



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

**FACULTE : SCIENCES
DEPARTEMENT : BIOLOGIE**

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :

**Mme. MESSAHLI Ilhem
et
Mme. SOLTANI Sabrina**

**DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie (S.N.V)
FILIERE : Biologie
OPTION : Microbiologie Environnementale et Infectieuse**

Thème

**Isolement des actinomycètes à partir des éponges
marines et mise en évidence de leur pouvoir
antimicrobien**

Jury de soutenance :

Membre 1	Président
Membre 2	Examineur
MESSAOUDI Omar	Maître Assistant classe A Rapporteur

Promotion : Juin – 2016

Remerciements

*Nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir guidé sur la
bonne voie, vers le savoir et la lumière.*

Au terme de ce modeste travail, nous adressons nos sincères

remerciements à :

Mr. Messaoudi Omar Maître Assistant à l'Université Amar Thelidji

Laghouat pour sa précieuse orientation.

*Que ce travail soit pour lui un témoignage de notre gratitude et
reconnaissance.*

*Mr. Frédéric Azémar Ingénieur en écologie environnementale du
laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (EcoLab),
université Paul Sabatier-Toulouse III pour son aide.*

Tout le personnel du laboratoire à l'Université Amar Telidji

Laghouat.

*Toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de
ce mémoire.*



Dédicace

Louange à Dieu le tout puissant, le Clément, le Miséricordieux, qui m'a donné le courage, la patience et la bonne volonté de mener à bien ce travail.

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mes grands-parents et mon beau-père, que Dieu accueille leurs âmes en son vaste paradis.

Aux êtres qui me sont les plus chers au monde, ceux qui m'ont recouvert d'affection et de tendresse et qui m'ont offert la source de fierté et de bonheur, Papa et Maman pour leurs sacrifices, leur soutien et leur amour, je vous aime tant.

A mon très cher mari qui n'as pas épargné d'effort pour me voir réussir, pour son soutien moral et ses encouragements.

A ma belle-famille et surtout à ma belle-mère et mes belles-sœurs.

A mon cher oncle Djamel et sa femme Nedjma.

A mes tantes Dalila et Yamina.

A mon très cher frère Lamine et sa femme Amina.

A mes adorables sœurs Hassiba, Imen et Sofia.

A leurs maris Djilali et Hichem

A mes chers poussins Mohammed, Hiba, Alaa et Hamza

A ma petite princesse Malek

A tous mes cousins.

A mon promoteur Mr Messaoudi Omar.

A mes chères amies Sabrina, Nabila et Wided.

A toute la promotion de Master Microbiologie Environnementale et Infectieuse.

A tous mes enseignants.

A tous ceux qui ont sacrifié leur temps pour la science.

A tous ceux qui utilisent le savoir pour le bien et la prospérité de l'humanité.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Allah





DEDICACE

C'est avec une grande joie et bonheur que je dédie ce mémoire aux personnes qui m'ont encouragé et qui m'ont soutenue pour accomplir ce travail :

*A mes très chers parents, mon mari Mustapha, ma tante Zohra
A ma belle-famille ; ma belle-mère, mon beau-père, et mes belles-sœurs*

A la mémoire de ma grande mère

A mes sœurs Amel, Nadia, Nassima, Fatima Zohra

A mon adorable frère Omar

A mon promoteur Mr. Messaoudi Omar

A ma très chère amie Ilhem.

A tous mes enseignants

A tous mes collègues de la promotion de 1^{ère} et 2^{ème} année Master

Microbiologie Environnementale et Infectieuse



Sabrina



Liste des figures

Liste des figures

Figure I.1 : <i>Diversité globale des éponges marines (Rob et al., 2012)</i>	4
Figure I.2 : <i>Schéma de la forme la plus simple d'une éponge (type ascon) (Quintin, 2001)</i>	5
Figure I.3 : <i>Typologie des éponges : A, de type ascon ; C, de type sycon; E, de type leucon d'après (Anne-Marie et al., 2010)</i>	6
Figure I.4 : <i>quelques exemples sur la classification des éponges marines, (a) éponge calcaire, (b) éponge hexactinellide, (c) démosponge (wikipedia, Porifera, Éponges, Spongiaire, 2016)</i>	8
Figure I.5: <i>Sporulation et cycle de vie de des actinomycètes d'après (Barka et al., 2016)</i>	11
Figure II-1 : <i>Carte montrant le site d'échantillonnage (Aïn El-Turk côte d'Oran) (Google maps)</i>	16
Figure II-2 : <i>L'éponge Chondrosia reniformis</i>	16
Figure III-1: <i>Nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture</i>	21
Figure III-2: <i>Observation macroscopique des isolats (a) : LAM₁SW₄V₁₁, (b) : LAM₁SW₄V₁₂</i>	23
Figure III-3: <i>(a): Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SW₃V₁₃ (x100) (b): le genre le plus probable correspondant (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1993)</i>	24
Figure III-4: <i>(a): Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁C₄V₁ (x100) (b): Les genres les plus probables correspondant (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>	24
Figure III-5 : <i>(a): Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SAV₄ (x100) (b): le genre le plus probable correspondant (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1993)</i>	25
Figure III-6 : <i>(a): Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SW₁V₅ (x100) (b): le genre le plus probable correspondant (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1993)</i>	25
Figure III-7 : <i>(a): Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SA₆M₇ (x100) (b): le genre le plus probable correspondant (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1993)</i>	26
Figure III-8 : <i>activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes</i>	27
Figure III-9 : <i>Sensibilité des souches testées vis-à-vis des colonies d'actinomycètes isolées</i>	28

Figure III-10 : <i>Aspect microscopique du mycélium de substrat (a), et du mycélium aérien de l'isolat LAM1SW4V12.</i>	31
Figure III-11 : <i>Différentes morphologies possibles de l'isolat LAM1SW4V12 selon Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey et al., 1993).</i>	31

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1: <i>La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity et al., 2004).....</i>	<i>12</i>
Tableau I.2: <i>Métabolites secondaires produites par des actinomycètes marin découvertes dans la période 2003-2005 d'après (Kin, 2006).....</i>	<i>15</i>
Tableau III.1: <i>Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats d'actinomycètes vis-à-vis des souches testées.....</i>	<i>26</i>
Tableau III.2 : <i>Résultats de la dépendance vis-à-vis de l'eau de mer.....</i>	<i>30.</i>

Sommaire

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
Introduction.....	3
I-1 Les éponges	3
I-1.1 Généralités.....	4
I-1.2 Biologie des éponges.....	4
I-1.2.1 Morphologie	4
I-1.2.2 Fonctions vitales.....	6
I-1.3 Classification des éponges	7
I-1.4 Symbiose éponge bactéries, un intérêt thérapeutique potentiel	8
I-2 Les actinomycètes	8
Introduction.....	8
I-2.1 Historique.....	9
I-2.2 Morphologie et caractéristiques des actinomycètes	10
I-2.3 Développement des actinomycètes	10
I-2.4 Cycle de vie.....	11
I-2.5 Taxonomie des actinomycètes	12
I-2.6 Distribution des actinomycètes dans la nature	13
I-2.7 Les actinomycètes indigènes du milieu marin	13
I-2.8 Potentiel biotechnologique des actinomycètes marins.....	14
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	16
II-1 Collecte des échantillons	16
II-2 Isolement des actinomycètes	17
II-2.1 Milieux de culture utilisés.....	17
II-2.1.1 Préparation de la solution mère.....	17

II-2.1.2 Préparation des dilutions décimales et ensemencement	17
II-3 Observation microscopique	18
II-4 Purification des isolats	18
II-5 Conservation des isolats.....	18
II-6 Mise en évidence de l'activité antibactérienne	18
II-6.1 Préparation de l'inoculum.....	18
II-6.2 Technique des cylindres agar.....	19
II-7 La dépendance des isolats vis-à-vis de l'eau de mer	19
II-8 Pré-identification.....	19
Chapitre III : Résultats et Discussion	21
III-1 Résultats d'isolement des actinomycètes	21
III-2 Discussion.....	22
III-3 Diversité morphologique des actinomycètes isolés.....	23
III-4 Résultats de l'activité antimicrobienne	26
III-5 Discussion.....	29
III-6 Résultats de la dépendance vis-à-vis de l'eau de mer	29
III-7 Discussion.....	30
III-8 Pré-identification de la souche sélectionnée.....	30
Conclusion	33
Références biobibliographiques.....	35
Annexe milieux de culture	42

Introduction générale

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexandre Fleming en 1928, les antibiotiques ont eu un immense impact sur le traitement des infections causées par les microorganismes pathogènes. Cependant, l'antibiothérapie abusive et l'automédication ont conduit à l'émergence de nouvelles souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques. Il en résulte qu'à l'heure actuelle aucune classe d'antibiotiques, aussi bien d'origine naturelle que synthétique n'échappent à ce phénomène. En effet, des études ont démontré en moyenne l'existence d'un intervalle de quelques années entre les premiers essais cliniques et les premiers cas de résistance observés (**Fernandez et al., 2011**). Sous l'effet de la demande croissante de nouvelles molécules bioactives efficaces sur ces bactéries multi-résistantes, la recherche et le développement de nouveaux produits dotés de nouvelles activités antimicrobiennes a été propulsé au rang des défis les plus importants pour l'humanité au 21^{ème} siècle. Les chercheurs estiment que seul 1% des microorganismes vivant sur terre a été découvert ce qui ouvre la voie vers la découverte de plusieurs nouvelles espèces microbiennes encore inexploitées et qui doivent posséder des métabolismes particuliers et donc la capacité de produire de nouvelles molécules.

La plupart des antibiotiques originaires du monde microbien proviennent de bactéries terrestres appartenant au groupe des actinomycètes (**Barka et al., 2016**). Ces derniers se présentent comme un groupe de bactéries particulièrement intéressantes par la richesse de leur métabolisme secondaire et par la diversité remarquable des métabolites qu'ils produisent (**Overbye et Barrett, 2005**). Toutefois, il est bien clair que la découverte de nouveaux métabolites isolés d'actinomycètes est en ralentissement. De nos jours, 90% des produits obtenus de souches actives sont des produits déjà connus.

Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux métabolites bioactifs d'intérêt pharmaceutique à partir de ces microorganismes, le moyen le plus utilisé consiste à les rechercher à partir des niches écologiques longtemps ignorées et / ou peu étudiées tel que les écosystèmes marins. D'un point de vue microbiologique, le milieu marin est très diversifié, et offre des conditions de vie variées aussi bien au niveau de la température, de la salinité que de la pression. La biodiversité des océans est due à leurs propriétés physiques mais aussi aux relations symbiotiques établies entre les microorganismes et les organismes marins (**Abdelmohsen et al., 2010**). Parmi les niches marines inexplorées, les éponges représentent la source marine la plus importante en produits naturels. En effet, elles détiennent une diversité de microorganismes dont des actinomycètes. De plus, vu le nombre incroyable des métabolites secondaires isolés de ces éponges et leurs systèmes de défense

mécaniques et physiques rudimentaires voire inexistantes, on peut comprendre que ces organismes marins ont su développer des capacités physiologiques et métaboliques uniques afin d'assurer leur survie dans des conditions extrêmes. Parmi ces capacités, la défense biochimique offre un potentiel de production de métabolites originaux, jamais observés chez les organismes terrestres (**Saradavey et Parameswaran, 2013**).

Dans cette étude, on s'est fixé l'objectif d'explorer l'activité antimicrobienne et antifongique de la flore actinomycétale associée à l'éponge marine *Chondrosia reniformis* collectée de la côte Ouest algérienne (Ain Turk, Oran).

A cet effet, on a adopté l'approche suivante :

- ✚ Isolement des actinomycètes à partir des échantillons de l'éponge *Chondrosia reniformis* prélevés.
- ✚ Mise en évidence du pouvoir antimicrobien des isolats.
- ✚ Pré-identification de l'isolat le plus producteur de substances antimicrobiennes sur la base de sa morphologie.

Le manuscrit est divisé en cinq sections ; une introduction générale qui montre les enjeux du sujet abordé et ses objectifs, suivie d'un premier chapitre qui est une revue de la bibliographie sur le thème de l'étude. Le chapitre matériel et méthodes donne un aperçu sur les techniques d'isolement des actinomycètes et de la mise en évidence de leur activité antimicrobienne. Les résultats de notre étude et leur discussion sont présentés dans le quatrième chapitre et on clôture cette étude par une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse bibliographique

Introduction

Bien que la biodiversité de l'environnement terrestre est importante, celle du milieu marin est extraordinaire et saisissante (**Lythgoe et Chao, 2003**). Les océans où a eu lieu la genèse de la vie couvrent plus de 70 % de notre planète. Dans certains écosystèmes, comme les barrières de corail, les experts estiment que la biodiversité est supérieure à celle des forêts tropicales. Les écosystèmes aquatiques sont loin d'avoir livré tous leurs secrets. Malgré sa spécificité biologique, l'environnement marin a reçu beaucoup moins d'attention que le terrestre.

I-1 Les éponges

Les éponges sont des parazoaires, situés entre les protozoaires et les métazoaires et ils forment un groupe appelé **spongiaires**. Les éponges marines encore appelées les **porifères** sont des invertébrés pluricellulaires primitifs par leur structure : pas de tube digestif, ni de système nerveux réel, ni de système d'excrétion. Elles font partie de la biomasse marine depuis la période du cambrien inférieur (**Se-Kwon, 2013**). Les éponges sont présentes dans toutes la planète et vivent dans de nombreux écosystèmes aquatiques. La plupart des espèces sont marines, mais il existe une cinquantaine d'espèces d'eau douce. Elles sont particulièrement bien représentées dans les zones littorales où la nourriture est abondante, entre 6 et 20 mètres de profondeur, mais certaines espèces peuvent vivre jusqu'à 8 600 m de profondeur (**Lecointre et Le Guyader, 2001**) (*Figure I.1*). Ces organismes benthiques et sessiles, ne se développent que sur un substrat dur comme les rochers, le bois et les épaves émergées (**Se-Kwon, 2013**). Ils filtrent l'eau et n'ont d'autres mouvements que de légères contractions de leurs surfaces qui présentent des formes asymétriques et des couleurs variées. Les éponges vivent souvent en symbiose avec des microorganismes. Les relations entre les éponges et les symbiotes sont complexes et on leur attribue plusieurs rôles possibles (**Faulkner et al., 1994; Se-Kwon, 2013**) : dans la mesure où les éponges se nourrissent de microorganismes, il est possible qu'elles tolèrent une colonie qui leur servirait de garde-manger ; il est également possible que ces symbiotes empêchent l'épibiose (colonisation de l'éponge par d'autres espèces comme les pathogènes).

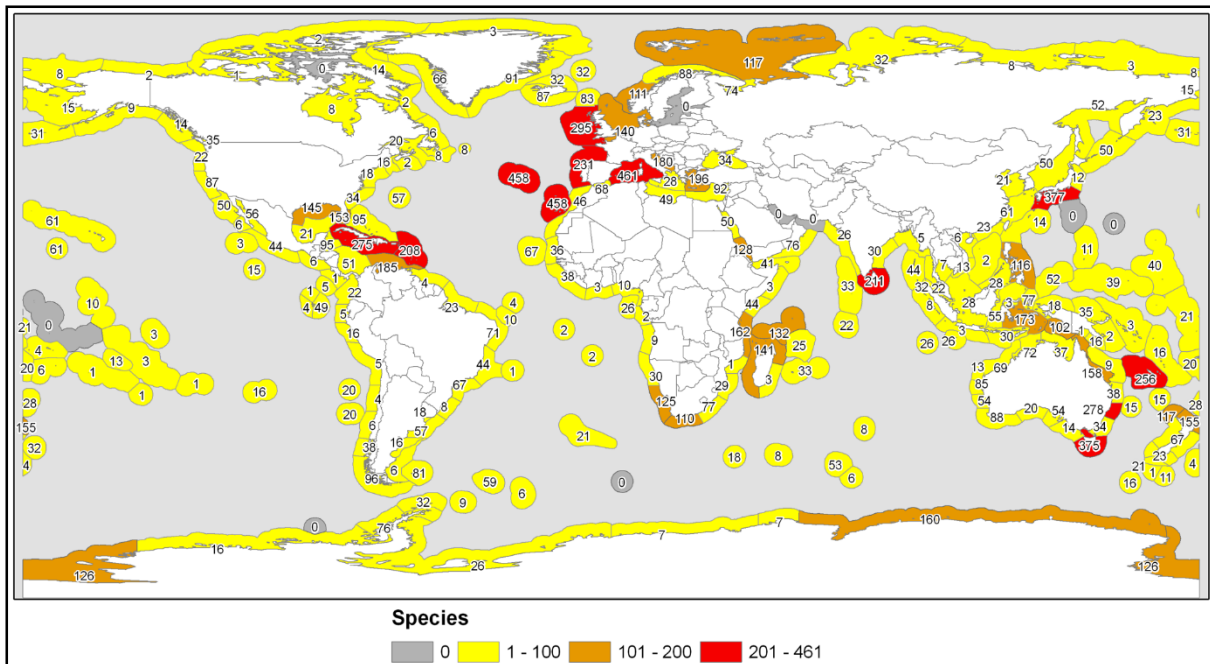


Figure I.1 : Diversité globale des éponges marines (Rob et al., 2012).

I-1.1 Généralités

Les défenses physiques et comportementales sont rares chez les éponges. Pourtant, étant des organismes sessiles et souvent mous, elles ont à faire face à un grand nombre de dangers, tels que la prédation, la compétition pour l'espace vital, l'épibiose ou encore l'infection par des microorganismes pathogènes (Se-Kwon, 2013). Si quelques-unes sont pourvues de spicules calcaires aiguisés et coupants qui les protègent des prédateurs, la majorité d'entre elles n'ont que les trous ou les crevasses ou elles vivent protégées. D'autres sont camouflées par les petits organismes qui les couvrent. Etant donné ces moyens de défense mécaniques et physiques rudimentaires au vu du nombre incroyable de métabolites secondaires isolés de ces éponges, on peut comprendre que la stratégie de défense biochimique est de loin la plus courante.

I-1.2 Biologie des éponges

I-1.2.1 Morphologie

Les éponges sont constituées de deux nappes cellulaires. La nappe cellulaire externe est appelée **ectoderme**, elle est composée de cellules aplaties : les **pinacocytes**. Entre les pinacocytes, on trouve les **ostioles** : cellules tubulaires encore appelées **porocytes**. La nappe cellulaire interne est appelée **endoderme** elle est composée de cellules flagellées : les **choanocytes**. Le flagelle est à son tour entouré d'une **collerette** qui est un organe filtrant. Entre

ces deux couches cellulaires se trouve la **mésoglée** dans laquelle évoluent librement les **ambioocytes**. Également dans la mésoglée se situent les spicules (les éléments du squelette de l'éponge) (Figure I.2). La très grande majorité des éponges se nourrissent en filtrant l'eau et certaines espèces peuvent filtrer l'équivalent de leur propre volume d'eau toutes les 5 secondes. Les mouvements d'eau sont assurés par les choanocytes grâce au mouvement de leur flagelle. Les particules nutritives sont piégées dans les microvillosités des choanocytes qui phagocytent la particule, comme chez les protozoaires. La digestion n'est cependant pas réalisée dans le choanocyte, qui ne dispose pas des enzymes nécessaires. Mais les éponges ont su développer d'autres modes de nutrition en particulier dans le cadre des échanges symbiotiques. Certaines espèces vivant à de grandes profondeurs sont carnivores, comme les Cladorhizidae. Elles possèdent de longs filaments hérissés de spicules qui piègent les petits animaux qui les traversent (Bautz et al., 2010 ; Manuel et al., 2003).

Les éponges les plus simples ont la forme d'un sac dont la paroi interne est tapissée de cellules à collerette. Il y a trois plans d'organisation :

- Le type **ascon** où les éponges possèdent une cavité interne (spongiocoele), qui s'ouvre sur l'extérieur par l'orifice exhalant de l'éponge (oscule) (Figure I.3.A).
- Le type **sycon** proche de l'ascon mais le sac présente, dans sa paroi latérale, des diverticules tubulaires où se trouvent les choanocytes (Figure I.3.C).
- Le type **leucon** : pour ce type d'éponges le spongiocoele a totalement disparu et l'éponge est constituée d'un ensemble de canaux (Figure I.3.E).

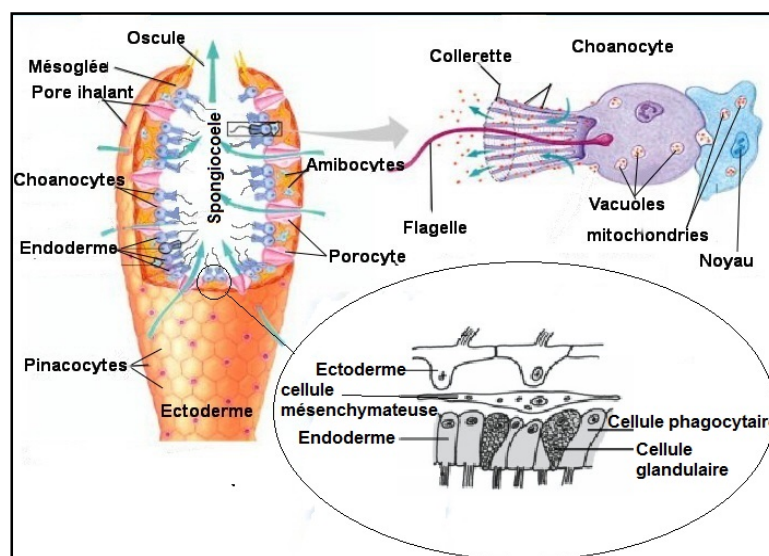


Figure I.2 : Schéma de la forme la plus simple d'une éponge (type ascon) (Quintin, 2001)

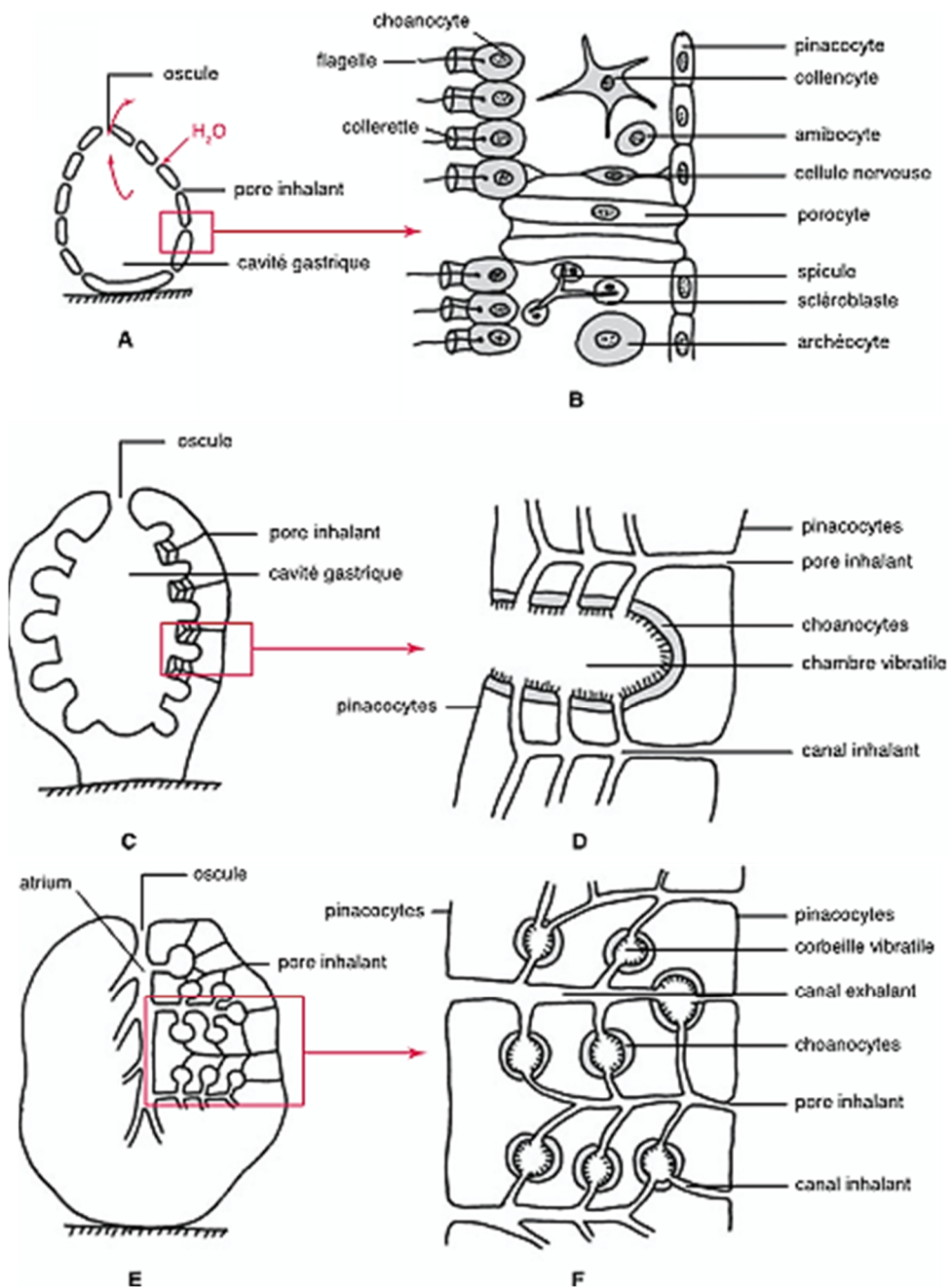


Figure I.3 : Typologie des éponges : A, de type ascon ; C, de type sycon ; E, de type leucon d'après (Bautz et al., 2010)

I-1.2.2 Fonctions vitales

La respiration, la nutrition et l'excrétion sont assurées par le courant d'eau créé par les flagelles des choanocytes. L'eau entre par les pores inhalants et ressort par l'oscule. Ce courant sert :

- A apporter les particules alimentaires qui sont phagocytées par les choanocytes.

- A renouveler le dioxygène au niveau des pinacocytes et des choanocytes.
- A éliminer les déchets non digestibles émis par les choanocytes, ainsi que les déchets du métabolisme cellulaire.

La circulation s'effectue sans appareil circulatoire. Le dioxygène et les nutriments passent de cellule à cellule grâce au mésenchyme (**Bautz et al., 2010**).

La locomotion et les fonctions de relation sont très peu développées puisque les éponges sont des animaux fixés qui ne se déplacent pas. Cependant les myocytes du mésenchyme permettent quelques contractions de la paroi du corps (les oscules peuvent s'ouvrir ou se fermer) (**Bautz et al., 2010**).

En ce qui concerne la reproduction, certaines éponges pratiquent la multiplication asexuée par bourgeonnement externe, ce qui aboutit, chez certaines espèces, à la formation de colonies. Les éponges calcaires se reproduisent aussi de façon sexuée grâce aux gonocytes du mésenchyme (**Bautz et al., 2010**).

I-1.3 Classification des éponges

On reconnaît trois classes, selon la nature et la spécificité des spicules :

a) Les éponges calcaires :

Les spicules sont composés de calcite. Elles peuvent être simples ou composées (*Figure I.4.A*). Il existe deux formes :

Homocœle : les choanocytes tapissent tout l'atrium.

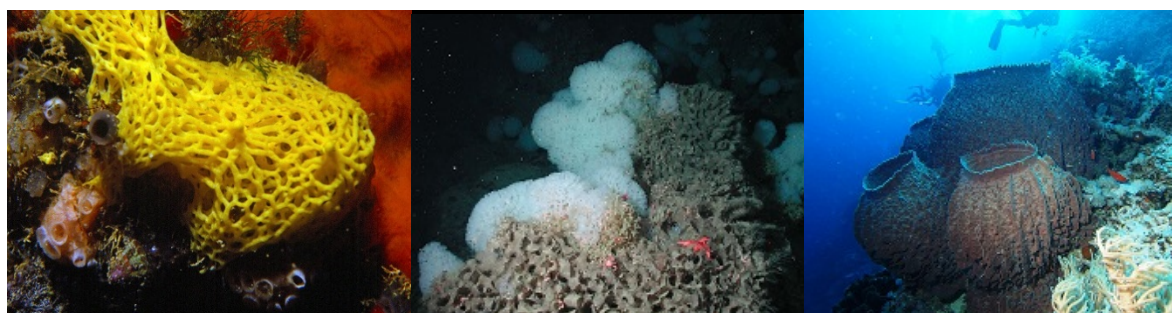
Hétérocœle : il y a formation de corbeilles vibratiles ou de diverticules tubulaires.

b) Les Hexactinellides :

(Ou triaxonides ; genre *Euplectella*). Les spicules sont composés de silice hydratée et donnent une architecture cohérente. Elles possèdent trois axes et parfois, peuvent atteindre une longueur de 60 centimètres (*Figure I.4.B*).

c) Les Démosponges :

Le squelette est formé de spongine pouvant être associée à quelques spicules siliceux (*Figure I.4.C*).



(A)

(B)

(C)

Figure I.4 : quelques exemples sur la classification des éponges marines, (a) éponge calcaire, (b) éponge hexactinellide, (c) démosponge (wikipedia, Porifera, Éponges, Spongiaire, 2016).

I-1.4 Symbiose éponge bactéries, un intérêt thérapeutique potentiel

L'association des bactéries avec les organismes marins est connue depuis longtemps. Parmi ces organismes, les éponges ont attiré le plus d'attention à cause de la diversité des composés bioactifs isolés qui sont probablement des métabolites secondaires de leurs communautés bactériennes associées (qui représentent jusqu'à 40% de la biomasse de l'éponge) (Friedrich et al., 2001 ; Taylor et al., 2007). En effet, de nombreuses éponges sont toxiques pour des prédateurs potentiels, ainsi les éponges marines constituent la source du plus grand nombre de métabolites bioactifs isolés et caractérisé (Panchanathan et al., 2013). Ces métabolites, parfois présents à fortes concentrations, jouent un rôle certain dans des fonctions biologiques telles que la communication, la régulation, et surtout la défense. Leurs activités biologiques, en particulier pharmaceutiques (anticancéreuses, antivirales, anti-inflammatoires, antifongiques, immunosuppressives, neuro-suppressives ou encore antibiotiques) ont ainsi été largement testées. Plusieurs revues mettent en évidence la diversité moléculaire dans les extraits d'éponges.

L'éponge *Craniella australiensis*, possède une grande diversité actinobactérienne, et affiche une grande activité antibactérienne (Li et Liu, 2006). Les actinomycètes du genre *salinispora* associés à l'éponge *P. clavata* produit plusieurs agents antibactériens, c'est en effet une source potentielle de l'antibiotique rifamycine B (Kim et al., 2006).

I-2 Les actinomycètes

Introduction

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses dont le développement donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe

qui leur a donné naissance (**Rastogi, et Kishore, 2006**). Les actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs du fait de leur morphologie fongicoïde, cependant, leur organisation cellulaire les range parmi les procaryotes. En effet, sur la base de la composition chimique de leur paroi cellulaire qui ne renferme ni cellulose ni chitine, leur matériel génétique dépourvu de noyau, leur sensibilité aux attaques des bactériophages et aux antibiotiques antibactériens, ces microorganismes sont maintenant reconnus, définitivement, comme de vraies bactéries et ils constituent l'un des plus grands embranchements bactériens connus. Les actinomycètes ont une diversité morphologique complexe et ils sont largement dispersés dans tous les écosystèmes terrestres et aquatiques. Ces bactéries sont d'une importance majeure pour la biotechnologie, la médecine et l'agriculture. En effet, leur métabolisme secondaire unique en son genre, produit environ les deux tiers de tous les antibiotiques d'origine naturelle actuellement utilisés (**Barka et al., 2016**).

I-2.1 Historique

La première période de l'histoire des actinomycètes correspond à la découverte de leur pathogénicité ; le plus ancien genre d'actinomycètes fut décrit par Cohn en 1875 et qu'il appela *Streptothrix*, Harz en 1877, isola l'agent responsable des actinomycoses du bétail et le nomma *Actinomyces bovis*.

La seconde période (1900-1940) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes avec la découverte en 1944 de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Belyagoubi, 2014**), dans cette période de nombreuses espèces ont été décrites.

Entre 1940 et 1970, une nouvelle période est attribuée au développement secondaires de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes en parallèle avec une meilleure compréhension de leur morphologie et leur intérêt pour la production de métabolites

Actuellement, l'essor des méthodes de génétique initiées par Hopwood et de génomique et le développement des méthodes de découverte des métabolites secondaires de ces microorganismes (**Belyagoubi, 2014**) ont révolutionné la classification des espèces.

I-2.2 Morphologie et caractéristiques des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positif, de haut coefficient de Chargaff (G+C) compris entre 60-70% (Mc Neil *et al.*, 1990 ; Sullivan et Chapman, 2010 ; Gao et Gupta, 2012). Ces microorganismes, tendent à croître lentement formant des filaments ramifiés ou hyphes de (0.5-1µm de diamètre avec une longueur allant de 1.5-50 µm).

On peut rencontrer en plus des filaments ramifiés, des bacilles et des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobacterium*.

Lorsqu'il croit sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former respectivement un mycélium aérien et un mycélium végétatif.

Dans certains cas, seul le mycélium végétatif (de substrat) est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*), en d'autres cas, il y a formation du mycélium végétatif puis du mycélium aérien mûri en conidies (exemple : *Streptomyces*)., tandis que dans le cas le plus extrême il y a formation uniquement du mycélium aérien, comme chez les *Sporichthya*.

Les filaments mycéliens peuvent produire des spores, soit uniques (exp: *Micromonospora*), soit en chaînes (exp : *Streptomyces*), soit groupées dans des sporanges (exp: *Actinoplan*).

I-2.3 Développement des actinomycètes

La plupart des Actinobactéries (les *streptomycètes* en particulier), sont des microorganismes saprophytes qui passent la majorité de leur cycle de vie sous forme de spores semi-dormantes, en particulier en carence de nutriments (Kroppenstedt, 1985). Ces microorganismes sont adaptés à un large éventail d'environnements écologiques. En effet, ils sont présents dans le sol, l'eau douce, l'eau salée et l'air et presque dans tous les écosystèmes terrestres et aquatiques où ils constituent une partie importante de la population microbienne.

La densité des populations des actinomycètes dépend de leur habitat et des conditions physico-chimiques qui prévalent (la température, le pH, l'humidité ... etc.).

Les actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important rassemble les formes oxydatives aérobies telles que les *Streptomyces* habitant surtout le sol. Le second est composé de bactéries fermentatives anaérobies, commensales des cavités naturelles de l'homme et des animaux illustrées par le genre type *Actinomyces* (Belyagoubi, 2014).

Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils se développent mieux à un pH compris entre 6 et 9, avec une croissance optimale autour de la neutralité. Ils sont généralement mésophiles (température optimale de croissance entre 25 et 30 ° C), d'autres sont thermophiles et tolèrent des températures allant de 50 à 60 ° C (Collins, 1994). En général, les actinomycètes sont des bactéries chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose et lignine). Mais il existe d'autres espèces chimioautotrophes utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le CO₂ comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990).

I-2.4 Cycle de vie

Le cycle de développement des actinomycètes débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium végétatif, formé d'hyphes non séptés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées (Figure I.5) (Belyagoubi, 2014 ; Barka et al., 2016).

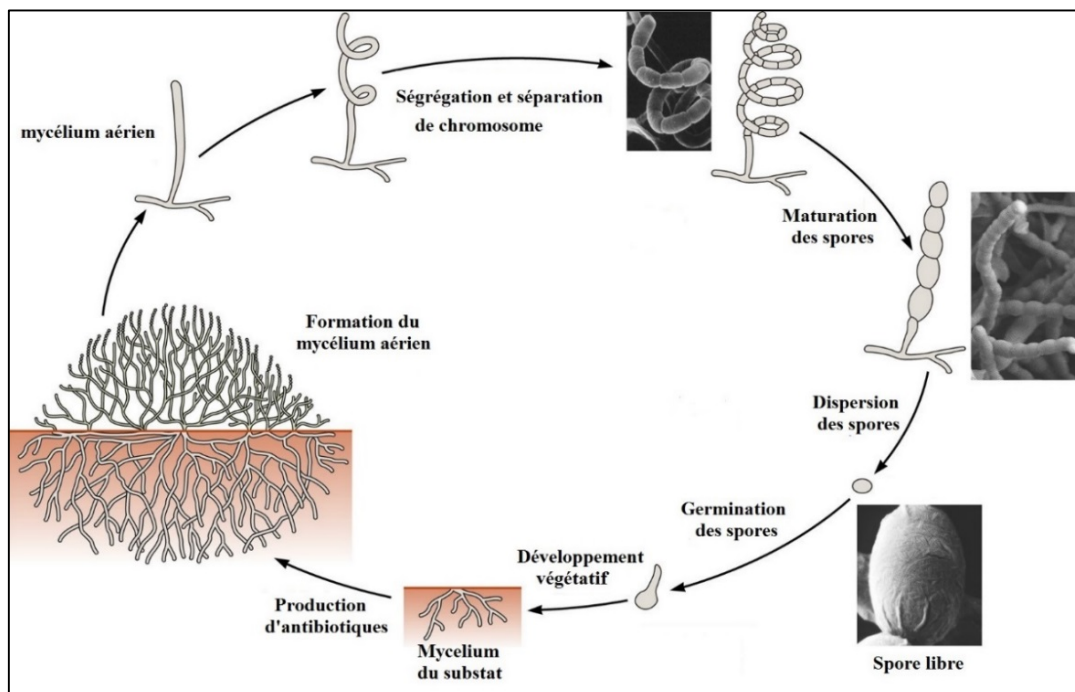


Figure I.5: Sporulation et cycle de vie de des actinomycètes d'après (Barka et al., 2016).

Tableau I.1: La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity et al., 2004).

Phylum Actinobacteria					
Classe Actinobacteria					
S/C	<i>Acidimicrobiae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
S/C Actinobacteridae					
Orders	<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Actinomycetales</i>		
Ordre Actinomycetales					
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Micrimonosporineae</i>	<i>Propionibacterineae</i>	
Famille	Familles		Famille		Familles
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>		Familles <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>		<i>Micromonosporineae</i> <i>Propionionibacteriaceae</i> <i>Nocardioideaceae</i>
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptosporangineae</i>	<i>Frankineae</i>	<i>Glicomycineae</i>	
Familles					
Familles		Familles		Famille	
<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>		<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>		<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i>	
Famille		Famille		Famille	
<i>Streptomycetaceae</i>		<i>Glycomycetaceae</i>		<i>Glycomycetaceae</i>	

S/C : sous-classe, S/O : sous-ordre.

I-2.5 Taxonomie des actinomycètes

Depuis leur découverte, la taxonomie des actinomycètes a largement évolué au cours de l'histoire. Elle est basée essentiellement sur des critères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques.

Actuellement, un outil pour l'identification des actinomycètes est l'analyse moléculaire (des acides nucléiques), le %CG donne une identification sur la famille, tandis que le séquençage de l'ADNr 16S permet de différencier nettement les genres. Selon la classification du « Taxonomic Outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology* », seconde édition 2004 (Garrity et al., 2004), un ouvrage de référence pour la taxonomie des

bactéries, les actinomycètes appartiennent au phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif, G+C % élevé) qui est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ». La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae* (Tableau I.1) qui contient 6 ordres : *Rubrobacteridae*, *Acidimicrobidae*, *Solirubrobacterales*, *Coriobacteridae*, *Bifidobacteriales*, *Actinobacteridae*.

I-2.6 Distribution des actinomycètes dans la nature

Bien que les premières souches d'actinomycètes aient été isolées de sources humaines et animales respectivement par Cohn en 1875 et Nocard en 1888, c'est le sol qui en est certainement le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes.

Les actinomycètes du sol sont présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur et nombre d'entre eux sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus. Ils produisent des substances spécifiques telles que la **géosmine** et le **2-méthyl isobornéol** qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al., 2003 ; Zaitlin et Watson, 2006**).

Les actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques : dans les lacs, les rivières et les ruisseaux, dans les mers et les océans (**Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**). En effet, certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins (**Singh et al., 2006 ; Imada et al., 2007**) dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur (**Khatabi et al., 2002**). Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins (**Weyland, 1981**).

I-2.7 Les actinomycètes indigènes du milieu marin

Les actinomycètes sont des membres actifs des communautés microbiennes marines. Ils forment, une population stable persistante dans divers écosystèmes marins. Les premières preuves étayant l'existence des actinomycètes marins provenaient de la description de *Rhodococcus nascene marino* (**Goodfellow et Williams, 1983**). Un soutien supplémentaire est venu de la découverte de certaines souches présentant des adaptations marines spécifiques

(Mincer et al., 2002). Ainsi, certaines souches semblent être métaboliquement actives dans les sédiments marins (Stach et al., 2004). Cependant, ces premiers résultats ne génèrent pas assez de motivations pour soutenir la recherche de nouveaux actinomycètes dans le milieu marin. Des données récentes ont montré que les actinomycètes indigènes marins existent bel et bien dans les océans. Ceux-ci comprennent des membres des genres : *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* et *Verrucosispora* (Bull et al., 2005 ; Jensen et al., 2005 ; Magarvey et al., 2004). Parmi ceux-ci, la découverte la plus excitante concerne un nouveau genre d'actinomycètes obligatoirement marin, *Salinispora* (anciennement connu sous le nom *Salinospora*), qu'on trouve souvent dans les sédiments marins (Colquhoun et al., 1998 ; Sahu et al., 2007). Des souches de *Salinispora* ont également été isolées à partir de l'éponge marine *Pseudoceratina clavata* (Okami et al., 1976), et dans certains échantillons de sédiments indiquant que ces bactéries sont métaboliquement actives dans le milieu naturel marin. Dans ce contexte, Grossart et al. (Hayakawa et Nonomura, 1987) ont montré que les actinomycètes représentent environ 10% des bactéries colonisant les agrégats organiques marins et que leur activité antagoniste pourrait être indispensable dans le maintien de leur présence. Plusieurs espèces d'actinomycètes ont été également isolés des éponges des Grandes barrières de corail *Rhopaloeides odorabile*, *Pseudoceratina clavata* et *Candidaspongia*, et des éponges méditerranéennes *Aplysina aerophoba* et *Theonella swinhoei* (Okami et al., 1976 ; Maldonado et al., 2005 ; Grossart et al., 2004 ; Alldrege et Silver, 1988). Jensen et al. (Jensen et al., 2005) ont isolées plusieurs espèces d'actinomycètes à partir d'échantillons d'algues et d'éponges. En particulier, les éponges peuvent être considérées comme des écosystèmes miniatures dans lesquelles différentes espèces de micro-organismes sont en concurrence pour les ressources. Par conséquent, les métabolites secondaires provenant des microorganismes symbiotiques ou commensaux de ces invertébrés marins pourraient ne pas être une fonction de l'écologie chimique de l'animal hôte lui-même, mais ils pourraient plutôt être des armes chimiques ou des agents de signalisation utilisés dans la lutte pour la croissance et la survie de ces micro-organismes.

I-2.8 Potentiel biotechnologique des actinomycètes marins

Les actinomycètes marins ont un potentiel biotechnologique remarquable. Leurs métabolites secondaires sont une source potentielle pour de nouvelles molécules bioactives. En

effet, depuis la découverte de la streptomycine isolée des *Streptomyces* et *Streptoverticillium* (**Atlas of Actinomycetes, The Society for Actinomycetes, Japan, 1997**), plusieurs antibiotiques, Antivirus, anti cancer, herbicides, pesticides, enzymes et substances immunosuppressives, immunostimulantes et antiparasites uniques ont été isolées de ces microorganismes. Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques on peut citer : les bêta-lactamines, les aminoglycosides, les glycopeptides, les anthracyclines, les tetracyclines...etc (**Panchanathan et al., 2013**).

A ce jour, et malgré l'immense progrès de la biologie moléculaire et des méthodes de synthèse biochimique, plus de 45% des métabolites bioactifs sont naturellement issus des actinomycètes (**Sibanda et al., 2010**). Le tableau 2 donne quelques exemples des métabolites secondaires isolés à partir des actinomycètes marins dans un laps de temps relativement court (de 2003 à 2005).

Tableau I.2: Métabolites secondaires produites par des actinomycètes marin découvertes dans la période 2003-2005 d'après (**Kin, 2006**).

Substance	Source	Activité
Abyssomicines	<i>Verrucosipora</i> sp.	antibactérien
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anti-cancer
Bonactine	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibactérien; antifongique
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-cancer
Chandrananimycines	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibactérien; anti-cancer; antifongique
Chinikomycines	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-cancer
Chloro-dihydroquinones	<i>Novel actinomycete</i>	Antibactérien; anti-cancer
Diazepinomicine (ECO-4601)	<i>Micromonosproa</i> sp.	Antibactérien; anti-cancer; anti-inflammatoire
Himalomycines	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibactérien
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	Anti-cancer
Lajollamycine	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibactérien
Marinomycines	' <i>Marinispora</i> '	Antibactérien; anti-cancer
Mechercharmycines	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anti-cancer
MKN-349A	<i>Nocardiosis</i> sp.	Activité biologique inconnue

Matériel et Méthodes

II-1 Collecte des échantillons

Dans un effort de gagner une meilleure compréhension de la diversité des côtes algériennes en actinomycètes et dans le but de les isoler à partir du milieu marin, des échantillons de l'éponge marine *Chondrosia reniformis* ont été récoltés par plongée sous-marine à une profondeur de 10 à 15 m au niveau de la côte d'Oran (située à l'ouest algérien). La récolte a eu lieu durant le mois de Février (2016).



Figure II.1 : Carte montrant le site d'échantillonnage (Ain El-Turk côte d'Oran) (Google maps).



Figure II.2 : l'éponge *Chondrosia reniformis*.

Les échantillons de l'éponge prélevés en utilisant des lames de rasoir ont été placés dans des sacs en plastiques stériles afin d'éviter tout contact avec l'air, gardés sur de la glace dans de l'eau de mer fraîche et plus tard transportés au laboratoire où ils ont été conservés à 4°C.

Les éponges marines échantillonnées ont été identifiées par le spécialiste dans le domaine Mr Frédéric Azémar, Ingénieur en écologie environnementale du laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), université Paul Sabatier-Toulouse III.

II-2 Isolement des actinomycètes

II-2.1 Milieux de culture utilisés

Dans le but d'accroître les chances d'isoler un maximum de la flore actinomycétale associée à l'éponge, six milieux de culture recommandés pour l'isolement des actinomycètes ont été utilisés :

- Milieu M₁ (Zhang *et al.*, 2006 ; Abdelmohsen *et al.*, 2010).
- Milieu *International Streptomyces Project 2* (ISP₂) (Messaoudi *et al.*, 2015 ; Abdelmohsen *et al.*, 2010).
- Milieu Sponge-Agar (SA) (Selvin *et al.*, 2004).
- Milieu Caséine Amidon Agar (CAA) (Zhang *et al.*, 2012 ; Poosarla *et al.*, 2013).
- Milieu amidon extrait de levure peptone eau de mer (SYP-SW) (Kennedy *et al.*, 2009).
- Milieu M₄ (Mincer *et al.*, 2002).

La composition de chaque milieu de culture est donnée dans l'**annexe**.

Tous les milieux de culture sont préparés à base d'eau de mer et le pH de chaque milieu est ajusté à raison de 7.4 ± 0.2 avant de les stériliser.

Afin d'inhiber la croissance des bactéries et des champignons, nous avons rajouté à tous les milieux utilisés dans cette étude 1ml/l de l'antifongique Serafine et 1ml/l de polymyxine B.

II-2.1.1 Préparation de la solution mère

Les échantillons d'éponges ont été dégelés à la température ambiante avant de les rincer avec de l'eau de mer stérile, par la suite leurs surfaces ont été décontaminées avec de l'alcool à 70 %. Les échantillons d'éponges ont ensuite été excisés en petits morceaux d'environ 1 cm³ en utilisant un bistouri stérile.

La préparation de la solution mère consiste à piler 10g d'éponges découpées en morceaux avec 90 ml d'eau de mer stérile dans un mortier préalablement stérilisé. La solution obtenue constitue la dilution 10⁻¹.

II-2.1.2 Préparation des dilutions décimales et ensemencement

Après homogénéisation au vortex, une série de dilutions (de 10⁻² jusqu'à 10⁻¹⁰) est effectuée à partir de la solution mère.

Un volume de 1ml de chaque dilution estensemencé par inondation à la surface des milieux de culture préalablement coulés dans des boîtes de pétri, avec deux répétitions pour chaque dilution.

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 30°C pendant une période de 14 à 21 jours et qui peut aller jusqu'à 90 jours dans certains cas. Les boîtes sont examinées régulièrement (**Ballav *et al.*, 2015**).

II-3 Observation microscopique

Les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique grossissements ($\times 10$, $\times 40$, $\times 100$) en utilisant la coloration simple au bleu de méthylène (**Kalyani *et al.*, 2012**).

II-4 Purification des isolats

Les colonies d'actinomycètes sélectionnés sont purifiées par repiquages successifs pour obtenir des cultures pures. À l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève un inoculum à partir des colonies du milieu d'isolement, qui sera ensuiteensemencé par épuisement sur le même milieu que celui d'isolement sous forme de stries. Cette dernière opération est répétée jusqu'à l'obtention de cultures pures. La pureté des isolats est contrôlée par des examens microscopiques directs, après chaque repiquage (**Boussaber *et al.*, 2012**).

NB : Il est recommandé d'éviter l'excès de repiquage, qui peut être à l'origine des mutations des isolats obtenus (**Guiraud, 2003**).

II-5 Conservation des isolats

Les isolats obtenus sont conservés pour être utilisés dans des tests ultérieurs. La conservation est réalisée comme suit :

Les isolats sontensemencés dans des tubes à essai sur milieu gélosé incliné puis incubés à 30 °C pendant 14 à 21 jours. Les cultures obtenues sont conservées à une température de 4 à 6 °C (**Ballav *et al.*, 2015**).

II-6 Mise en évidence de l'activité antibactérienne

II-6.1 Préparation de l'inoculum

Les souches de référence utilisées pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne sont toutes des souches **ATCC** issues du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire Biomédical et à l'Environnement (**LAMAABE**) (Tlemcen).

Pour cela, nous avons utilisé sept bactéries, dont quatre à Gram positifs : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152) et *Micrococcus luteus* (ATCC), trois à Gram négatifs : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC) et une levure *Candida albicans* (ATCC 10231).

Les suspensions sont préparées à partir d'une culture jeune de 18 heures de chaque bactérie test ensemencée dans des tubes contenant le milieu Mueller-Hinton liquide.

Les densités optiques de chaque suspension est ajustée à l'aide d'un densitomètre réglé à 580 nm de manière à obtenir des absorbances entre 0.08 à 0.1 ce qui correspond à une charge cellulaire comprise entre 10^6 à 10^8 cellules/ml. Une fois préparées, les suspensions sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile sur milieu Mueller-Hinton gélosé.

II-6.2 Technique des cylindres agar

Les isolats d'actinomycètes, sont d'abord ensemencés en stries serrées à la surface du milieu gélosé 5333 préparé à base d'eau de mer et incubés à la température de 30 °C pendant 14 jours.

Des cylindres de 6mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries tests.

Les boîtes de pétri sont ensuite placées à 4°C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes et après elles sont incubées à 37°C pendant 24h. Les zones d'inhibition formées autour des cylindres sont alors mesurées (Xiong *et al.*, 2015).

II-7 La dépendance des isolats vis-à-vis de l'eau de mer

Afin de mettre en évidence leur dépendance vis-à-vis de l'eau de mer, tous les isolats d'actinomycètes obtenus sont ensemencés sur deux milieux ISP2 préalablement préparés à base d'eau distillée, l'un d'eux contenant 7% de NaCl et l'autre à 0% de NaCl.

Les cultures sont incubées pendant 14 jours à 30°C. Après 14 jours, on compare les résultats de la croissance dans les deux concentrations de NaCl.

II-8 Pré-identification

L'identification des actinomycètes est basée sur des critères morphologiques, chimiotaxonomiques et génomiques. Dans ce travail, on s'est basé sur les caractéristiques morphologiques pour se rapprocher au genre correspondant. Pour cela, nous avons utilisé la technique de culture sur lamelle qui consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé approprié, de manière à former un angle de 45° avec la surface de la gélose, une goutte d'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu. Après 14 jours

d'incubation à 30°C, les lamelles sont retirées puis déposées sur une lame et observées au microscope Grossissement (x100). **(Ballav *et al.*, 2015).**

Résultats et Discussion

III-1 Résultats d'isolement des actinomycètes

À ce jour, on connaît très peu sur le benthos et la biodiversité marine de la méditerranée. Pour l'essentiel en raison de la ponctualité et de la dispersion des travaux qui y ont été menés. De ce fait, des études sérieuses sur les potentialités de valorisation des organismes marins en tant que source de métabolites bioactifs seront donc les bienvenus. Ceci nous a incité d'orienter ce travail vers la diversité des actinomycètes du milieu marin méditerranéen. Plus particulièrement, vers les actinomycètes associés à l'éponge marine *Chondrosia reniformis* issue des côtes ouest algériennes (la côte d'Oran).

Dans cette optique, et afin de réussir l'isolement de la plupart de la flore actinomycétale présente dans les échantillons, une stratégie de criblage orienté en employant six milieux d'isolement (M1, ISP2, SA, CAA, SYP-SW, M4) additionnés d'antibiotiques et d'antifongiques a été adoptée. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence d'actinomycètes dans l'espèce étudiée. En effet, après une période d'incubation d'au moins 14 jours, 20 colonies d'actinomycètes sont apparues sur quatre parmi les six milieux d'isolement utilisés (ISP2, SA, CAA, SYP-SW). Ces colonies sont reconnues par leur aspect macroscopique (colonies dures incrustées dans la gélose) et microscopique (aspect filamenteux ramifié). Les résultats indiquent que le milieu le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes est le milieu SA. En effet, le plus grand nombre d'isolats a été obtenu à partir de ce milieu de culture avec 7 colonies. Cinq colonies ont été isolées à partir des milieux ISP2 et SW et trois autres colonies à partir du milieu CAA. Aucune colonie n'a été isolée à partir des deux milieux M1 et M4. La Figure représente le nombre des isolats d'actinomycètes en fonction des milieux de culture.

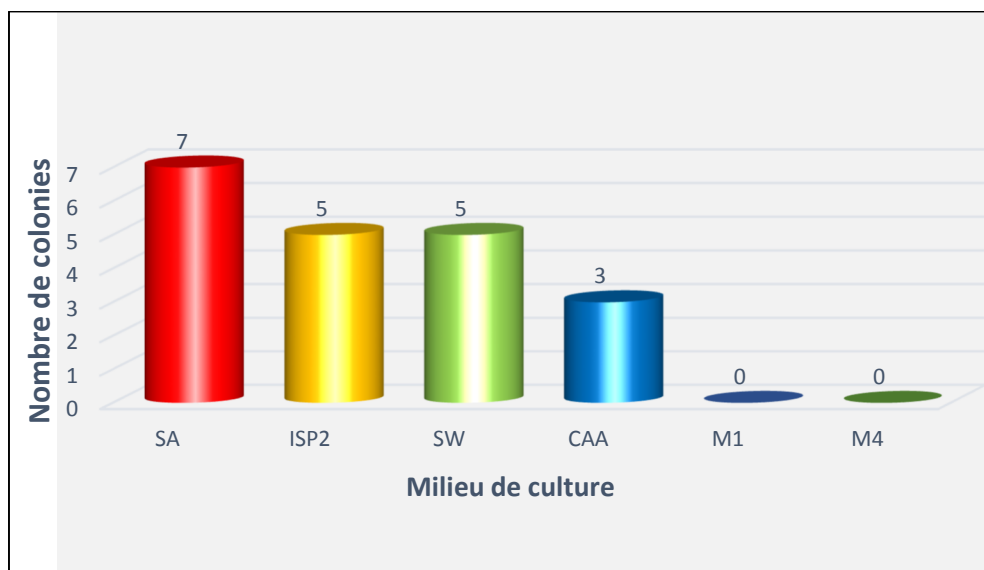


Figure III.1: Nombre de colonies d'actinomycètes isolés à partir de chaque milieu de culture.

III-2 Discussion

L'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose problème. En effet, la plupart des substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide, ce qui complique la tâche d'isolement des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (Williams *et al.*, 1982 ; Crawford *et al.*, 1993). Le choix de plusieurs milieux de culture et la stratégie de criblage orienté par l'addition de substances inhibitrices stoppant la croissance des germes envahisseurs est en parfait accord avec celles de plusieurs chercheurs (Hames-Kocabas *et al.*, 2012 ; Cheng *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Montalvo *et al.*, 2005 ; Mincer *et al.*, 2002 ; Kennedy *et al.*, 2009). D'après Cross (1982), cette stratégie augmente les chances de réussir un meilleur isolement de la flore actinomycétale.

L'histogramme présenté dans la Figure montre que la majorité des colonies sont isolées à partir du milieu SA. En effet, parmi les 20 colonies, 7 ont été isolées de ce milieu ce qui représente environ 35% de l'ensemble des colonies. Suivi des deux milieux ISP2 et SYP-SW avec 5 colonies par milieu soit 25% et du milieu CAA avec 3 colonies soit 15%. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus par Gandhimathi *et al.* (2008) qui ont prouvé que le milieu SA est le plus approprié pour l'isolement des actinomycètes endosymbiotiques des éponges *Fasciospongia cavernosa*, *Spongia officinalis*, *Callyspongia diffusa*, *Spirastrella inconstans* et *Tedania anhelans*.

L'efficacité des trois milieux (SA, ISP2 et SYP-SW) est très probablement due à leur richesse en éléments nutritifs. En effet, le milieu SA contient de la raffinose comme source de carbone, de l'histidine comme source d'azote et un ensemble de sels minéraux nécessaires pour la croissance des actinomycètes marins. De plus, ce milieu a été additionné d'extraits de l'éponge. Le milieu caséine amidon agar (CAA) additionné de 2g de NaCl s'est montré d'une efficacité modérée, probablement parce que la présence de l'amidon et de la caséine stimule la croissance préférentielle des actinomycètes aux autres microorganismes. Plusieurs travaux confirment l'efficacité de l'isolement des actinomycètes à partir du milieu CAA Gayathri *et al.* (2011) ont utilisé ce milieu pour isoler 20 colonies d'actinomycètes à partir d'un sol salin.

Les deux milieux M1 et M4 s'affichent complètement inefficaces. Or, le milieu M4 contient la chitine qui est une macromolécule qui nécessite des enzymes spécifiques pour la dégrader (Beier et Bertilsson, 2013). En ce qui concerne le milieu M1, dont la composition favorise la croissance de n'importe quel microorganisme, on a remarqué qu'à chaque fois, il y a formation d'un tapis microbien, ce qui inhibe la croissance des actinomycètes.

III-3 Diversité morphologique des actinomycètes isolés

Les colonies obtenues après repiquage sur le même milieu d'isolement ne présentent pas le même aspect macroscopique. Elles sont de tailles et de couleurs variées. Elles affichent une diversité morphologique remarquable (bossues, aplaties...etc.) et sont toutes incrustées dans la gélose. La plupart possèdent un mycélium végétatif et un mycélium aérien de différentes couleurs (blanc, beige, gris...etc.), certaines montrent seulement un mycélium de substrat. D'autres, élaborent des pigments (de couleur rouge) qui diffusent dans le milieu.

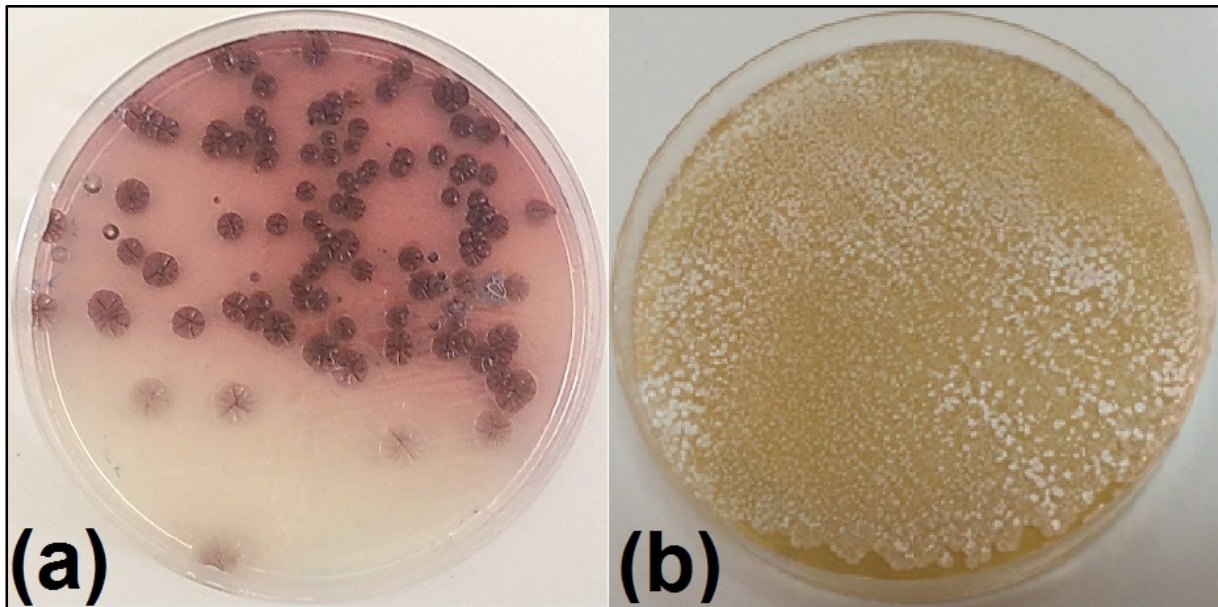


Figure III.2 : Observation macroscopique des isolats (a) : *LAM₁SW₄V₁₁*, (b) : *LAM₁SW₄V₁₂*.

L'aspect microscopique indique que les isolats obtenus ont un aspect filamenteux, ramifié, parfois fragmenté.

Sur la base des observations microscopiques, quatre groupes sont observés :

Groupe 1 : Le premier groupe : formé par l'isolat *LAM₁SW₃V₁₃* qui possède un mycélium aérien portant des sporanges de forme ovoïde. Selon *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1993)*, la morphologie caractéristique de cet isolat ressemble à celle des deux genres *Ampullariella* et *Pilimelia*.

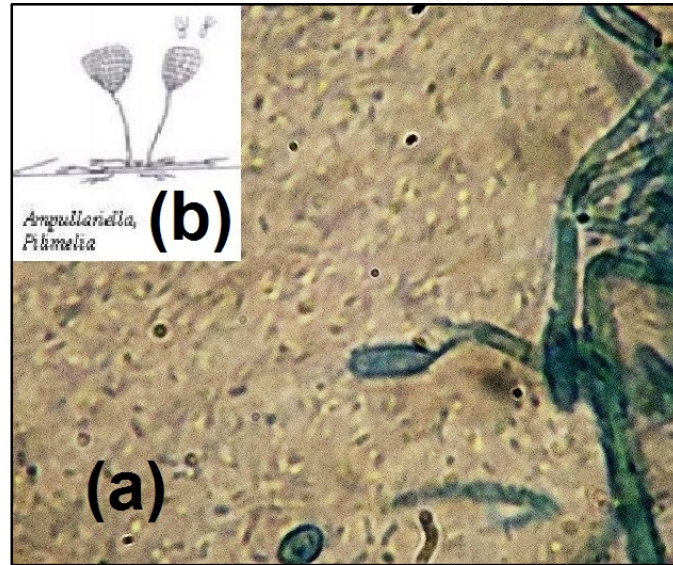


Figure III-3 : (a) : Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SW₃V₁₃ (x100)
 (b) : Le genre le plus probable correspondant (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*).

Groupe 2 : Le deuxième groupe : formé par des isolats possédant des chaînes de spores enroulées à l'extrémité. Ces isolats montrent des traits typiques liés aux genres *Streptoalloteichus* et *Actinomadura* (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*)

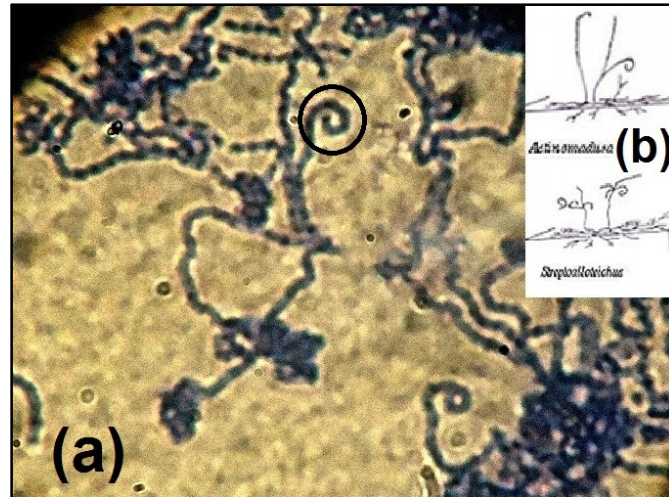


Figure III-4 : (a) : Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁C₄V₁ (x100)
 (b) : Les genres le plus probable correspondant (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*).

Dans ce groupe on trouve les isolats : LAM₁C₄V₁, LAM₁SW₃V₁₀ et LAM₁SW₄V₁₂ qui se caractérisent par un mycélium aérien dressant des chaînes de spores de taille moyenne (20 à 30 spores).

L'isolat LAM₁SA₆M₇ formant de longues chaînes de spores (40 à 50 spores).

Groupe 3 : Le troisième groupe formé par des isolats qui possèdent des chaînes de spores spiralées et longues : LAM₁SAV₄, LAM₁I₇V₉. La morphologie de ce groupe est très proche à celle du genre *Streptomyces*.

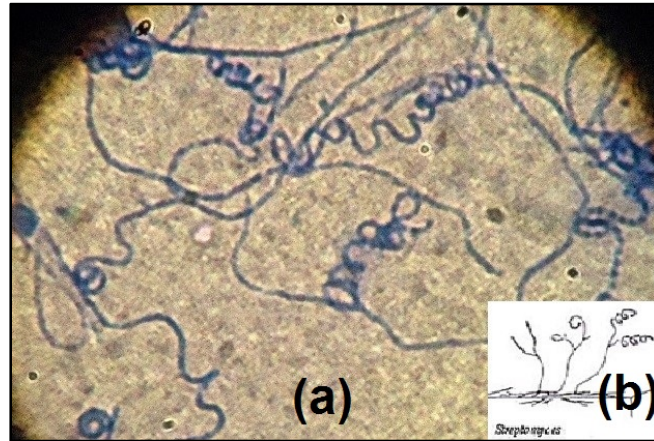


Figure 0-5 : (a) : Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SAV₄ (x100) (b) : Le genre le plus probable correspondant (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*).

Groupe 4 : Le quatrième groupe formant des chaînes de spores ramifiées : LAM₁SW₁V₅, LAM₁I₇V₆, LAM₁SA₂V₁₆. Les isolats appartenant à ce groupe ressemblent au genre *Streptomyces*.

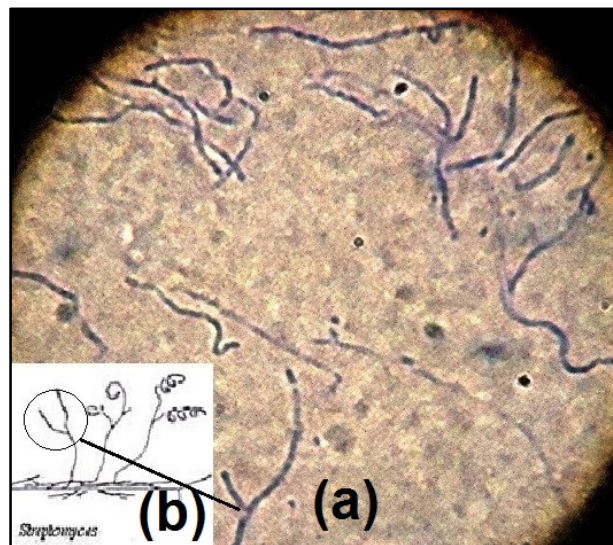


Figure III-6 : (a) : Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SW₁V₅ (x100) (b) : Le genre le plus probable correspondant (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*).

Groupe 5 : formé par l'isolat LAM₁SA₆M₇ qui possède à la fois une chaîne de spores et un sporange. Les actinomycètes du genre *Kibdelosporangium* ont la même caractéristique morphologique que cet isolat.

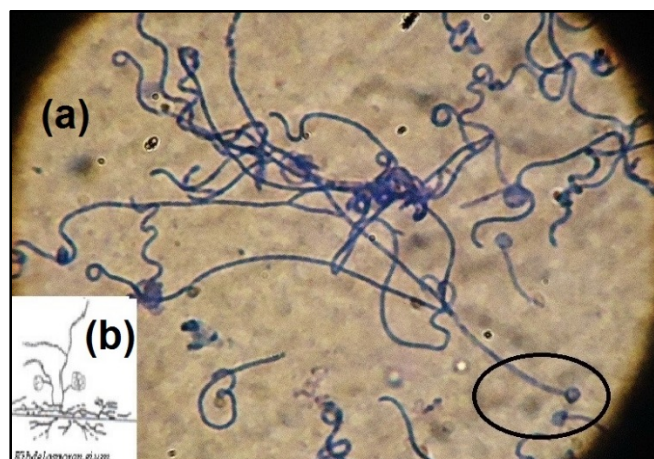


Figure III-7 : (a) : Observation microscopique du mycélium aérien de l'isolat LAM₁SA₆M₇ (x100)
(b) : Le genre le plus probable correspondant (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1993*).

III-4 Résultats de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes a été testée par la technique des cylindres d'agar sur sept bactéries dont quatre sont à Gram positif et trois à Gram négatif, et sur une levure, afin de sélectionner les colonies les plus productrices de substances antimicrobiennes. Les résultats obtenus figurent dans le **Tableau III.1**.

Tableau III.1: Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats d'actinomycètes vis-à-vis des souches testées.

Isolats d'actinomycètes	L. monocytogenes		S. aureus		E. coli		K. pneumoniae		M. luteus		B. cereus		P. aeruginosa		C. albicans	
LAM ₁ C ₄ V ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM ₁ I ₇ V ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM ₁ SAV ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11.5
LAM ₁ SW ₁ V ₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	14
LAM ₁ I ₇ V ₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM ₁ SA ₆ M ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-
LAM ₁ I ₆ V ₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM ₁ I ₇ V ₉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	11	12
LAM ₁ SW ₃ V ₁₀	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	11	11
LAM ₁ SW ₄ V ₁₂	14	12	19	18.5	14	13	16	17	15.5	16	13	13	11	11	19	21
LAM ₁ SA ₆ M ₁₄	-	-	7.5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7
LAM ₁ SA V ₁₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM ₁ SW ₆ V ₁₈	-	-	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	8
LAM ₁ SA ₆ V ₂₁	-	-	8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

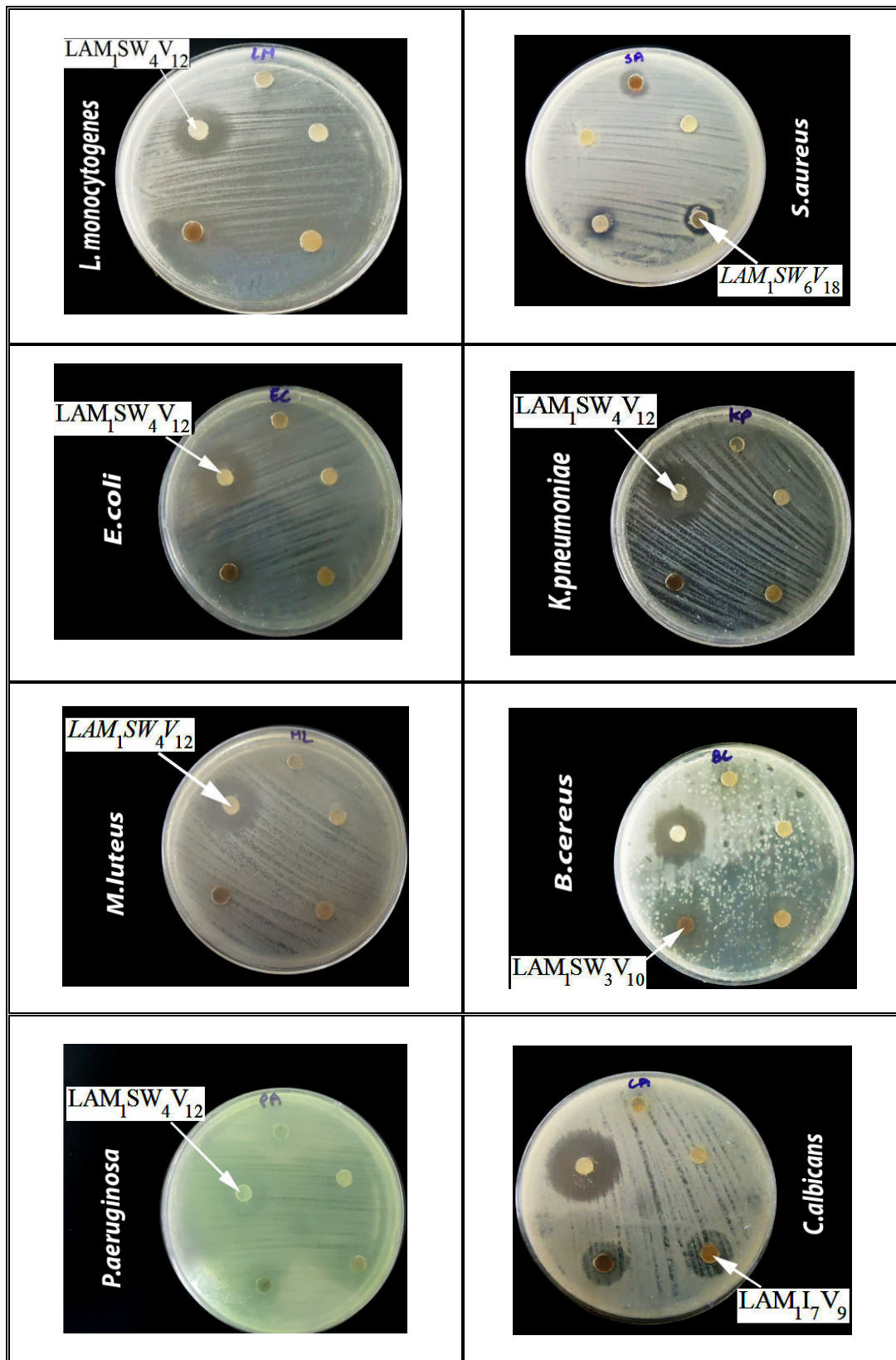


Figure III-8 : activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes.

Sur les 14 colonies d'actinomycètes, 9 isolats soit (64%) ont montré une activité antibactérienne contre au moins un microorganisme testé (bactérie ou levure). En revanche, 5 isolats soit 36% n'ont révélé aucune activité antibactérienne détectée.

Les isolats LAM₁SAV₄ et LAM₁SW₁V₅ sont actifs uniquement sur la levure *Candida albicans* (activité antifongique), alors que les deux isolats LAM₁SA₆M₇ et LAM₁SA₆V₂₁ sont exclusivement actifs sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* respectivement.

Sept isolats sont actifs sur la levure *Candida albicans*, LAM₁SAV₄, LAM₁SW₁V₅, LAM₁I₇V₉, LAM₁SW₃V₁₀, LAM₁SW₄V₁₂, LAM₁SA₆M₁₄, LAM₁SW₆V₁₈.

L'isolat LAM₁SW₄V₁₂ est actif sur l'ensemble des microorganismes testés (bactéries et levure).

On peut donc résumer les résultats du tableau précédant comme suit :

7 isolat sur 14 soit 50% affichent une activité antifongique.

8 isolats sur 14 soit 57.14% agissent contre les bactéries à coloration de Gram positif.

6 isolats sur 14 soit 42.86% agissent contre les bactéries à coloration de Gram négatif.

Un isolat sur 14 soit 7.14% agit à la fois contre des bactéries à coloration de Gram positifs et négatifs.

La plus grande zone d'inhibition est obtenue par l'isolat LAM₁SW₄V₁₂ avec une taille de 21 mm de diamètre contre la levure *Candida albicans* suivi par l'isolat LAM₁SW₁V₅ contre la même levure avec une zone d'inhibition de 14mm de diamètre.

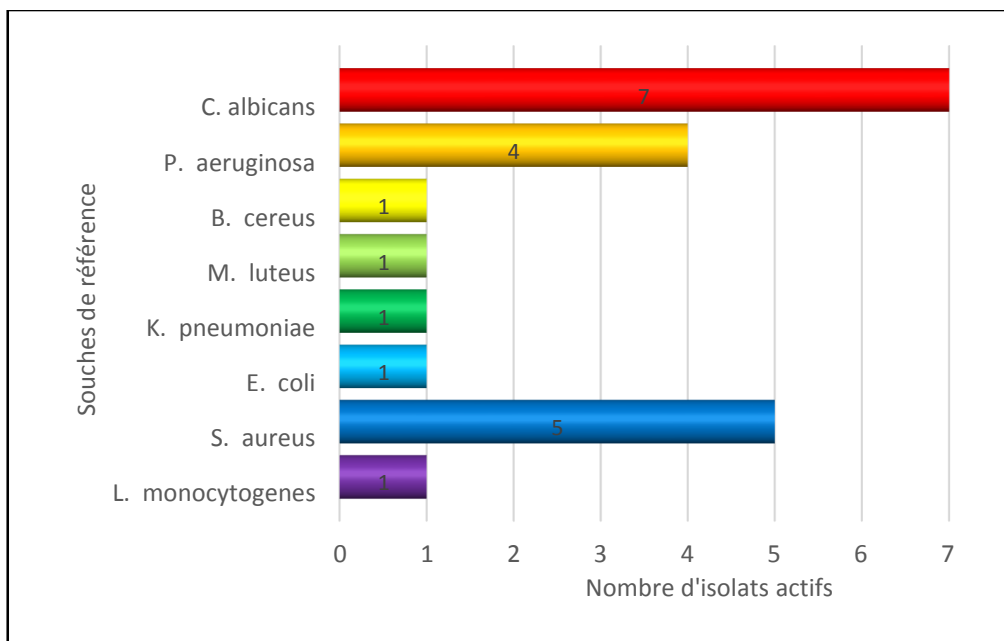


Figure III.9 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis des colonies d'actinomycètes isolées

III-5 Discussion

L'activité antagoniste remarquable de l'isolat LAM₁SW₄V₁₂ contre tous les microorganismes testés (bactéries et levure) confirme que les actinomycètes des écosystèmes marins sont une source potentielle importante de métabolites bioactifs.

La majorité des colonies d'actinomycètes isolées à partir de l'éponge marine *Chondrosia reniformis* ont présenté une activité antagoniste contre au moins un des pathogènes humains testés. Le pouvoir antimicrobien des isolats de cette éponge suggère que l'hôte est une niche d'une diversité microbienne et d'un potentiel biotechnologique inexplorée. Une simple revue de la bibliographie montre que les actinomycètes associés aux éponges sont irréfutablement une source potentielle de plusieurs substances antimicrobiennes (**Gandhimathi et al, 2008 ; Locci, 1989 ; Saadown et Garaibeh ,2003**). **Ozlem et al (2014)** ont mis en évidence l'activité antimicrobienne de 15 isolats d'actinomycètes associés à des espèces d'éponges issues de l'Est de la méditerranée (côte turquoise) dont le genre *Chondrosia reniformis*. Leurs travaux confirment que ces isolats sont actifs contre des bactéries pathogènes résistantes à la Methicilline (*Staphylococcus aureus*) et à la Vancomycine (*Enterococcus faecium*).

Cheng et al (2015) ont isolé pour la première fois 5 genres d'actinomycètes (*Geodermatophilus*, *Microlunatus*, *Actinomycetospora*, *Modestobacter* et *Promicromonospora*) à partir de 12 espèces d'éponges collectées des côtes méditerranéennes Grecques. Parmi les souches isolées, certaines affichent une activité contre *Trypanosoma brucei brucei* TC221. Deux autres isolats, à savoir *Streptomyces* et *Micromonospora* affichent une remarquable richesse de produits naturels non identifiés.

Il est important de constater que l'activité des isolats sur les bactéries à Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lotus*, *Bacillus cereus*) est plus importante que sur les bactéries à Gram négatif, cela s'explique par la morphologie différente de ces deux types de bactéries. En effet, les bactéries à coloration de Gram négatif ont une paroi imperméable au passage des solutés lipophiles à cause de leur contenance en sucres de nature lipopolysaccharidiques (LPS) contrairement aux bactéries à coloration de Gram positif qui ont des parois composées uniquement de peptidoglycanes qui n'agissent pas aussi efficacement comme barrière (**Sateesh et al, 2011**).

III-6 Résultats de la dépendance vis-à-vis de l'eau de mer

L'adaptation des isolats d'actinomycètes au milieu marin a été testée et les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau III.2**.

Tableau III.2 : Résultats de la dépendance vis-à-vis de l'eau de mer

Isolats	ISP2 avec 0% de NaCl	ISP2 avec 7% de NaCl
LAM ₁ SW ₄ V ₁₁	+	+
LAM ₁ I ₇ V ₃	+	+
LAM ₁ SWV ₅	+	+
LAM ₁ S ₄ V ₄	+	+
LAM ₁ I ₆ V ₈	+	+
LAM ₁ C ₄ V ₁	+	+
LAM ₁ SW ₃ V ₁₀	+	-
LAM ₁ SW ₄ V ₁₂	+	+
LAM ₁ I ₇ V ₆	+	+
LAM ₁ I ₇ V ₉	+	+

III-7 Discussion

A l'exception de l'isolat LAM₁SW₃V₁₀, on remarque que l'ensemble des isolats poussent bel et bien en présence et l'absence de NaCl pour des concentrations de 0 et 7 %. Ce résultat indique en premier lieu que les souches d'actinomycètes étudiées sont halotolérantes et en second lieu qu'elles sont adaptées au milieu marin mais ne sont pas marines obligatoires.

Les résultats obtenus dans cette étude corroborent les trouvailles de **Bukhari et al (2013)** qui ont étudié l'effet des conditions de culture (type du milieu d'isolement, pH, température, temps d'incubation et degré de salinité du milieu) sur des actinomycètes isolés à partir d'éponges marines. Leurs résultats ont montré qu'il y a eu croissance à différentes concentrations de sels marins allant de 0% jusqu'à 100%.

En ce qui concerne l'isolat LAM₁SW₃V₁₀, on constate qu'il pousse à 0% de NaCl tandis qu'il n'y pas eu croissance à une concentration de 7%. La littérature sur la composition de l'eau de mer méditerranéenne (**Klein et al., 1999**) indique qu'elle contient 21.4g/l de chlorures et 11.6 g/l de sodium. On remarque que cette concentration est inférieure à celle utilisée dans notre étude (70g/l). Donc on suppose que cette concentration a un effet inhibiteur sur la croissance de l'isolat LAM₁SW₃V₁₀.

III-8 Pré-identification de la souche sélectionnée

L'aspect microscopique de l'isolat LAM₁SW₄V₁₂ montre qu'il est formé par un mycélium aérien qui dresse des spores allongées formant des chaînes enroulées à l'extrémité de taille moyenne allant de 20 à 25 spores. Le mycélium de substrat est stable (non fragmenté) et qui ne porte pas de spores, ni de sporanges.

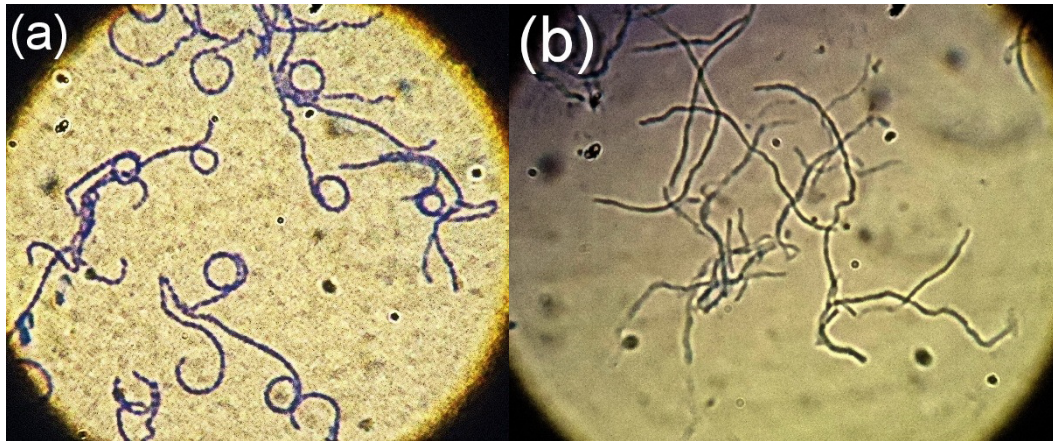


Figure III.10 : Aspect microscopique du mycélium aérien (a), et du mycélium de substrat (b) de l'isolat LAM1SW4V12.

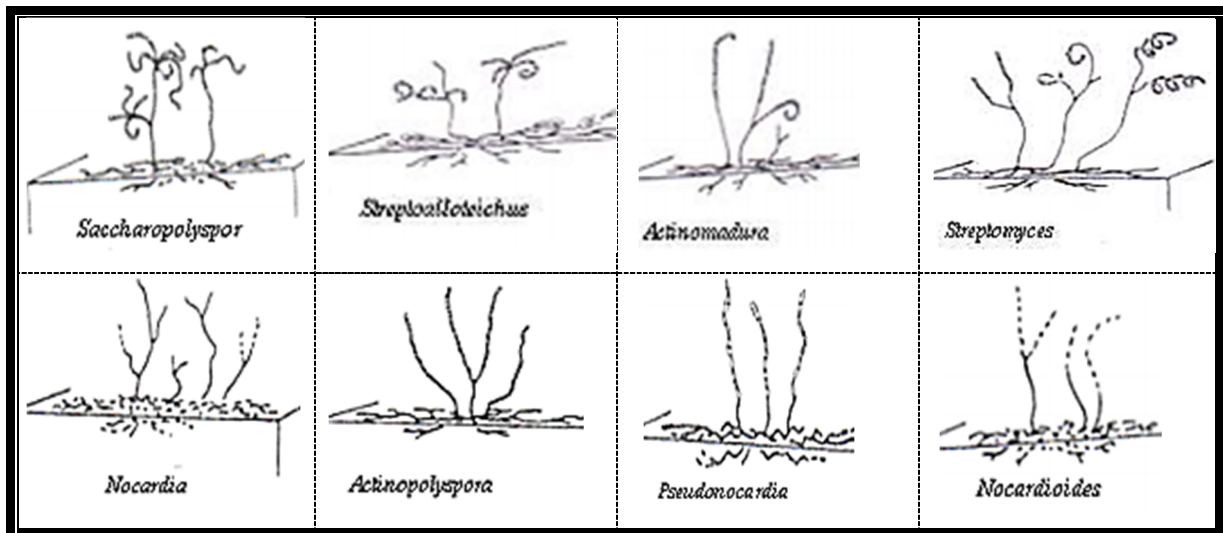


Figure III.11: Différentes morphologies possibles de l'isolat LAM₁SW₄V₁₂ selon Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1993).

D'après l'aspect morphologique de l'isolat LAM₁SW₄V₁₂, on observe une chaîne de spores. Selon la deuxième édition de *Bergey's manual of systematic*, volume 5 (2012). Les genres d'actinomycètes qui se caractérisent par une chaîne de spores sont : *Actinopolyspora*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Nocardioïdes*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus*, *Nocardia*.

L'isolat LAM₁SW₄V₁₂ se caractérise par un mycélium de substrat stable, ce qui nous permet d'exclure tous les genres ayant un mycélium de substrat fragmenté : *Nocardiopsis*, *Nocardioïdes*, *Saccharopolyspora*, *Pseudonocardia* et *Nocardia*.

La morphologie du mycélium aérien montre qu'il est formé par des chaînes de spores de taille moyenne, ramifiées et enroulées à l'extrémité donc on peut exclure les deux genres suivants :

Le genre *Actinopolyspora* (chaînes linéaires).

Le genre *Streptomyces* (chaînes de spores longues).

Selon la description des genres données dans la deuxième édition de Bergey's Manual of Systematic, volume 5 (2012), notre isolat peut appartenir à l'un des genres suivants : *Actinomadura* ou de *Streptoalloteichus*. Cependant, pour une identification complète et précise du genre, on doit procéder à une étude chimiotaxonomique, physiologique, biochimique et moléculaire ou phylogénétique, ce qui va nous permettre de confirmer ce résultat.

Conclusion

Conclusion

L'augmentation de la résistance microbienne et la propagation des microorganismes pathogènes au cours de ces dernières décennies ainsi que la limitation des médicaments disponibles sont devenues une préoccupation sanitaire majeure, et la recherche de nouvelles molécules d'antibiotiques devient une nécessité.

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, la plus remarquable est leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques. Ceux-ci ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches ont été orientées vers des genres peu fréquents à rares et provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (**Demain et Lancini, 2006**).

Ainsi, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est cruciale pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al, 2008**).

L'objectif de ce travail est d'isoler des souches d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes à partir d'un écosystème inexploité « les éponges marines ».

Et pour atteindre ce but, nous avons procédé à l'isolement, l'évaluation de l'activité antimicrobienne et la sélection du meilleur isolat producteur de substances antimicrobiennes pour être pré-identifié. 20 colonies d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de l'éponge marine *Chondrosia reniformis* prélevés au niveau de la côte d'Oran. Le nombre d'actinomycètes semble relativement faible. Il est cependant intéressant de signaler que Cheng et al. (**Cheng et al., 2015**) n'ont isolé aucune souche d'actinomycètes à partir de de cet espèce d'éponge.

Six milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement des actinomycètes, et le milieu Sponge Agar (SA) s'est avéré le plus efficace, cette performance a été attribuée à sa richesse en éléments nutritifs et aux extraits d'éponges additionnés au milieu ce qui a stimulé la croissance des actinomycètes.

Différents types morphologiques ont été obtenus dont certains ressemblent à des actinomycètes rares qui en général ne sont pas isolés facilement.

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre huit microorganismes-test. Sur les 20 colonies d'actinomycètes isolées, 9 isolats étaient actifs sur au moins un microorganisme-test étudié.

Le test d'adaptation des actinomycètes vis-à-vis l'eau de mer a montré que mis à part l'isolat LAM₁SW₃V₁₀, les autres isolats ont montré qu'ils sont adaptés à l'environnement marin mais ne sont pas obligatoirement marins.

Conclusion

Sur la base de ces résultats, nous avons sélectionné l'isolat LAM₁SW₄V₁₂ meilleure souche productrice de substances antimicrobiennes pour être pré-identifiée.

La pré-identification de l'isolat sélectionné indique qu'il peut appartenir au genre *Actinomadura* ou *Streptoalloteichus*, mais ce résultat reste à confirmer ultérieurement avec une identification moléculaire.

En perspectives à ce travail, nous souhaiterions :

- ✚ L'identification de la souche d'actinomycète sélectionnée LAM₁SW₄V₁₂ comme meilleure souche productrice de substances antimicrobiennes par des méthodes moléculaires.
- ✚ L'évaluation de l'activité antifongique de la souche LAM₁SW₄V₁₂.
- ✚ La réalisation des tests antagonistes contre de nombreux germes pathogènes à l'Homme et l'évaluation de la toxicité de l'antibiotique synthétisé envers ces organismes afin de savoir s'ils sont potentiellement intéressants dans le domaine pharmaceutique.
- ✚ L'isolement des actinomycètes à partir d'autres espèces d'éponges.
- ✚ L'exploitation du milieu marin en tant que source très riche en actinomycètes et en substances antimicrobiennes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- [1]: **Abdelmohsen UR., Pimente SM., Hanora A., Radwan M., Abou-El-Ela SH., Ahmed S., Hentschel U. (2010).** Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Mar. Drugs* (8): 399-412.
- [2] : **Bautz AM., Bautz A., Chardard D. (2010).** Mini manuel de biologie animal cours +TD, 2eme édition, Dunod, Paris.
- [3]: **Alldrege AL., Silver MW. (1988).** Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog. Oceanogr* (20): 41–82.
- [4]: **Atlas of Actinomycetes. (1997).** The Society for Actinomycetes, Japan.

B

- [5]: **Ballav S., Kerkar S., Thomas S., Augustine N. (2015).** Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (3): 323-330.
- [6] : **Barka EA., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H-P., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel GP. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (80):1– 43.
- [7]: **Beier S., Bertilsson S. (2013).** Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies, *Frontiers in Microbiology* (4): p149.
- [8]: **Belyagoubi L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie, soutenue le 26 Juin 2014, Université Aboubaker Belkaïd-Tlemcen.
- [9]: **Bergey DH., Holt JG., Breed RS. (1993).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ème Édition*, Lippincott Williams and Wilkins.
- [10]: **Bull AT., Stach JEM., Ward AC., Goodfellow M. (2005).** Marine Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* (87): 65–79.

C

- [11]: **Cheng C., Mac Intyre L., Abdelmohsen UR., Horn H., Polymenakou PN., Edrada-Ebel R., et al. (2015).** Biodiversity, Anti-Trypanosomal Activity Screening, and Metabolomic Profiling of Actinomycetes Isolated from Mediterranean Sponges. *PLoS ONE* 10(9): e138528.
- [12]: **Crawford DL., Lynch JM., Ousley MA. (1993).** Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *App. Environ. Microbiol.* 59(11): 3899-3905.
- [13]: **Collins MD. (1994).** Isoprenoid quinones, p 265–309. In Goodfellow M, O'Donnell AG (ed), *Chemical methods in prokaryotic systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom.

Références bibliographiques

[14]: Colquhoun JA., Mexson J., Goodfellow M., Ward AC., Horikoshi K., Bull AT. (1998) Novel Rhodococci and other mycolata actinomycetes from the deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* (74): 27–40.

[15]: Cross T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* (50): 397-423.

[16]: Cross, T. (1982). Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Dev. Ind. Microbiol.* (23): 1-18.

D

[17]: Demain AL., Lancini G. (2006). Bacterial pharmaceutical products in prokaryotes (1) :812-833.

E

[18]: Esin Hames-Kocabas E., Ataç U. (2012). Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples, *Journal of Microbiological Methods* (88): 342-347.

F

[19]: Faulkner DJ., Unson MD., Bewley CA. (1994). *Pure Appl. Chem.* (66): 1983-1990.

[20] : Fernandez I., Breidenstein EBM., Hancock REW. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drugs Resistance Updates* (14) :1-21.

[21]: Friedrich AB., Fischer I., Proksch P., Hacker J., Hentschel U. (2001). Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* (38): 105-115.

G

[22]: Gao B., Gupta RS. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 76(1): 66-112.

[23]: Garrity GM., Bell JA., Lilburn TG. (2004). Taxonomic Outline of the prokaryotes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Springer-Verlag. New York.

[24]: Gayathri A., Madhanraj P., Panneerselvam A. (2011). Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. *A sian J. Pharm. Tech.* (1). (3): 79-81.

[25]: Genilloud O. (2012). *Bergey's Manual of Systematic*. 2ed. Springer, New York; 5:1039.

[26]: Goodfellow M., Williams ST. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* (37): 139-216.

[27]: Grossart HP., Schlingloff A., Bernhard M., Simon M., Brinkhoff T. (2004). Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* (47): 387–396.

H

[28]: Hayakawa M., Nonomura H. (1987). Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* (65): 609–616.

[29]: Hozzein WN., Ahmed MB., Abdel Tawab MS. (2008). Microbial community structure in a wastewater treatment plant in Beni-Suef City. *New Egypt. J. Microb.* (20): 189–201.

I

[30]: Imada C., Koseki N., Kamata M., Kobayashi T., Hamada-Sato N. (2007). Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, 21 (1): 27-31.

J

[31]: Jensen PR., Gontang E., Mafnas C., Mincer TJ., Fenical W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* (7): 1039–1048.

K

[32]: Kalyani ALT., Ramya Sravani KM., Annapurna JB. (2012). Isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from marine soil samples. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 4(2): 109-112.

[33]: Kennedy J., Baker P., Piper C., Cotter PD., Walsh M., Mooij MJ., Bouke MB., Rea MC., O'Connor PM., Ross RP., Hill C., O'Gara F., Marches JR., Dobson ADW. (2009). Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Mar. Biotechnol.* (11): 384-396.

[34]: Khattabi A., Hilali L., Dari K., Assobhei O., Gavini F. (2002). Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev. Biol. Biotech.* (2):28–32.

[35]: Kim TK. et al. (2006). Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge Actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl. Environ. Microbiol.* (72): 2118–2125.

[36]: Kin Lam S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Current Opinion in Microbiology* (9):245–251.

[37]: Klein B., Rother W., Manca B., et al. (1999). The large deep water transient in the Eastern Mediterranean. *Deep sea Research*, (46): 371-414.

[38]: Kroppenstedt R. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms, p 173–199. Chemical methods in bacterial systematics. SAB Technical Series 20, Academic Press, London, United Kingdom.

L

[39] : **Lecointre G. Le Guyader H. (2001)**. Classification phylogénétique du vivant, Belin ISBN 2 : 7011-2137-X : 196-200.

[40]: **Li ZY., Liu Y. (2006)**. Marine sponge *Craniella australiensis* associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* (43): 410–416.

[41]: **Locci R. (1989)**. Streptomyces and related Genera, Bergey's manual of Systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins Company, p2508-41.

[42]: **Lythgoe KA., Chao L. (2003)**. Mechanisms of coexistence of abacteria and a bacteriophage in a spatially homogeneous environment. *Ecol. Lett.* (6): 326–334.

M

[43]: **Bukhari MAA., Thomas AN., Wong NK. (2013)**. Culture Conditions for Optimal Growth of Actinomycetes from Marine Sponges in: Developments in Sustainable Chemical and Bioprocess Technology, Springer + Business Media, New York.

[44]: **Magarvey NA., Keller JM., Bernan V., Dworkin M., Sherman DH. (2004)**. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* (70): 7520–7529.

[45]: **Maldonado LA., Fenical W., Jensen PR., Kauffman CA., Mincer TJ., Ward AC., Bull AT., Goodfellow M. (2005)**. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* (55): 1759–1766.

[46] : **Maldonado LA., Frangoso-Yanez D., Perez-Garcia A., Rosellon-Druker J., Quintana E., (2009)**. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* (95): 111-120.

[47]: **Maldonado LA., Stach JEM., Pathom-aree W., Ward AC., Bull AT., Goodfellow M., (2005)**. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek* (87): 11-18.

[48]: **Manuel M., Boury-Esnault N., Vacelet J. (2003)**. *Pour la Science*, (310): 68-75.

[49]: **Mariat F., Sebald M. (1990)**. Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

[50]: **Mc Neil MM., Brown JM., Jarvis WR., Ajello L. (1990)**. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* (12): 778-783.

[51] : **Messaoudi O., Bendahou M., Benamar I., Abdelwouhid DE. (2015)**. Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkhah of Kenadsa, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(6).

Références biobibliographiques

[52]: Mincer TJ., Jensen PR., Kauffman CA., Fenical W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* (68): 5005–5011.

[53]: Montalvo NF., Mohamed NM., Enticknap JJ., Hill RT. (2005). Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek* (87): 29-36.

O

[54]: Okami Y., Okazaki T., Kitahara T., Umezawa H. (1976). A new antibiotic apasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *J. Antibiot.* (28): 176–184.

[55]: Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.

[56]: Overbye KM., Barrett JF. (2005). Antibiotics: where did we go wrong? Review.vol 10 (1): 12.

[57]: Fenical W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developping a new resource. *Chem. Rev.* (93): 1673-1683.

P

[58] : Panchanathan M., Jayachandran V., Se-Kwon K. (2013). Introduction to Marine Actinobacteria in Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications, First Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Q

[59] : Quintin C. (2001). <http://pagesperso-orange.fr/christophe.quintin/> visité le (2009-05-03).

R

[60]: Rastogi V., Kishore BB. (2006). A Complete Course in ISC Biology. Pitambar Publishing: New Delhi. Pp: 592.

[61]: Rob WM., Van S., Boury-Esnault N., Vacelet J., Dohrmann M., Erpenbeck D., De Voogd NJ., Santodomingo N., Vanhoorne B., Kelly M., Hooper JNA. (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE* 7(4): e35105.

S

[62]: Saadoun I., Garaibeh R. (2003). The Streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotic resistant bacteria, *J. Arid. Environ.* (53): 365-71.

[63]: Sahu MK., Murugan M., Sivakumar K., Thangaradjou T., Kannan L. (2007) Occurrence and distribution of actinomycetes in marine environs and their antagonistic activity against bacteria that is pathogenic to shrimps. *Isr. J. Aquacult. Bamid.*, 59 (3) : 155–161.

Références bibliographiques

[64]: Saradavey V., Parameswaran PS. (2013). Recent advances in marine drug research, *Biotechnology Advances* 31(8): 1826-1845.

[65]: Se-Kwon K. (2013). *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

[66]: Selvin J., Joseph S., Asha KRT., Manjusha WA., Sangeetha VS., Jayaseema DM., Antony MC., Vinitha AJD. (2004). Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. Isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *FEMS Microbiol. Ecol.* (50): 117-122

[67]: Sibanda T., Leonard V., Mabinya LV., Mazomba N., Akinpelu DA., Bernard K., Olaniran AO., Okoh AI. (2010). Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci.* Vol: (11) N° 7: 2612–2623.

[68]: Singh SL., Baruah I., Bora TC. (2006). Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol.* 5 (2): 217-221.

[69]: Stach JEM., Maldonado LA., Ward AC., Bull AT., Goodfellow M. (2004). *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (54): 191–194.

[70]: Sullivan DC., Chapman SW. (2010). Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis and nocardiosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* (7): 216-221.

T

[71]: Tamura S., Park Y., Toriyama M., Okabe M. (1997). Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradia* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* vol 83 (6): 523-528.

[72]: Taylor MW., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (71): 295-347.

W

[73]: Weyland H. (1981). Distribution of actinomycetes on the sea floor. In: Actinomycetes. Eds: K. Schaal, G. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. *Zbl. Bakt. Suppl.* (11): 185-193.

[74]: Wikipedia, Porifera, Éponges, Spongiaires, <https://fr.wikipedia.org/wiki/Porifera>, consulté le 21-02-2016.

[75]: Williams ST., Wellington EMH. (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: Search and discovery. Academic Press, London. p9-26.

Z

[76]: Zaitlin B., Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res* 40(9): 1741–1753.

Références bibliographiques

- [77]: **Zaitlin B., Watson Sb., Ridal J., Satchwill T., Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can.* 95 (2): 113-118.
- [78]: **Zhang H., Lee YK., Zhang W., Lee HK. (2006).** Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gen-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* (90): 159-169.
- [79] : **Zhang H., Zhang W., Jin Y., Jin M., Yu X. (2008).** A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek* (93): 241-248.

Annexe

Milieu M₁ :

Amidon	10g
Extrait de levure.....	4g
Peptone	2g
Agar	18g
Eau de mer	1L

Milieu *International Streptomyces Project 2 (ISP2)* :

Glucose.....	4g
Extrait de levure.....	4g
Extrait de malt	10g
Agar	15g
Eau de mer.....	1L

Milieu M₄

Chitine	2g
Agar	18g
Eau de mer	1L

Milieu Sponge-Agar (SA) :

Raffinose.....	10g
Histidine.....	1g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01g
K ₂ HPO ₄	1g
CaCO ₃	0.02g

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5g
Agar	15g
Extrait d'éponge	120 ml

Milieu Caséine Amidon Agar (CAA) :

Amidon	10g
Caséine.....	0.3g
K ₂ HPO ₄	2g
KNO ₃	2g
Na Cl	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05g
CaCO ₃	0.02g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.01g
Agar.....	15g
Eau de mer	1L

Milieu amidon extrait de levure peptone eau de mer (SW) :

Amidon.....	10g
Extrait de levure.....	4g
Peptone	2g
Sels artificiels de mer.....	33.3g
Agar	15g

Milieu 5333

Amidon.....	15g
Extrait de levure.....	4g
MgSO ₄	0.5g

K ₂ HPO ₄	1g
Agar.....	18g
Eau de mer.....	1L

Bouillon Mueller-Hinton :

Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Extrait de cœur en pâte.....	5g
PH	7,4

Gélose Mueller-Hinton :

Infusion de viande de bœuf	300,0 ml
Peptone de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17,0 g
PH	7,4

ملخص

تم الحصول على 20 عزلة من البكتيريا الخيطية من الإسفنج البحري *Chondrosia reniformis* مأخوذة من الساحل الغربي الجزائري (بلدية عين الترك، ولاية وهران). ومن بين 20 عزلة، تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لأربعة عشر عزلة بواسطة تقنية اسطوانة أجار في وسط مولر-هنتون ضد أربع بكتيريا إيجابية الغرام وثلاثة سلبية الغرام وضد خميرة واحدة. أظهرت 9 عزلات، من بين الأربعة عشر، نشاطا ضد واحد على الأقل من الكائنات الحية الدقيقة المستخدمة. في حين أن عزلة واحدة فقط تبين أن لديها فعالية عالية ضد جميع هذه الكائنات. كما أنه لم تثبت أي عزلة أنها من أصل بحر ي. ولقد تم تحديد العزلة ذات النشاط الأكبر عل أنها تنتمي لأحد النوعين *Actinomadura* أو *Streptoalloteichus*.

الكلمات المفتاحية: إسفنج بحري، عزل، نشاط مضاد للبكتيريا، تحديد، *Actinomadura*، *Streptoalloteichus*.

Résumé

Un total de 20 isolats d'actinomycètes a été obtenu de l'éponge marine *Chondrosia reniformis* collectée des côtes ouest algériennes (commune Ain-Turk, wilaya d'Oran). L'activité antimicrobienne de 14 isolats a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar sur milieu Mueller-Hinton contre 7 bactéries dont 4 à Gram positifs et 3 à Gram négatifs et contre une levure *Candida albicans*. Parmi les isolats testés, 9 isolats ont affiché une activité contre au moins un microorganisme-test. Un seul isolat a montré une forte activité contre tous les microorganismes-tests. Aucun des isolats testés ne s'est montré obligatoirement marin. La souche la plus productrice de substances antimicrobiennes LAM₁SW₄V₁₂ a été pré-identifiée comme *Actinomadura* ou *Streptoalloteichus*.

Mots clés : éponges marines, Isolement, activité antimicrobienne, pré-identification, *Actinomadura*, *Streptoalloteichus*.

Abstract

20 isolates of actinomycetes were got from marine sponge *Chondrosia reniformis*. The sponge samples were collected from west costs of Algeria (Ain-Turk, Oran). The screening of antimicrobial activity of 14 isolates was carried out by the agar cylinder technique on Muller –Hinton medium against 4 Gram positive bacteria, 3 Gram negative bacteria and one yeast *Candida albicans*. Among the tested isolates, 9 tested isolates showed activity against at least one tested microorganism. One isolate showed activity against all of bacteria and fungi. This isolate appears to produce high anti-fungal and anti-bacterial compounds. No tested isolate was shown seawater-requiring. The potent producer of antimicrobial compounds strain was identified as *Actinomadura* or *Streptoalloteichus*.

Key words: marine sponges, Isolation, antimicrobial activity, pre-identification, *Actinomadura*, *Streptoalloteichus*.