W Grün (2010) Nonomuraeaeosp. Nov. Int. J. Syst.Evol. Microbiol. 60: 1118–1124.
- Kaur T., Sharma D., Kaura A., and Manhasa R.K., (2013) Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes, *Archives OfPhytopathology And Plant Protection*, 46: 1756–1768.
- Keulen, G.V., Jonkers, H.M., Cloesson, D.L.D., Woston H.A.B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 185 (4): 1455–1458.
- Khayar ,Y.(2011).Comportement des enterobacteriesisolees des urines vis-à-vis de l’amoxiciline . acideclavulaniquel’impeneme et l’ertapeneme .Thèse de doctorat .
- Kim, C., Lee, K., Kwon, O., Yoo, I., and Shimazu, A. (1994). Selective isolation of actinomycetes by physical pretreatment of soil sample. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 222–225..
- Kitouni. M. (2007). Isolement de bactériesactinomycétalesproductricesd’antibiotiques à partird’écosystèmesextrêmes. Identification moléculaire des souches actives etcaractérisationpréliminaire des substances élaborées. Thèse doc: universitéMentouriConstantine. Pp : 176.
- Kurtböke DI. (2012).Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. ApplMicrobiol Biotechnol.;93:1843-52.

L

- Lamari, L,(2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d’actinomycète, *Saccharothrixalgeriensis*. ThèsedeDoctorat. UniversitéMouloudMammeri de TiziOuzou.
- Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 2, 231-51.

- Larpent, J.P. et Larpent- Gourgaud, M., (1985). Manuel pratique de microbiologie. Herman. Paris.
- Le Minor , L and Véron M. 1989. Bactériologie médicale, 2ème édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2:428-432.
- Lechevalier&Lechevalier, 1970(a). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Vol : 20. N°: 4. Pp. 435- 443.
- Lechevalier MP, Lechevalier HA.1980. The chemotaxonomy of actinomycetes, p 225–292. In Dietz A, Thayer DW (ed), Actinomycete taxonomy, vol A6. Virginia Society of Industrial Microbiology, Arlington, VA
- Leclers, H, Gaillard JL ; Simonet. M. 1995. Microbiologie générale. la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeur , Paris.
- Lemriss . S. Laurent. F. Couble. A. Casoli . E. Lancelin . J.M . Saintpierre-Bonaccio . D . Rifali. S. Fassouane. a. Boiron. p. (2003). screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes . Canadian journal Microbiology. 49(11) .669-74.
- Limkhada, J.R. ; Mander, P. ; Cho, S.S. and Yoo, J.C. 2010. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Proc Biochem*. 45: 88-93.
- Lindholm , P., Kortemaa , H., Kokkila, M., Haahtela , K., Salkinoja-Salonen , M ., Valkonen , J.P.T , 1997. *Streptomyces* ssp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland . *Plant Dis*, 81(11) :1317-1322.
- Locci R, Sharples G. 1984. Morphology, p 165–199. In Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (ed), *The biology of Actinomycetes*. Academic Press, London, United Kingdom
- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987;51:88–134.

M

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). “Antibiotics: isolation and characterization,” in *Brock Biology of Microorganisms*, 8th Edn., ed M. T. Madigan (New Jersey: Prentice-Hall International Inc.), 440–442.
- Madigan M.T., Martinoko J .M. Stahl D. Clark D.P .2011.. *Brock biology of microorganism* .13th Edition Hardcover .ISBN.-13:978-0-321-64963-8.
- Madigan M.T. Martinoko J .M .Stahl D .A. Clark D.P .2012.. *Brock biology of microorganism* .13th Edition Hardcover .ISBN.-13:978-0-321-64963-8.
- Mariat F., Sebald M. 1990. Actinomycétales.. *In*: Le Minor. L., Véron M. *Bactériologie médicale. Médecine-Sciences. Flammarion. France*. Deuxième partie : 933-999.
- Messaoudi. O. 2013 . contribution à la caractérisation de souches d’actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkhia de kenadsa (becher), Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen .p 03.

- Misato T. (1982). - Present status and futur prospects of agricultural antibiotics. *J. pest. Sci.*, 7, 301-305.
- Mukhtar S, Zaheer A, Aiysha D, Malik KA, Mehnaz S .2017. Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *J Proteomics Bioinform* 10: 316-319. doi: 10.4172/jpb.1000456.

O

- Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, 3(9), 441–446.
- Oskay M. (2009). Antifungal and antibacterial compound from Streptomyces strains. *Afr J Biotechnol.* 8 (13): 3007-3017.

P

- Pandey, A., Nigam, P. Soccol, C.R. Soccol, V.T. Singh D. Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.*; 31(2):135–152. 7.
- Parthasarathi S., Kim C.J., Lee J.C., Sathya S., Manikandan M., Manikandan T. and Balakrishnan K. (2010). - Taxonomic characterization and UV/VIS analysis of antagonistic marine actinomycete isolated from South Pacific Coast of Philippines. *Int. J. Med. Res.*, 1, 99-105.
- Perry J. J.; Staley J. T.; Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod, Paris. 497–498.
- Polpass, A et al., 2014. Characterization of Antibiotic Producing Rare Actinomycete *Nonomuraea* sp. JAJ18 Derived from an Indian Coastal Solar Saltern. Department of Molecular Microbiology, School of Biotechnology, Madurai Kamaraj University. 7 : 1 7.
- Prescott.M.B. Conger.S.A.(1995). Information technology innovation: a classification by IT locus of impact and research approach , *ACMSIG MIS Database: the DATABASE FOR Advances in information systems* ,26(2-3),20-41.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein D.A. (2007). *Microbiologie*. De Boek&Larcier, Bruxelles:805–825 Prescott, L., Harley , J.P., Klein D.A. 2003. *Microbiologie tome II*. De Boeck (Berlin) ,2éme édition, pp539.
- Prescott, L., Harley , J.P., Klein D.A.(2003). *Microbiologie tome II*. De Boeck (Berlin), 2éme édition, pp539.
- Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A.(2010). *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088. •
- Procópio. R.E, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *Braz. J. Infect. Dis.* 16(5):466 -471.

R

- Rajagopalan G. Krishnan C.(2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Biores Technol.*; 99:3044–3050.

- Ravikumar .S .Krishnakumar .S.Inbaneson .S.J.Gnanadesigan .M. (2010).Antagonistic activity of marine actinomycètes from Arabin Sea coast .Archives of Applied science research . 2(6).273-280.
- Reghioua, S.Boughachiche,F.Zerizer,H.Oulmi,L.Kitouni,M.Boudemagh,A.Boulahrouf ,A..(2006).Activitéantibactérienned’actinomycètesraresisoléesd’échantillons de sol aride du Sud-est Algérien.Antibiotiques.8: 147-152.
- Remya, M, Vijayakumar ,R , (2008) , Isolation And Characterization Of Marine AntagonisticActinomycetesFrom West Coast Of India , FactaUniversitatisSeries: Medicine and BiologyVol.15, No 1, pp. 13 – 19

S

- Sabaou, N.1988.Contribution à l’ etude des Actinomycetes , 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.
- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A. et al., 1998. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d’actinomycètes rares producteurs d’antibiotiques. Sécheresse, 9, 147–153..
- Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. (1993). Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, 144 (8), 633-642
- Sastrahidayat I.R., Djauhari S., Prasetya B., and Saleh N., (2011) Biocontrol of dampingoff disease (*Sclerotiumrolfii*SACC.) using Actinmycetes and vam fungi on soybean and impact to crop production and microorganism diversity in rhizospher zone, *Inter.J. Acad. Res.*, 3:114–119 .
- Sateesh V., NaikpatiletRathod J.L., (2011) Selective isolation and antimicrobialactivityofrareactinomycetesfrom mangrove sediment of Karwar. Journal of Ecobiotechnology., 3: 48-53.
- Schäfer, J., Jäckel, U., Kämpfer, P. (2010). Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS MicrobiolLett*, 311(2): 103–112.
- Schmid .RD. 1998. and Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int.* 37: 1608-1633.
- Scribian .R.1993 Biotchnologie.4^{ème}edution .Technique et documentation-lavoisier.Paris.
- Sharma, M.Dangi.P and Choudhary.M. (2 014).Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. Vol .3,n°2:_812
- Shirling E. B et Gottieb D.,1966. Methods for characterization of Streptomyces species.*International journal of systematic bacteriology.*,16(3): 313-340.
- Silva.M.S, Sales. A. N., Magalhães-Guedes .K.T., E. S. Dias, and Schwan R.F..BrazilianCerrado Soil Actinobacteria Ecology.2013.VO2013, Article ID 503805, 10 pages .
- Singh V. Haque S .Singh H. Verma J. VibhaK . Singh R. Jawed R. Tripathi. C. K. M .2016.Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications.Vol 07 .01.921

- Solanki,R. KhannaM .Lal R.(2008).Bioactive compounds from marine actinomycetes.Indian J. Microbiol.48:410–431.
- SoleckaJ.Zajko J .Postek M .RajniszA .(2012).Biologically active secondary metabolites from actinomycètes .Central European Journal of biology 7.373-390.
- Stackebrandt E. and Woese C.R (1981). The evolution of procaryotes. Synopsia of the society for generalmicrobiology, 32, 1-31.
- Stachebrandt ,E.,Rainey ,S.,Ward-Rainey ,N.L.1997.Proposal for a new hierarchic classification system ,Actinobactériaclassisnov . Int J SystEvol M icrobiol , 47(2) : 479-491
- Stanek . J.L, et G.D. Roberts.2008 .Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography .n° 2, 28(1974):226-31.
- Strub C..Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France.
- SuzukiC. and Nikkuni S. (1994). - The primary and subunit structure of a novel type killer toxinproduced by a halotolerantyeast*Pichiafarinosa*. J. Biol. Chem., 269, 3041-3046.

T

- Taibi Z. Saoudi B. Boudelaa M. Trigui H. Belghith H. Gargouri A. et al. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura sp.* strain Cpt20 isolated from poultry compost. ApplBiochemBiotechnol 2012; 166(3):663–679.
- Tenailon O. Skurnik D. Picard B .Denamur E .2010.The population genetics of commensal *Esherichia coli* .Nat Rev Microbiol .08,201-217.doi 10.1038/nrmicro 2298.
- Theilleux J.1993. - les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.
- Tokala, R. K., J. I. Strap, C. M. Jung, D. L. Crawford, M. H. S. Love, L. A. Deoblad, J. F. Bailey et M. J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68: 2161-2171
- Tortora. 2003. Introduction à la microbiologie. septième édition. p 352-353.

U

- Ullah, I, Masood Arshad. M, Chuadhry. I. J. M, Noureen. U, Jadoon. W. A; Jadoon. M. A. 2012. Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. Rec. Zool. Surv. Pakistan. Vol : 21. Pp: 10-13.

V

- Valli S. Sugasini. S. S, Aysha O. S, Nirmala. P, VinothKumar P, Reena. 2012. A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Pp: 469-473.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(3):495-548.
- Voelker F. and Altaba S., 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, 147: 2447-2459.

W

- Waksman, S.A. (1959). The actinomycetes: nature, occurrence and activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1: 29–46.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., and B.D. Bhole (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.* **176**, 386–390.

Y

- Yala D., Merad A. S., Mohamedi D. et Ouar Korich M. N., (2001). Classification et modes d'action des antibiotiques, *Médecine du Maghreb* 91 :13-19.

Z

- Zerizer. H. (2014). Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Constantine 1.
- Zucchi T. D., Guidolin A. S. and Consoli F. L. 2011. "Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae)," *Microbiological Research*, vol. 166, no. 1, pp. 68–76,

Annexes

Annexe 01 : Illustrations

Tableau 01. Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires (Delaunay et al., 2003).

| Métabolites primaire | Métabolites secondaire |
|---|--|
| Synthétisé pendant la trophopase | Synthétisé pendant l'idiopase |
| Présent tout au long du cycle cellulaire | Apparition à un moment du cycle cellulaire |
| Nécessaire à la croissance | Inutile pour la croissance |
| Rôle physiologique connu | Rôle physiologique mal connu |
| "turn-over" élevé | "turn-over" pratiquement nul |
| Produit dans des conditions de culture diverses | Produit dans des conditions de culture bien définies |
| Ubiquitaire | Spécifique |
| Enzymes à spécificité étroite | Enzymes à spécificité large |
| Voies de synthèse simple et courte | Synthèse longue et complexe |
| Synthèse d'un produit parfaitement défini | Synthèse d'un mélange de produits |
| Structure chimique généralement simple | Structure chimique souvent complexe |
| Concentration élevée | Concentration faible |

Tableau 02. Les enzymes commerciales les plus importants produits par les actinomycètes, leurs caractéristiques et l'utilisation potentiels (Mukhtar, 2017).

| <i>Enzyme</i> | <i>Souches productrices</i> | <i>pH optimal et Température</i> | <i>Substrates Spécifiques</i> | <i>Applications industrielles</i> |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Cellulase</i> | <i>Streptomyces ruber</i> | 6 et 37°C | CMC | <i>Detergents</i> |
| | <i>Thermobifida halotolerans</i> | 7 et 45°C | CMC | Papier et pâte |
| | | | | Textile |
| <i>Protease</i> | <i>Streptomyces pactum</i> | 7.5 et 40°C | Caseine | Pharmaceutiques |
| | | | | <i>Cuir</i> |
| | <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> | 6.5 et 65°C | Kératine | <i>Detergents</i> |
| | | | <i>Aliment</i> | |
| <i>Keratinase</i> | <i>Actinomadura keratinilytica</i> | 10 et 70 °C | Kératine | <i>Cuir</i> |
| <i>Amylase</i> | <i>Streptomyces erumpens</i> | 9 et 45°C | Amidon | <i>Detergents</i> |
| | | | | <i>Cuisson</i> |
| | <i>Thermobifida fusca</i> | 6 et 60°C | Amidon | <i>Paier et pâte</i> |
| | | | <i>Textiles</i> | |
| <i>Xylanases</i> | <i>Streptomyces spp.</i> | 9 et 50°C | Xylane | Papier et pâte |
| | <i>Actinomadura sp.</i> | 4 et 70°C | <i>Xylane</i> | <i>L'alimentation animale</i> |
| | | | | <i>Cuisson</i> |

| | | | | |
|------------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Lipase</i> | <i>Streptomyces exfoliates</i> | 6 et 37°C | Triacylglycerides | Papier et pâte |
| | <i>Nocardiopsis alba</i> | 7 et 30°C | Triacylglycerides | Detergent |
| | | | | Cosmetiques |
| <i>Chitinase</i> | <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> | 6 et 60°C | Chitine colloïdale | Textile |
| | <i>Nocardiopsis prasina</i> | 7 et 55°C | Chitine colloïdale | Cuir |
| <i>Pectinase</i> | <i>Streptomyces lydicus</i> | 6.5 et 45°C | Acide Polygalacturonique | Textile et <i>Boisson</i> |

Annexe 02 : Matériel analytique

- ❖ Agitateur
- ❖ Balance
- ❖ Plaque chauffante.
- ❖ Autoclave
- ❖ Bain marie
- ❖ pH mètre
- ❖ Microscope optique
- ❖ Etuves réglables à 28C° et 37C°
- ❖ Réfrigérateur
- ❖ Vortex
- ❖ Spectrophotomètre
- ❖ Loupe binoculaire
- ❖ Anse de platine
- ❖ Bec bunsen
- ❖ Boîtes de Pétri (boîtes compartiment, des mini boîtes)
- ❖ Portoirs
- ❖ Virerai: béchers gradués, éprouvettes gradués, tubes à essai stériles, et les flacons
- ❖ lames
- ❖ Lamelles
- ❖ Pipettes Pasteur
- ❖ Spatule
- ❖ Barreaux magnétique
- ❖ Picette

Annexe 03 : Milieux de cultures utilisés**❖ Bennett**

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Extrait de levure | 1g |
| Extrait de viande..... | 1g |
| Peptone pancréatique de caséine | 2g |
| Glucose | 10 g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

❖ ISP2

| | |
|-------------------------|---------|
| Extrait de malt | 10 g |
| Extrait de levure | 04 g |
| Glucose | 04 g |
| Agar | 20 g |
| Eau distillé | 1000 ml |
| pH | 7.2 |

❖ Milieu ISP3

| | |
|--------------------------------|---------|
| Farine d'avoine | 20 g |
| Solution saline standard | 1 ml |
| Agar | 20 g |
| Eau distillée q.s.p | 1000 ml |
| pH | 7,2. |

Solution saline standard: $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1 g ;

Eau distillée q.s.p 100 ml.

❖ Milieu ISP4

| | |
|--|------|
| Amidon | 10 g |
| K_2HPO_4 | 1 g |
| $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 g |
| NaCl | 1 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2 g |
| CaCO_3 | 2 g |
| Solution saline standard (voir ISP3) | 1 ml |

| | |
|---------------------------|---------|
| Agar | 20 g |
| Eau distillée q.s.p. | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

❖ **Bouillon nutritif**

| | |
|-------------------------|---------|
| Peptone | 10 g |
| Extrait de levure | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| pH | 7,2 |

❖ **Gélose nutritive**

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

❖ **Eau physiologique**

| | |
|--------------------------|---------|
| Chlorure de sodium | 09 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

Annexe 04 : Aspect morphologique des actinomycètes

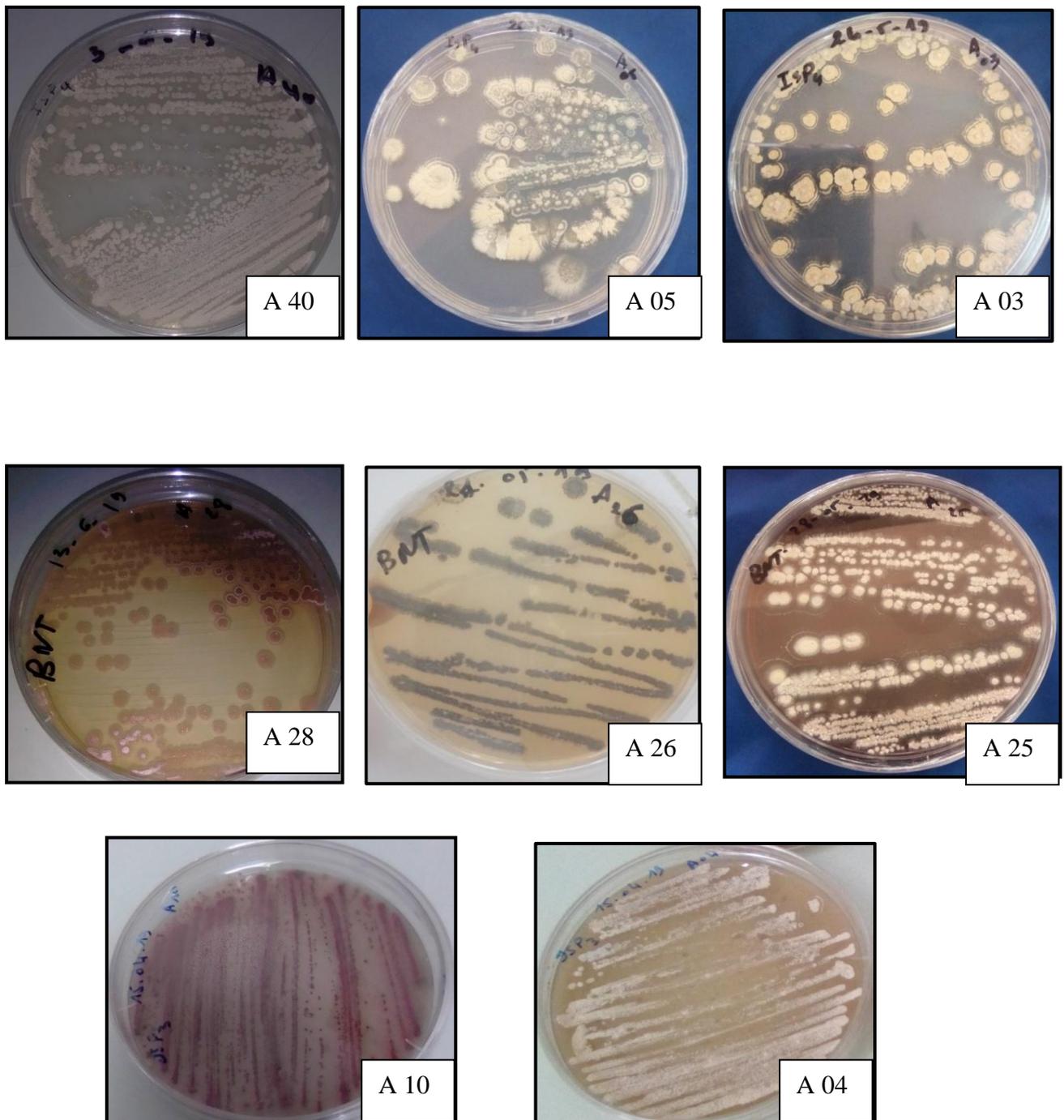


Figure 01. Aspect macroscopique des isolats d'actinomycètes après 21J à 30 °C sur différents milieux ISP4, Bennett et ISP3, respectivement.

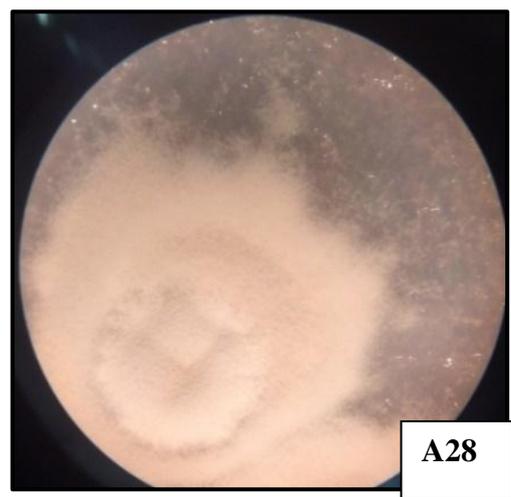
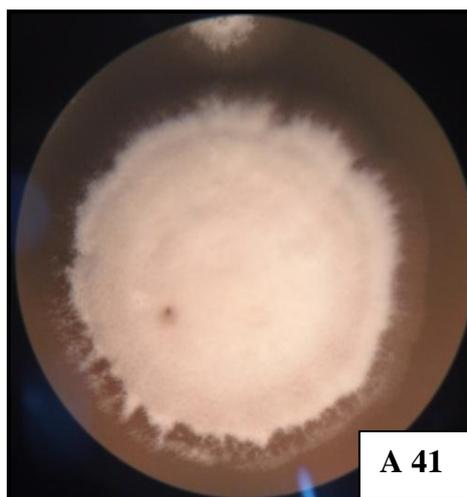
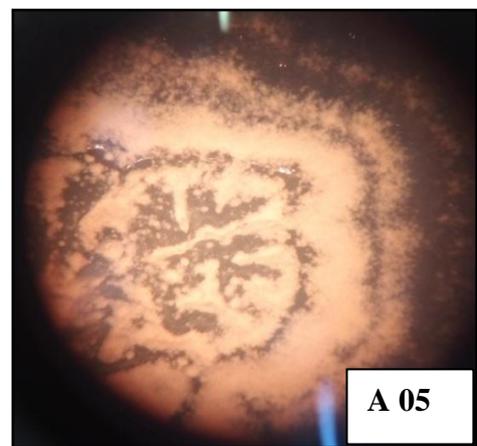
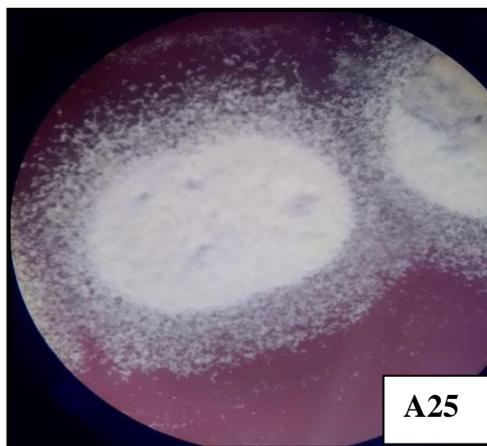
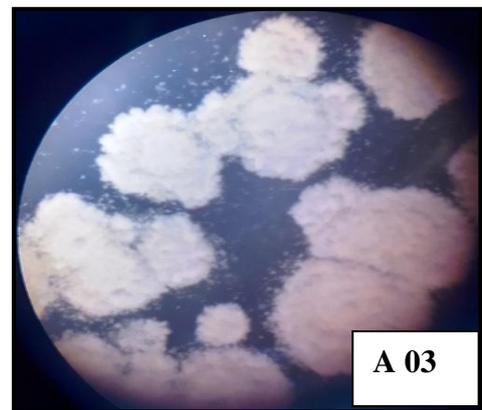
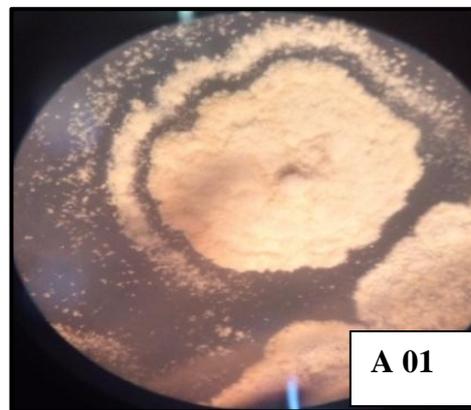


Figure 02. Observation par la loupe binoculaire des isolats d'actinomycètes après 21 jours (G× 04).

Annexe 05 : Activité antibactérienne

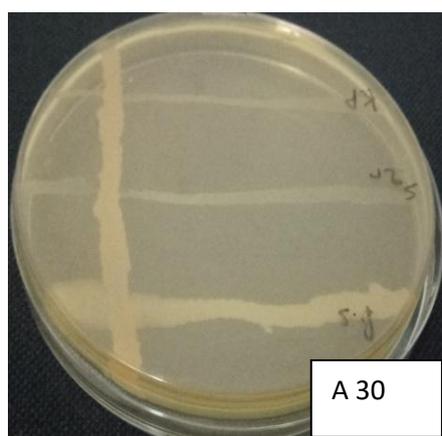
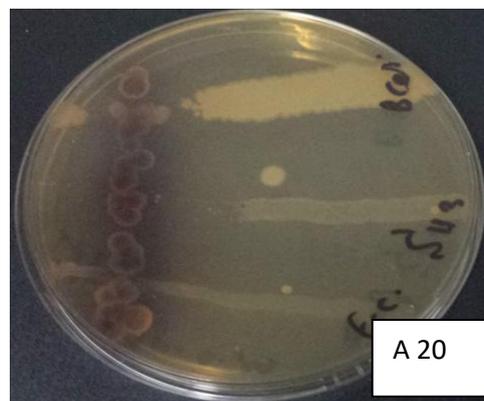
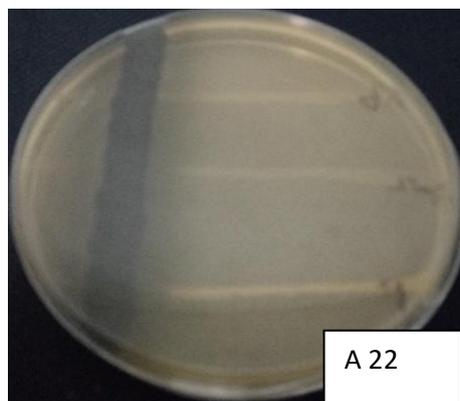
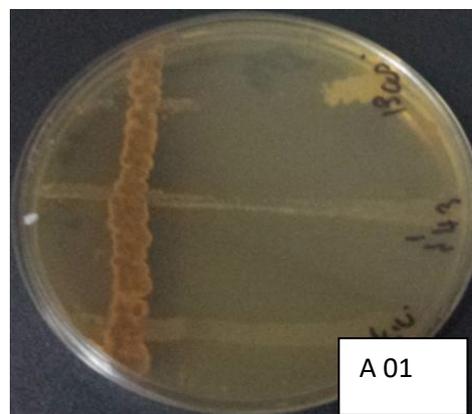
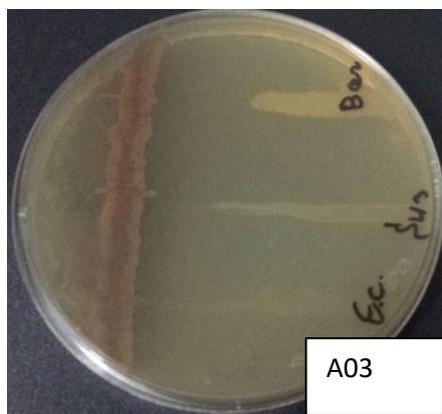


Figure 03. L'activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries testées (**en recto**) par la technique des stries croisées.

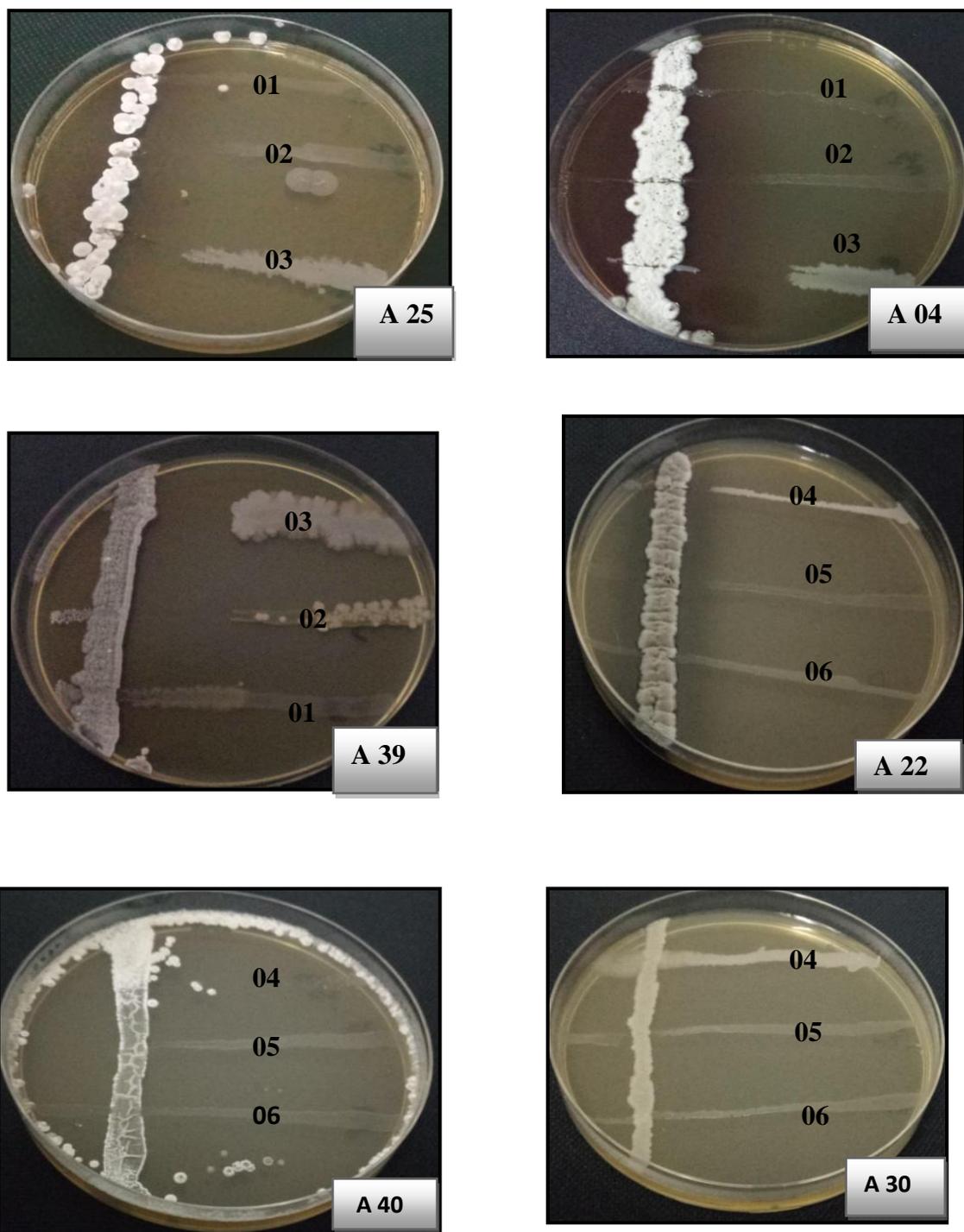


Figure 04. L'activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries testées par la technique des stries croisées.

01 : E. coli 02 : S. aureus 43 03 : B. cereus 04 :B. subtilis 05 :S. aureus 25 06 :K. pneumonie

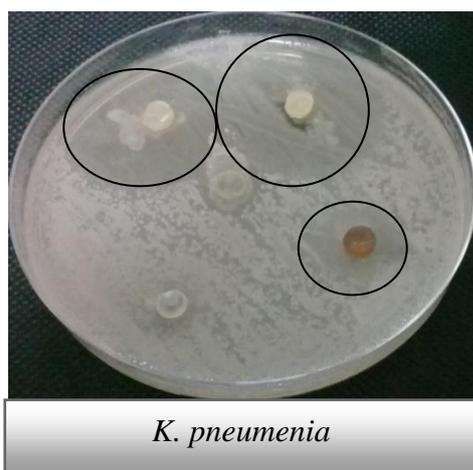
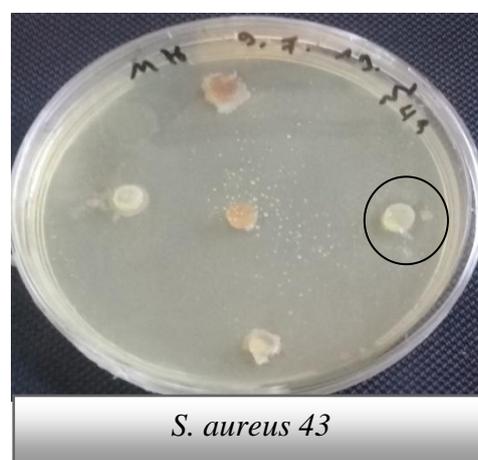
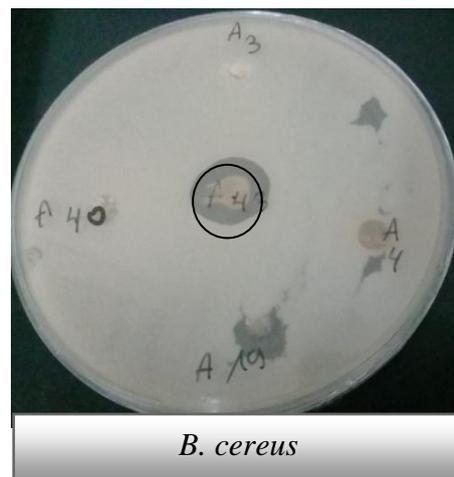
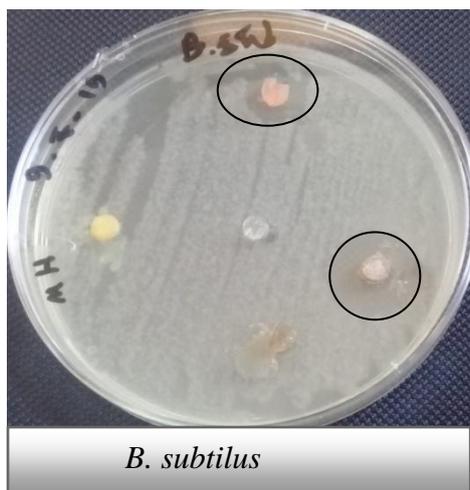


Figure 05. L'activité antibactérienne de quelques isolats d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries testées par la technique des cylindres d'agar.