République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de master

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE

Thème

Caractérisation préliminaire des bactéries actinomycètales productrice d'enzymes et des molécules antimicrobiennes.

Travail réalisé par :

Melle : AISSOU Kahina

Melle : LOUNI Kenza

Devant le jury :

Président : Mr DJENANE D. Professeur à l'UMMTO

Promoteur : Mr OUELHADJ A. Maitre de conférences A à l'UMMTO

Examinateurs : Mr YAZID H. Maître assistant B à l'UMMTO

Mme HELLAL Z. Maître assistante A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015 – 2016

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donné la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier :

Profondément notre promoteur : ***Monsieur OUELHADJ. A : Maitre de conférences A à l'UMMTO****, pour le privilège et la confiance qu'il nous a accordée durant l'étude pratique, pour avoir accepté de diriger notre travail avec compétences, pour sa disponibilité, aide, sa patience, ainsi que pour ses précieux conseils.*

- ***Monsieur DJENANE. D : Professeur à l'UMMTO****, pour avoir accepté de présider le jury.*
- ***Mr YAZID. H.*** **:** ***Maître assistant B à l'UMMTO****, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*
- **Mme HELLAL.Z. :Maître assistante A à l'UMMTO***, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Ainsi que toute personne ayant participé, de prés de loin à la réalisation de ce mémoire.

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de la variance.

ATCC: American Type Culture Collection.

DAP : l'acide LL- 2,6 diaminopimélique.

EPE : Le milieu peptonée exempt d'indole.

MEVAG : Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides.

MH : Milieu Mueller-Hinton.

NR1 : Nitrate réductase 1.

NR2 : Nitrate réductase2.

PS: pigment soluble.

RM: Rouge de méthyle.

SAB : Milieu Sabouraud.

TSI : La gélose Triple seule source de carbone.

VP1 : Voges Proskauer 1.

VP2 : Voges Proskauer 2.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Principaux groupes *d'actinomycètes.*	04
02	Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.	06
03	Cycle de développement de *Streptomyces griseus.*	07
04	Étapes de développement et structures d'une colonie *d'actinomycètes* (genre *Streptomyces*) sur milieu solide. 1: spore,2: tube germinal, 3:mycélium végétatif, 4: colonie jeune, 5: mycélium aérien, 6: sporophore, 7:sporulation, 8 et 9: maturation des spores, 10: colonie mature.	08
05	Coupe transversale d'une colonie *d'actinomycète* avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés.	09
06	différents types de chaînes de spores chez les *actinomycètes*, (A) spores endogènes**.**	10
07	différents types de chaînes de spores chez les *actinomycètes*, (B) spores exogènes.	11
08	Structure des isomères de l'acide diaminopimélique.	12
09	Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses.	17
10	Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques.	21
11	Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides.	29
12	Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates.	29
13	Modélisation tri-dimensionnelle du pore forme par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique, d'après Baginski *et al.* (1997). Amphotéricine B : blanc (H), vert (C), rouge (O), bleu (N); ergostérol : rose.	32
14	Structure tri-dimensionnelle de la stérol 14 déméthylase de *Mycobacterium tuberculosis* en interaction avec le fluconazole, d'après Podust *et al.* (2001). En gris, ERG11p; en marron, fluconazole; en bleu, hème; et en rouge, liaison entre l'azote libre du fluconazole et le fer de l'hème.	33

15	Protocole d'extraction des produits actifs à partir du culot de la culture.	42
16	Protocole d'extraction des produits actifs à partir du surnageant de culture.	43
17	Aspect morphologiques des trois souches *d'actinomycètes* R8', R14' et TB0304 respectivement**.**	50
18	Test d'activité des souches *d'actinomycètes* cultivées sur le milieu de Bennett contre les bactéries teste.	55
19	Activité antifongique des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *Aspergillus niger* par la méthode de cylindre d'agar.	59
20	Activité antifongique des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *C.albicans* par la méthode de cylindre d'agar.	59
21	Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique des cultures des trois souches d'actinomycètes vis - à –vis les bactéries testées par la méthode de disque en papier wathman.	64
22	l'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *A.niger* par la méthode de disque en papier.	66
23	l'activité antifongique des extraits méthanolique des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *C. albicans* par la méthode de disque en papier.	67
24	Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformique des cultures des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les six bactéries testées par la méthode de disque en papier wathman.	71
25	Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyles des cultures des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les bactéries testées par la méthode de disque en papier wathman.	73
26	Activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *Aspergillus niger* par la méthode de disque en papier wathman.	76
27	Activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des cultures des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *C. albicans* par la méthode de disque en papier wathman	77
28	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14' vis- à- vis les microorganismes cibles, en fonction du pH.	80

29	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanoliquede la souche R8', vis-à-vis les microorganismes cibles en fonction du pH.	81
30	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche TB0304, vis-à-vis les microorganismes cibles en fonction du pH.	82
31	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthylede souche R14', vis-à-vis les microorganismes testés à 4°C.	86
32	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche R8', envers les microorganismes-tests à 4°C.	87
33	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche TB0304, envers les microorganismes-tests à 4°C.	87
34	Résultats de l'activité Enzymatique (hydrolyse de l'amidon) par les trois souches *d'actinomycètes*étudies R14', R8' et TB0304.	90
35	Résultats de l'activité Enzymatique (hydrolyse de la caséine) par les trois souches *d'actinomycètes* étudies R14', R8' et TB0304	91

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Taxonomie de la classe *Actinobacteria*.	05
02	Types de parois des *actinomycètes* en fonction des constituants en acides aminées et en sucres.	13
03	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des *Actinomycètes*.	15
04	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les *actinomycètes*.	17
05	Antibiotiques de *Streptomyces* utilises.	20
06	Les différentes classes d'antifongiques.	22
07	Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels**.**	26
08	La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques.	30
09	Produits chimiques et réactif.	34
10	Milieux de culture utilisée.	36
11	Les appareille utilisés.	37
12	Les souches microbiennes utilisées.	38
13	Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.	38
14	Aspect macroscopique des trois souches *d'actinomycètes*.	50
15	Résultats de l'observation microscopique à (G×100) après coloration de Gram.	52
16	Résultats du criblage des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les six bactéries cibles.	53
17	Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition des trois souches *d'actinomycètes* contre les six bactéries cibles (Ø= moyenne±Ecart type). (n=2), le Ø des cylindres d'agar est inclus (8mm).	56
18	Résultats du criblage des trois souches *d'actinomycètes* contre les deux souches fongiques cibles.	58
19	Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition des trois souches *d'actinomycètes* étudiées (Ø= moyenne ± Ecart type). (n=2), le Ø des cylindres d'agar est inclus (8mm).	60

20	Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique des cultures des trois souches *d'actinomycètes* contre les bactéries cibles par la méthode de disque en papier.	62
21	Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	64
22	Résultats du test de l'activité antifongique des extraits méthanolique des cultures des trois souches *d'actinomycètes* envers les souches fongiques testées par la méthode de disque en papier.	65
23	Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antifongique des extraits méthanolique des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	67
24	Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétates des cultures des trois souches *d'actinomycètes* contre les bactéries-tests par la méthode de disque en papier.	69
25	Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des deux extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes*.(n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	74
26	Résultats du test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les deux souches fongiques testées par la méthode de disque en papier wathman.	75
27	Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'activité antifongique des extraits des chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	78
28	Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extraits d'acétate d'éthyle de la souche R14', vis-à-vis les microorganismes cibles, en fonction du pH.(n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	83
29	Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de lasouche R8'vis-à-vis les microorganismes testés, en fonction du pH. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	84
30	Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de la souche TB0304, vis-à-vis les microorganismes cibles, en fonction du pH. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	84

31	Moyennes des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14', vis-à-vis les microorganismes testés à 4°C. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).	88
32	tableau synthétique de quelque caractère biochimique de trois souches *d'actinomycètes.*	95

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction…… 01

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I.- Actinomycètes

I-1Historique…… 03

I-2-Généralité…… 03

I-2-1- Taxonomie des actinomycètes……... 04

I- 2-2-Caractéristiques morphologique des actinomycètes…….. 05

I- 2-3-Le cycle de développement des actinomycètes……. 06

I- 2-3-1- La germination des spores……. 07

I- 2-3-2-Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes……... 08

I-2-3-3- La formation des spores…… 10

I-2-4-Critères physiologiques…... …… 11

I- 2-5-Critères biochimique ……... 12

I -2-5-1-Composition en aminoacides …… 12

I-2-5-2-Composition en glucides ……..... 13

I -2-5-3-Composition en lipides……... 14

1-Les lipides polaires…… 14

2-Les ménaquinones……..... 14

3-Génétique et structure de l'ADN…….. 14

Chapitre II.- INTERETS DES ACTINOMYCETES

II-1-Substances bioactives produites par les actinomycètes…….. 16

II-1-1- Antibiotiques……. 16

II-1-1-1-Définition des antibiotiques…….. 16

II-1-1-2-Classification des antibiotiques…… 18

II-1-1-3-Applications des antibiotiques…….. 19

II-1-2-Les antifongiques…… 21

II-1-2-1-Définition…….. 21

II-1-2-2-Classification des antifongiques selon l'origine et la structure……..... 22

II-1-2-3-Applications des antifongiques …… 24

II-1-3- Les enzymes…… 24

II-1-3-1- Les types d'enzyme……..... 24

II -1-3-2-Application des enzymes……..... 25

Chapitre III.- LA RESISTANCE BACTERIENNE

III-1-La résistance bactérienne…….. 27

III-1-1-Résistance aux antibiotiques……..... 27

III-1-1-1-Définitions…… 27

III-1-1-2-Les types de résistance…… 27

a- La résistance naturelle…… 27

b- La résistance acquise…….. 27

III-1-1-3 Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques…….. 30
III-1-2-Résistance aux antifongiques……. 31
III- 1-2-1-Définitions…… 31
III- 1-2-2-Le mode d'action……..... 31

PARTIE 2.- ETUDE EXPÉRIMENTALE

1-Matériels et méthodes

1-1-Matériel…….. 34
1-1-1-Les souches d'actinomycètes…….. 34
1-1-2-Matériel de laboratoire…….. 34
1-1-3-Appareillage……..... 37
1-1-4-Souches microbiennes utilisées……..... 37
1-1-5-Molécules de référence utilisée : antibiotiques et antifongique……..... 38
1-2-Méthode…… 39
1-2-1Sélection des actinomycètes bioactives et caractérisation partielle des souches représentatives…….. 39
1-2-1-1-Préparation des frottis……. 39
1-2- 1-2- Coloration de Gram……..... 39
1-2-2-Recherche de l'activité antimicrobienne……..... 39
1-2-2-1- Criblage de l'activité antibactérienne Criblage par la technique des cylindres d'agar……..... 39
1-2-2-2- Criblage de l'activité antifongique…… 41
1-2-3-Extraction des produits actifs par des solvants organiques……..... 41
1-2-3-1- Etude de la stabilité de molécules actives……. 44
1-2-3-1-1- Effet du pH ……..... 44
1-2-3-1-2-Effet de la température…….. 44
1-2-4- Galerie Biochimique…… 44
1-2-5- L'Activité enzymatiques……..... 49
1-2-5-1-Hydrolyse de l'amidon……..... 49
1-2-5-2-Hydrolyse de la caséine…….. 49
1-2-6-Analyse statistique ……..... 49

2-Résultats et discussions

1-Etude morphologique……. 50
1-1-Caractères culturaux……. 50
1-2-Observation macroscopique des colonies suspectes…… 50
1-3-Observation microscopique des colonies suspectes……. 51
2-Recherche de l'activité antimicrobienne…… 53
2-1-Criblage de l'activité antibactérienne…….. 53
2-2-Criblage de l'activité antifongique……..... 58
3-Extraction des molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes …….... 62
3-1-Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits organiques…… 62
3-1-1- Test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique……. 62
3-1-2- Test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique……. 63
3-1-3-Test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles……. 69
3-1-4-Test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles…… 75
4-Effet de pH sur la stabilité des molécules bioactifs……. 80

5- Effet de la température sur la stabilité des molécules bioactifs…….. 86
6-Activité enzymatique……..... 89
6-1 Hydrolyse de l'amidon…… 89
6-2-Hydrolyse de la caséine…….. 91
7- Galerie biochimique……. 92
Conclusion et perspective…… 94
Référence bibliographique……..
Annexe…….....
Résumée…….

Le présent travail est une étude de l'activité antimicrobienne des trois souches *d'actinomycètes* isolés de la région Ain El Hammam Tizi-Ouzou (Benyaou, 2015).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que :

Les observations macroscopique et microscopique nous laissant conclure que nous souches cibles sont des actinomycètes. En effet la coloration de Gram a révélé que nous souches *d'actinomycètes* cibles possèdent les attributs caractéristiques du groupe des *actinomycètes*.

En termes de production des activités antimicrobiennes, un criblage primaire sur milieu solide par la technique des cylindres d'agar a révélé que les trois souches d'actinomycètes (R14', R8' et TB0304) possèdes un pouvoir inhibiteur plus au moins important contre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif ainsi que les deux souches fongiques cibles (*C. albicans* et *A.niger*).

L'étude consiste à suivre la production des métabolites bioactifs, ainsi de faire l'extraction des composées actifs à partir de mycélium et de surnageant d'une pré-culture sur milieu liquide et cela on utilisant différentes solvant organiques de différent polarité (Acétate d'éthyle, Chloroforme et Méthanol); ce qui nous donne une idée sur la nature des composés extraits; l'étude est ensuite suivi par l'effet de pH et de température sur la stabilité des molécules bioactifs produite par les trois souches d'actinomycètes.

On se basant sur ces résultats, on peut obtenir des informations sur la nature du principe actif par l'utilisation de différents révélateurs chimiques et microbiologiques.

D'après l'extraction des antibiotiques et des antifongiques et la recherche d'activité antagoniste vis-à-vis les six bactéries testés et les deux souches fongique cible; on résulte que les molécules antimicrobiennes sont secrétées dans le milieu de culture et associées au mycélium et au surnageant de la culture. L'extraction par les solvants a révélé que l'acétate d'éthyle semble être le solvant le plus approprié pour extraire les molécules bioactives des filtrats de la culture.

L'étude de la stabilité des molécules produites par les trois souches d'actinomycètes montrent que ces molécules bioactifs sont stables vis-à-vis des paramètres (pH, T°).

L'analyse des propriétés physiologiques à mis en évidence, la capacité des trois souches d'actinomycètes à dégrader certaine composé organique complexe grasse à la production d'enzyme spécifique telle que les protéases et les amylases.

L'intérêt de ce métabolite dans le domaine médicale et de la santé publique nécessite son étude d'une manière plus approfondie en procédant à :

- L'identification moléculaire des souches (16S RNA).
- L'identification des molécules ainsi produites.
- L'optimisation de la production en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et azotées, élément minéraux, température, aération et pH).
- La purification complète des molécules produites (en utilisant d'autre techniques chromatographiques).
- Détermination leurs structures par l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques comme la spectroscopie nucléaire.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices(CMI).

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de biotechnologie (Smaoui, 2010).

Les produits naturels issus du métabolisme de microorganismes constituent l'une des principales sources des bioindustries de fermentation dans diverse domaines, reconnu des agents performants de transformation, de dégradation et de production de plusieurs métabolites d'intérét, les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes. Parmis ces molécules,on peut citer les alcools, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques…(Demain,2000).

De nombreux antibiotiques ont été isolés dans une variété de microorganismes et ont été employés dans beaucoup de domaines : l'industrie, l'agriculture, science vétérinaire et pharmaceutique (Oskay et al., 2004). Cependant, des études sont en cours pour identifier de nouveaux antibiotiques efficaces contre les mycètes et les bactéries pathogènes. A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associe à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques tels que les *actinomycètes*.

Les *actinomycètes* représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (Okami et Hotta, 1988), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (Islam et *al*., 2009).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs essentiels : le criblage des souches *d'actinomycètes* productrices de substances à effet antagoniste vis-à-vis des bactéries et champignons pathogènes, l'extraction de ces molécules bioactives par des solvants organiques, et enfin réaliser une étude préliminaire de caractérisations de ses souches *d'actinomycètes*.

1-Historique

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique très important. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les *actinomycètes* filamenteux. C'est en 1940, après la découverte de *l'actinomycine*, que ces bactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches et elles sont extrêmement exploitées durant les années 80 dans différentes domaine (Boughachiche et *al .,* 2006).

Le terme *actinomycète* a été utilisé pour la première fois par Bollinger, en 1877, pour désigner l'agent responsable d'une maladie du bétail. Les *actinomycètes* ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et considérés comme étant des champignons primitifs, du fait de leur morphologie parfois fongoïde (Beker *et al.,* 1965 ; Reponen *et al.,*1998). Les bactériologistes considèrent les *actinomycètes* comme des bactéries tandis que les mycologues les considèrent comme des champignons (Gottlieb, 1973).

2-Généralités

Les véritables *Actinobacteria*, également connus sous le nom *d'actinomycètes*, sont des microorganismes septées. Les *actinomycètes*, bactéries filamenteuses, dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (Eunice et Prosser, 1983), constituées d'hyphes c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973; Lechevalier et Lechevalier, 1981; Eunice et Prosser, 1983). Cela explique leur dénomination « *Actinomycetes* ». Du Grec *aktino, mycètes* « champignons à rayons » ou champignons rayonnant. (Gottlieb, 1973; Pandey et al ., 2003). Les *actinomycètes* se situent dans l'ordre des *actinomycétales* (Marial et Sebald, 1990) sont des bactéries Gram+ avec une proportion de G+C élevée, formant des colonies à la morphologie complexe (Colombié, 2005). Les différentes espèces, pour la plupart thermophiles, se développent surtout dans les fumiers et les composts (Figure1) (Stanier, 1966).

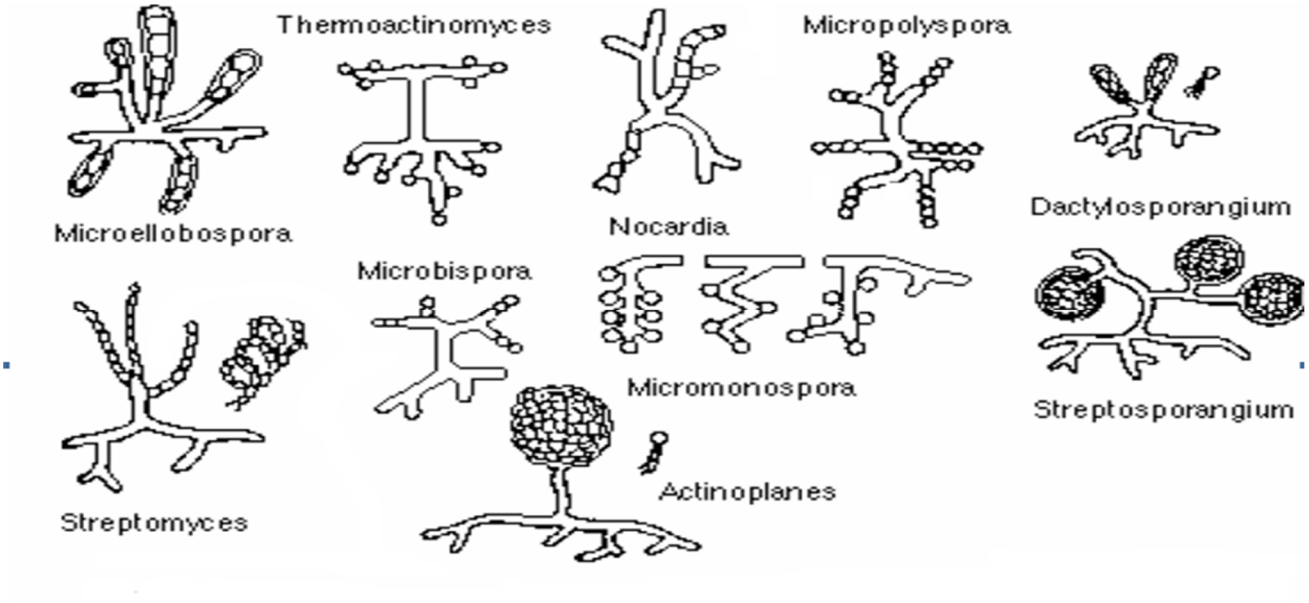


Figure 1 : Les principaux groupes d'actinomycètes (Stanier, 1966).

2-1-Taxonomie des actinomycètes

Les *actinomycètes* sont des microorganismes procaryotes rattachés à l'ordre des *Actinomycétales* crée par Buchanan en 1917. Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires notamment la séquence du gène ARNr 16s.

La classification des *actinomycétes* producteurs d'antibiotique selon "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al*., 2004), Le Phylum *Actinobacteria* est constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Actuellement le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2007), la classe *Actinobacteria* est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre, 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines *Corynebactéries*, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (Ventura *et al.,* 2007).

Tableau 1: Taxonomie de la classe *Actinobacteria* (Loucif ,2010).

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

2-2-Caractéristiques morphologique des actinomycètes

La morphologie des différents groupes *d'Actinomycètes* est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes (figure 2).

Selon (Boudjella *et al.,* 2007), les caractères morphologiques contribuent parfois dans la différenciation des genres *d'actinomycètes* entre eux. Parmi ces caractères les plus importants sont :

- La production d'un mycélium aérien (MA) ou non (exemple : *Actinoplanes et Micromonospora).*
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS).
- La couleur du mycélium aérien (MA) et de mycélium du substrat (MS).
-La formation des spores leur forme, mobilités et leur germination, etc.

a-Exospores sur le MA et/ou sur la MS, leur forme et leur taille, la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue).

b-Endospores (*Thermoactinomyces*) ou la présence de structures Particulières comme les sporanges, les sclérotes ou synnemata (*Actinosynnema*) (Demain et Solomon, 1986).

- La production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS) (Badji ,2006).
- La germination des spores.
- La croissance des hyphes (dispersée ou en pellet).

La morphologie des *actinomycètes* ressemble fortement a celle des *mycètes* (Prescot *et al., 2013)* le diamètre des hyphes est de 0.5 a 1µm (Eunice et Prosser ,1983).

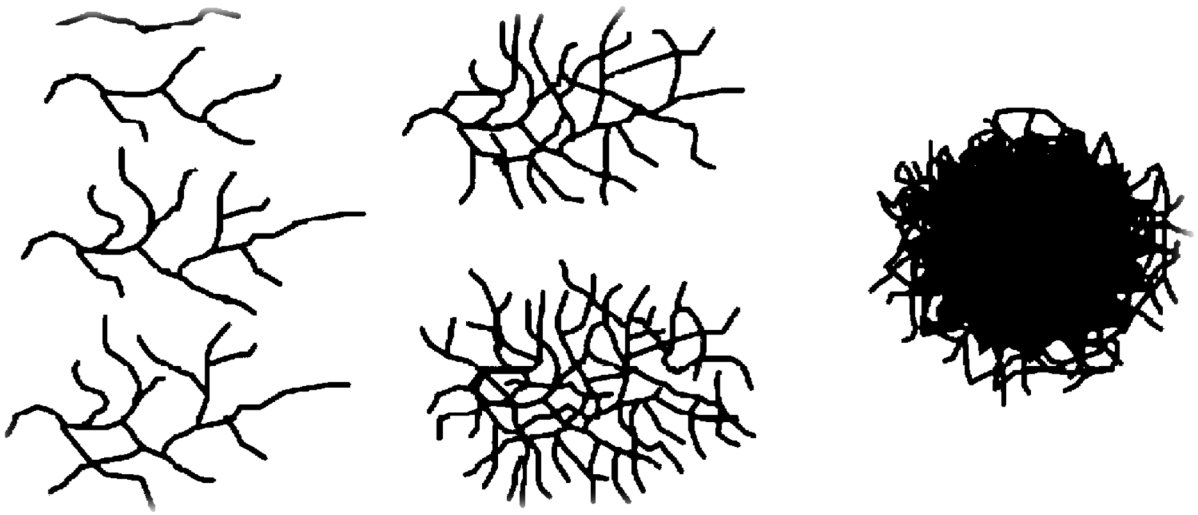


Figure 2 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

2-3-Le cycle de développement des actinomycètes

La diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle de développement semblable à celui de certains eucaryotes.

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium de substrat (MS), formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien (MA). Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées (Flärdh et Bruttner, 2009).
Comme le montre la figure.3.

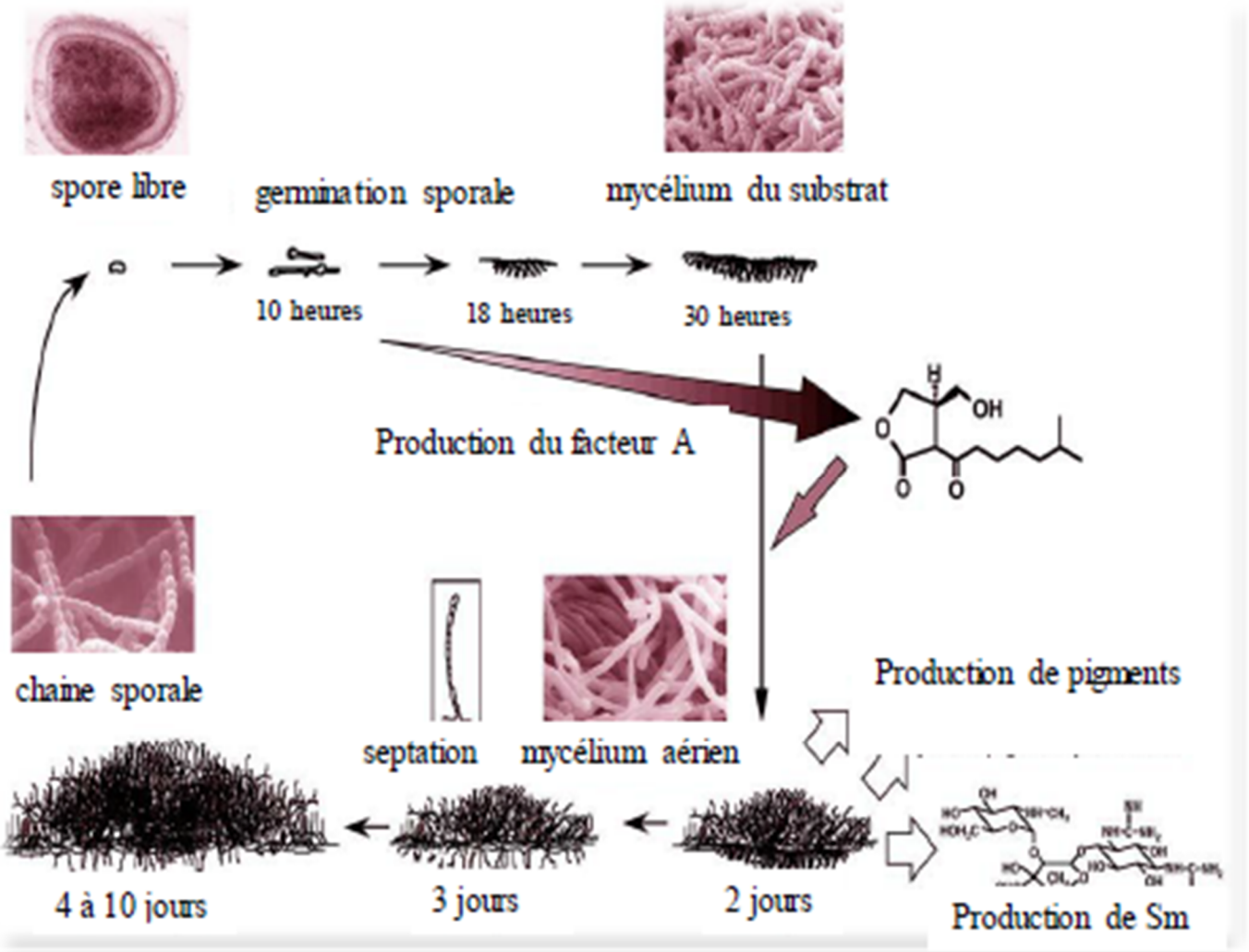


Figure 3 : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002).
Facteur A : facteur chimique qui permet la croissance de *Streptomyces griseus* .

2-3-1- La germination des spores

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative (figure 4). Quatre étapes distinctes sont décrites : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance.

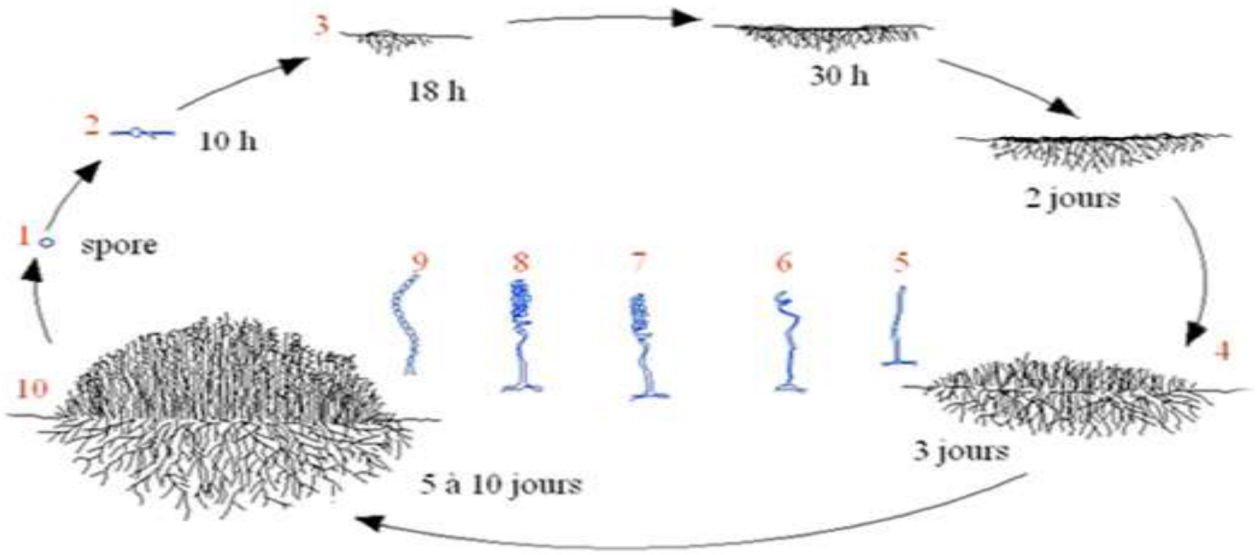


Figure 4 : Étapes de développement et structures d'une colonie *d'actinomycètes* (genre *Streptomyces*) sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985) 1: spore, 2: tube germinal, 3:mycélium végétatif, 4: colonie jeune, 5: mycélium aérien, 6: sporophore, 7:sporulation, 8 et 9: maturation des spores, 10: colonie mature (Zerizer, 2014).

2-3-2-Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes

La majorité des *actinomycètes* cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien, sachant que le mycélium du substrat est aérobie facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobie strict (Silvey et Roach, 1975).

Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.,* 2004 ; Smaoui, 2010).

a-Mycélium du substrat

Le mycélium du substrat, également dénommé mycélium végétatif ou primaire, se développe à partir du tube de germination (hyphe) issu de la spore (Theilleux, 1993). Cet hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises.

Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette aptitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des

actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (Locci, 1976).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes.

b-Mycélium aérien

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat (figure 5).

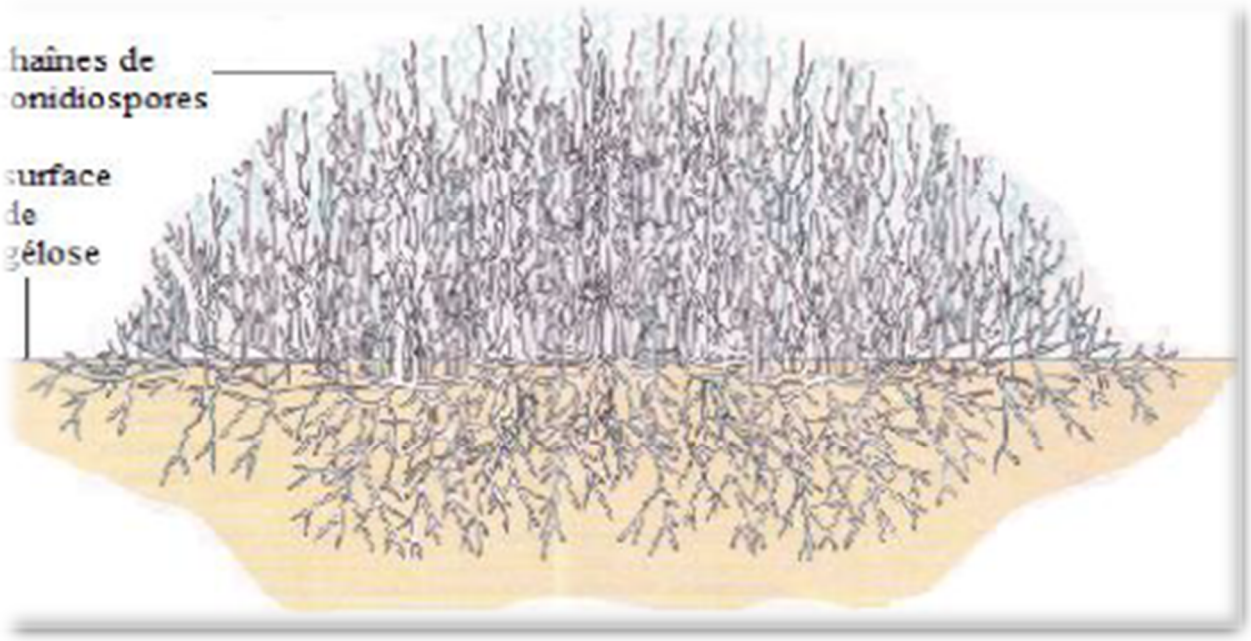


Figure 5 : Coupe transversale d'une colonie *d'actinomycète* avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (Prescott *et al.,* 2003).

Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat, ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott *et al.,* 2003). Le mycélium aérien n'est pas une spécificité des *actinomycète*s qui possèdent le mycélium végétatif.

2-3-3- La formation des spores

Les divers types de spores des *actinomycètes* peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores *(Theilleux, 1993)*. Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales (Figure 6 et 7). De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores .

a- Les endospores

Les endospores sont produites par des *actinomycètes* thermophiles. Elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant (Singleton, 1994), elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces* (Pelmont, 1994). Tout comme les endospores bactériennes du genre *Bacillus*.

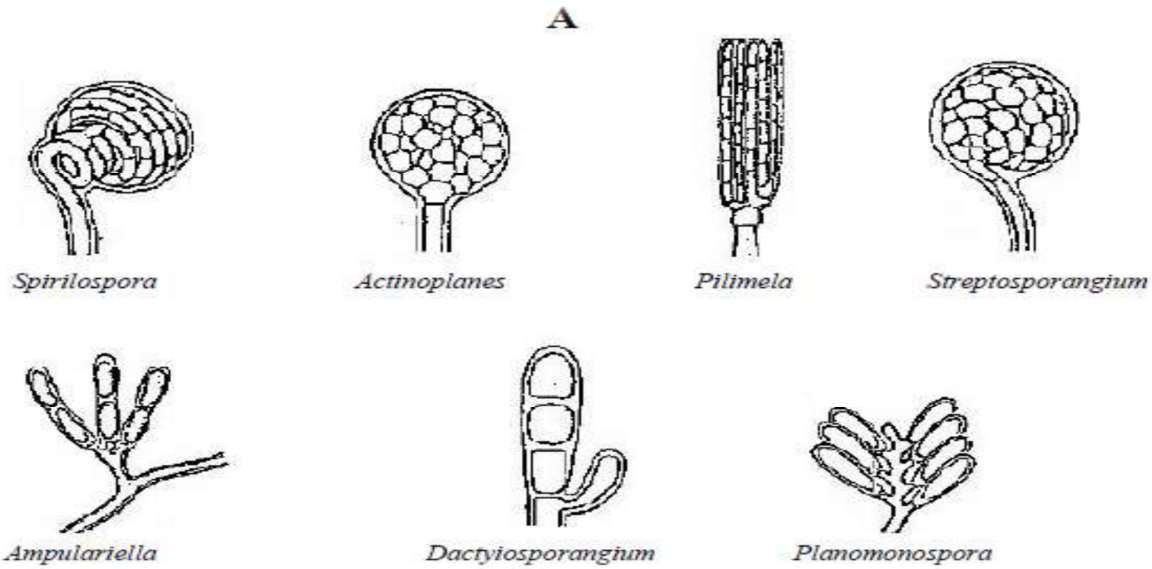


Figure 6: différents types de chaînes de spores chez les *actinomycètes*, (A) spores endogènes (Errakhi, 2008).

B -Les exospores

Les exospores sont le type le plus fréquent, Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptive (Prescott *et al.*, 2007).

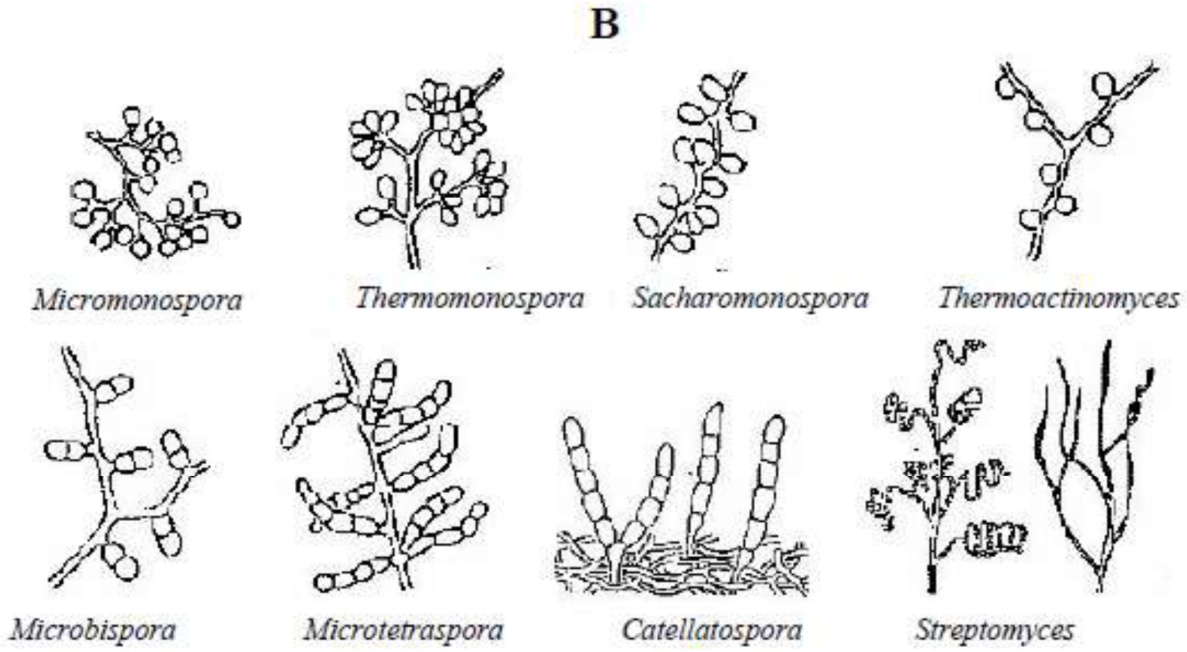


Figure 7: différents types de chaînes de spores chez les *actinomycètes*, (B) spores exogènes (Errakhi, 2008).

2-4-Critères physiologiques

Les *Actinomycètes* sont aérobies à métabolisme oxydatif représentent les espèces telluriques, plus rarement anaérobies, à métabolisme fermentatif correspondant aux espèces parasites saprophytes de la cavité buccale pathogènes pour l'homme (*Actinomyces* par exemple). Ce sont généralement des organismes hétérotrophes, qui ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats azotés et carbonés. De nombreuses espèces sont fortement protéolytiques et agarolytiques (Hsu et Lockwood, 1975).

La plupart des espèces sont mésophiles. Cependant, que d'autre sont thermophiles, tel que le genre *Streptomyces* comporte des espèces comme *Streptomyces thermocoprophilus* (Kim *et al.,* 2000) .

En général, les *actinomycètes* ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles Jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Oskay *et al*., 2004 ; Prescott *et al.,* 2007).Ces derniers sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (Lee et Hwang, 2002).

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité *d'actinomycètes* acidophiles qui diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces neutrophiles (Basilio, 2003). Les souches acidophiles croissent à des valeurs de pH comprises entre 3 ,5 et 6,5 avec un pH optimal de croissance compris entre 4,5 et 5,5 tel que : *Streptacidiphilus oryzae* (Wang *et al.,* 2006).

2-5-Critères biochimique

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des *actinomycètes* montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée d'aminoacides, des lipides et des glucides.

2-5-1- Composition en protéines

La paroi cellulaire des *Actinomycètes* est composé soit :

a-glycoprotéine riche en lysine **;** ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, illustrées par le genre *Actinomyces* (Lechevalier et Lechevalier, 1985).

b-glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP) (Figure 8). Ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives, illustrées par le genre *Streptomyces*.

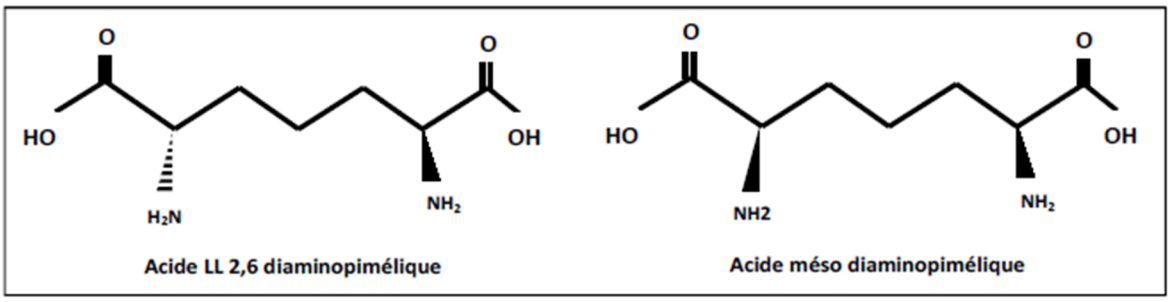


Figure 8 : Structure des isomères de l'acide diaminopimélique (Zerizer ,2014).

2-5-2- Composition en glucides

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs :

-spectre glucidique A une composition en arabinose et en galactose,

-spectre glucidique B une composition en madurose (3-O-méthyle-Dgalactose),

-spectre glucidique C correspond à l'absence de sucres caractéristiques.

-spectre glucidique D une composition en xylose et arabinose. (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

La combinaison entre la composition en acides aminés et le spectre glucidique permet la distinction de 8 types de paroi (tableau 2).

Tableau 2 : Types de parois des actinomycètes en fonction des constituants en acides aminées et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Type de paroi	Constituants majeurs
I	LL-D.A.P
II	Méso ou hydroxy-D.A.P., Glycine, Xylose, Arabinose
III	Méso-D.A.P., Madurose ou aucun sucre
IV	Méso-D.A.P., Arabinose, Galactose
V	Lysine, Ornitine
VI	Lysine
VII	D.A.B., Glycine
VIII	Ornitine

D.A.P.: acide 2,6- diaminopimélique, D.A.B.: acide 2,4- diaminobutyrique

2-5-3-Composition en lipides

Les lipides peuvent être divisés en 3 groupes: les lipides polaires, les ménaquinone et les acides mycoliques.

1-Les lipides polaires

Les plus communs chez les *actinomycètes* sont les phospholipides d'origine membranaire, (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

2-Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des lipides présents au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative. Sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes.

3-Les acides gras

Les acides gras les plus communs chez les *actinomycètes* appartiennent soit à un groupe de molécules comportant 12 à 20 atomes de carbone (comme chez les genres *Streptomyces*). Soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium, Nocardia* et *Rhodococcus.*

3-Génétique et structure de l'ADN

Le matériel génétique des *actinomycètes* est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par l'ADN plasmidique ou de l'ADN phagique. Un caractère majeur est la proportion élevée environ 70 % de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes (Theilleux, 1993).

Les genres *d'actinomycètes* peuvent être définies par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % (tableau 3), qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, les espèces ne sont pas identifiées par cette technique. Historiquement, la classification des bactéries était basée sur la similarité des caractères phénotypiques. Bien que cette méthode ait donné toute satisfaction, elle est coûteuse, lente et pas assez précise pour permettre la distinction ente les organismes les plus proches.

L'étude des acides nucléiques a apporté des renseignements plus précis (Williams *et al*., 1989). Des auteurs insistent cependant, sur la nécessité de jumeler les études

phénotypiques et moléculaires pour une identification encore plus précise (Goodfellow, 2004).

Tableau 3 : Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (Williams *et al*., 1989).

Genre	G + C % (Moles)
Actinomadura	64 à 69
Nocardia	64 à 72
Streptomyces	69 à 78
Micromonospora	71 à 73
Actinoplanes	72 à 73
Actinopolyspora	64
Agromyces	71 à 77
Frankia	66 à 71
Glycomyces	71 à 73
Nocardiopsis	64 à 69
Rodococcus	63 à 72
Streptosporangium	69 à 71
Streptoverticillium	69 à 73
Thermoactinomyces	53 à 55

La taille de l'ADN des *actinomycètes* est de 3.7 paire de base, leur durée de réplication est de 50 à 65 minutes. Les bactéries *actinomycétales* possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. A la suite de croisements des *actinomycètes*, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent µun rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques, ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (Larpent *et al*., 1989).

1- Substances bioactives produites par les actinomycètes

Les *actinomycètes* représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des Antibiotiques, d'enzymes extracellulaires et des antifongiques. Ils sont à l'origine de plus de 45 % de composés bioactifs connus, 34 % dérivent du genre *Streptomyces* et 11 % des genres *d'actinomycètes* rares.

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 (avermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur 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).

1-1- Antibiotiques

1-1-1-Définition des antibiotiques

Le mot antibiotique fut employé pour la première fois, en 1942 par Waksman qui en a donné la définition suivante : Un antibiotique est une substance chimiquement définie, produite par des microorganismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou d'autre microorganismes en solution dilué in vitro ou in vivo (Simon et Meunier, 1970). Les antibiotiques sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes (Marinelli, 2009).*Les actinomycètes* sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques (Berdy, 2005) (Figure 9).

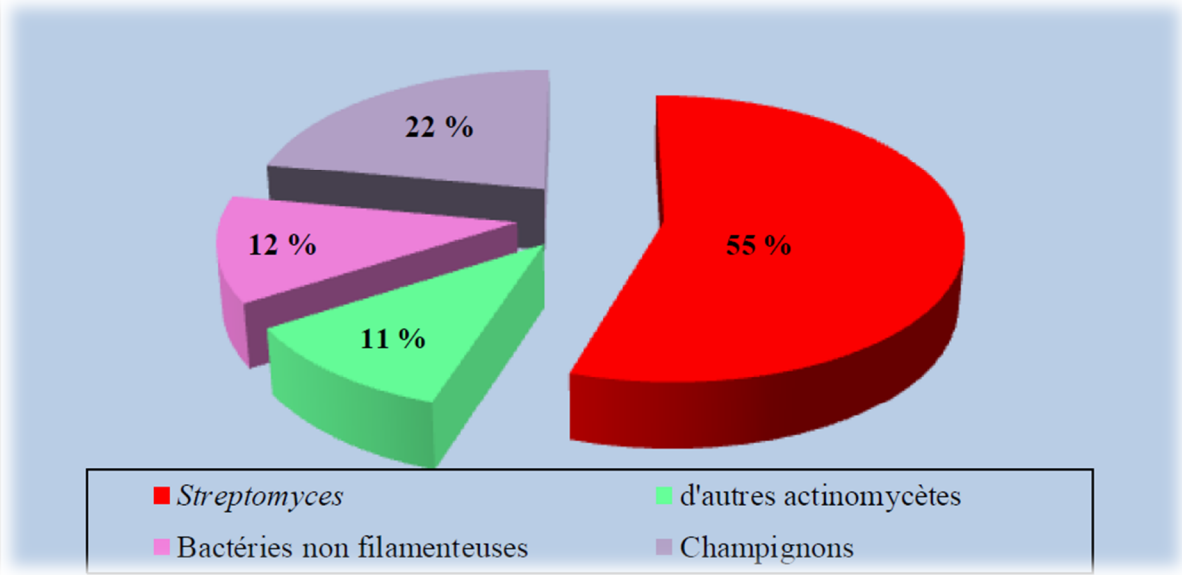


Figure 9 : Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les *actinomycètes*, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005).

Les *actinomycètes* sont surtout importants du fait qu'ils sont à l'origine de nombreux antibiotiques. Plus de 70% des antibiotiques produits par ce vaste groupe bactérienne (Gundliffe ,2006). Le tableau.4, illustre quelques exemples d'antibiotiques produite par les *actinomycètes* (Loucif, 2010).

Tableau 4 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les *actinomycètes*.

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
1/Les agents antibactériens		
Micromonospora sp.	Clostomycine	**Takahashi *et al.*, 2003**
Streptomyces griseus	Candicidine	**Jinenez *et al.*, 2009**
Streptomyces lydicus	Streptolydigine	**Liu*et al.*, 2007**
Streptomyce lindensis	Rétamycine	**Inoue *et al.*, 2007**
Marinispora sp.	Marinomycine	**Sturdikovà et Sturdik, 2009**
Verrucosispora sp.	Abyssomycine	**Sturdikovà et Sturdik, 2009**

1-1-2-Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification.

Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les β lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicols, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques, ….etc (Smaoui, 2010).

Familles des β-lactamines

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β-lactame indispensable à l'activité antibiotique (Cavallo et *al*., 2004). La thienamycine connu sous le nom de imipenème, l'un des derniers antibiotiques découvert possédant un cycle lactame et doté d'un large spectre d'action, est produit par l'espèce *actinomycetale*, *Streptomyces cattleya* (Demain et Lancini, 2006).

a) **Les pénicillines**

Le terme pénicilline regroupe plus de 50 antibiotiques chimiquement apparentés. Toutes les pénicillines ont une structure commune dans laquelle la chaîne cyclique β –lactame tient lieu de noyau .Les pénicillines sont produites par voie naturel ou par voie soumis synthétique (Tortora, 2012).

a) Les céphalosporines

Les céphalosporines appartiennent à la classe des céphèmes. Elles ont été classées en quatre générations selon leur spectre d'activité (Jacques, 2004).

b) Les aminosides

Les aminoglycosides, ou aminosides, forment une famille d'antibiotiques dont les molécules sont reliées par des liaisons glycosidiques. Ils comprennent la streptomycine et la gentamicine, qui perturbent les premières étapes de la synthèse des protéines en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. Il en résulte des erreurs de lecture

du code génétique des ARNm (Tortora, 2012). L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamycine produite par *Micromonospora purpurea* (Demain et lancini, 2006).

c) **Les tétracyclines**

Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaines latérales. Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien (Prescott et *al*., 2007). Elles s'interposent entre les ARN t porteurs des acides aminés et la sous-unité 30S du ribosome, ce qui empêche l'ajoute de nouveaux acides aminés au polypeptide en formation (Tortora, 2012).

d) Les polypeptides

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

1-1-3-Applications des antibiotiques

Les antibiotiques constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinomycètes et principalement des *Streptomyces*. Ces molécules d'origine naturelle manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreusen. Si les antibiotiques sont connus d'abord pour leurs applications médicales, ils présentent aussi un intérêt significatif dans les domaines de la santé animale, de l'élevage et de l'agriculture (Berdy, 1980), ainsi que dans le secteur pharmaceutique. Le tableau.5 détaille les antibiotiques synthétises par les *Streptomyces*, leurs classes chimiques, leurs cibles d'action ainsi que leurs applications.

Tableau 5 : Antibiotiques de *Streptomyces* utilises (Kieser e*t al*., 2000 ; Madigan et Martinko, 2007).

Antibiotique	Producteur	Classe	Cible	Application
Acide clavulanique	*S.clavuligerus*	β-lactamine	Inhibiteur de β-Lactamase	Antibactérien
Actinomycine D	*S.sp*	Peptide	Transcription	Antitumorale
Antimycine A	*S.sp*	Macrolide	Système cytochrome	Insecticide
Avermectine	*S.avremitilis*	Macrolide	Chaine d'ions chlorures	Antihelminthe
Bambermycine	*S.bambergiensis*	Aminoglycoside substitué	Peptidoglycane	Favorise la Croissance des plantes
Bialaphos	*S.hygroscopicus*	Peptide	Glutamine synthétase	Herbicide
Bléomycine	*S.verticillus*	Glycopeptide	ADN	Antitumoral
Candicidine	*S.griseus*	Macrolide polyène	Membrane (formation de pores)	Antifongique
Cephamycine	*S.sp*	β-lactamine	Peptidoglycane	Antibactérien
Chloramphénicol	*S .venezuelae*	N-dichloroacyl Phenylpropanoide	R	Antibactérien
Chlorotétracycline	*S.aureofaciens*	Tétracycline	R	Antibactérien
Cyclosérine	*S.orchidaceus*	Peptide cyclique substitué	Peptidoglycane	Antibactérien
Daptomycine	*S.roseosporus*	Lipopeptide	_	Antibactérien

R : l'antibiotique se lie au ribosome bloquant ainsi la synthèse protéique.

1-2-Les antifongiques

1-2-1-Définition

Ces substances ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse**.**

Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structur polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide *et al.*, 1986). La découverte de la nystatine en 1950 par Hazen et Brown, qui est un polymère a activité antifongique synthétisé par *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (Drouhet *et al .,* 1978). La chronologie de la découverte des différents agents antifongiques est résumée dans la figure ci-après (Figure 10).

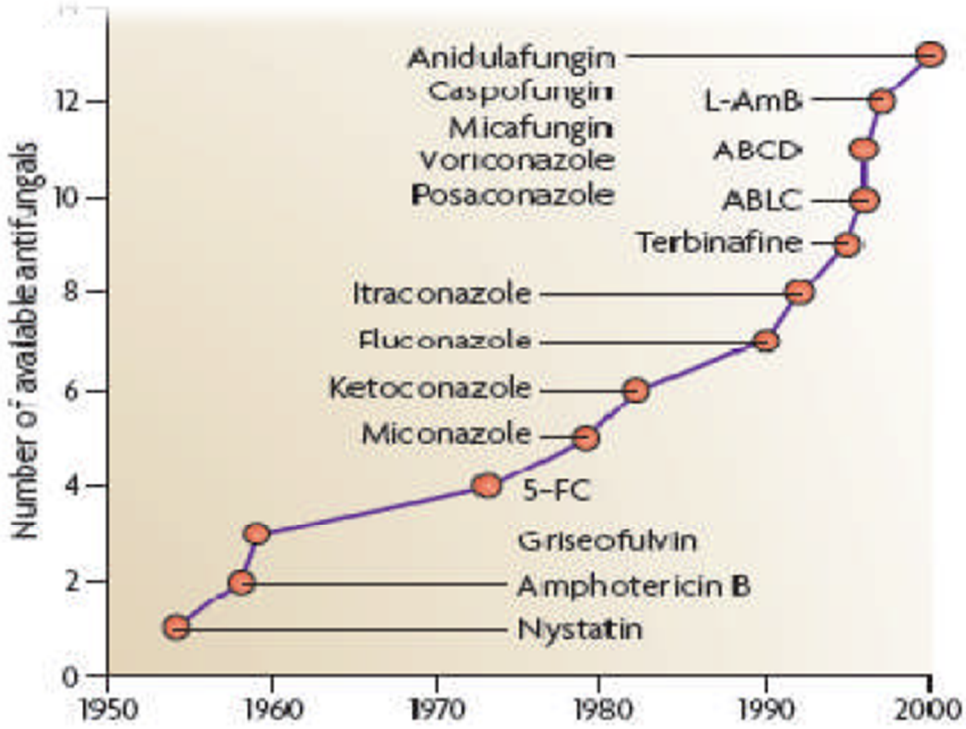
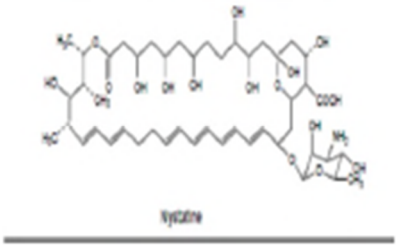
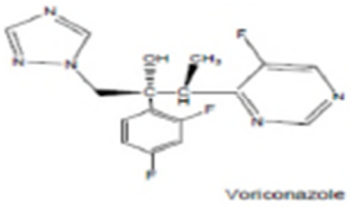
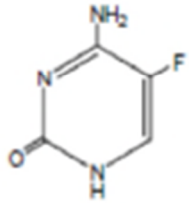
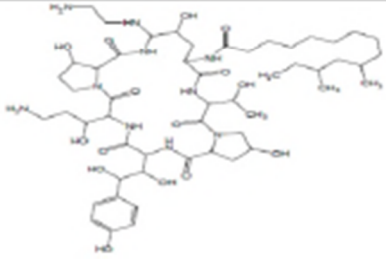


Figure 10 : Chronologie de la découverte des différents agents antifongiques (Ostrosky-zeichner*et al*., 2010).

1-2-2-Classification des antifongiques selon l'origine et la structure

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limite puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008), et sont résumées dans le tableau suivant **(tableau 11)**.

Tableau 11: les différentes classes d'antifongiques (Million, 2006 ; Tulkens, 2008).

Classes d'antifongiques	Cible	Mécanisme d'action	Structure chimique
Polyènes : **-Nystatine** (fongicide)	**Membrane fongique**	**Augmentation de la perméabilité membranaire par formation de complexes avec l'ergostérol**	
Azolés : **-voriconazole** (fongistatique)	**Membrane fongique**	**Inhibition de la synthèse de l'ergostérol**	
Fluoro-pyrimidines **-Flucytosine** (Fongistatique)	**Acides nucléiques**	**Perturbation de la synthèse protéique (substitution de la 5FU à l'uracyl dans l'ARN Altération de la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase**	
Candines **-Caspofungine** (Fongicides pour Candida Fongistatique pour Aspergillus)	**Paroi fongique**	**Inhibition de la B (1-3) D glucane synthétase**	

1) Antifongiques de synthèse chimique

- **Les azolés**

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Vandeputte, 2008).

- **Les fluorpyrimidines**

Ce sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine (Vandeputte, 2008).

2) Antifongiques naturels

- **Les polyènes**

Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine (figure 3) (Vandeputte, 2008).

- **Les échinocandines**

Parmi les échinocandines, on peut citer la caspofungine. Cette substance est issue d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*. Trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de développement : la caspofungine, anidulafungine et micafungine (Rautemaa *et al*., 2008).

- **Les antifongiques non polyéniques**

Les antifongiques non polyéniques ont des structures assez variées. Ils sont moins importants en thérapie que les polyènes sauf pour quelques uns comme les aminoglycosides (kasugamycine), les quinones (anthracyclines), les hétérocycles azolés (blasticidine), les aromatiques (griséofulvine), les composés alicycliques (cycloheximide). Leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans l'agriculture est parfois courante (Zitouni, 1995).

1-2-3-Applications des antifongiques

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux. Parmi ces substances en cites :

1- La griséofulvine est utilisée comme agent fongicide en agriculture et en clinique comme traitement orale des infections dermatophytes chez les animaux. Elle est utilisée, également, contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanés qui affectent la partie supérieure du corps.

2 - La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus sp* ainsi que de nombreuses moisissures. La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée uniquement pour des usages topique La nystatine agit comme tous les autre antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (Kerridge et Whelan, 1984).

1-3- Les enzymes

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des *actinomycètes* (Lopes *et al.*, 1999).

1-3-1- Les types d'enzymes

- Les cellulases

Les *actinomycètes*, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, Synthétises des enzymes qui dégradent la cellulose (Sanglier *et al*., 1993 ; Mason *et al*., 2001). D'autres espèces *d'actinomycètes* produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (Rivas *et al*., 2003).

- Les ligninases

Beaucoup d'espèces *d'actinomycètes* telles que *Streptomyces thermoviolaceus ,Streptomyces viridosporus, Streptomyces fusca* ont une activité lignocellulolytique et sont capables de produire l'hemeperoxidase, enzyme qui dégrade la lignine (Mason *et al*., 2001).

- Les amylases

Elles sont produites par la majorité des *actinomycètes*, les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*,*Thermomonospora curvata, Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al*., 1993).

- Les lipases

Les lipases endo et exocellulaires sont isolées à partir de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris.* Des phospholipases sont également isolées avec un taux élevé à partir des espèces du genre *Streptoverticillium* et de l'espéce *Micromonospora chalcea* (Demain et Solomon, 1985).

- Les protéases

Des protéases alcalines thermostables sont produites par les espèces thermophiles du genre *Micropolyspora*, d'autres protéases résistantes à la majorité des inhibiteurs de protéases, sont isolées à partir du genre *Oerskovia,* d'autres genres *d'actinomycètes* tel que les genres *Actinomadura, Micromonospora, Nocardiopsis, Planomonospora, Planobispora* sont capables de produire des kératinases. Les élastinases sont élaborées par plusieurs souches appartenant à14 genres *d'actinomycètes* (Demain et Solomon, 1985 ; Chitte *et al*., 1999).

1-3-2-Application des enzymes

Les enzymes sont les produits industriels les plus importants des *actinomycètes* (Theilleux, 1993). Les enzymes extracellulaires qui sont d'une importance majeure dans l'industrie. (Tableau 7).

Tableau 7 : Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels (Kirk *et al.,* 2005).

Secteur industriel ou Classe d'utilisation	Enzyme	Application
Industrie des détergents	-Cellulase -Amylase -Protéase -Lipase	-Nettoyage, clarification des couleurs. -Enlèvement des tâches d'amidon -Enlèvement des tâches protéiques -Enlèvement des tâches des graisses
Industrie des boissons	-Pectinase -Amylase	-Dépectinisation, Clarification des jus, broyage. -Traitement des jus.
Produits laitiers	-Pectine méthyl estèrase -Protéase -Lipase	-Affermissement de produits à base de fruits. -Lait caillé. -Aromes des fromages.
Industrie textile	-Cellulase -Pectate lyase	-Assouplissement du coton -Lessivage

1- La résistance bactérienne

Une bactérie est dit résistante lorsqu'elle se développe en présence d'une concentration d'antibiotique, qui habituellement, inhibe sa croissance.

1-1-Résistance aux antibiotiques

1-1-1- Définitions

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce. On distingue deux types de résistance bactérienne, la résistance naturelle et la résistance acquise.

1-1-2-Les types de résistance

a- La résistance naturelle

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewskiet Rabaud, 2010). La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (Smaoui, 2010), elle fait partie du patrimoine génétique normale du germe (Yala *et al.,* 2001). *Klebsiella spp* produit naturellement des bêta-lactamases, et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Lozniewski et Rabaud, 2010).

b- La résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (Yala *et al.,* 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007) . Comme le montre les figures.11 et 12.

- **Résistance par mutation chromosomique**

Les résistances bactériennes par mutation chromosomique sont induites par des modifications structurales de chromosome pouvant se traduire soit par un problème de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques, soit en rendant les cibles spécifiques des antibiotiques indifférentes.

La résistance chromosomique est un phénomène qui présente plusieurs caractères exceptionnels. Il s'agit premièrement de sa rareté puisqu'il intervient en moyenne tous les 10^5 à 10^{10} divisions de la bactérie. Ensuite elle possède un caractère aléatoire car l'antibiotique n'est par une molécule mutagène donc n'induit pas de mutation chez la bactérie. Cependant l'antibiotique participe à la sélection des bactéries mutantes. On note aussi son caractère spécifique (affecte un antibiotique ou une famille d'antibiotiques qui ont le même mécanisme d'action), son indépendance et son absence de transmissibilité (Courvalin *et al.*, 2001).

- **La résistance par acquisition de gènes**

Il s'agit ici de la résistance par un gain d'ADN extra-chromosomique le plus souvent de nature plasmidique. Le plasmide est un fragment d'ADN extra-chromosomique (présent dans le cytoplasme) et qui peut porter un ou plusieurs gènes de résistance. Ces fragments d'ADN peuvent être transmis d'une bactérie donneuse à une autre bactérie dite receveuse ; cette transmission peut se faire entre deux espèces différentes de bactéries. A travers ce mécanisme, on se trouve face a une facilite d'acquisition de résistance et même de multi-résistance contrairement à celle acquise par mutation d'ADN chromosomique. Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents dont la transduction (avec un bactériophage comme vecteur), la transformation (capture d'ADN par la bactérie) et la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente) (Baudry et Brézellec, 2006).

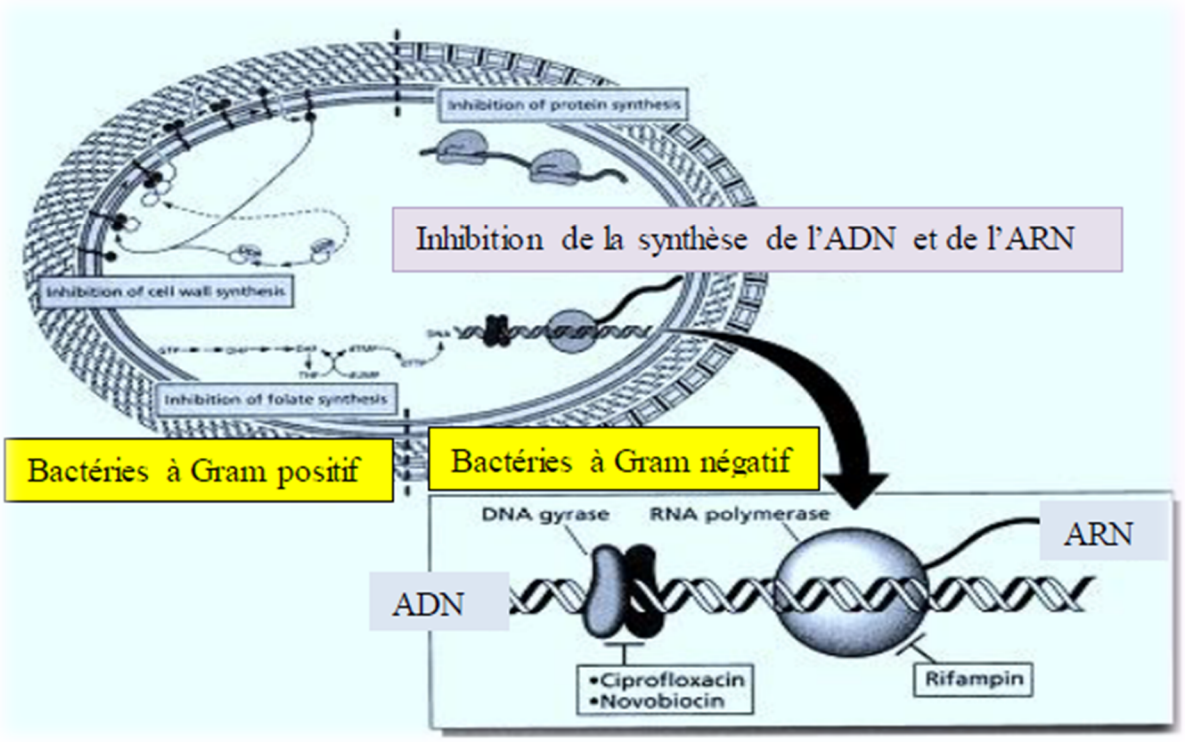


Figure 11 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Walsh *et al.,* 2001).

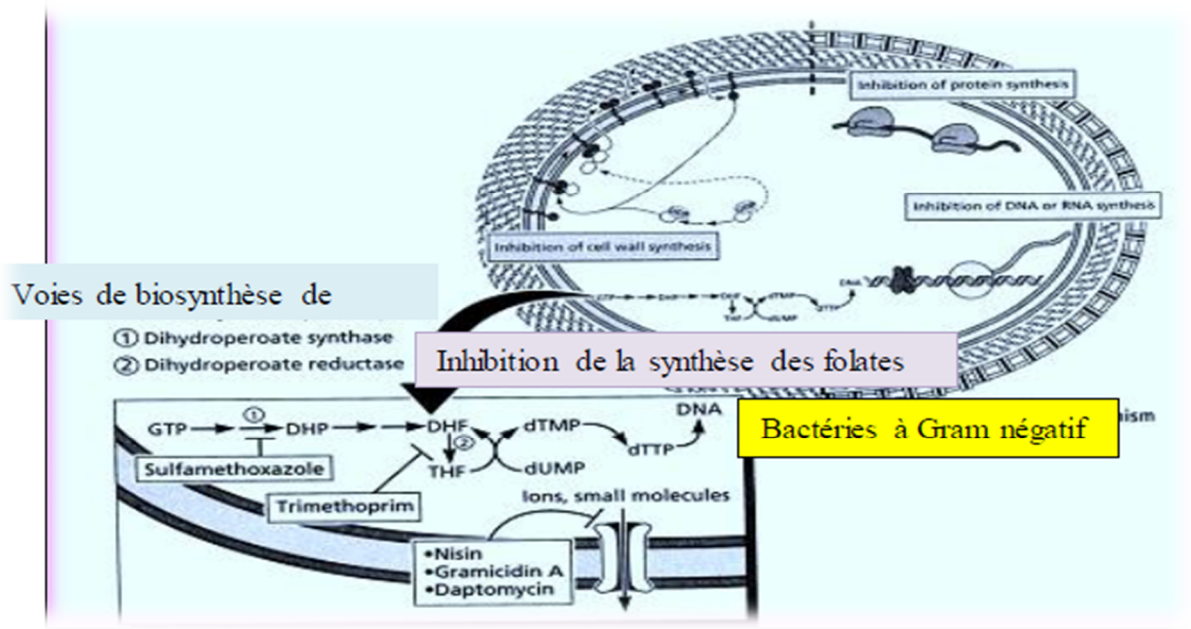


Figure 12 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates (Walsh *et al.,* 2001).

La résistance de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 8 : La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques (Loucif, 2006).

β- lactamines Pénicilline anti-Pseudomonas Céphalosporine	Inhibent la formation de ponts peptidiques au niveau de la paroi cellulaire.	B-lactamase plasmidique, B-lactamase chromosomique diminuent l'affinité des protéines liant la pénicilline
Aminosides (Tobramycine, Gentamycine)	Inhibent la synthèse protéique en agissant au niveau de l'unité ribosomique 30S	Enzymes modifiant les aminosides ; altération de la structure du ribosome ; diminution de la capacité des aminosides.
Quinolones (Ciprofloxacine)	Inhibe l'ADN gyrase	Mutation au niveau de l'ADN gyrase ; altération des protéines de la membrane externe.

1-1-3 Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne due aux effets des antibiotiques, se manifeste par les mécanismes suivants :

- Production d'enzymes qui détruisent l'antibiotique.

- Changement de la perméabilité aux antibiotiques.

- Développement d'une altération structurelle du récepteur à l'antibiotique.

- Développement d'une autre voie métabolique qui permet d'éviter l'inhibition provoquée par l'antibiotique.

- Développement d'un changement enzymatique qui permet un changement d'affinité à l'antibiotique de la part de la bactérie (Helali, 1994).

1-2-Résistance aux antifongiques

1-2-1-Définitions

Les résistances aux antifongiques peuvent être :

a- Naturelles (primaires, caractère d'espèce ; par exemple, *C. kruzei* et fluconazole).

b- Acquises (secondaires, caractère de souche, résultant de mutations et de la surexpression de certains gènes).

La résistance aux antifongiques continue à croitre et à évoluer, compliquant ainsi la prise en charge des malades. Divers mécanismes sont impliqués. Pour le genre *Candida*, largement isolé en clinique, la résistance aux dérivés azolés intervient par un mécanisme influant l'effluxmédité par des pompes membranaires. La résistance à l'echinocandine intervient par une mutation modifiant la cible moléculaire de cet antifongique (Pfaller, 2012). Parmi les stratégies proposées pour pallier à la résistance des champignons, on peut citer la recherche de nouvelles molécules, l'étude approfondie de la relation champignon-hôte et l'étude génomique. Ceci peut mettre en évidence de nouvelles possibilités de traitements, et permet par la même occasion la détection de nouvelles cibles (Vandeputte *et al*., 2011).

1-2-2-Le mode d'action

On note le mode d'action de deux voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les polyénes, les derives azolés.

- **Mode d'action des polyénes**

Les polyénes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer a la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. Les données de résonnance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 a 100 nm de diamètre (Figure13). La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K+, a l'origine de la lyse cellulaire (Lemke *et al.*, 2005).

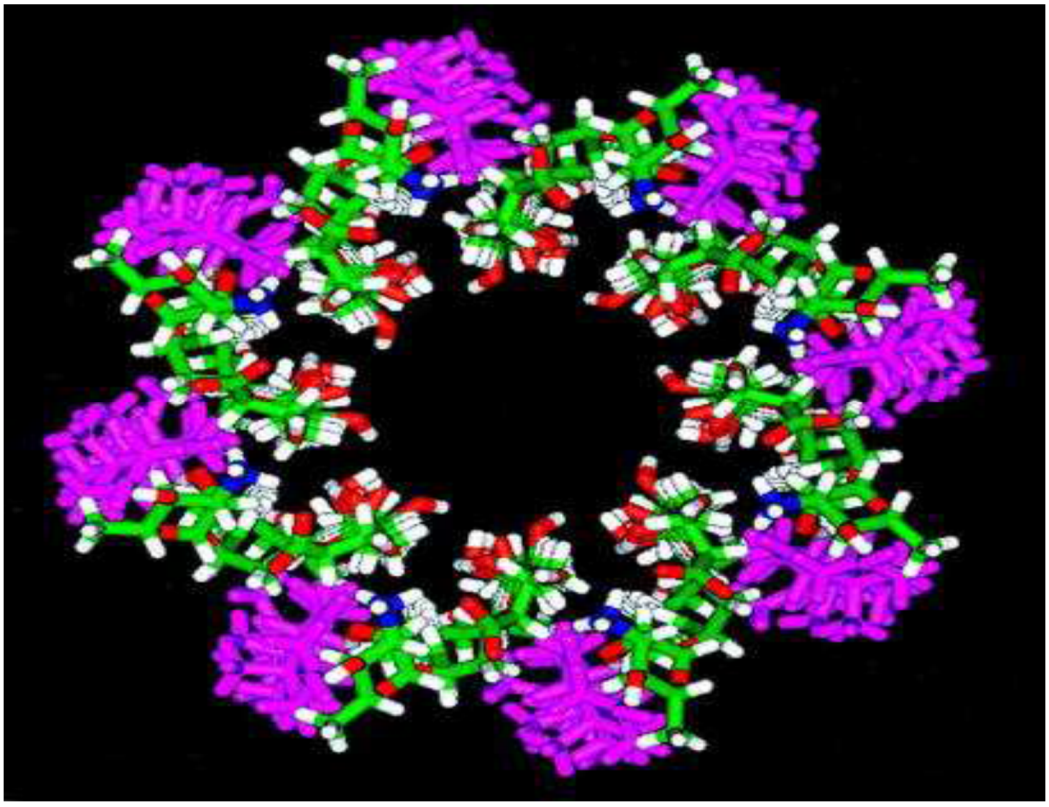


Figure 13 : Modélisation tri-dimensionnelle du pore forme par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique, d'après Baginski *et al.* (1997). Amphotéricine B : blanc (H), vert (C), rouge (O), bleu (N); ergostérol : rose.

Si les données structurales concernant ces molécules indiquent que leur cible cellulaire est l'ergostérol, et bien que leur liaison a l'ergostérol ait été démontrée (Baginski *et al.*, 1997; Milhaud *et al.*, 2002; Paquet et al., 2002), une controverse existe quant a une éventuelle action au niveau intracellulaire. Des travaux ont en effet suggéré que les polyénes seraient capables d'induire un stress oxydatif, notamment chez *C. albicans* (Ghannoum et Rice, 1999; Akins, 2005; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006); de plus, il semble que leur activité soit diminuée en conditions hypoxiques (Warn *et al.*, 2004).

- **Mode d'action des azolés**

Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Ils inhibent spécifiquement la lanostérol 14 déméthylase a cytochrome P450, codée par le gène *ERG11*. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle imidazole ou triazolé a l'atome de fer de l'hème de

l'enzyme (Figure14) et a pour conséquence l'accumulation de dérives 14méthylés, dont la métabolisation par les enzymes situées en aval d'ERG11p dans la voie de biosynthèse produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol (Carillo-Munoz *et al.*, 2006).

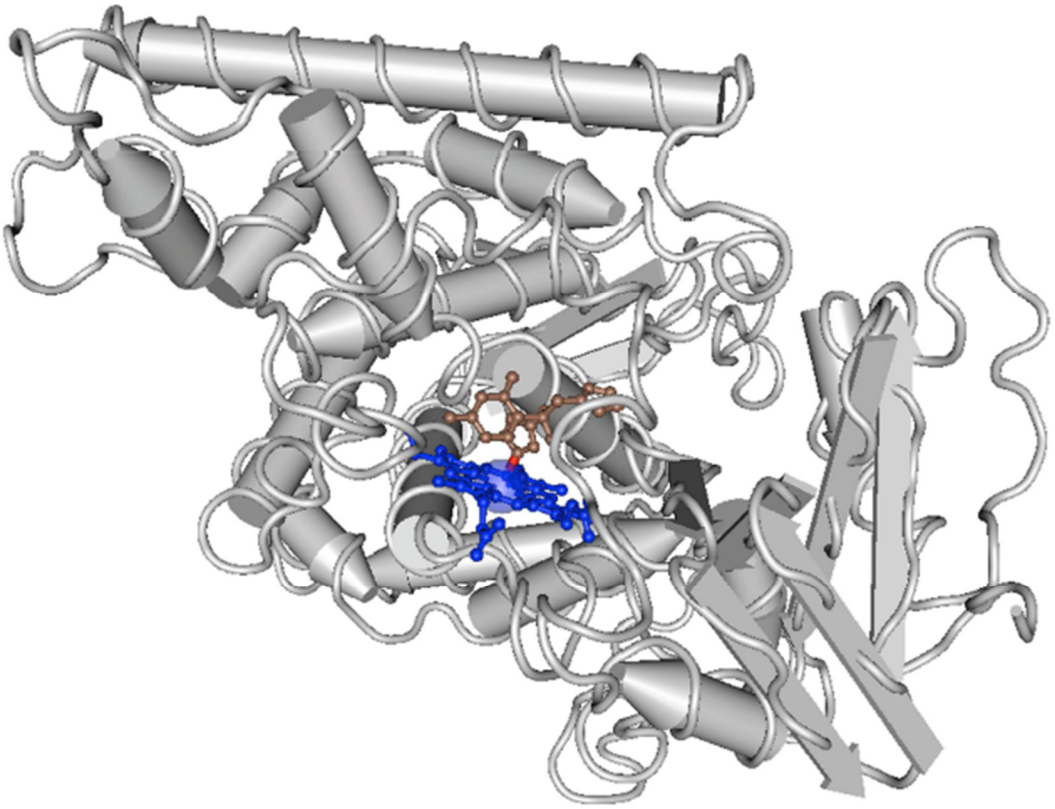


Figure 14: Structure tri-dimensionnelle de la stérol 14 déméthylase de *Mycobacterium tuberculosis* en interaction avec le fluconazole, d'après Podust *et al.* (2001). En gris, ERG11p; en marron, fluconazole; en bleu, hème; et en rouge, liaison entre l'azote libre du fluconazole et le fer de l'hème.

La spécificité de chaque azoleé est dépendante de la nature du substituant sur le carbone en position sur la chaine latérale greffée sur l'atome d'azote en un du noyau imidazole ou triazole. De même, les effets secondaires observes avec les antifongiques azolés sont le plus souvent la conséquence de l'affinité des azolés pour les cytochromes P450, présents également chez l'homme (White *et al.*, 1998; Sanglard, 2002; Carillo-Munoz *et al.*, 2006).

1-Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau des laboratoires communs I et II d'analyses physico-chimiques et le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou, durant la période allant du mois de Mars au mois de juin de l'année 2016.

1-1-Matériel

1-1-1- Les souches d'actinomycètes

Les souches *d'actinomycètes* ont été isolée et purifier à partir des échantillons prélevés au niveau de la commune d'Ain El Hammam, wilaya de Tizi-Ouzou (Ben Yaou,2015), identifiée et codées, « R8' », « R14' », « TB0304 » aimablement fournies par Mr Ouelhadj.

1-1-2-Matériel de laboratoire

Tableau 9: Produits chimiques et réactif.

Produits chimiques et réactif	Source
Acétate d'éthyle	Biochem Chemopharma France
Chloroforme	Sigma Aldrich Allemagne
Méthanol	Sigma Aldrich Allemagne
solution de Lugol	Biochem Chemopharma Québec
Violet de Gentiane	Sigma Aldrich Allemagne
Fuchsine	Fluka Analytical Allemagne

Huile à immersion	Biochem Chemopharma France
Huile de vaseline	Biochem ChemopharmaFrance
Eau oxygéné (H_2O_2)	/
eau distillée	/
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Sigma Aldrich Allemagne
Acide chlorhydrique (HCl)	Sigma Aldrich Allemagne
Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma Aldrich Allemagne
Poudre de Zinc	Sigma Aldrich Allemagne
Réactif de Kovacs	Sigma Aldrich Allemagne
Créatinine à 1% (VP1) et (VP2)	Sigma Aldrich Allemagne
Créatinine à 1% (VP1) et (VP2)	Sigma Aldrich Allemagne
Réactif NR2	Sigma Aldrich Allemagne
Rouge de méthyle (RM)	Sigma Aldrich Allemagne

Tableau 10: Milieux de culture utilisée.

Milieu de culture	Abréviation	Utilisation	Source
Milieu Mueller-Hinton	MH	Repiquage des bactéries	CondaPronadisa Espagne
Milieu Sabouraud	SAB	Repiquage des Souches Fongique	Institut Pasteur Algérie
Milieu Bennet	/	Repiquage des Actinomycétes	/
Le milieu peptonée exempt d'indole	EPE	Recherche de la production d'indole	Institut Pasteur Algérie
milieu Clark et Lub	/	Caractère Rouge de méthyle et Voges Proskauer	CondaPronadisa Espagne
Le milieu MEVAG	/	Détermination de la voie	CondaPronadisa Espagne
Le milieu Mannitol Mobilité	/	Caractère mannitol et mobilité	CondaPronadisa Espagne
le milieu Citrate de Simmons	/	Utilisation du citrate commev	Institut Pasteur Algérie
La gélose Triple seule source de carbone	TSI	Etude de la fermentation des sucres	CondaPronadisa Espagne
milieu nutritif gélosé conteant1%d'amidon	/	Hydrolyse de l'amidon	/
milieu nutritif gélosé contenant lait écrémée	/	Dégradation des protéines	/

Voir annexe 1pour la préparation des milieux de culture utilisés.

1-1-3-Appareillage

Tableau 11: Les Appareilles utilisés

Appareillage	Source
Centrifugeuse	HettichUniversal / K2S.
Autoclave	WEBECO. Allemagne.
Bain Marie	MEMMERT. Allemagne
Réfrigérateur	ENIEM. Algérie.
Spectrophotomètre	Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK)
Etuve	BINDER. Allemagne.
Balance de précision	KERN 770. Allemagne
Ampoule à décanter.	/
Hotte	/
Rotavapor	/
Broyeur électrique	KRUPS 75. Allemagne
Agitateur à barreau magnétique non chauffant	GARHARDT. Allemagne

1-1-4-Souches microbiennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées appartiennent à des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont activées à 37 °C par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH).

Trois des souches bactériennes utilisées (tableau 12) sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Les souches fongiques sont des espèces pathogènes responsables des mycoses chez l'homme, repiquées sur milieu Sabouraud et incubées à 28 °C.

Tableau 12: Les souches microbiennes utilisées

Souches bactériennes	*Escherichia coli* (ATCC25922)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou
	Staphylococcus aureus (ATCC43300)	Gram positif	
	Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)	Gram négatif	
	Escherichia coli	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou
	Staphylococcus aureus	Gram positif	
	Klebsiella pneumoniae	Gram négatif	
Souches fongiques	*Candida albicans*	Levure	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou
	Aspergillus niger	Moisissure	

1-1-5-Molécules de référence utilisées : antibiotiques et antifongique

Tableau 13 : Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.

	Nom	**Abréviation**	**Compagnie**
Antibiotiques	Gentamycine	CN	Bioanalyse Inde
	Amoxycilline	AMX- AX- AM	
	Oxytétracycline	O	
	Trimethoprim / Sulfamethoxazole	SXT	
	Céfoxitine	FOX	
Antifongique	Amphotéricine B Fungizone®	/	Haupt Pharma Allemagne

1-2-Méthodes

1-2-1-Sélection des actinomycètes bioactives et caractérisation partielle des souches représentatives

a-Préparation des frottis

Sur des lames en verre propres, des frottis des trois souches *d'actinomycètes* ont été réalisés puis fixés par la chaleur en les passants, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen.

b-Coloration de Gram

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

Les frottis préalablement préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane pendant une minute, ensuite on couvre ces dernières deux fois avec de lugol pendant 45 seconds. Puis on décolore avec de l'alcool pendant 30 sec, on utilise l'eau du robinet pour arrêter l'effet de l'alcool, les frottis sont recolorés à la fuschine pendant une minute puis on rince abondamment à l'eau du robinet.

Une fois les lames son séchées, ils vont être examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (Gx1000).

1-2-2-Recherche de l'activité antimicrobienne

a-Criblage de l'activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar

Le criblage sert à la fois à confirmer la présence ou l'absence de l'activité antibactérienne et à obtenir des données quantitatives concrétisées par l'amplitude des zones d'inhibition autour des cylindres d'agar. Les souches *d'actinomycètes* sont ensemencées en stries serrées sur le milieu Bennett et incubées à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres d'agar de 8 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'emporte pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries cibles (On dépose 100µl de la solution standardisée d'inoculum (10^6 à 10^7 UFC/ml) dans chaque boîte de pétri qui contient

le milieu Muller Hinton, ces derniers sont répartis uniformément avec un râteau puis sont laissées séchées pendant cinq minutes). Les boites sont alors placées à 4°C pendant 4 heures pour permettre aux substances actives de diffuser dans la gélose, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres d'inhibition sont alors mesurés. Cinq antibiotiques sont utilisés comme des témoins (Kitouni, 2007).

1- Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur le Mueller-Hinton, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Les souches fongiques ont été repiquées de la même manière sur le milieu Sabouraud, l'incubation est faite à 28 °C.

2- Préparation des pré-cultures

A partir des géloses nutritives inclinées pour les souches ATCC et des boites de pétri (antibiogramme) pour les souches cliniques, nous avons effectué des repiquages des souches bactériennes sur gélose Mueller-Hinton (MH) afin d'avoir une culture jeune de 18h à 24h en phase exponentielle de croissance.

3- Préparation et standardisation de l'inoculum

Après incubation, des suspensions bactériennes sont préparées dans de l'eau physiologique stérile, bien homogénéisées, leur opacité doit être équivalente à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à une concentration de 10^6 à 10^7 germes/ml. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture, ou bien de l'eau physiologique stérile.

4- Lecture des résultats

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition claires (en millimètres) qui se forment autour des cylindres d'agar.

b- Criblage de l'activité antifongique

Les souches ayant montré une activité antibactérienne sont ensuite testées contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* via la méthode des cylindres d'agar. Les souches *d'actinomycètes* sont ensemencées en stries serrées sur le milieu Bennett et incubées à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres d'agar de 8 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'emporte pièce et déposés à la surface du milieu Sabouraud préalablement ensemencé par les souches fongiques tests (On dépose 100µl de la solution standardisée d'inoculum (10^6 à 10^7 UFC/ml) dans chaque boîte de pétri qui contient le milieu Sabouraud, ces derniers sont répartis uniformément avec un râteau puis sont laissées séchées pendant cinq minutes). Les boites sont alors placées à 4°C pendant 4 heures pour permettre aux substances actives de diffuser dans la gélose, puis incubées à 28°C pendant 7 jours. Les diamètres d'inhibition sont alors mesurés. L'amphotéricine est utilisée comme un témoin.

1-2-3-Extraction des produits actifs par des solvants organiques (Boudemagh, 2007).

a-Culture des actinomycètes

Une colonie de chaque souche *d'actinomycètes* est ensemencée dans un Erlenmeyer de 50 ml de volume contenant le milieu Bennet liquide. Les cultures sont incubées à 28°C avec agitation pendant 12 heures. Cependant ces cultures sont entièrement versées dans un autre Erlenmeyer de 250 ml de volume contenant 200 ml de milieu Bennet liquide. Ces nouvelles cultures sont, ensuite, incubées à 28°C avec agitation pendant 7 jours.

b - Extraction des produits actifs à partir du culot

Les cultures sont centrifugées à 5000g pendant 15minutes, le mycélium présent dans le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile. Un volume du culot est traité pendant 12 heures environ, sous agitation à température ambiante, avec cinq volumes de méthanol. La solution obtenue est centrifugée à 5000g pendant 5 minutes. Ces extraits méthanoliques sont concentrés sous vide à 40°C à l'aide d'un Rotavapor (Boudemagh, 2007). (Figure 15).

c- Extraction des produits actifs à partir du surnageant

Une batterie de solvant non miscible à l'eau sont testées, afin de déterminer le ou les solvants capables de dissoudre les produits actifs présents dans le surnageant de chaque culture en Erlenmeyer. Les solvants testés sont les suivants : le chloroforme et l'acétate d'éthyle.

Après séparation des phases dans les ampoules à décanter, la partie organique obtenue pour chaque souche à été concentrée par évaporation au Rotavapor à 40°C (figure 16). Ces extraits sont testés pour leur activité antibactérienne et antifongique par la technique de disque en papier. (Boudemagh, 2007).

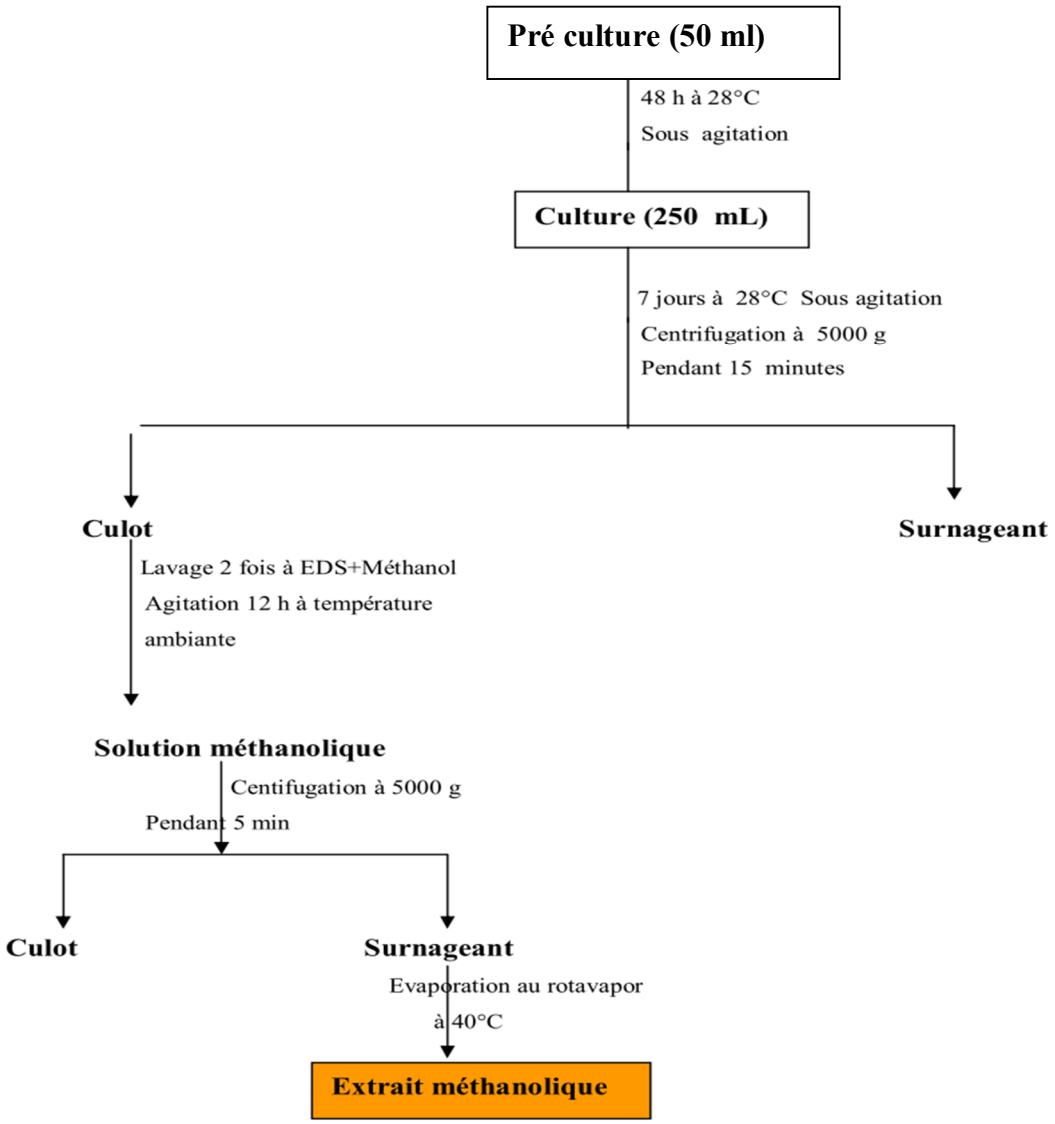


Figure 15 : Protocole d'extraction des produits actifs à partir du culot de la culture (Boudemagh, 2007).

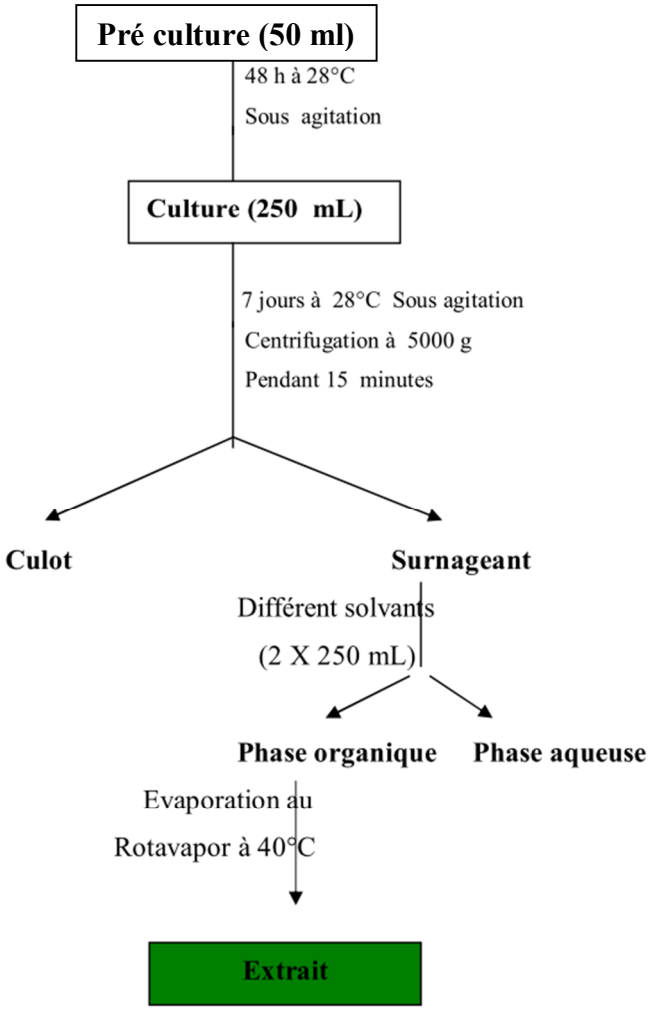


Figure 16 : Protocole d'extraction des produits actifs à partir du surnageant de culture (Boudmagh, 2007).

d-Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits (Technique des disques en papier)

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose (Ouelhadj *et al.,* 2014). Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé Mueller-Hinton pour les bactéries en surfusion sont laissées solidifiées et séchées à une température de 25°C/ 30 min. 100µl de la solution standardisée d'inoculum (10^6 à 10^7 UFC/ml) est versé dans chaque boîte puis uniformément répartie avec un râteau. Des disques stériles en papier Wattman (6mm de diamètre) préalablement imbibés de 15µl de chaque extrait .ces disques sont séchés à température ambiante, ensuite déposés à la surface du milieu gélosé Mueller-Hinton, préalablement, ensemencé par les microorganismes tests. Les boittes

sont laissées à 4°C pendant 4 heures, pour une bonne diffusion puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries cibles et à 28°C pour les champignons pendant 5 à 7 jours. Les diamètres d'inhibition sont alors mesurés.

1-2-4-Etude de la stabilité de molécules actives

Après extraction et purification des molécules actives, il est indispensable d'étudier la stabilité de ces dernières en fonction de certains critères physicochimiques (pH et températures). Après chaque test, l'activité est testée par la méthode des disques en papier sur le germe cible le plus sensible. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des témoins.

a- Effet du pH

Des fractions de l'extrait des cultures sont ajustées à des pH 3, 7 et 11 en utilisant l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'acide chlorhydrique (HCl), l'activité est testée par la méthode des disques en papier sur le germe cible le plus sensible**.** Une fraction a pH 7 est utilisée comme témoin (Badji et *al* ., 2006).

b- Effet de la température

D'autres fractions de l'extrait à pH 7 ont subit un traitement thermique à 4°C pendant 7 jours, l'activité est testée par la méthode des disques en papier sur le germe cible le plus sensible.

1-2-5-Galerie Biochimique

a) Recherche de la production d'indole

Le milieu EPE (eau peptonée exempt d'indole) est ensemencé de quelque goutte de la souche préalablement mise en suspension. La lecture est effectuée après 7 jours d'incubation à 28°C. L'indole est mis en évidence par l'addition du réactif de Kovacs ; la réaction forme un composé coloré en rouge intense, ce dernier est concentré à la surface du tube formant une sorte d'anneau.

b) Caractère Rouge de méthyle et Voges Proskauer

Les caractères RM (Rouge de méthyle) et VP (Voges Proskauer) sont étudiés dans le milieu Clark et Lub ; ce dernier permet l'identification de la voie de fermentation des microorganismes. Il existe plusieurs voies fermentaire dont la voie des acides mixtes et la voie du butylène glycol :

La réaction RM consiste à mètre en évidence, par une réaction colorée, les bactéries produisant des acides organiques (acide formique, acétique, lactique, butyrique, succinique, malique, oxalique, etc.) par la voie des acides mixtes. Dans le cas d'une réaction positive le milieu vire en rouge par acidification, soit fermentation des acides mixtes. A l'inverse, la coloration jaune montre un milieu peu acide ou réalcalinisé, soit une absence de fermentation des acides mixtes.

La réaction VP consiste à mètre en évidence, par une réaction colorée, les bactéries produisant le butanediol et l'acétoine par la voie du butyléne glycol (fermentation butanediolique). La production d'acétoine et mise en évidence par l'ajout de soude IN (VPI) et de a-naphtol (VP) ce qui provoque un virage du milieu vers la couleur rose.

La souche préalablement mise en suspension est ensemencée sur le milieu Clarck et Lub, puis incubée à 28°c pendant 7 jours. Le milieu est ensuite répartir sur deux tubes, l'un pour la réaction RM et l'autre pour VP :

- Réaction RM : ajout de 2 gouttes de solution de rouge de méthyle à 2.5% d'alcool à l'un des deux tubes, la réaction est quasi instantanée.
- Réaction VP : ajout de 3 gouttes de solution de soude. Laisser le tube ouvert et le maintenir en position incliné afin de maximiser la surface du liquide en contact avec de l'oxygène. Laisser agir environ 10 minutes.

c) Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le milieu pour l'étude de la voie d'attaque des Glucides (MEVAG) : il s'agit d'une gélose solide généralement composée de glucose et de rouge de phénol en guise d'indicateur de pH. Il permet de caractériser les bactéries fermentaires de celles oxydatives ou indifférentes. Les bactéries peuvent en effet utiliser deux voies pour cataboliser un sucre :

-Lors des respirations, le glucide est oxydé en CO2, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral).

-Lors des fermentations, le glucide est oxydé en acides, alcool ; qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement.

- Pour l'étude d'une souche bactérienne, en utilisera 2 tubes :
- L'un sera recouvert de vaseline (tube fermé)
- L'autre non recouvert (tube ouvert)

Le culot est ensemencé en piqure centrale, celui-ci est ensuite incubé à 28°c pendant 7 jours.

- Après incubation :
- Virage au jaune dans les deux tubes →Métabolisme fermentaire.
- Virage au jaune du tube non recouvert de vaseline → Métabolisme oxydatif.
- Pas de virage de couleur au niveau des deux tubes→ Bactérie inactive vis-à-vis du sucre.

d) Caractère mannitol et mobilité

Le milieu Mannitol mobilité est un milieu faiblement gélosé permettant de tester simultanément la mobilité et l'utilisation du mannitol :

- La fermentation du mannitol conduit à la formation de fructose qui est lui –même dégradé en acides à courtes chaines induisant ainsi une acidification du milieu dont la couleur vire vers le jaunes (changement de couleur de l'indicateur de pH : rouge de phénol).
- La mobilité est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (capacité des bactéries à envahir l'ensemble de ce milieu faiblement gélosé).

Un tube avec le Mannitol mobilité est ensemencé avec le germe étudié par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis incubé à 28°C pendant 7 jours.

e) Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le caractère citrate est recherché sur le milieu Citrate de Simmons. Ce milieu en tube incliné permet de mètre en évidence l'utilisation du Citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

La pente de milieu de Citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette pasteur stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à 28°C pendant 7 jours.

Les bactéries capable d'utiliser le citrate de sodium (acide citrique) comme seule source de carbone pourront se développer sur se milieu. La fermentation du citrate de sodium qui est un triacide sera transformé en diacide, entraînant ainsi une alcalinisation du milieu provoquant un virage de couleur du milieu vers le bleu (le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur de pH).

f) Etude de la fermentation des sucres (Glucose, lactose, saccharose) et recherche du caractèreH2S à l'aide du milieu d'identification multiple TSI

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des bactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène H2S. Ce milieu est constitué d'un culot et d'une pente. Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés en piqure centrale et sur la surface inclinée, puis incubés pendant 7 jours à 28°C. Les résultats se manifestent comme suit :

- Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).
- Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de se sucre a été abaissée au 1/10éme de celle du lactose ou du saccharose, de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement, ce qui entraîne un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une réalcalinisation plus prononcée ; par contre, la réaction acide (Couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube.
- Les germes qui fermentent le lactose et/ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.

- La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.
- La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

g) Recherche de la Nitrate Réductase

La respiration des bactéries ne s'effectue pas exclusivement sur l'oxygène. Les nitrates peuvent servir d'accepteurs d'électron pour former des nitrites. Parfois la réduction peut être poursuivie jusqu'au stade diazote.

L'utilisation des nitrates comme accepteur d'électron nécessite la présence d'une enzyme localisée dans la membrane plasmique de la bactérie : la Nitrate Réductase. Elle est mise en évidence par la présence de nitrites ou l'absence de nitrates après incubation de la bactérie sur un milieu nitraté.

Des tubes contenant de bouillon nutritif de nitrates de potassium sont ensemencée, puis incubée à 28°C. Pendant 7 jours, 3 gouttes des réactif NR1 et NR2 sont respectivement ajoutée au milieu (MARCHAL et *al*., 1991).

En cas de réaction positive : les nitrates réagissent avec les réactifs en donnant une coloration rouge. La bactérie sera donc classée NR+.

En cas de réaction négative : absence de nitrites →on rajoute de la poudre de Zinc ayant pour effet de réduire les nitrates en nitrites, deux cas de figure se présentent alors.

- Coloration rouge : le Zinc réduit les nitrates en nitrites, les réactifs ajoutés précédemment régissent donc avec ces nitrites et donnent une coloration rouge ; la bactérie ne possède donc pas de nitrate réductase.

h) Recherche de catalase

La présence de catalase est expérimentalement démontrée en mélangeant quelques colonies de la souche à étudier avec quelque goutte d'eau oxygénée, s'il y a présence de catalase on constate un phénomène d'effervescence au niveau de l'échantillon.

i) Recherche de l'oxydase

Quelque millilitres de la souche préalablement versés dans un tube à essai au quel on ajoute un disque d'oxydase. La réaction est quasi instantanée, si la souche est oxydase positive on devrait constater l'apparition de la couleur violette au bout d'une minute.

j) Recherche de la β⁻galactosidase

Quelque millilitres de la souche préalablement mise en suspension sont versés dans un tube à essai au quel on ajoute un disque ONPG. L'apparition d'une couleur jaune au bout d'une heure indique la présence de la β⁻galactosidase.

k) Croissance à différente températures

Afin de déterminer les niveaux de tolérance à des températures d'incubation croissantes et afin de cerner de façon approximative la température optimum de croissance des souches microbiennes sélectionnées, celle-ci ont été ensemencée sur le milieu Bennet puis incubée à 37°C et à 42°C pendant 7 jours.

1-2-6-L'activités enzymatiques

a- Dégradation de l'amidon

Ce test est réalisé en cultivant les trois souches *d'actinomycètes* sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de Gordon et Smith (1953). Après 7 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. À l'inverse, les zones contenants de l'amidon se colorent en brun.

b- Dégradation de la caséine

Ce test est réalisé en cultivant les trois souches *d'actinomycètes* sur milieu nutritif gélosé contenant lait écrémée à 10 %. La lecture des résultats est effectuée Après 7 jours d'incubation à 28°C. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par la présence d'une zone claire autour des colonies.

1-2-7-Analyse statistique

Les résultats de la production des molécules bioactives par les trois souches *d'actinomycètes* sont analysés en utilisant le logiciel Statistica version 7.1 en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) avec 5% de risque d'erreur.

1-Etude morphologique

1-1- Caractères culturaux

Après ensemencement des trois *d'actinomycètes* sur le milieu de culture Bennett, les colonies des souches R8', R14'et TB0304 apparaissent au bout de sept jours d'incubation à 28°C. La figure suivante illustre l'aspect et la couleur de ces trois souches ensemencées conjointement sur le milieu Bennett.



Figure 17 : Aspect morphologiques des trois souches d'actinomycètes R8', R14' et TB0304 respectivement**.**

1-2-Observation macroscopique des colonies suspectes

Après sept jours d'incubation, nous avons effectué des observations macroscopiques des différentes cultures utilisés. Les colonies suspectes répondant aux caractères morphologiques des actinomycètes sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau14: Aspect macroscopique des trois souches *d'actinomycètes*.

Les souches	Plan	Surface	Elévation	Couleur	Consistance	Filaments
R8'	Circulaire	Lisse	Bombés	Blanche virant vers noire	Sèche	+
R14'	Circulaire	Lisse	Plate	Blanche	Grasse	+
TB0304	Circulaire	Lisse	Plate	Jaune virant le blanc	Crémeuse	+

+ : Présence des filaments, - : Absence des filaments.

Nous avons utilisé le milieu de culture Bennett pour purifier les souches *d'actinomycètes* parce qu'il s'est révélé meilleur que certains d'autres. Selon les résultats de (Kitouni, 2007 ; Benyaou, 2015). Il permet une bonne croissance des souches: Cette propriété s'explique d'avantage par le fait que le milieu de Bennett est riche en substrats carbonés (comme le glucose) et en substrats azotés (extrait de levure et extrait de viande).

Une étude récente, où l'activité de 19 souches *d'actinomycètales* a été testée sur dix milieux différents, a donné le milieu Bennett comme étant le milieu idéal pour la production des substances antimicrobiennes (Loucif, 2011). C'est sur la base de ces observations que nous avons décidé d'effectuer la purification sur le milieu Bennett.

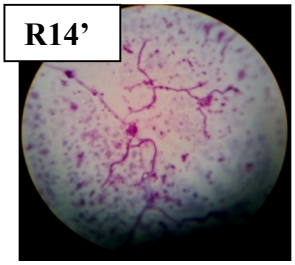
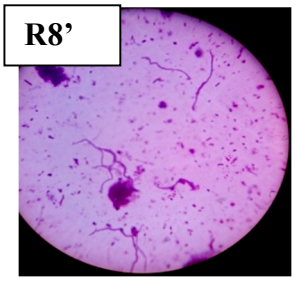
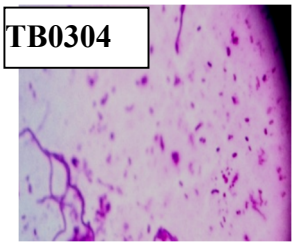
De nombreux auteurs s'accordent sur un profil macromorphologique et physiologique des actinomycètes plus ou moins général: il s'agit de sélectionner des colonies susceptibles d'appartenir au groupe des *actinomycètes* : colonies circulaires, le plus souvent sèches, d'aspect fongique, parfois duveteuses, et dont la croissance est relativement lente, comparée aux autre bactéries (Kitouni, 2007 ; Djaballah, 2010 ; Messaoudi, 2013 ; Benyaou, 2015).

1-3-Observation microscopique des colonies suspectes

Chaque colonie d'actinomycètes est observée au microscope optique (G×1000), ces observations sont effectués directement sur une lame pour confirmer son appartenance aux *actinomycètes* (caractères micromorphologiques) puis repiquée sur le milieu Bennett. Les résultats de la coloration de Gram reflètent la composition chimique de la paroi des bactéries d'une manière générale et particulièrement celle des *actinomycètes*.

L'observation microscopique des trois souches *d'actinomycètes* (R14, R8'et TB0304) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultats de l'observation microscopique à (G×1000) après coloration de Gram.

Aspects microscopiques (G × 100)	Caractère Gram	Filaments
R14' 	+	+
R8' 	+	+
TB0304 	+	+

+ : Bactérie Gram Positive, **- :** Bactérie Gram Négative

Après observation des frottis colorés au microscope, il s'est révélé que les trois souches *d'actinomycètes* sont des bactéries filamenteuses, à coloration de Gram positive, ces résultats sont proche à ceux de (Benyaou , 2015) qui à montré que ces *actinomycètes* sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive.

Les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies à coloration de Gram positive, qui poussent en produisant un mycélium végétatif (mycélium de substrat) ramifié et un mycélium aérien portant des chaînes d'arthrospores. Le mycélium de substrat et les spores peuvent être pigmentés, mais peuvent produire également des pigments diffusibles (Williams *et al*., 1989).

L'identification des genres *d'actinomycètes* repose principalement sur l'étude de caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium de substrat ou du mycélium aérien. Aussi, elle se base sur la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme et la présence de sclérotes (Aouar, 2012). D'autres examens au microscope électronique doivent également être effectués afin de déterminer l'ornementation des spores (Larpent *et al.*, 1989).

2-Recherche de l'activité antimicrobienne

2-1-Criblage de l'activité antibactérienne

Ce travail vise à montrer la présence ou l'absence d'une activité antimicrobienne des souches *d'actinomycètes*. L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar vis-à-vis de deux souches bactériennes à Gram positif et quatre souches bactériennes à Gram négatif. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Selon la quelle, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches *d'actinomycètes* contre les bactéries tests utilisées.

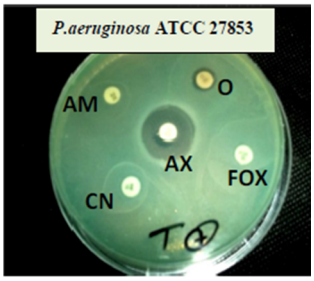
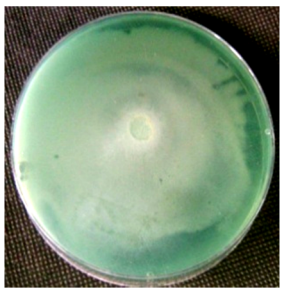
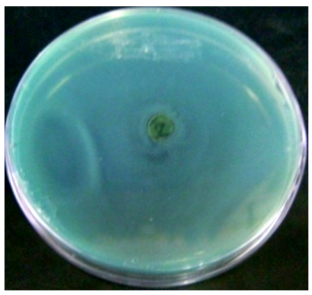
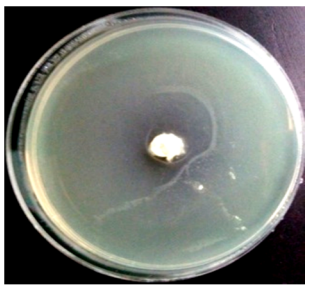
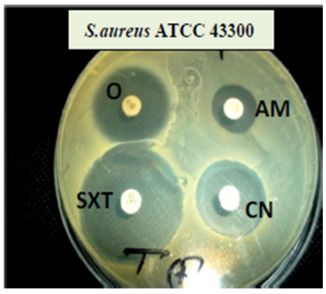
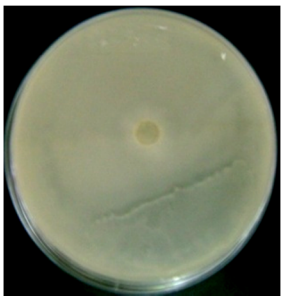
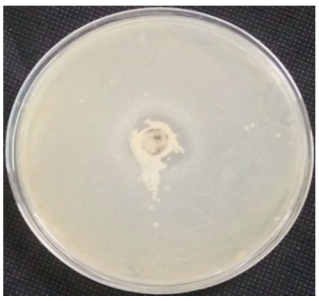
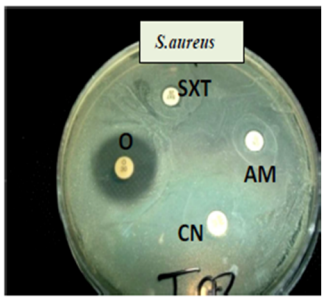
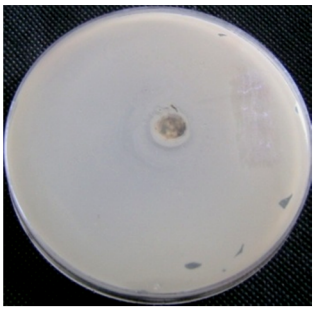
Les résultats de l'activité antibactérienne des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les six bactéries cibles présente dans le Tableau.16, d'où il en ressort que les trois souches *d'actinomycètes* sont actives au moins contre une des bactéries cibles étudiées.

Tableau16: Résultats du criblage des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les six bactéries cible.

Actinomycètes / **Bactéries cibles**	**R14'**	**R8'**	**TB0304**
E. coli ATCC 25922	-	+	-
S. aureus ATCC43300	-	+	-
P. aeruginos A TCC27853	-	-	+
E. coli	+	-	-
S. aureus	+	-	-
K. pneumoniae	-	-	-

+ : Présence d'activité antibactérienne, - : Absence d'activité antibactérienne

La souche TB0304 est active vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (Gram négatif), alors que la souche R14' présente une activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif). Seule la souche R8'qui présente une activité vis à vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (Gram positif) et *Escherichia coli* ATCC25922 (Gram négatif). Aucune de ces trois souches n'agit sur *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif). Ces résultats sont présentés dans la figure suivante :

Souches / Bactérie cibles	R14'	R8'	TB0304
			
			
			

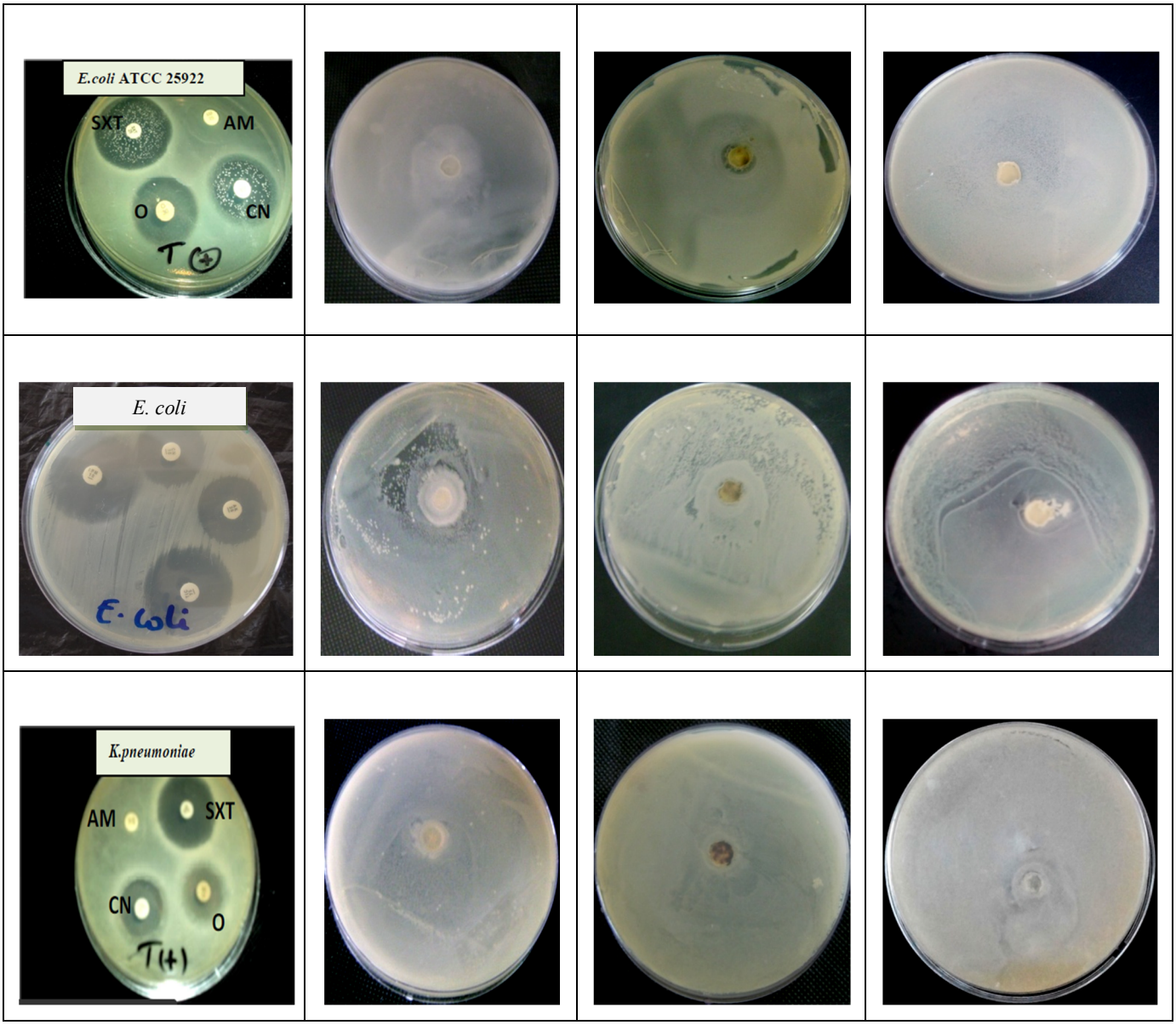


Figure 18 : Test d'activité des souches d'actinomycètes cultivées sur le milieu de Bennett contre les bactéries teste.SXT:Trimethoprim /Sulfamethoxazole ; O: Oxytétracycline ; CN: Gentamycine; AM /AX: Amoxycilline et FOX: Céfoxitine.

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des trois souches d'actinomycètes contre les six bactéries cibles sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau17: Diamètres en (mm) des zones d'inhibition des trois souches *d'actinomycètes* étudiées (Ø= moyenne ± Ecart type). (n=2), le Ø des cylindres d'agar est inclus (8mm).

Actinomycétes / Bactéries cibles	R14'	R8'	TB0304	Antibiotiques					
	Moyenne	Moyenne	Moyenne	O	CN	AM	AX	FOX	SXT
E. coli ATCC 25922	8±0,00	14±1,06	8±0,00	22	20	7	NT	NT	30
E. coli	22±1,41	8±0,00	8±0,00	19	28	21	NT	NT	30
*S.aureus*ATCC43300	8±0,00	10±0,46	8±0,00	25	21	16	NT	NT	32
S.aureus	26.5±2,12	8±0,00	8±0,00	9	20	7	NT	NT	7
*P.aeruginosa*ATCC27853	8±0,00	8±0,00	14±1,12	9	19	8	30	8	NT
K. pneumoniae	8±0,00	8±0,00	8±0,00	17	18	8	NT	NT	28

NT : non testé.

SXT: Trimethoprim /Sulfamethoxazole; O: Oxytétracycline ; CN:Gentamycine;

AM /AX: Amoxycilline; FOX: Céfoxitine.

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition répertoriées dans le tableau.16, que sur les six bactéries testées, *Klebsiella pneumoniae* apparaît comme la souche la plus résistante contre les trois souches *d'actinomycètes*. Seule la souche R8' est active contre *Escherichia coli* ATCC 25922, tandis que les quatre souches *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC43300, *E. coli* et *S. aureus* sont les plus sensibles aux antibactériens produite par les *actinomycètes* étudies.

Pour chaque souche *d'actinomycète*, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une bactérie cible à une autre. En général, les résultats du test de la production du métabolite antibactérienne sur milieu solide montre que, l'activité antibactérienne des trois souches *d'actinomycètes* est absente vis-à-vis de *K. pneumoniae* (Gram négatif), seul la souche R8' qui a montré une activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (Gram positif), avec une zone d'inhibition de 10 mm de diamètre. Tandis que les deux souches R8'et TB0304 ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante contre les deux bactéries cibles, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 respectivement. Alors, en remarque que la souche R14' est la plus performante par une activité antibactérienne très importante contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif), avec une zone d'inhibition de 26,5 mm de diamètre et vis-à-vis de *Escherichia coli* (Gram négatif) avec une zone d'inhibition de 22 mm de diamètre. Des résultats similaires mentionnés par

Sahin et Ucur. (2003) Ou deux souches parmi 15 souches de *Streptomyces* isolées du sol sont actives avec des zones d'inhibition entre 10 et 20 mm de diamètre.

Les résultats de criblage montrent que l'activité antimicrobienne des souches *d'actinomycètes* dépend de la méthode utilisée (Lemriss, 2003).

Afin de cribler les trois souches *d'actinomycètes* antagonistes, le test d'antagonisme a été réalisé sur milieu solide en utilisant la technique des cylindres d'agar. En effet, il a été démontré que le milieu solide est le plus adéquat pour le développement des *actinomycètes* et la production d'antibiotiques (Shomura *et al.*, 1979 ; Badji *et al.*, 2005 et Anibou *et al.*, 2008).

Le choix des souches cibles dépend du but spécifique de la recherche. Les souches de référence sensibles aux antibiotiques sont de préférence employées, diverses combinaisons sont possibles, mais un panneau devrait au moins se composer d'une bactérie à Gram positif et une autre à Gram négatif (Cos *et al.,* 2006).

D'après nos résultats, les bactéries Gram négatif sont moins sensibles aux antibiotiques produits par les souches *d'actinomycètes* que les Gram positif, contrairement à L'étude de (Yilmaz *et al.,* 2008) portant sur 55 souches *d'actinomycètes* isolées de différentes rhizosphères, à montré l'activité antimicrobienne de 22 souches. Cette activité est plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif.

Les bactéries Gram négatif étant souvent moins sensibles aux antibiotiques que les Gram positif à cause de la présence d'une membrane externe qui rend leur paroi moins perméable (Toussaint., 1996).

Il faut noter aussi que les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Entrerococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont servi comme modèle de référence dans plusieurs études préliminaires afin d'évaluer l'activité antibactérienne de nombreuses bactéries et *d'actinomycètes* productrices de composés bioactifs (Reghioua *et al*., 2008; Kamat *et al* ., 2011).

De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des *actinomycètes*. Les résultats de (Oskay*et al.,* 2004) indiquent que 34% des 50 isolats *d'actinomycètes* sont actifs contre au moins un microorganismes cibles; *A. tumefaciens*, *E. carotovora*subsp. *amylovora*, *Pseudomonas viridiflova*, *Clavibacter michiganensis*sub Sp. *michiganensis*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus feacalis*, *S. aureus*, *E. coli* et *Sarcinalutea*.

Nos résultats montre que les trois souches *d'actinomycètes* sont active contre au moins un germe cible parmi les six bactéries cibles, ces résultats sont proche à ceux de (Hacène *et al*., 1994) qui ont trouvé que sur 286 souches *d'actinomycètes* isolées de différents écosystèmes du Sahara algérien, seulement 32 souches (11,19 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible parmi quatre bactéries, deux levures et plusieurs champignons filamenteux. Et sont aussi cohérents à ceux de (Hilali *et al*., 2002) qu' il ont obtenu des résultats d'un criblage initial de 85 souches *d'actinomycète* isolées à partir du milieu naturel (sol, eau et sédiments marins) montrent que 25 souches (29,41 %) ont une activité vis-à-vis au moins un des germes cibles suivants : bactéries et/ou des champignons pathogènes (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*R2, *Fusariumculmorum*, *Fusariumgraminearum*).

D'après nos résultats seul la souche R14', qui a montré une activité inhibitrice très importantes vis-à-vis *s. aureus,* ces résultats sont proche à ceux de (Kitouni., 2007) qui a obtenus avec la souche EC5 une activité uniquement vis à vis de *Staphylococcus aureus* Mu 50 (Hôpital Juntendo, Tokyo,Japon).

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) a donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les trois souches *d'actinomycètes* ont le même effet inhibiteur sur les six bactéries testées en produisant des molécules antibactérienne.

2-2-Criblage de l'activité antifongique

La méthode retenue pour effectuer le criblage de l'activité antifongique est la méthode des cylindres d'agar. Cette méthode permet de recueillir des données quantitatives mesurables exprimées sous la forme des diamètres d'inhibition.

Les trois souches *d'actinomycètes* qu'ils ont montré une activité antibactérienne ont donc été testées contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger.* Les résultats de l'activité antifongique sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau18: Résultats du criblage des trois souches *d'actinomycètes* contre les deux souches fongiques cible.

Actinomycètes / Souches fongiques	R14'	R8'	TB0304
Candida albicans	+	-	+
Aspergillus niger	+	-	+

+ : Présence d'activité antifongique, - : Absence d'activité antifongique.

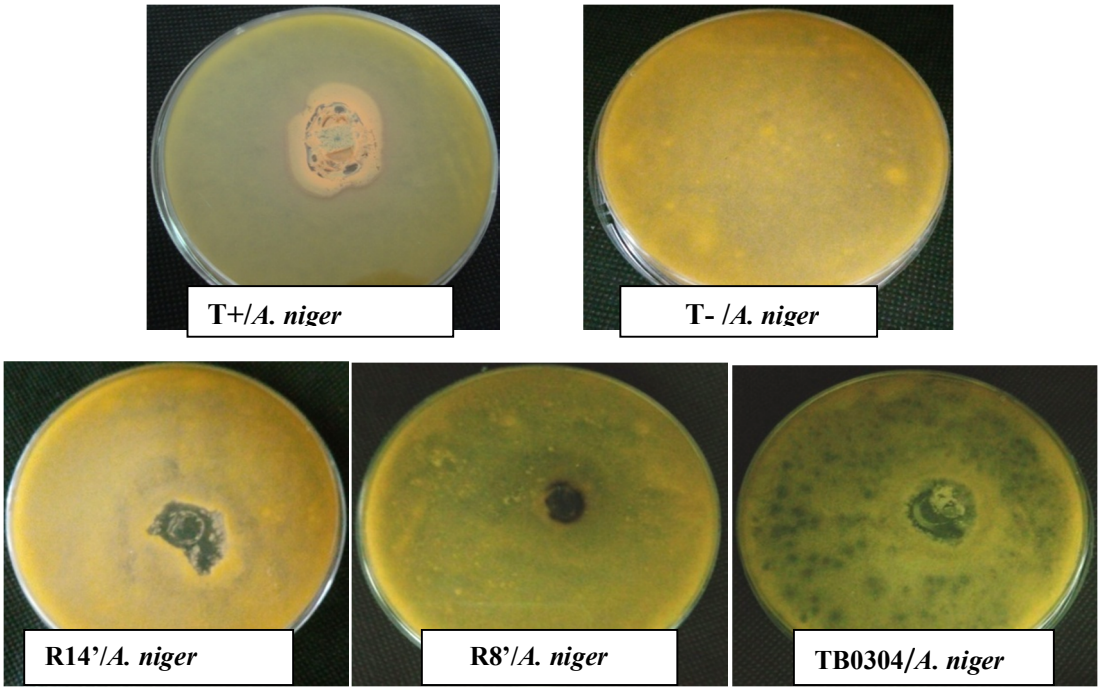


Figure19 : Activité antifongique des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis de *A. niger* par la méthode des cylindres d'agar. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif).

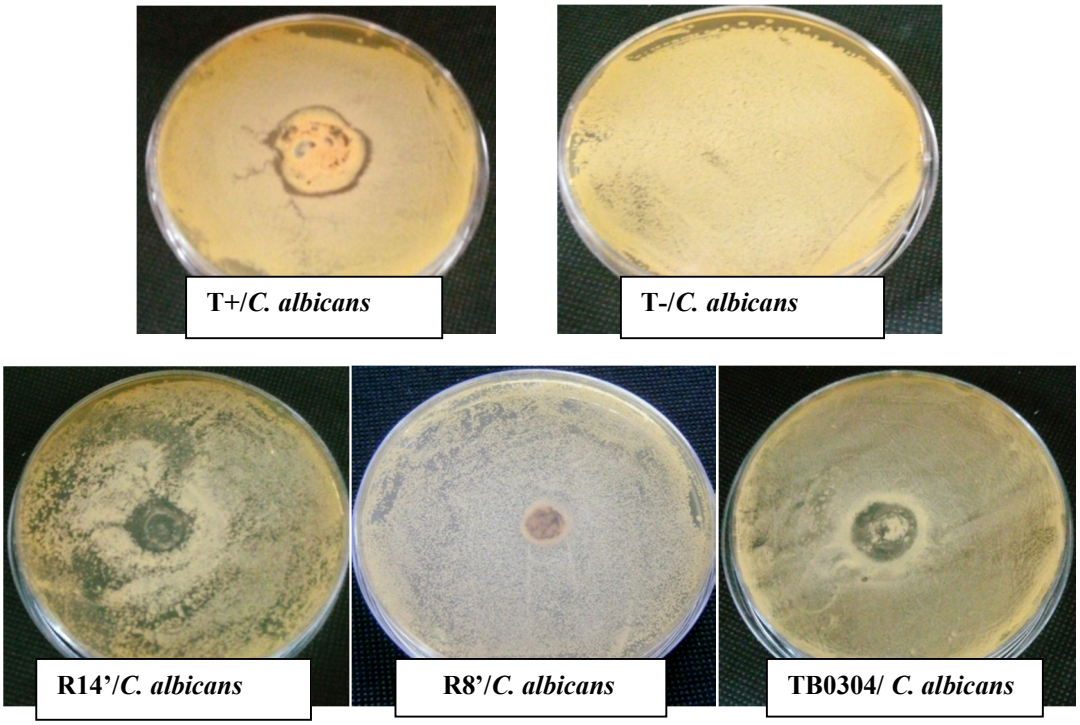


Figure 20 : Activité antifongique des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *C. albicans* par la méthode des cylindres d'agar. (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif).

Les deux souches R14'et TB0304 sont actives contre *Candida albicans* et *A. niger*. Seule la souche R8' qui ne révèlent aucune activité antifongique contre les deux souches fongiques cibles. Ces résultats sont présentés dans les figures .19 et 20.

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique des trois souches *d'actinomycètes* contre les deux souches fongiques cibles sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau19: Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition des trois souches *d'actinomycètes* étudiées (Ø= moyenne ± Ecart type). (n=2), le Ø des cylindres d'agar est inclus (8mm).

Actinomycètes / **Souches fongiques**	**R14'**	**R8'**	**TB0304**	**Antifongique**
Candida albicans	17±0,00	8±0,00	15,5±0,71	29
Aspergillus niger	17±0,70	8±0,00	17±2,12	21

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition répertoriées dans le tableau, que les deux souches fongiques *C. albicans* et *A. niger* sont soit sensibles, soit résistantes aux antifongiques produites par les souches R14', R8' et TB0304.

Les *actinomycètes* sont caractérisés par une large activité antibactérienne et antifongique. Elles ont actives au moins sur une souche bactérienne testée et/ou fongique testée.

Pour chaque souche d'*actinomycète*, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une souche fongique à une autre. En générale, ce qui concerne les résultats du test de la production du métabolite antifongique sur milieu solide montre que : l'activité antifongique de la souche R8' est absente contre les deux souches fongiques cibles. Alors que les deux souches R14' et TB0304 est les plus performantes par une activité antifongique très importante contre *Aspergillus niger* avec une zone d'inhibition de 17 mm de diamètre, et contre *Condida albicans* avec une zone d'inhibition de 17 mm de diamètre pour R14' et 15,5 pour TB0304 , ces résultats sont proche a ceux de (Belyagoubi, 2014) qui à obtenue avec les deux souches 493 et 512 contre *C. albicans* une forte activité antifongique avec des zones d'inhibition de 21 et 17mm de diamètre respectivement, et aussi sont proche à ceux obtenue par (Kaioua et Grairi, 2015) qu'ils ont montré que les *Actinomycètes* isolés à partir de la rhizosphère de forêt en montagne présente une activité inhibitrice contre *Aspergillus niger*.

D'après les résultats des expériences réalisées par (Lemriss*et al*., 2003) par la méthode des cylindres d'agar et la méthode des puits (3mm). On note que parmi les 110 actinomycètes d'origine clinique, 42 (soit 38%) sont actives contre *C. albicans* CIP 884.65 avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 3 et 52 mm. De même (Slavica *et al*., 2005) ont mentionné que des souches appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition entre 11 et 31mm vis-à-vis de *C. albicans* ATCC10231.

Plusieurs études ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie (Cadet *et al*., 1996; Kauffman et Carver, 1997; Kang *et al.*, 2010 ; Mendes *et al.*, 2013).

Nos résultats montre que la souche R14' présente une activité fongique vis-à-vis de *C. albicans* et *A. niger*, contrairement à L'étude de (Benyaou, 2015) qui à travaillé sur la même souche vis-à-vis de *C.albicans* mais le criblage de l'activité antifongique n'a cependant pas donné de résultats.

D'après nos résultats parmi les trois souches *actinomycètales* possédant une activité antibactérienne, seule les deux souches (R14' et TB0304) qui présentent une activité vis à vis des champignons testés ces résultats sont cohérent à ceux de (Kitouni, 2007) qui à montré que seule les deux souches *actinomycétales* (SS2 et EL3) présentent une activité vis à vis des champignons testés, La souche SS2 inhibe tous les champignons, quant à la souche EL3, elle n'agit pas sur *Aspergillus fumigatus* UMIP 1082.74 et *Fusarium oxysporum* UMIP 625.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) a donné une p-value <0,05, donc statistiquement il ya une différence significative, c'est-à- dire que les trois souches d'*actinomycètes* n'ont pas le même effet inhibiteur sur les deux souches fongiques testées en produisant les molécules antifongiques. D'après le test de Newman Keuls qui nous a permet de classé les trois souches d'*actinomycétes* en trois groupes homogènes en fonction de leur effet inhibiteur, les résultats de ce test montre que la souche R14'a un effet inhibiteur plus important vis-à-vis des deux souches fongiques cibles.

3-Extraction des molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes

3-1-Evaluation de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide des différents extraits organiques

Trois solvants de polarité différente (chloroforme, méthanol et l'acétate d''éthyle) ont été utilisés pour l'extraction des molécules bioactives à partir d'une culture de 14 jours des

trois souches *d'actinomycètes* (R14', R8' et TB0304) cultivées dans le milieu de culture liquide (milieu Bennett). Le test de l'activité antimicrobienne à été réalisé par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre.

3-1-1 -Test de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques

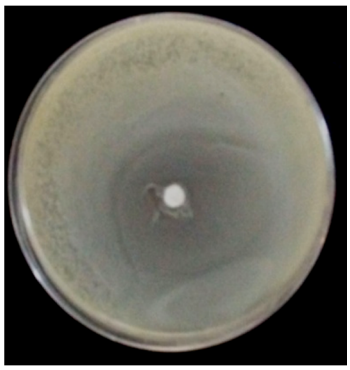
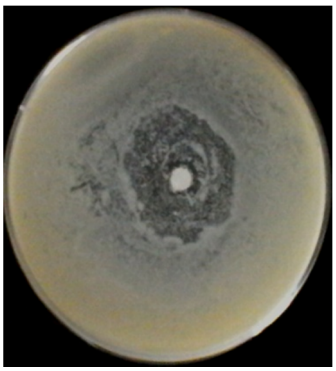
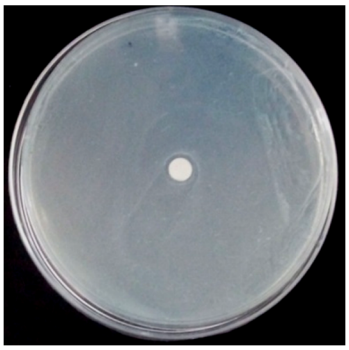
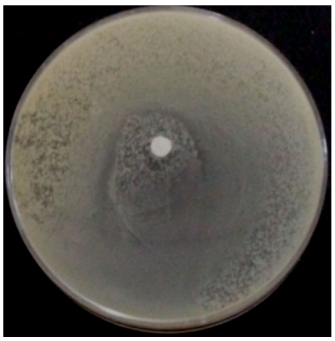
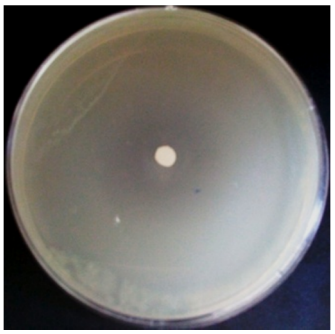
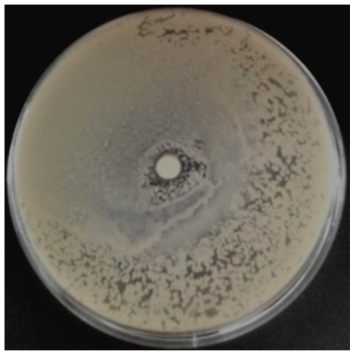
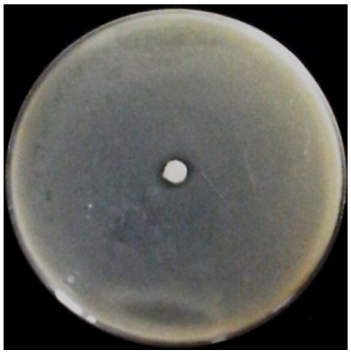
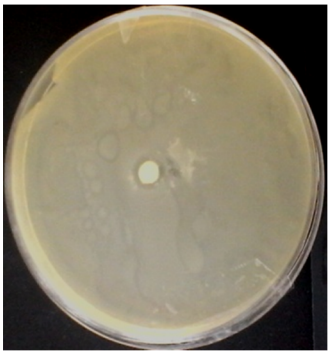
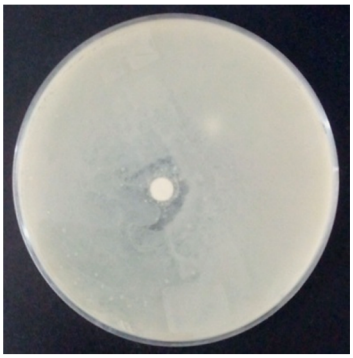
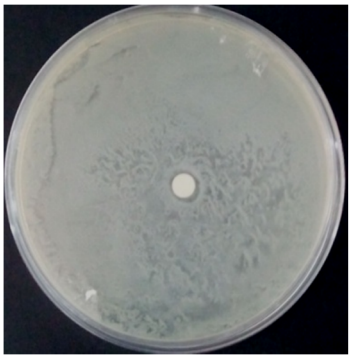
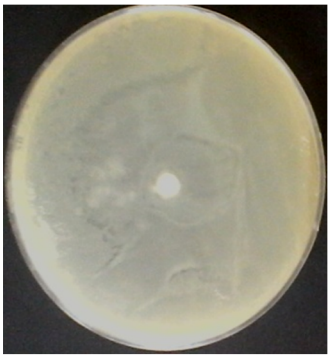
Les résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau20:Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique des cultures des trois souches *d'actinomycètes* envers les bactéries-testées par la méthode de disque en papier.

Souches / Bactéries tests	R14'	R8'	TB0304
*S.aureus*ATCC43300	-	+	+
S. aureus	-	+	-
E. coli ATCC 25922	+	+	+
E. coli	+	+	-
K. pneumoniae	-	+	-
*P.aeruginosa*ATCC27853	-	+	+

+ : Présence d'activité antibactérienne, - : Absence d'activité antibactérienne

Les extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* ont montrés une activité antibactérienne contre ou moins une bactérie testées dont, l'extrait méthanolique de la souche R14'contre deux bactéries cibles et celui de TB0304 contre trois bactéries. Seul l'extrait méthanolique de la souche R8' qui à montre une activité contre les six bactéries testées. Ces résultats sont présentés dans la figure suivante :

souches / T-des bactéries testées	R14’	R8’	TB0304
*S.aureus*ATCC4330			
S. aureus			
E. coli ATCC			
E. coli			

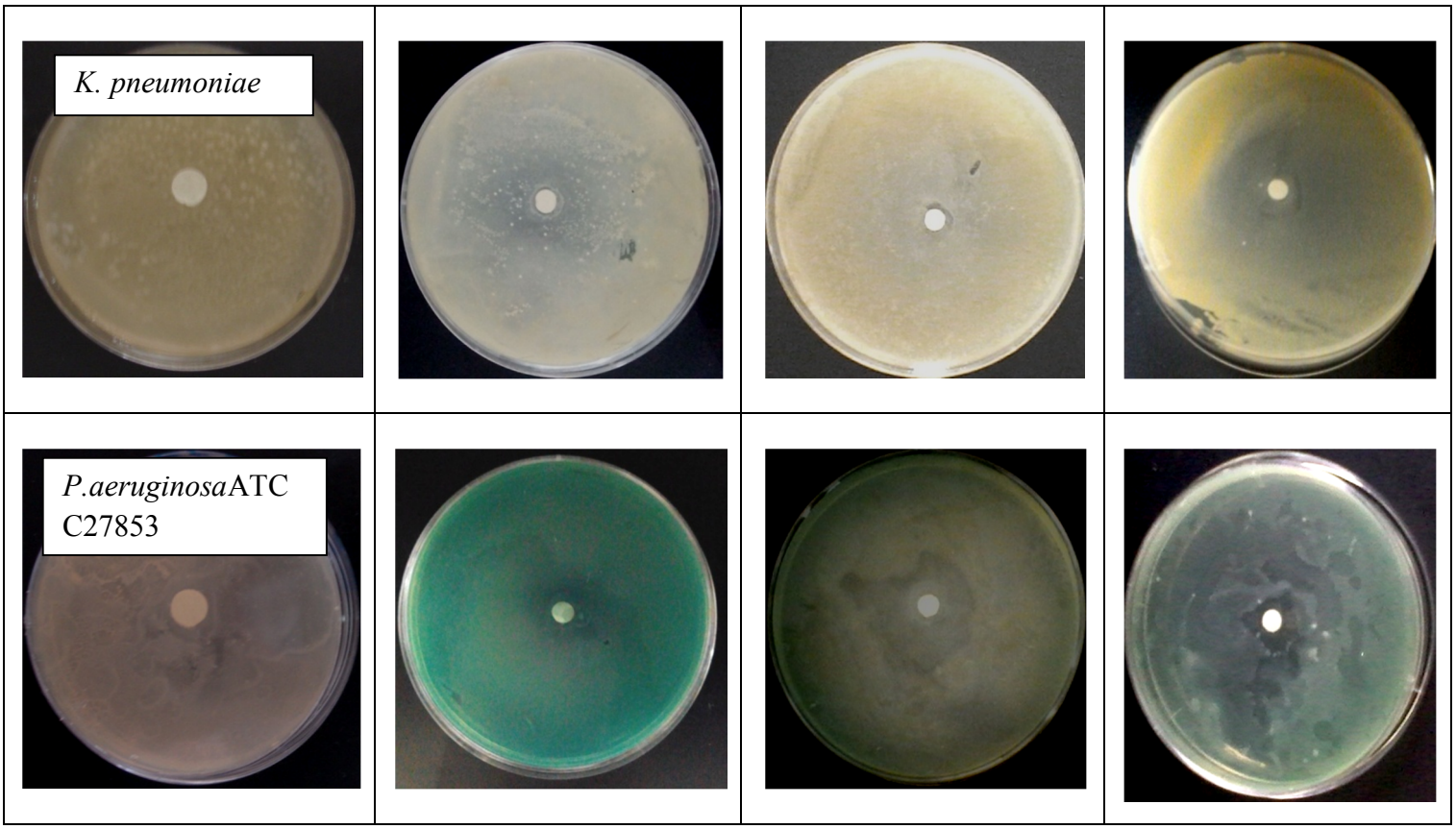


Figure 21: Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des trois souches d'actinomycètes vis - à –vis les bactéries testées par la méthode de disque en papier wathman. (T- : témoin négatif).

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des trois souches d'actinomycètes vis-à-vis les bactéries testées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

souches / Bactéries- tests	R14'	R8'	TB0304
*S.aureus*ATCC43300	6± 0,00	30,5±2,00	7±1,00
S. aureus	6±0,00	10±1,24	6±0,00
E. coli ATCC 25922	11±1,06	8,5±2,50	9±1,02
E. coli	13±1,10	9±1,02	6±0,00
K. pneumoniae	6±0,00	11±0,90	6±0,00
*P.aeruginosa*ATCC 27853	6±0,00	34±2,00	14±1,00

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des deux souches *d'actinomycètes* R14'et TB0304 présenté dans la figure.21, que l'activité antibactérienne est absente vis-à- vis de *Klebsiella pneumoniae* et *S. aureus*. Seul l'extrait méthanolique de la souche R8' qui a montré une activité vis-à-vis les six bactéries testées.

Les résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques (tableau 21) montrent que les diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* diffèrent d'une souche bactérienne à une autre. En général, les résultats de la production des métabolites antibactériens extraits à partir du culot sur milieu liquide montrent une très faible activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de la souche TB0304 vis-à-vis *staphylococcus aureus* ATCC43300 (Gram positif), avec une zone d'inhibition de 7 mm de diamètre. Par contre l'extrait méthanolique de la souche R8' est le plus performant par une activité antibactérienne très importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (Gram négatif) avec des zones d'inhibition de 34 et 30,5 mm respectivement.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) des extraits méthanoliques a donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les extraits méthanonoliques des trois souches *d'actinomycètes* ont le même effet inhibiteur sur les six bactéries cibles en produisant les molécules antibactérienne.

3-1-2-Test de l'activité antifongique de l'extrait methanolique

Les résultats du test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 22: Résultats du test de l'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches d'actinomycètes contre les souches fongiques testées par la méthode de disque en papier.

Souches / Souches fongiques	R14'	R8'	TB0304
Candida albicans	+	+	-
Aspergillus niger	+	+	-

+ : Présence d'activité antifongique, - : Absence d'activité antifongique.

Les extraits méthanoliques des deux souches R14'et R8'sont actives vis-à-vis de *Candida albican s*et *Aspergillus niger*. Contrairement à l'extrait méthanolique de la souche TB0304. Ces résultats sont présentés dans les figures suivantes:

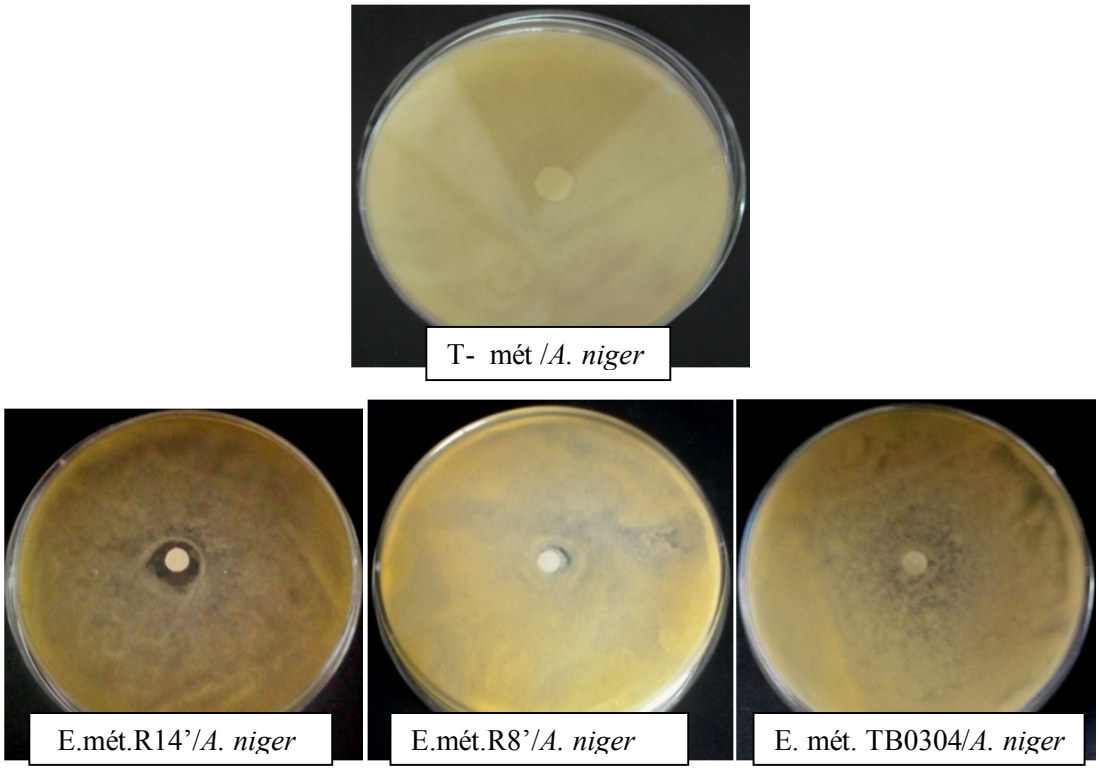


Figure 22: L'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *d'A.niger* par la méthode de disque en papier. (T-) : témoin négatif ; E. mét : Extrait méthanolique.

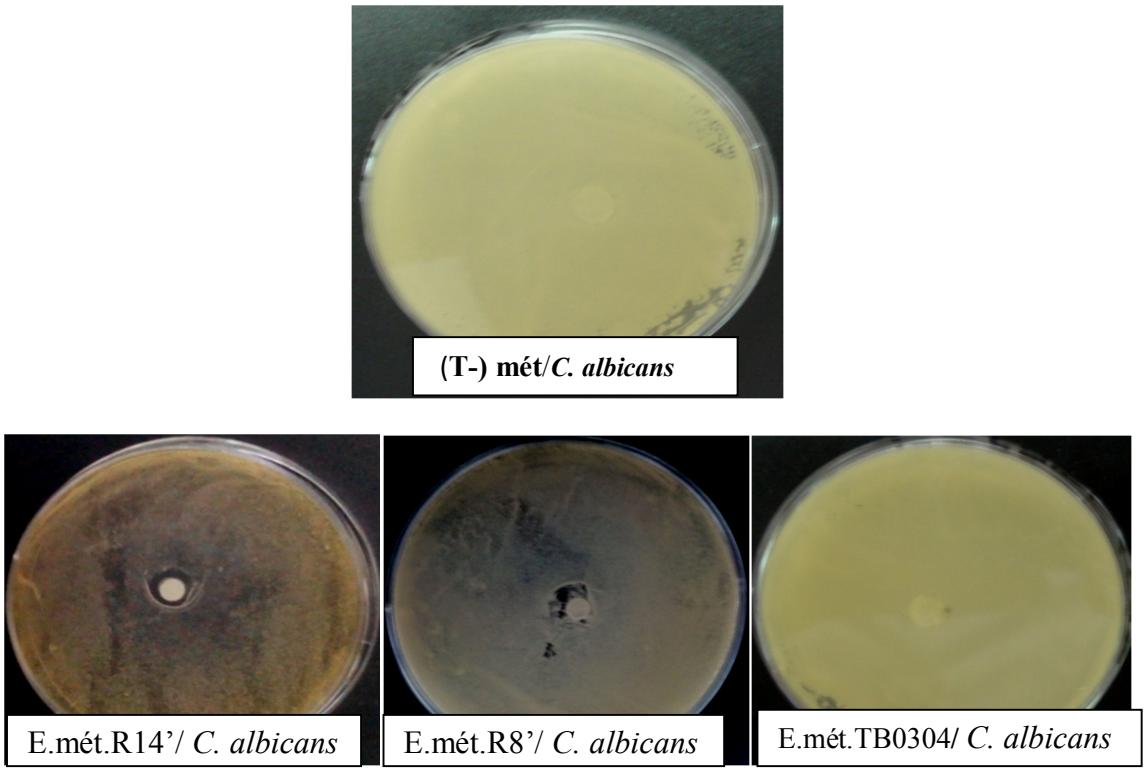


Figure 23: L'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis de *C. albicans* par la méthode de disque en papier. (T-) : témoin négatif ; E. mét : Extrait méthanolique.

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les deux souches fongiques testées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 23: Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'activité antifongique des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Souches / Souches fongiques	R14'	R8'	TB0304
Candida albicans	12±0,07	11±0,00	6±0,00
Aspergillus niger	13±1,12	8±0,06	6± 0,00

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des trois souches d'actinomycètes présenté dans les figures .22 et 23 que, l'extrait méthanolique de la souche TB0304 ne présente aucune activité antifongique vis-à-vis *C .albicans* et *A.niger*. Contrairement aux extraits méthanoliques des deux souches R14'et R8' qui ont montré une activité vis-à-vis les deux souches fongiques cibles.

Les résultats du test de l'activité antifongique (tableau.23) montrent que les diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* diffèrent d'une souche fongique à une autre. Les plus grande zones d'inhibition ont été obtenue avec l'extrait méthanolique de la souche R14' avec un diamètre de 13 et 12 mm vis-à-vis de *A. niger* et *C.albicans* respectivement**.** Par contre, la plus faible zone est obtenue avec l'extrait méthanolique de la souche R8'vis-à-vis de *A.niger* avec un diamètre de 8mm.

En général, les résultats de l'extraction des métabolites antifongiques à partir du culot montrent l'absence de l'activité antifongique d'extrait méthanolique de la souche TB0304 vis-à-vis de *Condida albicans* et *Aspergillus nige*r. Par contre, l'extrait méthanolique de la souche R14' est le plus performant par une activité antifongique très importante vis-à-vis *Aspergillus niger* et *Condida albicans* avec une zone d'inhibition de 13 et 12 mm de diamètre respectivement.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) a donné une p-value <0,05, donc statistiquement il ya une différence significative, c'est-à- dire que les extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* n'on pas le même effet inhibiteur sur les deux souches fongiques testées en produisant les molécules antifongiques. D'après le test de Newman Keuls qui nous a permet de classé les extraits méthanoliques des trois souches *d'actinomycètes* en trois groupes homogènes en fonction de leur effet inhibiteur, les résultats de ce test montre que l'extrait méthanolique de la souche R14'a un effet inhibiteur plus important vis-à-vis les deux souches fongiques.

Nos résultats expérimentaux montre que la production des métabolites antimicrobienne est plus importante sur le milieu liquide que sur le milieu solide, ceci s'accorde avec les résultats de (Hilali, 2002 **;** Melouli, 2003 **;** Slavica, 2005**,** et Zitouni, 2005) qui ont montré que la production d'antibiotique est meilleure sur le milieu de culture liquide.
D'aprés nos résultats l'extraction des molécules bioactives est obtenue en utilisant le méthanol, chloroforme et l'acétate d'éthyle, ces résultats s'accorde avec ceux de (Zouaghi,

2007) qui à montré que l'extraction de ces molécules est obtenue en utilisant le chloroforme, l'acétate d'éthyle ou le système formé de 3méthyl-butanol et du méthanol.

Par ailleurs, nous avons démontré que le méthanol permet l'extraction des deux types de molécules bioactives : les molécules à activité antibactérienne anti-Gram positif et celles à activité antibactérienne anti-Gram négatif.

D'autre part nous avons déduit que l'extrait methanolique présente une activité très importante vis-à-vis les six bactéries testées et les deux souches fongiques cibles, contrairement aux résultats obtenue par (Boughachiche, 2012) qui à montré que l'extrait mèthanolique du mycélium ne montre qu'une faible activité contre *B. cereus*.

3-2- Test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles

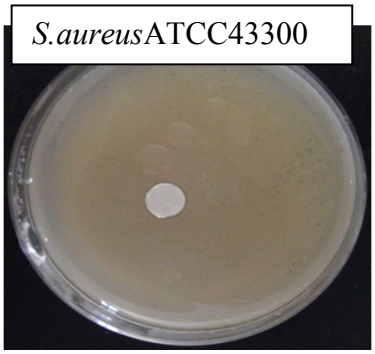
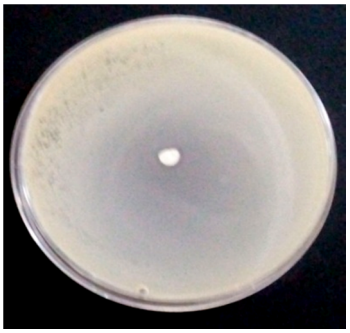
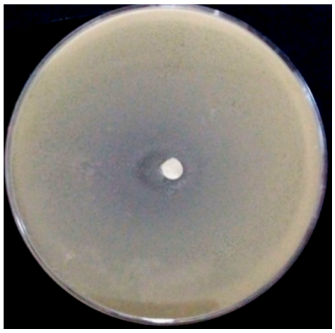
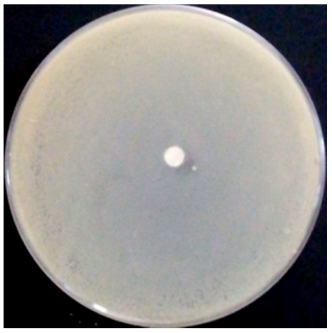
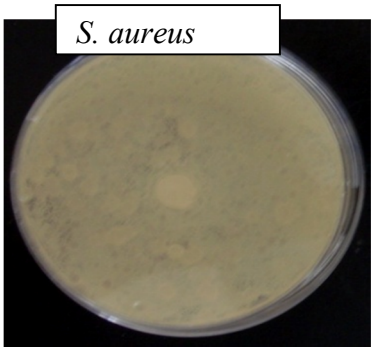
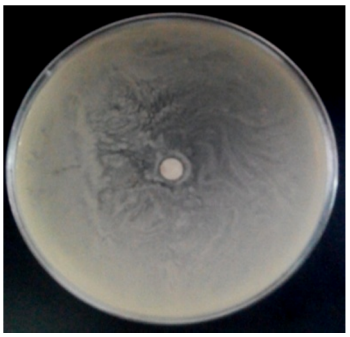
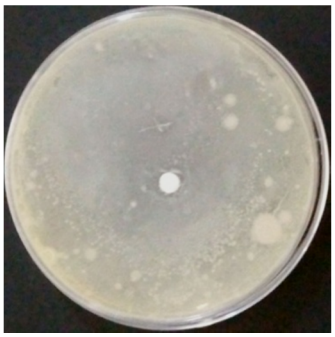
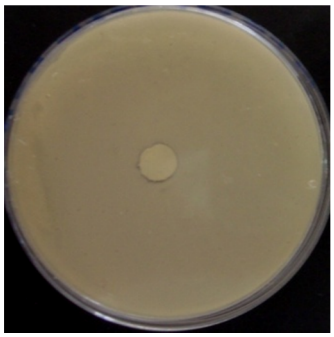
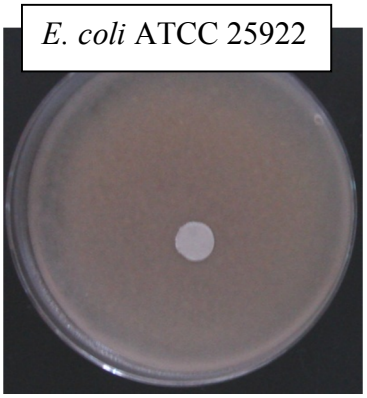
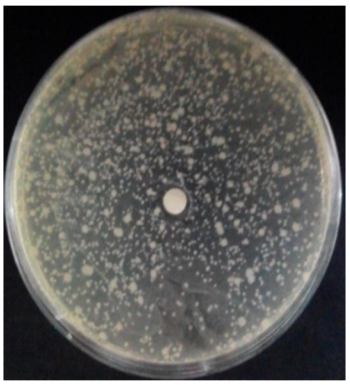
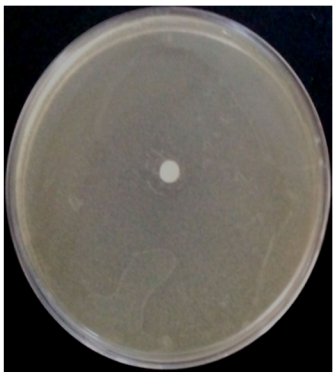
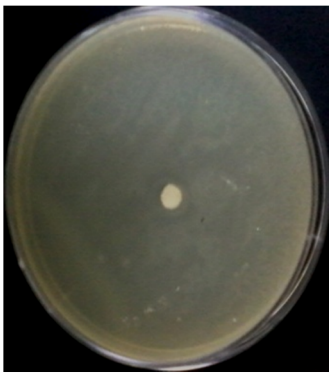
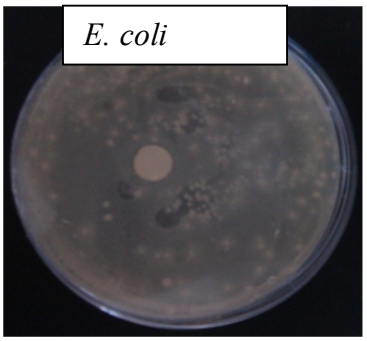
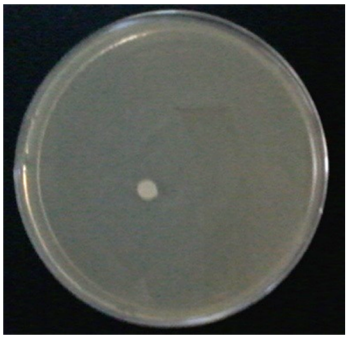
Les résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau24: Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétates des cultures des trois souches *d'actinomycètes* contre les bactéries cibles par la méthode de disque en papier.

Extraits / Bactéries testées	Extraits chloroformiques			Extraits d'acétate d'éthyles		
	R14'	**R8'**	**TB0304**	**R14'**	**R8'**	**TB0304**
*S.aureus*ATCC43300	+	+	+	+	+	+
S. aureus	+	-	+	+	+	+
E. coli ATCC 25922	+	-	+	+	+	-
E. coli	+	+	+	+	-	+
K. pneumoniae	+	+	+	+	+	+
*P.aeruginosa*ATCC27853	+	+	+	+	+	+

+ : Présence d'activité antibactérienne, - : Absence d'activité antibactérienne

Les extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles de la souche R14' ont montré une activité antibactérienne contre les six bactéries cibles ainsi que l'extrait chloroformique de la souche TB0304. Contrairement aux extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles de la souche R8'dont l'activité antibactérienne a été détectée contre certains bactéries cibles. Ces résultats sont présentés dans les figures suivantes :

souches T- des bactéries testées	Extraits chloroformiques R14'	R8'	TB0304
*S.aureus*ATCC43300				
S. aureus				
E. coli ATCC 25922				
E. coli				

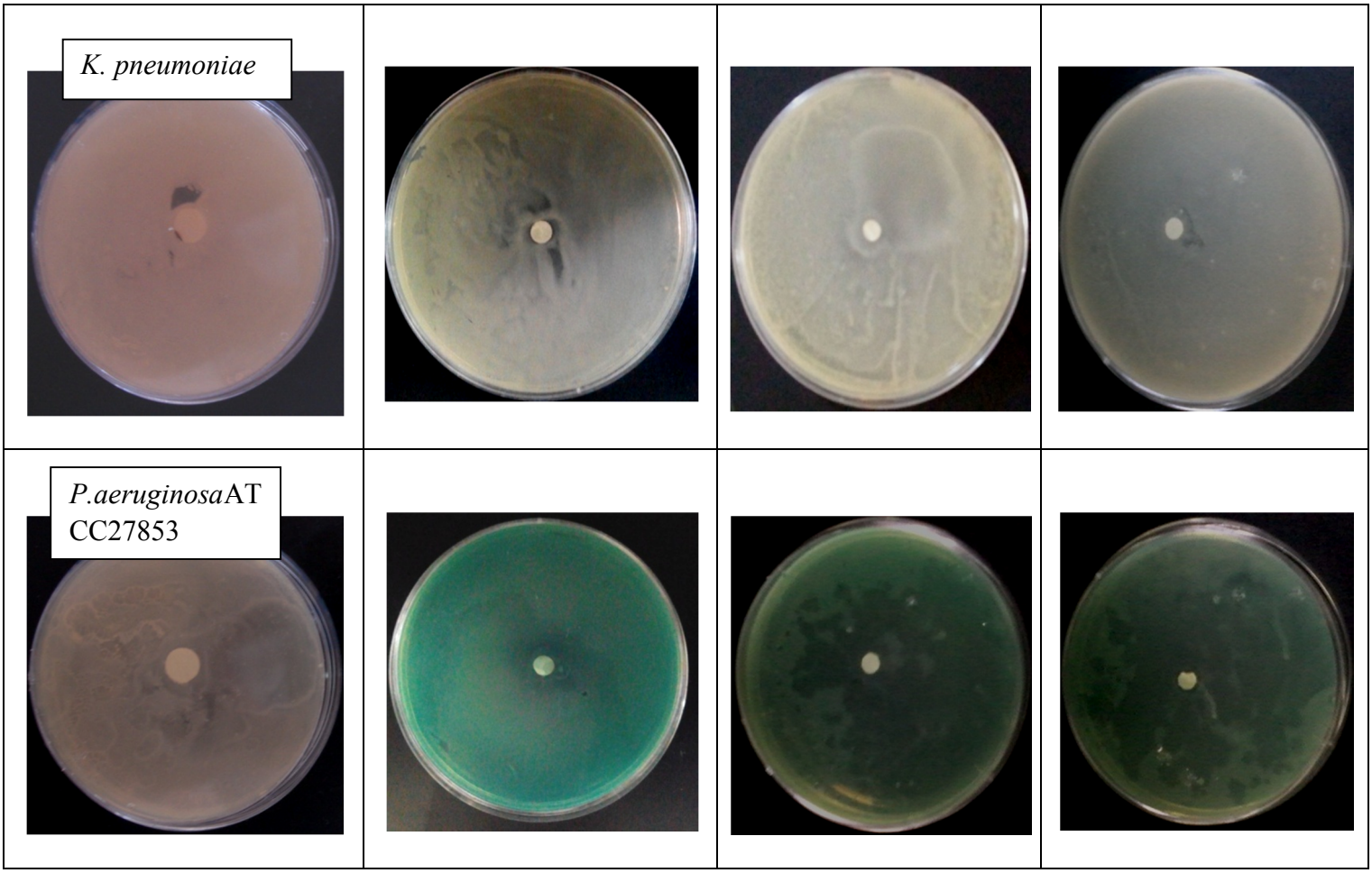
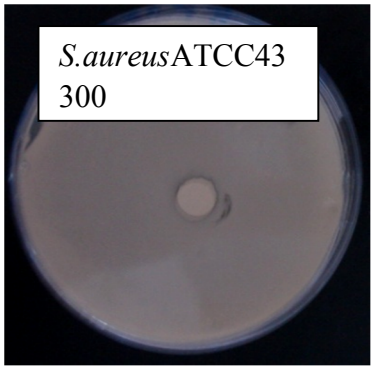
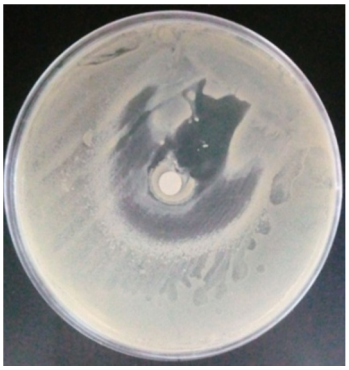
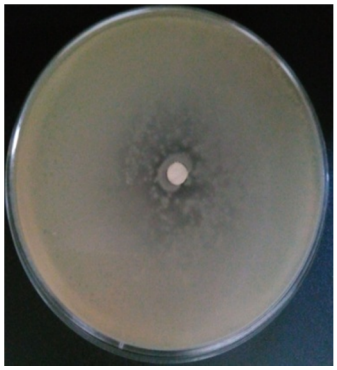
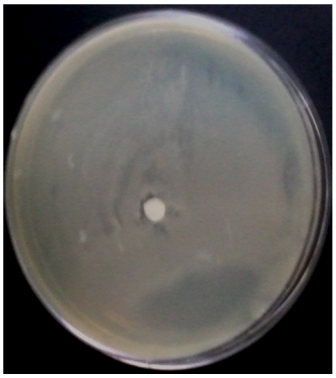
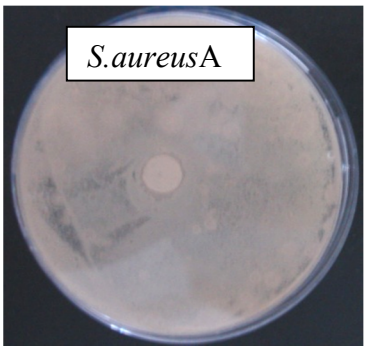
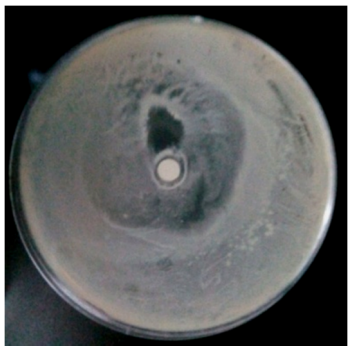
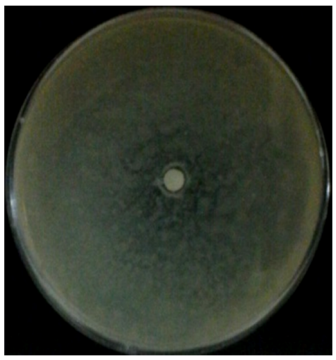
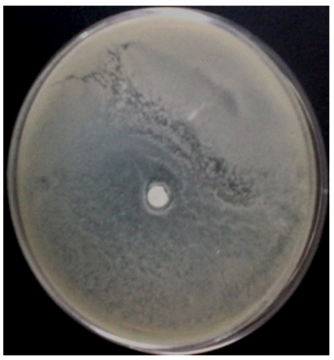
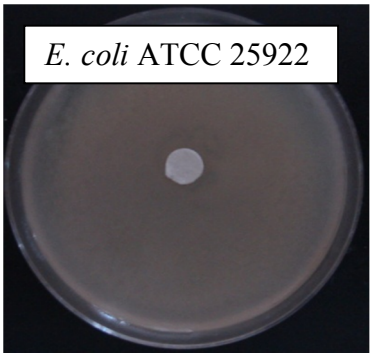
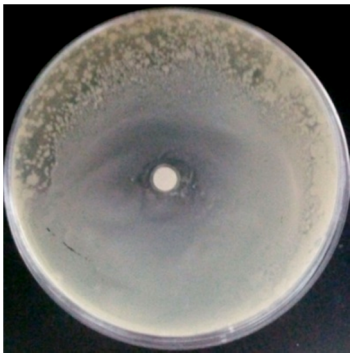
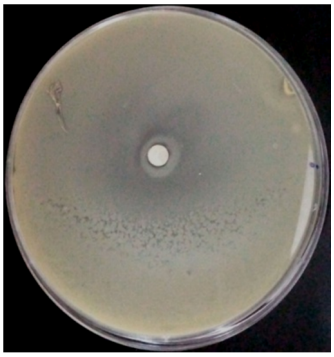
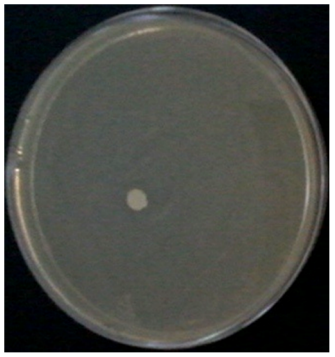
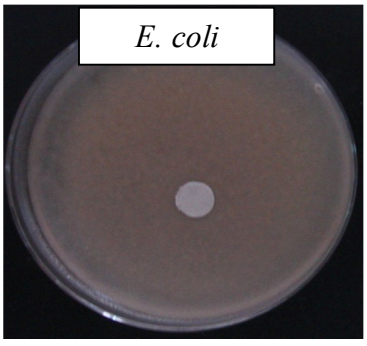
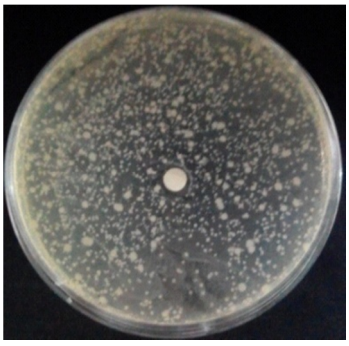
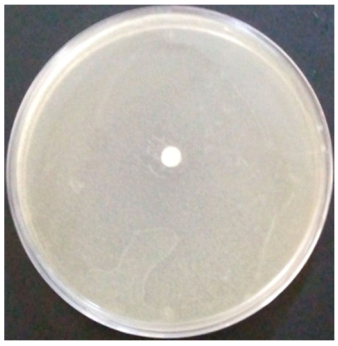
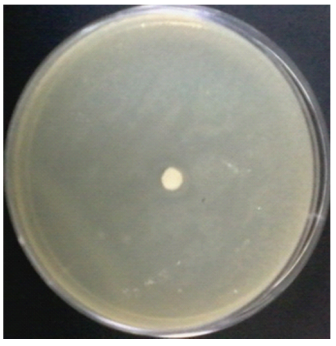


Figure 24 : Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les six bactéries cibles testées par la méthode de disque en papier wathman.

Souches-tests / T- de bactéries-tests	Extraits d'acétate d'éthyles		
	R14'	R8'	TB0304
*S.aureus*ATCC43 300				
*S.aureus*A				
E. coli ATCC 25922				
E. coli				

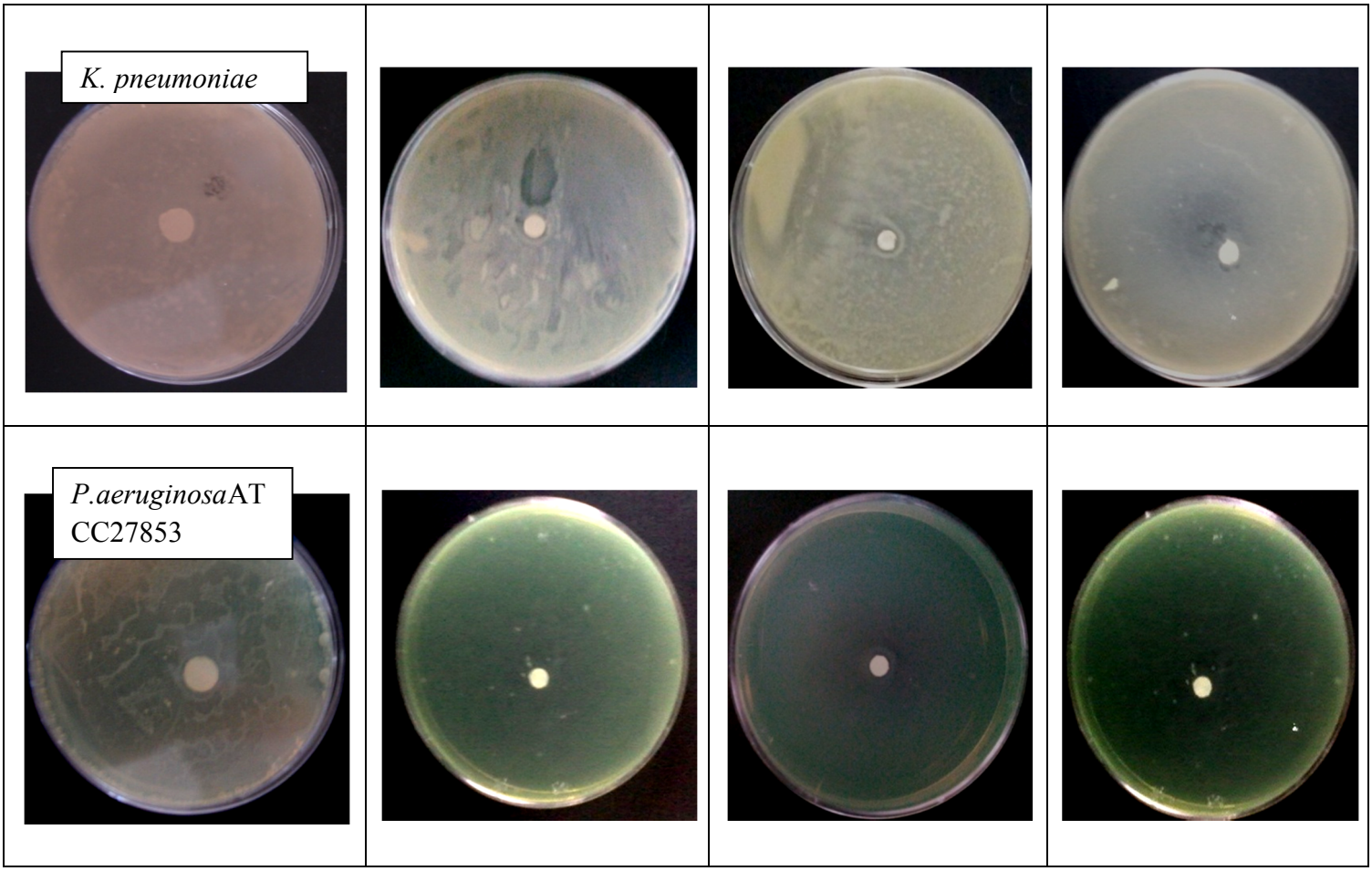


Figure 25:Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyles des cultures des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les bactéries testées par la méthode de disque en papier wathman.

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* contre les bactéries cible sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 25: Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes*. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Extraits / Bactéries testées	Extraits chloroformiques			Extraits d'acétate d'éthyles		
Souches testées	R14'	R8'	TB0304	R14'	R8'	TB0304
*S.aureus*ATCC43300	6,5±0,70	11±1,00	6,5±1,42	32,5± 3,02	6,5±0,00	8,5±0,87
S. aureus	7,5±0,90	6±0,00	7±0,62	41±2,00	8±1,33	7±0,54
E. coli ATCC 25922	9±0,00	6±0,00	8±1,09	17,5±1,02	7±0,00	6±0,00
E. coli	8±2,00	9±0,46	8,5±0,87	6±0,00	6±0,00	9±0,05
K. pneumoniae	9,5±2,02	7±1,64	8±2,01	6,5±0,89	8,5±1,00	6,5±0,00
*P.aeruginosa*ATCC27853	12,5±1,33	9±2,00	7±0,00	13±1,12	6,5±0,54	11±2,00

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles présentée dans les figures.24 et 25, que sur les six bactéries cibles, *E. coli* ATCC 25922 et *P.aeruginosa*ATCC27853 apparaissent comme les souches les plus résistantes vis-à-vis les extraits des trois souches *d'actinomycètes*. Seule les deux extraits de la souche R14'qui sont active contre les six bactéries cibles.

Les résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles (tableau 25) ont montré que pour chaque souche *d'actinomycète*, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une souche bactérienne à une autre et d'un solvant organique à un autre. En général, les résultats du test de la production des métabolites antibactérienne à partir de surnageant sur milieu liquide montre l'absence de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis certains souches testées et une activité antibactérienne plus ou moins importante à été obtenu avec l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14' vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922 avec une zone d'inhibition de 17,5 mm de diamètre. Par contre, une activité plus performante à été obtenu avec le même extrait vis-à-vis de *S. aureus* et *S. aureus* ATCC43300, avec des zones d'inhibition de 41 et 32 ,5 mm de diamètre respectivement.

D'après nos résultats on conclu que l'acétate d'éthyle pourrait être le meilleure solvant pour l'extraction des métabolites antibactérienne produits par *les actinomycètes*.

3-2-2-Test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles

Les résultats du test de l'activité antifongique des extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyles sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Résultats du test de l'activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis les deux souches fongiques testées par la méthode de disque en papier wathman.

Extrait / Souches fongiques	Extrait chloroformique			Extrait d'acétate d'éthyle		
	R14'	R8'	TB0304	R14'	R8'	TB0304
Candida albicans	+	+	+	+	+	+
Aspergillus niger	-	-	-	-	-	-

+ : Présence d'activité antifongique, - : Absence d'activité antifongique.

Les extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches R14', R8 ' et TB0304 présentes une activé vis-à-vis de *C. albicans.* Alors que ces extraits ne sont pas actifs contre *Aspergillus niger.* Ces résultats sont présentés dans les figures suivantes :

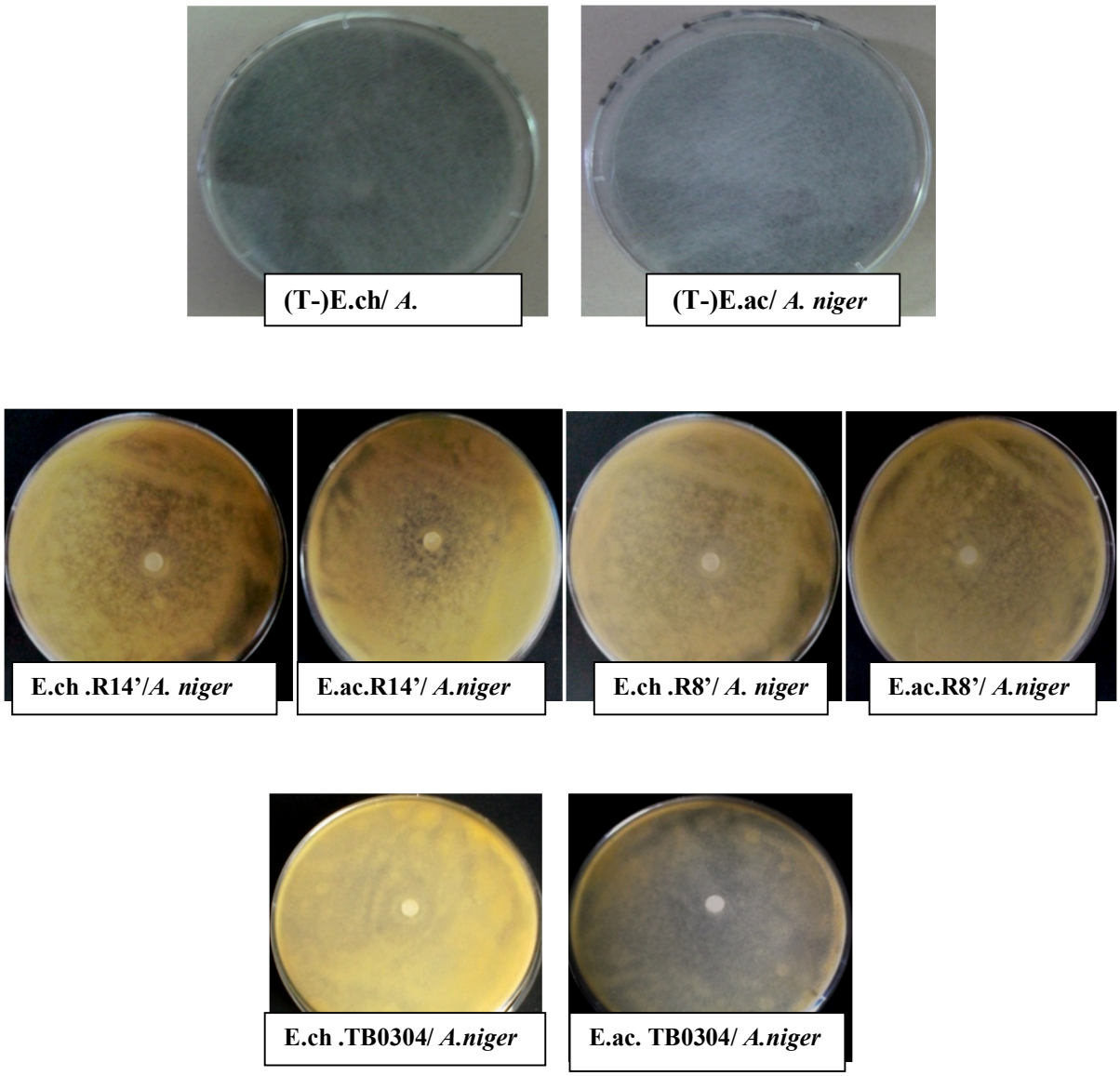


Figure 26 : Activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis *d'A. niger* par la méthode de disque en papier wathman. E.ch: extrait chloroformique, E.ac**:** extrait d'acétate d'éthyle.
(T-) : témoins négatif.

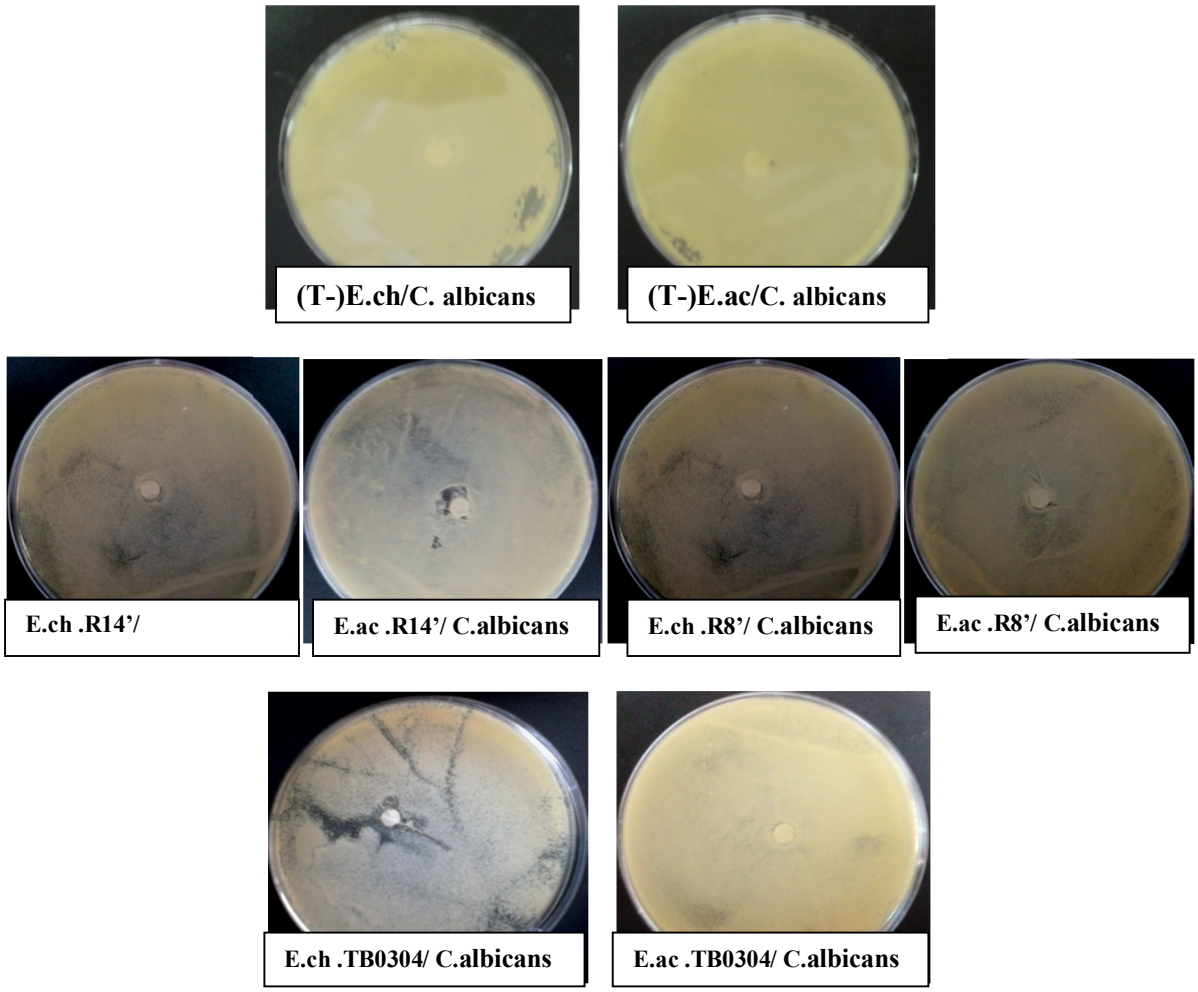


Figure 27 : Activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* vis-à-vis de *C. albicans* par la méthode de disque en papier wathman. E.ch: extrait chloroformique, E.ac**:** extrait d'acétate d'éthyle.

(T-) : témoins négatif.

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches d'actinomycètes vis-à-vis les deux souches fongiques testées sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 27 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'activité antifongique des extraits des chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches d'actinomycètes. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Extraits / Souches fongiques	Extraits chloroformique			Extraits d'acétate d'éthyle		
	R14'	R8'	TB0304	R14'	R8'	TB0304
Candida albicans	7±1,00	8±0,67	15±3,10	8±1,89	6 ,5±0,00	6 ,5±0,33
Aspergillus niger	6±0,00	6±0,00	6±0,00	6±0,00	6±0,00	6±0,00

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition des extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles présenté dans la figures.26 et 27 que *Aspergillus niger* apparaît comme la souche la plus résistante contre les extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois *actinomycètes* étudié. Pour chaque souche *d'actinomycète*, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une souche fongique à une autre et d'un solvant organique à un autre. Les plus grande zones d'inhibition ont été obtenue avec l'extrait chloroformique de la souche R14' avec un diamètre de 15mm contre *C. albicans*.

D'après nos résultats on conclu que le chloforoforme est le meilleure solvant pour l'extraction des métabolites antifongiques produits par les *actinomycètes*.

Nos résultats indique que le chloroforme et l'acétate d'éthyle permettent l'extraction de deux types de molécules bioactives: les molécules à activité antibactérienne anti-Gram positif et celles à activité antibactérienne anti-Gram négatif, ces résultats sont proche à ceux de (Loucif, 2010) qui a montré que Le chloroforme et le dichlorométhane permettent l'extraction de ces deux types de molécules bioactives.

Nos résultats montrent que l'extrait chloroformique à une activité antibactérienne plus faible que celle obtenu avec l'extrait d'acétate d'éthyle. Contrairement aux résultats obtenue par (Aissaoui, 2012) qui à montré que l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique est la plus performante que celle d'acétate d'éthyle.

D'autre part nous avant déduit que l'activité antifongique de l'extrait chloroformique est importante que celle de l'extrait d'acétate d'éthyle, contrairement aux résultats obtenus par (Oskay, 2011) ou l'extrait d'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur de molécules antifongique.

Par ailleurs, nous avons démontré que l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14' à montré une activité très importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec une zone

d'inhibition de 41 mm de diamètre, contrairement aux résultats obtenues par (Zitouni *et al*., 2005 ; Badji, 2005) qu' ils ont montré que l'activité antibactérienne contre la souche *Staphylococcus aureus* X1ATCC(MRSA) est meilleur avec le dichloromethane (24mm), faible avec l'acétate d'éthyle et nulle avec le n-hexane et le n-butanol.

Nos résultats expérimentaux indiquent que l'extrait méthanolique présente une activité faible que celle obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle, ces résultats sont proche à ceux rapportés par (Bouti, 1997) ou l'extrait méthanolique du mycélium montre une activité trois fois plus faible que celle obtenue à partir de l'extrait du dichlorométhane du filtrat.

Selon (Augustine *et al*., 2005), la plupart des antifongiques connus à ce jour , sont surtouts extraits par l'acétate d'éthyle. Du même point de vue (Oskay, 2011) rapportent que l'acétate d'éthyle est le meilleur extracteur des molécules antibactérienne et antifongique de la souche *Streptomyces* RM42, (Hozzein *et al*., 2011) rapport aussi que l'activité antimicrobienne de la souche *Streptomyces violachromogenes* est mieux extrait avec ce même solvant .

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) montre que la nature de solvant organique influence sur l'effet inhibiteur. Le test ANOVA des extraits d'acétate d'éthyles a donné une p-value <0,05, donc statistiquement il ya une différence significative, c'est-à- dire que les extraits d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* n'on pas le même effet inhibiteur sur les six bactéries testées en produisant les molécules antibactérienne. D'après le test de Newman Keuls qui nous a permet de classé les extraits d'acétates d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* en trois groupes homogènes en fonction de leur effet inhibiteur, les résultats de ce teste montre que l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14'a un effet inhibiteur plus important vis-à-vis des six bactéries cibles, contrairement ou extraits chloroformiques de ces trois souches, ou le test ANOVA a donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les extraits chloroformiques des trois souches *d'actinomycètes* ont le même effet inhibiteur sur les six bactéries testées en produisant les molécules antibactérienne.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) des deux extaits chloroformiques et d'acétate d'éthyles a donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les extraits chloroformiques et d'acétate d'éthyles des trois souches *d'actinomycètes* ont le même effet inhibiteur vis-à-vis les deux souches fongiques cibles en produisant les molécules antifongiques.

4-Effet de PH sur la stabilité des molécules bioactifs

La stabilité des molécules bioactifs produit par les souches *d'actinomycètes* était testé par l'ajout d'un volume du NaOH ou HCl à l'extrait méthanolique pour les deux souches R8' et TB0304 et à l'extrait d'acétate d'éthyle pour la souche R14' afin d'obtenir des différents pH (3,7 et 11). L'activité de ces solutions contre les bactéries cibles (*S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa*ATCC27853, *S. aureus*et *E. coli* ATCC 25922) et contre la souche fongique cible (*Candida albicans*) a été étudiée par la technique des disques en papier wathman (6 mm de diamètre), les résultats obtenues sont présentés dans les figures suivantes:

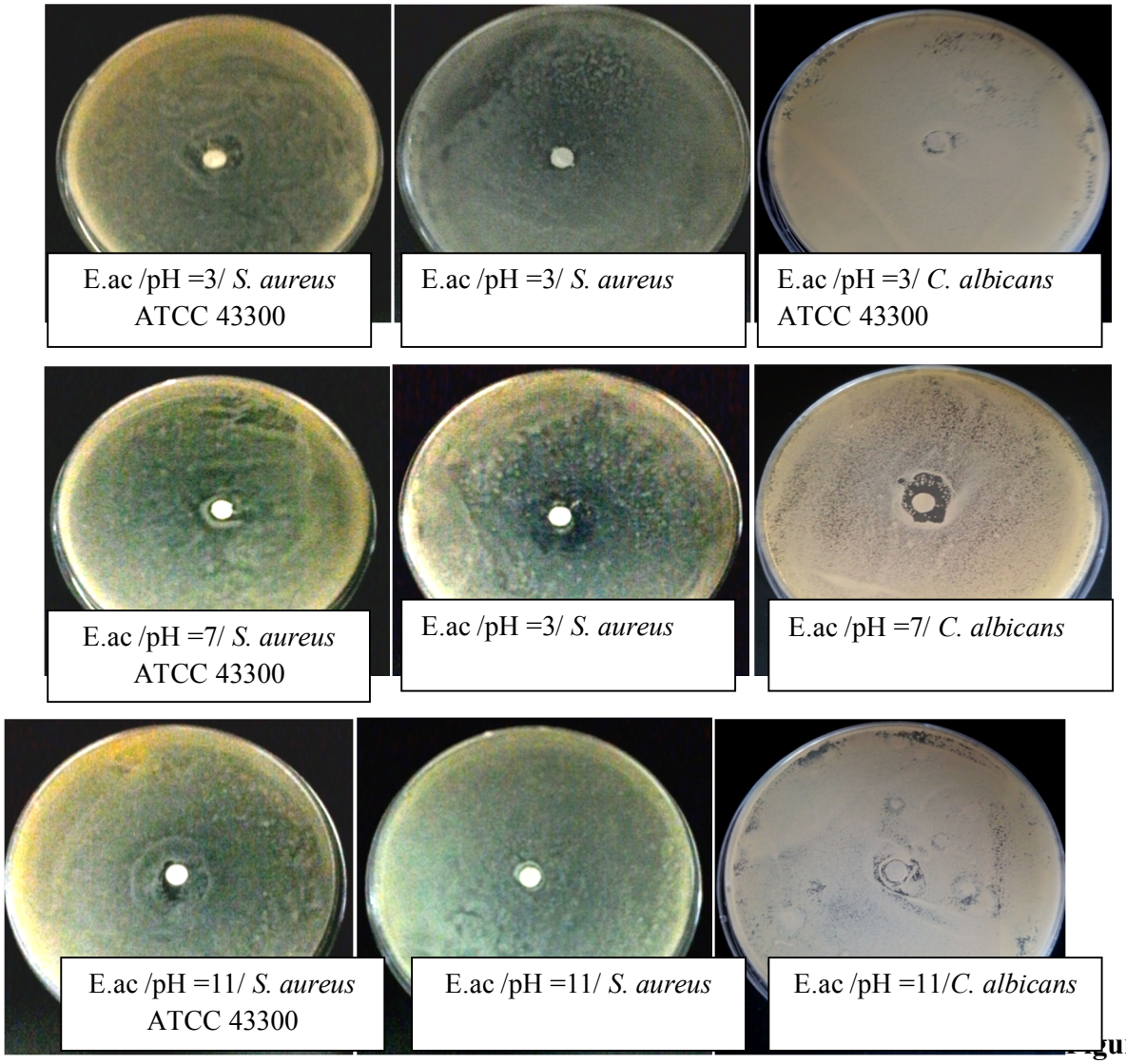


Figure 28 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14' vis- à- vis les microorganismes cibles, en fonction du pH.

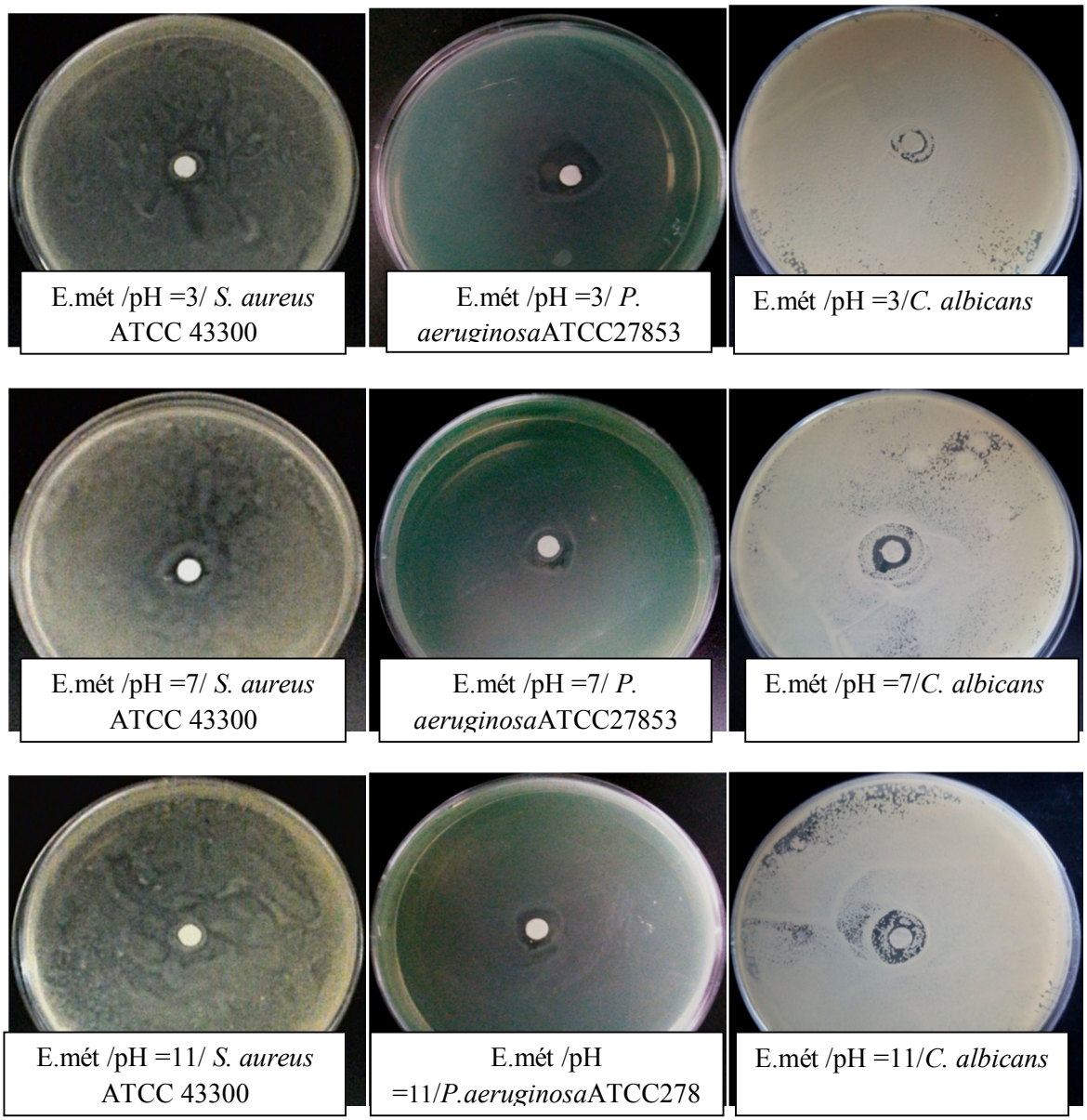


Figure 29: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche R8', vis-à-vis les microorganismes cible en fonction de pH.

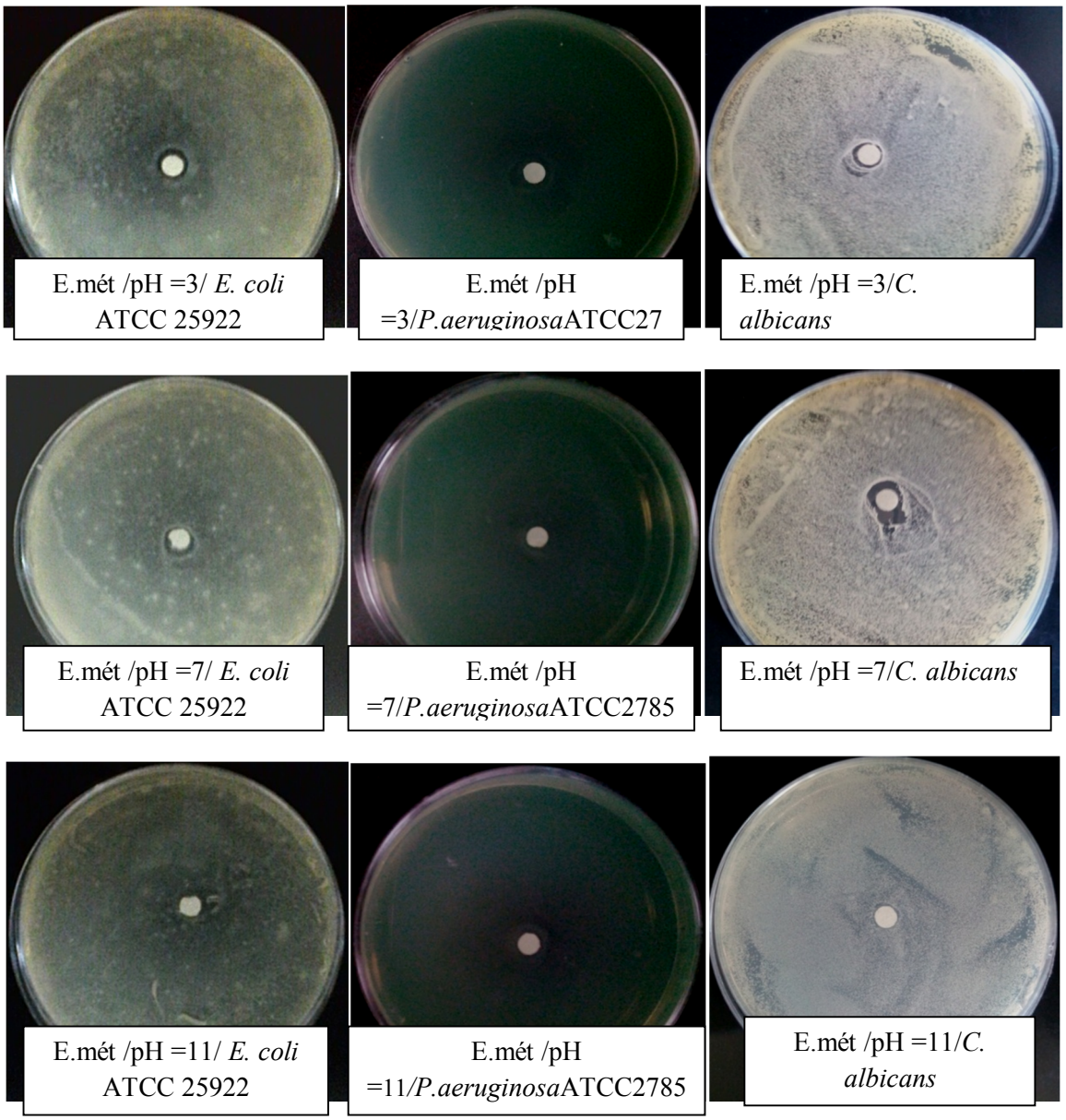


Figure 30: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche TB0304, vis-à-vis les microorganismes cibles, en fonction du pH.

A partir des figures. 28, 29 et 30 précédentes, on constate que :

Pour la souche R14': les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle, a montré une activité à pH 3 et pH 11 vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC4330 et à pH 7 vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (figure 28).

Pour la souche R8': les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait méthanolique, a montré une activité à pH 3 et pH 11 contre *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC27853 et *Candida albicans* et à pH 7 contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 , *Pseudomonas aeruginosa*et *Candida albicans* (figure 29).

Pour la souche TB0304: les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait méthanolique, a montré une activité à pH 3 et pH 7 vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* et à pH 11 vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* (figure 30).

Les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les différents extraits organiques en fonction du pH sont rassemblés dans les tableaux 28, 29 et 30.

Tableau 28: Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extraits d'acétate d'éthyle de la souche R14', vis-à-vis les microorganismes cibles, en fonction du pH. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Microorganismes-testés	Valeurs de pH testées		
	pH= 3	pH= 7	pH= 11
Staphylococcus aureus ATCC43300	15±3,00	10±2.10	10±0.70
Staphylococcus aureus	6±0,00	10±0.35	6±0,00
Candida albicans	6±0,00	13.5±2,00	6±0,00

Tableau 29: Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de la souche R8'vis-à-vis les microorganismes testés, en fonction du pH. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Microorganismes-testés	Valeurs de pH testées		
	pH= 3	pH= 7	pH= 11
Staphylococcus aureus ATCC43300	6±0,00	10±0,70	6±0,00
*Pseudomonas aeruginosa*ATCC27853	17±0,35	17±1,00	12.5±0,00
Candida albicans	6,5±0,10	10,5±0,80	14±2,00

Tableau30: Moyenne des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de la souche TB0304, vis-à-vis les microorganismes cibles, en fonction du pH. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Microorganismes-testés	Valeurs de pH testées		
	pH= 3	pH= 7	pH= 11
*P. aeruginosa*ATCC27853	10±0,50	8±2,00	7±1,20
Escherichia coli ATCC 25922	10±0,7	10±0,00	8±2,00
Candida albicans	8±1,40	9±2,30	6±0,00

Pour la souche R14' : Les molécules antimicrobiennes des extraits d'acétate d'éthyles restent actives à des pH acide (pH =3) et basique (pH =11) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300. L'activité est optimale à pH 7 vis-à-vis des trois souches testées (*Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*)**.**

La stabilité des molécules bioactives est observée sur toute la gamme du pH testée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC43300. L'activité est inexistante contre *Staphylococcus aureus et Candida albicans* à pH acide et pH alcalin (tableau 28).

Pour la souche R8'**:** les molécules antimicrobiennes des extraits méthanoliques sont actives vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Candida albicans* sur toute la gamme du pH testée. L'activité est optimale à pH 7.

Pour *S.aureus* ATCC43300, les molécules bioactives conservent leur stabilité dans des pH neutres pH 7(tableau 29).

Pour la souche TB0304 les molécules antimicrobiennes des extraits méthanoliques sont actives contre les trois souches cibles (*P.aeruginosa* ATCC27853 ; *E.coli*ATCC 25922 et *C.albicans*). Les molécules bioactives conservent leur stabilité sur toutes les gammes du pH. L'activité est inexistante vis-à-vis la souche fongique (*Candida albicans*) à pH alcaline (tableau 30).

La production d'antibiotiques varie quantitativement et qualitativement suite à une modification des conditions de culture de l'organisme producteur (Tanaka, 1992 ; Higgs *et al.,* 2001) comme le pH et la température. Ce ci s'accord aves nos résultats.

D'après nos résultats la comparaison des diamètres des zones d'inhibition des extraits traités (ajustés à différentes valeurs du pH) avec ceux non traités nous permettent de conclure que le pH à un effet sur la stabilité des molécules antimicrobiennes et donc sur la persistance de leur activité passant d'une bactérie cibles à une autre et d'un solvant organique à un autre.

Nos résultats expérimentaux montre que l'activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14' perde sont activité à des pH alcalin et acide, les mêmes résultats Ont été obtenu par (Badji *et al.,* 2006) qui à observé que l'antifongique a perdu son activité antifongique à des pH supérieurs à 10 et une diminution de l'activité à des pH acides.

Des travaux ultérieurs réalisés par (Muiru *et al.,* 2007) montrant la présence de l'activité antifongique vis-à-vis *Pythium Sp* à des pH allant de 12 à 14. Par ailleurs, nous avons démontré que l'activité antibactérienne des deux extraits méthanoliques des souches R8'et TB0304 perd leur activité vis-à-vis *P. aeruginosa* ATCC 27853 à pH 11, ces résultats sont proche à ceux de (Reghioua *et al.,* 2008) qui ont montré que les molécules antibactériennes du mycélium sont actives à des pH allant de 2 à 8. Cette activité est optimale à pH 4 et devient inexistante en milieu très alcalin (pH 9 et 10).

D'après Florey *et al.,* (1949), un composé qui est soluble dans un solvant organique à pH acide est lui-même acide. Basant sur ces données, on peut conclure que l'extrait méthanolique de la souche R8' comportent probablement des molécules antibactériennes de nature acide actives vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa.*

Belkherroubi**,** (2009) remarque que lorsque le pH de la solution mère d'amphotéricine B varie de 4 à 10,8, l'activité antifongique est maintenue vis-à-vis *Candida albicans*. Par contre à pH 3,8, elle perd 50% de son efficacité.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) des deux extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyles à des pH déférents des trois souches d'actinomycètes a donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyles des trois souches d'actinomycètes à des pH déférents ont le même effet inhibiteur vis-à-vis les microorganismes testées en produisant les molécules antimicrobienne.

5-Effet de la température sur la stabilité des molécules bioactifs

La connaissance de l'effet de la température sur nos extraits (contenant les Molécules antimicrobiennes) est très importante. A cet effet on a testée la Stabilité de l'activité antibactérienne et antifongique en fonction de la température après six jours d'incubation à 4°C. Cette activité est mise en évidence, par la technique des disques en papier wathman de 6 mm de diamètre. Les résultats de ce test sont illustrés dans les figures suivantes.

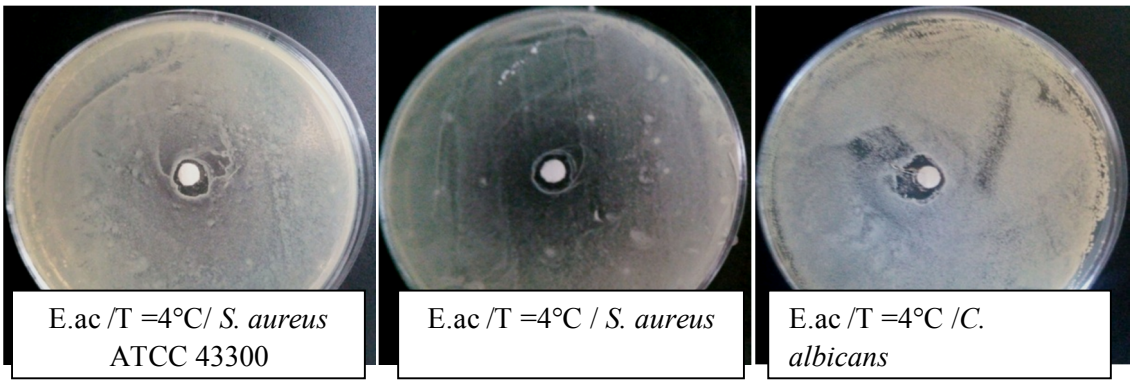


Figure 31 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche actinomycète R14', vis-à-vis les microorganismes testées à 4°C.

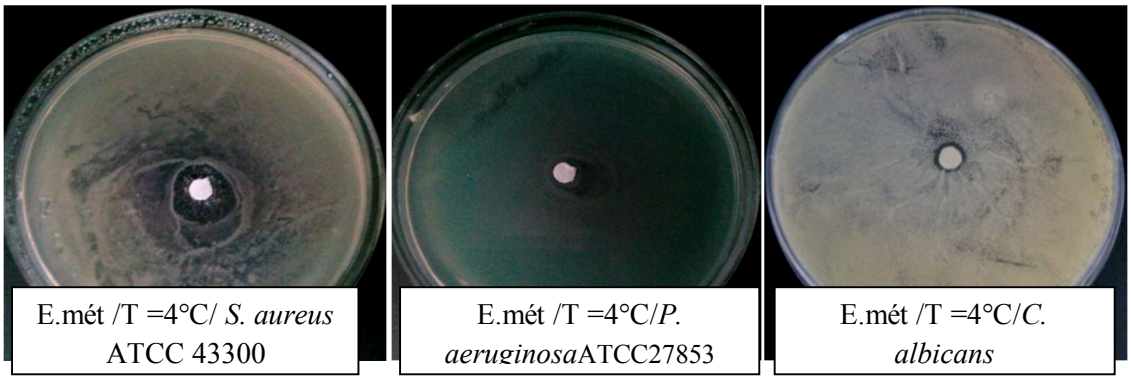


Figure 32 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche actinomycète R8', contre les microorganismes-tests à 4°C.

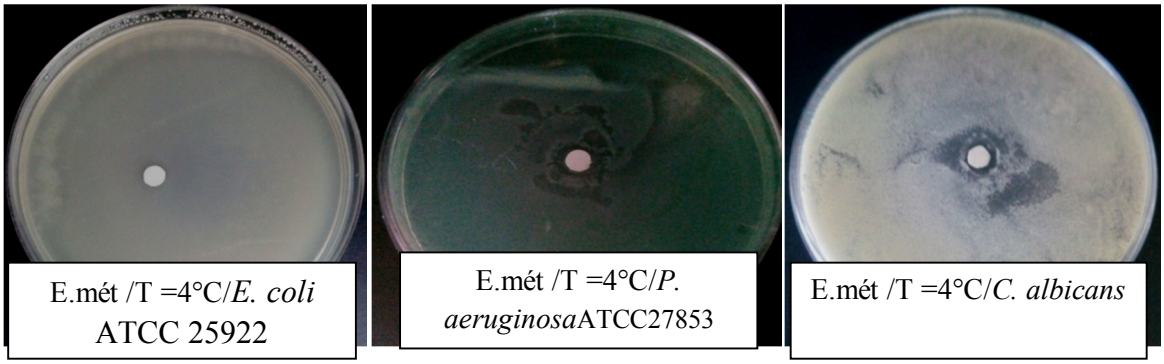


Figure 33: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la souche actinomycète TB0304, contre les microorganismes-tests à 4°C.

A partir des figures.31 ,32 et 33 précédents, On constate que :

Pour la souche R14' : les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle testé à 4°C, a montré une activité à contre les trois microorganismes tests (Figure.31).

Pour la souche R8' : les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait méthanolique testé à 4°C, a montré une activité contre les trois microorganismes testés (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC2785, *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* ATCC43300) (Figure.32).

Pour la souche TB0304: les résultats du criblage de l'activité antimicrobienne à partir de l'extrait méthanolique testé à 4°C, a montré une activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Candida albicans* (Figure.33).

Les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les différents extraits organiques des souches R14', R8' et TB0304 après traitement thermique sont rassemblés dans le tableau.31.

Tableau 31: Moyennes des diamètres en (mm) des zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14', vis-à-vis les microorganismes testés à 4°C. (n=2), le Ø de disque en papier wathman est inclue (6mm).

Microorganismes-tests	Souches d'*actinomycètes*		
	R14'	R8'	TB0304
Staphylococcus aureus ATCC43300	10± 2,12	17±0,00	NT
Staphylococcus aureus	10±0,35	NT	NT
*Pseudomonas aeruginosa*ATCC27853	NT	11±0,50	10±0,00
Escherichia coli ATCC 25922	NT	NT	6±0,00
Candida albicans	13±1,42	7.5±0,21	10±1,02

NT : non testé

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition répertoriées dans Les figures, que les diamètres des zones d'inhibition des différents extraits organique diffèrent d'un microorganisme tests à un autre. La plus grande zone d'inhibition à été obtenue avec l'extrait méthanolique de la souche R8' testé contre *Staphylococcus aureus* ATCC43300 avec un diamètre d'inhibition de 17 mm. Les molécules bioactives produits par la souche R8' conservent leur stabilité à 4°C vis-à-vis les trois microorganismes testés. En plus nous avons observée que l'extrait méthanolique de la souche TB0304 à montrée une activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 10mm (tableau 31). L'activité est inexistante contre *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'extrait d'acétate d'éthyle de la souche R14'à montrée une activité vis-à-vis les trois microorganismes testés la pus grand zone d'inhibition à été obtenue vis-à-vis de *Candida*

albicans avec un diamètre d'inhibition de 13 mm, alors que 10 mm de diamètre été obtenue contre *Staphylococcus aureus* ATCC43300 et *Staphylococcus aureus*.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition des extraits traités (testé à 4°C) avec ceux non traités nous permettent de conclure que la température a un effet sur la stabilité des molécules antimicrobiennes et donc sur la persistance de leur activité passant d'une bactérie-testée à une autre et d'un extrait organique à un 'autre.

L'étude statistique par analyse de la variance (test ANOVA) des deux extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyles à 4C° des trois souches d*'actinomycètes* à donné une p-value>0,05, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à- dire que les extraits méthanoliques et l'extrait d'acétate d'éthyle des trois souches d'actinomycètes testé à 4°C ont le même effet inhibiteur vis-à-vis les microorganismes testées en produisant les molécules antimicrobienne.

6-Activité enzymatique

6-1-Hydrolyse de l'amidon

Après incubation à 28°C pendant 7 jours, les cultures son recouvertes avec 5 à 10 ml de solution iodée (lugol), un résultat est positive se traduit une auréole claire autour de la colonie (Sundaramoothi*et a*., 2011). Les résultats de l'hydrolyse de l'amidon sont représentés dans la figure suivante :

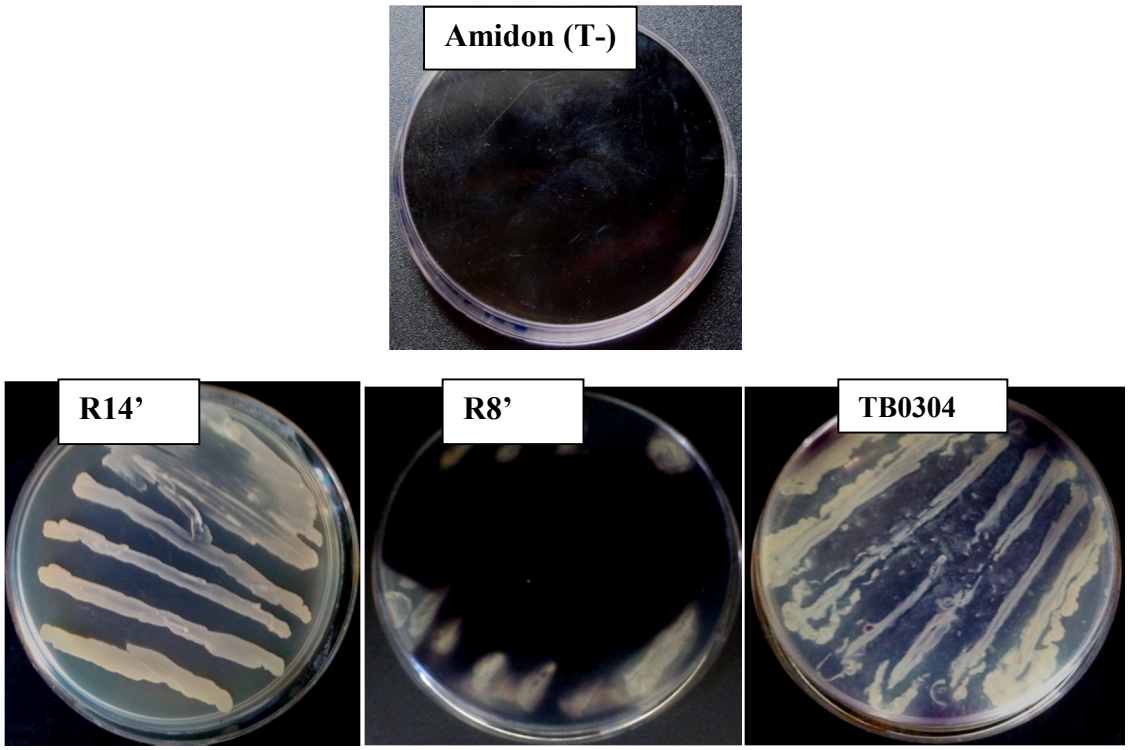


Figure 34: Résultats de l’activité Enzymatique (hydrolyse de l’amidon) par les trois souches *D’actinomycètes* étudies R14’, R8’ et TB0304.T- **:** témoin négatif.

La dégradation de l’amidon est vérifiée selon la méthode de (Marchal et Bourdon, 1973).

Il ressort à travers l’observation des résultats présente dans la figure.34, la présence d’un auréole claire autour des colonies R14’et TB0304, contrairement à la souche R8’ou l’amidon non hydrolysé reste bleu. D’appris nos résultats les deux souches R14’et TB0304 dégrade l’amidon, ces résultats sont cohérent a ceux (Morakchi, 2007) qui à obtenu à partir de 10 souches *d’actinomycètes* étudiées, 7 entres elles hydrolysent l’amidon et 2 souche seulement hydrolyse la caséine. D’autre part ces substrats sont dégradés par certain espèces de *streptomyces* pour être utiliser comme source de carbone (Schatz*et al.,* 1956 ; Adelson *et al.,* 1957) mais également pour la production d’antibiotique.

6-2-Hydrolyse de la caséine

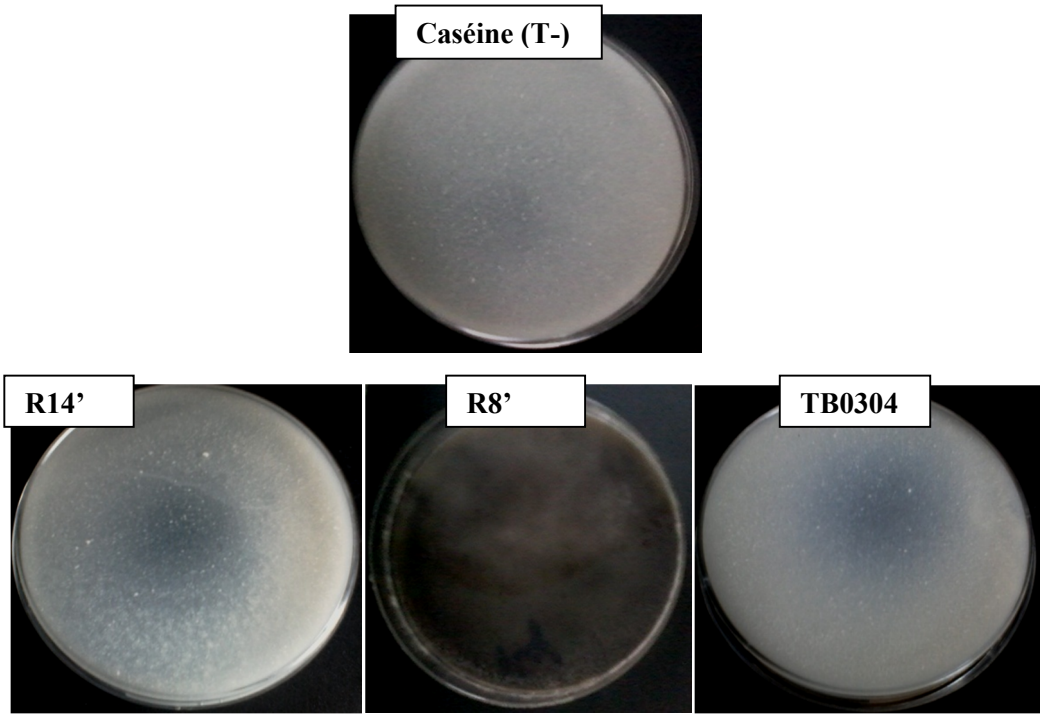


Figure 35: Résultats de l'activité Enzymatique (hydrolyse de la caséine) par les trois souches D'actinomycètes étudies R14', R8' et TB0304. (T-) **:** témoin négatif.

Il ressort à travers l'observation des résultats présente dans la figure.35, la présence d'un halo claire autour des colonies des souches R14'et TB0304, contrairement à la souche R8'.d'appris nos résultats les deux souches R14'et TB0304 dégrade la caséine, ces résultats sont proche à ceux de (Belyagoubi , 2014) qui à obtenu à partir de huit souches sur neufs *actinomycètes* étudiées, sept entres elles sont capable d'hydrolysés la caséine.

La biotechnologie est un champ multidisciplinaire qui a connu un développement important ces dernière année pas seulement dans la production d'antibiotique, mais aussi, dans d'autre domaine tout aussi important pour les industriels tels que l'utilisation d'enzymes les protéases sont aujourd'hui très importante notamment dans l'industrie alimentaire et la fabrication des nouveau détergents (Najafi *et al.,* 2005 ; Thumar et Singh, 2007).

Nous constatant également que la pente de tube contenant la souche TB0304 vire très légèrement au jaune ; celle-ci fermente donc le saccharose et /ou le lactose.

Aucun des trois tubes ne présente de coloration noire ; celle-ci donc H2S (-).

Absence des bulles ou de fragmentation de la gélose au niveau des tubes ensemencées des souches R14' et TB0304 ; celle-ci donc GAZ- ; des boulles de gaz ont été observé au niveau de tube contenant la souche TB0304 ; celle-ci donc GAZ+.

h) Caractère RM et VP

La réaction RM est négatives au niveau des tubes de milieu clark et lub contenant les souches R8' et R14,' dans le tube contenant la souche TB0304 le milieu vire au rouge par acidification ; celle-ci donc produise des acides organique par la voie des acides mixtes.

La réaction VP est négatives au niveau des tubes de milieu clark et lub contenant les souches R8' et TB0304, l'apparition d'un virage du milieu vers la couleur rose a été observé au niveau de tube contenant la souche R14'; celle-ci donc produise de l'acétoine par la voie de butyléne glycol (fermentation butandiolique).

i) Production d'indole

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les tubes de milieu EPE ensemencée des souches testées, l'indole est mis en évidence par l'addition du réactif de kovacs. L'apparition d'un anneau rouge a été observée au niveau de tube ensemencé par la souche TB0304 ; celle-ci produise donc de l'indole.

j) Croissance à différentes températures

Les trois souches ont été incubées durant 7 jours à 37°C et 28°C. Nous avons observé précédemment que les trois souches avaient une croissance relativement soutenue à 28°C. La souche TB0304 est la seul qui a montrer une très légère croissance à 37°C.

Tableau 32 : tableau synthétique de quelque caractère biochimique de trois souches *d'actinomycètes.*

Souches / Caractères	R8'	R14'	TB0304
Voie d'attaque des glucides (MEVAG)	**Oxydatif**	**Oxydatif**	**Fermentatif**
Catalase	-	-	+
β-galactosidase (ONPG)	-	-	+
Oxydase	-	+	-
Nitrate réductase	+	+	+
Mobilité	-	-	-
Mannitol	-	+	+
Citrate	+	+	-
Glucose	-	+	+
Saccharose et /ou Lactose	-	-	+
H2S	-	-	-
Gaze	-	-	+
RM	-	-	+
VP	-	+	-
Indole	-	-	+
Croissance à28°C	+	+	+
Croissance à37°C	-	-	+

+ : Résultat positif, - : Résultat négatif

A

Aissaoui N. (2012). Etude de molècules d'antibiotiques biossynthétisées par une bactérie extremophile issue d'une sebkha Algérienne d'EL Goléa. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie.

Akins, R. A (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans. Medical. Mycology*. 42:285-318.

Amanullah, A., Justen, P., Davies, A., Paul, G.C, Nienow, A.W., Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum. Biochemical Engineering Journal,* 5 (2): 109–114.

Anibou M. Chait A., Zyad A., Taourirt M, Ouhdouh Y. (2008). Actinomycetes from Moroccan habitas: isolation and screening for cytotoxic activities. *World. Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24, 2019-2025.

Aouar L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat : 201 p.

Aouiche A. (2011) Activité antimicrobienne de Streptomyces sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxinogènes résistants aux antibiotiques. *Journal De Mycologie Médicale*, France : 2p.

Auguestine S.K.,Bhavsar S.P, Kapadnis B.P,(2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by Streptomyces rochei AK35 *Indian Journal of Medical Research*, 121:146-170.

B

Badji. B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea.* Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226 p.

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N., (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxinogènes. *Journal de Mycologie Médicale*. 15 : 211–219.

Badji. B., Zitouni .A., Mathieu. F., Lebrihi.A., and Sabaou. N. (2006) Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil**.** *Canadian Journal of Microbiology. 52:373-382*

Baginski, M., H. Resat, J. A. McCammon. (1997). Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. Molecular Pharmacology. 52:560–570.

Basilio A., Gonza´ lez I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonza´lez A. and O. Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*., 95. 814-823.

Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycétes productrices de substances antifongiques de structure non-polyenique *mircen Journal.* 2 : 453-466.

Belkherroubi L. (2009). Biologie cellulaire et Moléculaire : Effet de l'état physique des antifongiques polyeniques sur leur activité cellulaire : exemple de l'amphotericine B. Thèse de doctotrat. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. 132p.

Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (Actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. 146p.

Berdy J. (2005). Bioactrive microbiol metabolites. *Journal of antibiotics*. 58: 1-26.

Berdy J., Aazalos A. and Mc Nitt K.L., (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

Bergey's Manuel. (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In*: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.

Boudjella, H., Boutia, K., Zitounia, A., Mathieub, F., Lebrihib, A., Sabaoua N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Research*, 161(4) : 288–298.

C

Cadet, D.E., Fontenay G., Laveille B., Linas M. D., Segula, J. P. (1996). Comparaison statistique de deux méthodes d'évaluation de l'activité antifongique. *Journal de Mycologie Médicale* , 6 (3) : 129–132.

Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra, G. Quindós. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Revista Espanola Quimioterapia. 19:130-139

Cavallo J.D., Fabre R., Jehlf., Rapp C., et Garrabé E., (2004) - Beta-lactam antibiotics. EMC-Maladies Infectieuses: 1, 129–202.

Chitte R. R., Nalawade V. K. et Dey S. (1999). Keratinolytic activity from the broth of a featherdegrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. Letters. *Applied. Microbiology* 28, 131-136.

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens.*Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. 174p.

Cos P., Arnold J.V., Dirk V.B, Louis M., (2006). Anti-infection potential of natural products : How develop a stronger in vitro « proof-of-concept ». *Journal of Ethnopharmacology*; 106:290-302.

Courvalin, P-F., Denis M.-C .,Ploy, M-P-D. .,Garilhe, P .,Trieu-Culot., Universalis. (2001)."Antibiotiques."Retrieved 24 mai, 2013, (from http://www.universalie du.com/encyclopedie/antibiotiques/).

D

Demain A. L. et Solomon N. A. (1985). Biology of industrial microorganisms. *The Benjamin/Cummings publishing company, Inc.* 291-357.

Demain A.L. and Salomon N.A. (1986). Manual of industrial microbiology, biotechnology. *American Society for Microbiology Press, Washington*.

Demain A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe.

Biotechnology Advances, 18(6): 499-514.

Demain A.L., et Lancini G., (2006). - Bacterial Pharmaceutical Products in Procaryotes, 1, 812–833.

Djaballah, (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha d'Ain M' lila. Memoire de l'obtention du Diplome de Magister en Micbiologie. Université Mentouri Costantine : 102p.

Drouhet E. (1978). Antifugut agents. *Antibiotics. Chemotherapy.,* 25: 253-288.

E

Errakhi R. (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.

Eunice J. A. and Prosser J. I., (1983). Mycelial growth, branching of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *Journal of general. Microbiol society*. 129, 2029 – 2036.

F

Flardh K, Bruttner M. J. (2009). ***Streptomyces*** *morphogenetics: dissecting differenciation in a filamentous bacterium*. *Nature Reviews*. 7: 36-49.

Flory H. W., Chain E., Heatly N. G., Jennings M. A., Sanders A. G., Abraham E. P., Florey M. E. (1949). Antibiotics: survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances from fungi, actinomycetes,bacteria, plants. Vol. 1. Oxford University Press. London.

G

Ghannoum, M.A., L. Rice. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology. Review* 12:501-517.

Goodfellow M, Jones Al, Maldonado La, Salanitro J. (2004). Rodococcus aethrivorans sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether degrading actinomycetes. *Systematic and Applied .Microbiology*. 27:61-5.

Goodfellow M. et Williams S.T., (1983). Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbioogyl. 37, 189-216

Gottlieb D., (1973). Général considération and implication of the Actinomycetales. In: Actinomycetales charactirestics and pratical importance. Edited by G.sykes and F.A skinner. Academic press, London, New York.

Gundliffe E. (2006). Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 500-506.

H

Hacène, H., Sabaou, N., Bounaga, N., Lefevre, G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare actinomycetales. *Microbios*, 79(319): 81–5.

Higgs R. E., Zahn G. A., Gygi J. D., Hilton M. D. (2001). Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 371-376.

Hilali, L., Khattabi, A., Nssarlah, N., Malki, A., Finance, C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2(1) : 49–53.

Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Johnson J.A., Onderdonk A.B., Cosimi L.A., Yawetz S., Lasker B.A., Bolcen S.J., Brown J.M, Marty F.M. (2011). *Gordonia bronchialis* bacteremia and pleural infection: casereport and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* 49(4): 1662–1666.

Horinouchi S. (2002). Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphologicaldifferenciation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*.*Frontiers in Biosciences*.7: 2045-2057.

Hozzein W.N., Rabie R., Ali M.I.A.,(2011). Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *African Journal of Biotechnology,* 10(12), 2295-2301.

Hsu S.C., Lockwood J.L., (1975). Powder chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Appled.Microbiology Technology, 66: 559-565.

K

Kaioua A., Grairi I. (2015). Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souche d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isoléesdes soles rhizosphériques. Mémoire Master. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.

Kamat T.K., Kiran S, Kerkar S., (2011). Antimicrobial potential of *Bacillus marismortui*, a salt pan isolate of Cavellosim ,Goa,India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; 3: 321-328.

Kang, M.J., Strap, J.L., Crawford, D.L. (2010). Isolation and characterization of potent antifungal strains of the Streptomyces violaceusniger clade active against *Candida albicans. Journal of Industtrial Microbiology and Biotechnology* 37(1): 35–41.

Kauffman, C.A., Carver, R.L. (1997). Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developpements. *Drugs,* 53(4): 539–549.

Kerridge d., Whelan w.L., (1984). The polyene macrolide antibiotics and 5- fluorocytosine: molecular actions and interactions. In "Mode of action of antifungal agents" Cambridge University Press. *Cambridge* 343-376.

Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, UK* : 613.

Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P, Michael Goodfellow M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus sp. nov., a cellulase-free endo-xylanaseproducing streptomycete. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 50.505-509.*

Kirk O., Dmhus T., Borchert TV., Fuglsang CC. (2005). Enzyme applications industrial in: seldel A(Ed)-Kirk-Othmer. encyclopedia of chemical technology. 5th edition, *New York.Wilet-Interscience*. 248(10), 317-898.

Kitouni, (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques a partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat :170 p.

L

Larpent J.P. et Sanglier J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p.

Lechevalier M. P, Lechevalier H., (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal Systematic and Evolutionary Bacteriol*ogy 20, 435 – 443.

Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: microbiology thayer,.Actinomycete taxonomy. Eds : A. DIETZ, D.W.. *Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA*. 225-291.

Lechevalier H. A., Lechevalier M. P., (1981). Introduction to the order *Actinomycetales*. In: The prokaryotes, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), *Springer – Verlag, Berlin*. p. 1915-1922.

Lechevalier M.P,Lechevalier H. (1985). "Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. *The Benjamen Cummings Publishing Company*, *INC*. 315-360.

Lee J.Y, Hwang B.K., (**2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Jpurnal of Microbiology*. 48. 407-417.

Lemke, A., Kiderlen, A.F., O. Kayser. (2005). Amphotericin B. Applied Microbiology and Biotechnology 68:151-162.

Lemriss S. (2003). Screening of antifungal metabolits produced by clinical isolates of *actinomycetes. Biotechnology Progress* . 17:366-368.

Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D.,Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian Journal Microbiology*, 49(11): 669–674.

Locci R. (1976). "Developmental micromorphology of actinomycetes". In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed., Tokyo*. 170-180.

Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Memoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine : 115p

Loucif L. (2006). Recherche des souches d'actinomycètes productrices de molécules antibactériennes « Cas des eaux du lac oubeira d'el kala ». Memoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Badji Mokhtar- Anaba : 160p.

Lopes A., Coelho R. R., Meirelles M. N. I., Branquinha M. H. et Vermalho A. B. (1999). Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Menorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 94, 763-770.*

Lozniewski A., Rabaud C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prevention du risqué inféctieux. Centre de Coordination de lute contre les infections Nosocomiales-Sud Est.

M

Madigan M. T et Martinko J.M. (2007) Biologie des microorganismes. *Pearson Education France,* 11e edition : 331-423, 686-718.

Marchal N et Bourdon J.M.(1973). Milieu de culture et identification biochimique des bactéries. Ed Doin. Paris.

Mariat F. et Sebald M. (1990). « Les actinomycetes. » Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. *Flammarion. France.*

Marinelli F. (2009). Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2: 20-23.

Mason M. G., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. et Wilson M. T. (2001). Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes : A case of Mistaken identity. *Applied Environmental Microbiol*ogy 67(10), 4512-4519

Mellouli L., Ben Ameur –Mehdi R.,Sioud S.,Salem M, Bejar S, (2003). Isolation , purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces Sp.US24 strain Microbio.vol154:345-.352

Mendes, T.D., Borges, W.S., Rodrigues, A., Solomon, S.E., Vieira, P.C., Duarte, M.C., Pagnocca, F.C. (2013). Anti-Candida properties of urauchimycins from Actinobacteria associated with trachymyrmex ants. *Biomeded Research Int*ernational (2013): 835081, 9 p.

Milhaud, J,. V. Ponsinet, M. Takashi, B. Michels. (2002). Interactions of the drug amphotericin b with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insights into the role of ergosterol. Biochimica. Biophysica. Acta **1558**:95–108.

Million L. (2006). Antifongiques : traitement des mycoses invasives. DIU chimiothérapie anti infectieuse.

MORAKCHI H. (2011). Isolement et identification de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives au niveau du lac Oubeira: etude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité. Diplôme Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba : 129p

Morakchi H, Ayari A ,Taok M, Kirane D.Cochet N. Characterisation of Streptomyces strain SLO -105 isolated from lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African journal of biotechnologie*. (2009)8(22):6332-6336

Muiru W., Mutitu E. W., Mukunya D. M. (2007). Characterization of antibiotic metabiltes from actinomycetes isolates. African Crop Science Conference Procedings. **8** : **2103-7**.

N

Najafi M.F, D. Ddeobagks, (2005). Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100.*Electronic Journal of Biotechnolgy* ., 8: 197-203.

O

Oskay M., Tamer A.U, Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 3 (9), pp. 441-446.

Oskay M. (2011). Isolation and Purification of Two Metabolites (KGG32-A & KGG32-B) from a Soil Bacterium, *Streptomyces* sp., *KGG32 International Journal Agricultural and Biology., 13(3):369–374.*

Ostrosky-zeichner Luis,arturo casadevall,john N.Galgiani,Frank C.Odds, john H.Rex. (2010). An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond.nature Reviews Drog Discovery.

Ouelhadj A., Amel A., Sizine K. et Djenane D. (2014). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* récolté en Algérie. *Revue de Microbiologie Industrielle, sanitaire et Environnementale*., 2 (8): 145-162.

P

Pandey B., Ghimire P., Agrawal V.P., (2003). Studies on the antibacterial avtivity of the Actinomycetes isolated from Khumbo Region of Nepal. Academy of science and Technology.4p

Paquet, M. J., I. Fournier, J. Barwicz, P. Tancrede, M. Auger. (2002). The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol containingdipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by 2H NMR. Chemistry Physics ofLipids 119:111.

Pelmont J. (2005). Biodégradation et Métabolisme. Les bactéries pour les technologies del'environnement. EDP Sciences. France.

PFALLER M.A. (2012). Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American journal of Medicine*., 125 (1): S3- S13.

Podust, L. M., T. L. Poulos, and M. R. Waterman. (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**:3068-3073.

Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A. (2003). Microbiologie. De Boeck & Larcier. France

Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A. (2007). Microbiologie. Edition De Boeck et Larcier.

Prescott W.M., Sherwood M., Woolverton J., (2013). Micbiologie.8e édition Bruxelles : 568p.

R

Rautemaa R.,Richardson M.,Michael A.,faller P., Perheentupa J., saxen H.(2008). Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconasole and Voriconazole against Candida albicans. *DiagnosticMicrobiology and Infectious Disease. 62* : 182-185

Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahfrouf A. (2008). Separation et caracterisation preliminaire d'antibiotiques produits par une souche representative d'actinomycetes isoles de sol aride de la region de biskra**.** *Science and Technoogyl c. 28 : 59-64.*

Reponen T.A., Gazenco S.V., Griinshpu S.A., Willeke k., Cole E.C., (1998). Caracteristics of airborne actinomycete spore. Applied Environmental of Microbiology, 64 :3807-3812.

Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian Journalof Microbiology*, 49(11): 669–674.

Rivas R., Sanchez M., Trujillo M. E., Zurdo-pineiro J. L., Mateos P. F., Martinez-

Molina E. et Velazquez E. (2003). *Xylanimonas cellulosilyca* gen. Nov., sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decaded tree (UImus nigra). *Internatinal Journal of Systematic* 53, 99-103.

S

Sabaou N., Amir H. et Bounaga D., 1980. Le palmier dattier et la fusariose. X. Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère ; leur antagonisme vis à vis de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. *Annual Review of Phytopath*logy; 12: 253-257.

Sanglard, D. (2002). Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. **20:**462-469.

Sanglier J. J., Wellington E. M. H., Kamoun A., Kelly C., Mercer D. K., Prinzis, Trigo C. (1993). Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* 144, 661-663.

Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., Inouye S, Niida T. (1979). Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF 1993. *Journal of Antibiotibiotic* 32, 425-427.

Singleton P. (1994). Bactériologie.Masson. France.

Simon P. et Meunier R., (1970)-Microbiologie industrielle et génie biochimique. 452p.

Slavica, B.I., Sandra, S.K., Zoran, B.T. (2005). Uv/Vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Medecine and Biology* 12(1) : 44–46.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. en vue de l'obtention du doctorat. Toulouse : 22p.

Sundaramoorthi C, Vengadesh PK, Gupta S, Karthick K, Tamilselvi N. Production and characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes. Int Res J Pharm 2011; 2(4): 114-118.

Tanaka Y. (1992). Fermentation processes in screening for new bioactive substances, dans «The search for bioactive compounds from microorganisms» **303-325** pp. *Springer-Verlag, New York,(Ed)*.

Theilleux J. (1993). *In* Levreau J. Y., Bouix M. O. Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoiser. France. Ch 6 : 425-481.

Theilleux J. *In* **Levreau J.Y. and Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle. Lesmicro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Paris. Ch : 6 425-481. *Technique et documentation. Lavoisier. Paris.*

Toussaint V. (1996). Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophtora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

Tulkens P.,Van Bambeke V. (2008). Pharmacologie et Pharmacothérapie Antiinfectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie**.**

Thumar J.T, Singh S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphic, *streptomyces clavuligerus strain Mit-1 Brazilian journal of Microbiology.(2007);* 38: 766 772**.**

V

Vandeputte. V. (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez candida glabrata. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.

Vandeputte p., Ferrari S. et Coste A.T. (2011). Antifungal Resistance and New Strategies toControl Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. 2012: 26.

Ventura. M; Canchaya. C; Tauch. A; Chandra. G; Fitzgerald. G.F; Chater. K.F; and van Sinderen.D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an AncientPhylum. *Microbiology an Molecular Biology Reviews, 71 (3), 495–548.*

W

Walsh C., Traujer J., Courvalin P., Davies J. (2001). Adapté à partir du poster des mechanisms d'action et de la résistance aux antibiotiques. Trends *In*Microbiology, the Lancet Infectiousn Diseases, *Current Opinion in Microbiology*, Trends *In* Molecular Medecine.

Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M, Rodrı´guez C. (2006). *Streptacidiphilus oryzae* sp. *nov*., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *Internarional journal of Systematic and . Evolutionary Microbiology*., 56. 1257-1261.

Warn, P. A., A. Sharp, J. Guinea, D. W. Denning. (**2004)**. Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against *Aspergillus* and *Candida*. Journal of Antimicrobial Chemothererapy. 53:743–749.

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

White, T. C., K. A. Marr, R. A. Bowden. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology.Reviews . 11:382-402.

White, T. C., K. A. Marr, R. A. Bowden. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology.Reviews .. 11:382-402.

Williams S.T, Goodfellow M., Alderson G., (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In "Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins 2452-2492.p

Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Medecine de Maghreb. N° 91.

Yilmaz E.I., Yavuz M. and Kizil M. (2008). Molecular characteriazation of rhizospheric soil Streptomycetes isolated from indigenous plans and their antimicrobial activity. *Word Journal of Microbiolgy and Biotechnology*. 24, 1461-1470.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharoyhrix Sp* SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi ouzou, (Algérie). 230p.

Zitouni A., Bennadji H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A, Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology* 156, 984-993.

Zouaghi A. (2007). Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par Streptomyces rimosus. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage : 12p

Annexe 01:

Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- ✓ **Eau physiologique stérile** (composition en g/l)

• Chlorure de sodium (Na Cl)…….9 g.

• Eau distillée……. 1000 ml.

• pH = 7.

• Stérilisation à 120 °C/15 min.

- ✓ **Gélose Mueller Hinton (composition en g/l)**

•Extrait de viande ……. ….. 3 g

•Amidon ……..1,5 g

•Hydrolysat acide de caséine ……. . 17,5 g

•Agar……. ...18 g

• Eau distillée……..1000 ml

•pH = 7,4

- ✓ **Milieu de Bennett (composition en g/l)**

•Glucose 10g

•Extrait de levure …….....2g

•Extrait de viande….....1g

•Agar……..20g

• Peptone.....20g

•Eau distillée ……... …..1000 ml

•pH = 7,2

- ✓ **Milieu Sabouraud (composition en g/l)**

•Glucose 40g

•Peptone.....10g

•Agar…….20g

- Eau distillée ……1000 ml
- pH =5.6

- ✓ **Milieu Bennett liquide (composition en g/l**

- Glucose 10g
- Extrait de levure ……....2g
- Extrait de viande.….....1g
- Eau distillée ……..1000 ml
- pH = 7,2

- ✓ **Milieu de culture à base de lait écrémé (composition en g/l)**

- Poudre du lait écrémé…….10g
- Peptone…….....5g
- Na Cl……0,03g
- Agar…….....20g
- Eau distillée ……....1000 ml

- ✓ **Milieu de culture a base d'amidon (composition en g/l)**

- Glucose 5g
- Extrait de levure …….....2g
- Extrait de viande.….....1g
- Agar…….....20g
- Peptone.....20g
- Amidon…….....10g
- Eau distillée ……...1000 ml
- pH = 7,2

Annexe 02 :

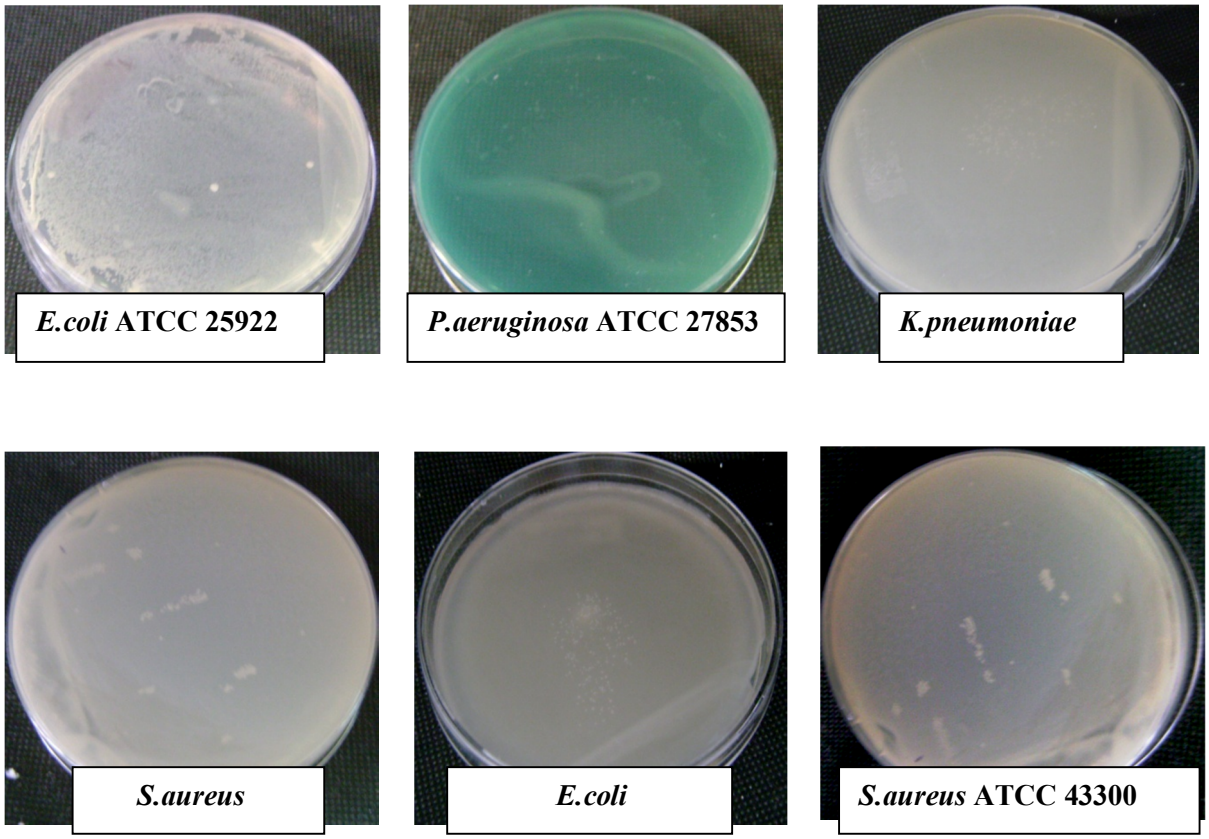


Figure 1: Témoins négatifs des six bactéries cibles.

Annexe 03 : Résultats des tests statistiques

Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille de données1)
Paramétrisation sigma-restreinte
Décomposition efficace de l'hypothèse

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	930,0888	1	930,0888	23,75453	0,000648
souche	102,5833	7	14,6548	0,37428	0,897462
Erreur	391,5417	10	39,1542		

Figure 2: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antibactérienne.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétres (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1134,375	1	1134,375	3025,000	0,000013
souches	99,750	2	49,875	133,000	0,001178
Erreur	1,125	3	0,375		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable diamétre (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = ,37500, dl = 3,0000 souche	**diamétre Moyenne**	1	2
2	R8'	8,00000		****
3	TB0304	16,25000	****	
1	R14'	17,00000	****	

Figure 3: tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats du l'activité antifongique

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2200,056	1	2200,056	41,65019	0,000011
souche	336,111	2	168,056	3,18153	0,070503
Erreur	792,333	15	52,822		

Figure 4: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	522,6667	1	522,6667	313,6000	0,000393
souche	42,3333	2	21,1667	12,7000	0,034332
Erreur	5,0000	3	1,6667		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable diamétre (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 1,6667, dl = 3,0000 **souche**	diamétre Moyenne	1	2
3	TB0304	6,00000	****	
2	R8'	9,50000	****	****
1	R14'	12,50000		****

Figure 5: tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1184,222	1	1184,222	396,2082	0,000000
souche	5,444	2	2,722	0,9108	0,423338
Erreur	44,833	15	2,989		

Figure 6: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	384,0000	1	384,0000	26,79070	0,013996
souche	19,0000	2	9,5000	0,66279	0,577584
Erreur	43,0000	3	14,3333		

Figure 7: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2380,500	1	2380,500	33,97748	0,000033
Souche	566,583	2	283,292	4,04349	0,039394
Erreur	1050,917	15	70,061		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable diamétre (Feuille) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 70,061, dl = 15,000 Souche	diamétre Moyenne	1
2	R8'	7,08333	****
3	TB0304	8,00000	****
1	R14'	19,41667	****

Figure 8: tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	253,5000	1	253,5000	338,0000	0,000351
Souche	0,7500	2	0,3750	0,5000	0,649519
Erreur	2,2500	3	0,7500		

Figure 9: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1100,028	1	1100,028	45,88760	0,000506
pH	10,889	2	5,444	0,22711	0,803379
Erreur	143,833	6	23,972		

Figure 10: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antimicrobienne de la souche R8' en fonction de pH.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	756,2500	1	756,2500	62,29977	0,000219
pH	22,1667	2	11,0833	0,91304	0,450630
Erreur	72,8333	6	12,1389		

Figure 11: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antimicrobienne de la souche R14' en fonction de pH.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamétre (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	641,7778	1	641,7778	577,6000	0,000000
pH	9,5556	2	4,7778	4,3000	0,069406
Erreur	6,6667	6	1,1111		

Figure 12: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antimicrobienne de la souche TB0304 en fonction de pH.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour T° (Feuille) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	992,2500	1	992,2500	94,75066	0,000068
Souche	16,1667	2	8,0833	0,77188	0,503140
Erreur	62,8333	6	10,4722		

Figure 13: tables de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antimicrobienne de la souche TB0304 à 4°C.

Résumé :

Ce travail porte sur l'étude de production, extraction de quelques molécules bioactifs isolée a partir de trois souches d'actinomycètes «R14', R8' et TB0304».

L'étude consiste d'une part à l'estimation de la production de métabolites actifs des trois souches actinomycétales et l'extraction de ces métabolites aux différentes solvants organiques, de différentes polarités, et d'autre par de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits et l'étude de la stabilité de ces molécules en fonction de pH et de la température.

Le screening primaire a révélé que les trois souches sont active vis-à-vis les bactéries à Gram positives les bactéries à Gram négatives ainsi que les deux souches fongiques cibles. Le screening secondaire nous a permis de choisir l'acétate d'éthyle comme le meilleur solvant d'extraction. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité envers les souches bactériennes testées, contre*S.aerus*ATCC 43300 et *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 32.5 et 41 mm de diamètrerespectivement et un léger pouvoir inhibiteur contre *C.albicans* et *A.niger*.

Mots clés : molécules antimicrobiennes, actinomycétales, souches fongiques, Le screening secondaire.

Abstract :

This work focuses on the study of production, extraction of bioactive molecules isolated from three strains of actinomycetes' R14 ', R8' and TB0304 ".

This study consists in the first step on the estimation of the production of active metabolites of three Actinomycetales strains and extracting these metabolites to various organic solvents with different polarities, and the other is to show the antimicrobial activity of the extracts in addition the study of the stability of these molecules according to the pH and temperature.

The first screening revealed that three strains are overlooked the Gram-positive bacteria to Gram-negative bacteria as well as for the two target fungal strains. The second screening allowed us to choose ethyl acetate as the best extraction solvent. The ethyl acetate extract showed activity against the bacterial strains tested, against S.aerus ATCC 43300 and

S. aureus with a zone of inhibition of 32.5 and 41 mm respectively. And a slight inhibitory potency against *C. albicans* and *A.niger*.

Keywords: antimicrobial molecules, Actinomycetales, fungal strains, the secondary screening,