



Université ABDERAHMANE MIRA- Béjaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté par

M^{elle} BOUDRAHEM Daouia

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée aux Substances Antimicrobiennes.

Thème

**Isolement et sélection de souches d'actinomycètes marines
productrices de substances bioactives.**

Soutenu le : 05/02/2015

Devant le jury composé de

Noms et prénoms	Grade		
M ^{elle} . BENDALI .F	Maître de conférences	UAMB	Présidente
M ^r . KECHA. M	Professeur	UAMB	Rapporteur
M ^r . AISSAT.K	Maître de conférences	UAMB	Examineur
M ^r . NABTI. H	Maître de conférences	UAMB	Examineur

2014 - 2015

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes parents qui ont toujours été présents pour faire mon bonheur. Que Dieu les protège et leur donne longue vie pleine de santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mon mari Salim d'être toujours à mes côtés pour me soutenir et surtout pour me donner la force pour surmonter tout les obstacles et les difficultés. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à lui. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Ma grande mère, mes oncles, leurs femmes et leurs enfants, mes tantes et leurs maris et leurs enfants.

Mes beaux parents .Que Dieu les protège et leur donne longue vie pleine de santé et de bonheur.

Mes frères Yacine ,Taher, Daoued ,leurs femmes et leurs enfants ; l' adorable fougou ,Yara,et Malek,

Mes beaux frères Nassim , Karim ,sa femme et ses enfants Aris Yasmine et Liza.

Mes sœurs Karima,Chafia,Houria,Bahia et Souzene , leurs maris et leurs enfants :Randa ,Yanis,Amine,Rayane,Mariam et Amina.

Mes belles sœurs :Farida,Fadila,Naima,Rbiha Sadika et Lamia,leurs maris et leurs enfants :Brahim ,Mourad,Riad ,Razika, Kousseyla,Rayane ,Lylia,Zakaria, Mounir, Thélissa,Amine,Sara et la petite Dina.

Mes collègues et amis: Zohra,Lamia,Houria,Yasmina,Akila,Louiza , Samia,Amel , Hamza,Nabila et toute l'équipe du LMA.

En témoignage de ma profonde reconnaissance et respect.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté de Sciences de la nature et de la vie, département de Microbiologie à l'Université A. Mira -Bejaia.

Au terme de ce travail je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour le réaliser.

Je tiens à remercier avant tous mon encadreur Mr KECHA M. qui a accepté de superviser ce travail pour ses conseils, sa disponibilité.

Mes sincères considérations et remerciements vont également aux membres du jury : M^{lle} BENDALI F. qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, Mr AISSAT K. et Mr NABTI H. qui ont accepté de faire partie de ce jury.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr BENALLAOUA S. Responsable du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer, également, mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et qui m'ont appris une infinité de choses et m'ont aidé, conseillé et soutenu de manière continue afin de mener ce travail dans les meilleures conditions.

Liste des abréviations

As : *Aspergillus*

ATCC: American Type Culture Collection

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

B. cinerea: *Botrytis cinerea*

C: *Candida*

C.H.U: Centre Hospitalo-Universitaire

D.A.P: Acide 2,6-diaminopimélique

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

E. coli : *Escherichia coli*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

F : *Fusarium*

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

Fig: Figure

Gr : Grossissement

GEM : Gélose à l'Extrait de Malt

GLM : Gélose à l'Extrait de Levure et de Malt

GlcNAc: N-acétyl-glucosamine

GN: Gélose nutritive

GYEA: Glucose-Yeast-Extract-Agar

HPLC DAD: High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection

HTC: High-Throughput Cultivation

HSV-1: *Herpes Simplex Virus Type 1*

ISP: International *Streptomyces* Project

J : Jour

L : *Listeria*

LMA: Laboratoire de Microbiologie Appliquée

L. major: *Leishmania major*

M2: Milieu de Williams

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium du substrat

MSA : Milieu Synthétique à base d'Amidon

Muc : Mucor

ND : Non déterminé

NPS : Nutrient Poor Sediment

NRS : Nutrient Rich Sediment

OGA : Oxytetracycline Glucose Agar

P : *Plasmodium*

P.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PCR : Polymerase Chain Reaction

S: *Staphylococcus*

SARM: *Staphylococcus aureus résistant à la méticilline*

SMP: Seawater Mannitol Peptone

SSW: Sterile Sea Water

T. brucei : *Trypanosoma brucei*

TRFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

VSV: Vesicular Stomatitis Virus

Liste des figures

Fig.1 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète.....	5
Fig.2 : Photographie de différentes chaînes de spores au microscope optique (X400)	9
Fig.3 : Diagramme de la classification des actinomycètes selon le Bergey's Manuel de Systématique et de la Classification en Bactériologie.	11
Fig.4 : Schéma démonstratif de la méthode d'estampillage.	16
Fig.5 : Illustration de l'utilisation d'encapsulation à haut débit pour la culture de micro-organismes de l'environnement.....	18
Fig.6 : Structure chimique de deux lactames bicycliques inhabituels, salinosporamides A et B.....	27
Fig.7 : Répartition d'isolats d'actinomycètes selon le site d'échantillonnage.....	49
Fig.8 : Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon le milieu de culture utilisé (avec ou sans traitement).	50
Fig.9 : Répartition du nombre des isolats d'actinomycètes selon la méthode d'isolement.....	51
Fig.10 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Staphylococcus aureus</i>	54.
Fig.11 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>SARM</i>	55
Fig.12 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Listeria innocua</i>	55
Fig.13 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Enterococcus faecalis</i>	56
Fig.14 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Bacillus subtilis</i>	57
Fig.15 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Escherichia coli</i>	58
Fig.16 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Fig.17 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre les souches d' <i>Aspergillus</i>	60
Fig.18 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre <i>Fusarium polyferatum</i>	61
Fig.19 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre <i>Botrytis cinerea</i>	62
Fig.20 : Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre <i>Mucor ramanianus</i>	62
Fig.21 : Activité anti luvurale des isolats d'actinomycètes contre <i>Candida albicans</i>	63
Fig.22 : Mise en évidence de l'activité cellulastique des isolats S2T2H1(a), S5T2H1(b), S7T2H1(c) et S29T3J31(d) issus de différents milieux.	65

Fig.23: Mise en évidence de l'activité xylanasiqne des isolats S2T2H1 (a) et l'isolat (b) S7T2H1 issus de différents milieux.	67
Fig.24: Suivi de la production d'antibiotiques antibactériens par l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide SCA vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	71
Fig.25 : Suivi de la production d'antifongiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide SCA vis-à-vis de <i>B.cinerea</i>	72
Fig.26 : Suivi de l'évolution du pH du milieu SCA inoculé avec l'isolat S5T2H1.	75
Fig.27 : Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu MSA.	76
Fig.28 : Suivi de l'évolution du pH du milieu MSA inoculé par l'isolat S5T2H1.....	76
Fig.29: Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu ISP2.	77
Fig.30 : Suivi de l'évolution du pH du milieu ISP2 inoculé par l'isolat S5T2H1.....	78
Fig.31: Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu GYEA.	78
Fig.32 : Suivi de l'évolution du pH du milieu GYEA inoculé par l'isolat S5T2H1.....	79
Fig.33: Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett.	79
Fig.34 : Suivi de l'évolution du pH du milieu Bennett inoculé par l'isolat S5T2H1.....	80
Fig.35: Cinétique de croissance et de production d'antifongiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu MSA.	82
Fig.36 : Cinétique de croissance et de production d'antifongiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu GYEA.	83
Fig.37 : Cinétique de croissance et de production d'antifongiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett.	84
Fig.38 : Observation de la coloration de Gram a l'objectif à immersion de l'isolat S5T2H1.....	88
Fig.39 : Micromorphologie de l'isolat S5T2H1 cultivé pendant 21 jours à 28°C sur milieu SCA, vu au microscope (X400).	88
Fig.40 : Croissance de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett aux pH 5, 7 et 9,5.....	91
Fig.41 : Croissance de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett supplémenté avec différentes concentrations en NaCl.	91

Liste des figures (annexe)

Fig.42: Test de production de nitrate réductase par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.....	140
--	-----

Liste des tableaux

Tableau I: Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires.	7
Tableau II : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.	8
Tableau III : Différentes méthodes de prétraitement pour isolement sélectif des actinomycètes marins.	13
Tableau IV : Répartition des actinobactéries cultivables dans les sédiments marins.	23
Tableau V: Caractéristiques physicochimiques des sédiments marins prélevés.	34
Tableau VI : Les antibiotiques testés à l'égard des isolats d'actinomycètes.	45
Tableau VII : Mise en évidence de l'activité L-asparaginase des isolats S2T2H1, S5T2H1 S7T2H1 et S29T3H31 issus de différents milieux de culture.	69
Tableau VIII : Les caractères macromorphologiques de l'isolat S5T2H1.	86
Tableau IX: Les caractères physiologiques de l'isolat S5T2H1.	89
Tableau X: Utilisation de substrats organiques simples et complexes par l'isolat S5T2H1.....	90

Liste des tableaux (annexe)

Tableau XI : Les meilleurs milieux de culture utilisés pour l'isolement des actinomycètes marins à partir de sédiments marins.....	117
Tableau XII : Caractères morphologiques de quelques isolats actinomycètes isolés.....	122
Tableau XIII : Nombre d'isolats d'actinomycètes en fonction de sites d'isolement. ...	124
Tableau XIV : Nombre d'isolats d'actinomycètes en fonction de milieu d'isolement.	125
Tableau XV : Nombre d'isolats d'actinomycètes en fonction de la technique d'isolement.	125
Tableau XVI: Résultats de test d'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.	126
Tableau XVII : Résultats de test d'activité antifongique des isolats d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.	127

Tableau XVIII : Représentation des photographies de test d'activité antibactérienne sur milieu solide par méthode des disques d'agar des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.	128
Tableau XIX : Résultats de la cinétique de production des antibiotiques par l'isolat S5T2H1 sur différents milieux liquides.	131
Tableau XX : Aspect morphologique de l'isolat S2T2H1, sur différents milieux de culture.....	132
Tableau XXI : Aspect morphologique de l'isolat S7T2H1, sur différents milieux de culture.	133
Tableau XXII : Aspect morphologique de l'isolat S29T3J31, sur différents milieux de culture.....	135
Tableau XXIII : Caractéristiques physiologiques des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.....	136
Tableau XXIV : Utilisation des composés glucidiques et des acides aminés comme seule source de carbone par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.	137
Tableau XXV : Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.	138
Tableau XXVI : Sensibilité des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31 aux différents agents chimiques.	139

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes marins.....3

1-Historique.....3

2-Définition et caractéristiques générales4

3-Identification et classification.....5

3-1- L'approche moléculaire5

3-2- L'approche chimiotaxonomique6

3-3- L'approche classique8

3-4- L'approche de taxonomie numérique.....10

4-L'isolement12

4-1- Echantillonnage et prélèvement12

4-2-Le prétraitement12

4-3- L'enrichissement15

4-4- L'isolement15

4-5-L'approche moléculaire pour la recherche des actinobactéries marines21

5- La répartition et la diversité et des actinomycètes dans le milieu marin22

5-1-La répartition22

5-2-La diversité.....23

6-Rôle des actinomycètes marins en milieu marin24

Chapitre II : Les métabolites bioactifs des actinomycètes marins25

1-Généralités sur les métabolites bioactifs.....25

2-La redécouverte de métabolites bioactifs...25

3- Les caractéristiques des métabolites bioactifs des actinomycètes marins27

4- Les genres d'actinobactéries producteurs de nouveaux métabolites bioactifs.....30

5- Origines géographiques des métabolites bioactifs28

6-La classification.....	28
6-1-Les antibiotiques.....	28
6-2-Les substances antioxydantes	31
6-3-Les enzymes	31
6-4-Les inhibiteurs enzymatiques	32
6-5-Les probiotiques	33

La partie expérimentale

I- Matériels et Méthodes.....	34
1- Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens.....	34
1-1- Origine et prélèvement des échantillons.....	34
1-2- Les méthodes et les milieux de culture utilisés pour l'isolement	35
1-3- Purification et conservation des isolats	37
2-Mise en évidence de l'activité antibiotique, et enzymatique des souches isolées sur milieu solide	38
2-1- Mise en évidence de l'activité antibactérienne	38
2-2-Mise en évidence de l'activité antifongique:.....	39
2-3- Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	40
3- Mise en évidence de la production des antibiotiques par l'isolat sélectionné sur milieu liquide.....	41
4- Choix de meilleur milieu liquide pour la production des antibiotiques, et de la croissance de l'isolat sélectionné	42
5- Etude taxonomique des isolats sélectionnés.....	43
5-1- L'étude morphologique	43
5.2. Etude physiologique.....	44
5.3. Les tests biochimiques	45
II -Résultats et discussion.....	49
1-Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens.....	49
1-1- Origine et prélèvement des échantillons.....	49
1.2. Les méthodes et les milieux de culture utilisés pour l'isolement.....	50
2. Mise en évidence de l'activité antibiotique et enzymatique sur milieu solide.....	53
2. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	53
2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	60
3.3. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	64

3- Mise en évidence de la production des antibiotiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide.....	71
4- Choix de meilleur milieu liquide pour la production des antibiotiques, et de la croissance de l'isolat S5T2H1	73
4-1-Choix de meilleur milieu de croissance et de production de l'antibiotique antibactérien par l'isolat S1T2H1 à l'égard de <i>S. aureus</i>	74
4-2-Choix de meilleur milieu de croissance et de production de l'antifongique par l'isolat S1T2H1 à l'égard de <i>B. cinerea</i>	81
5. Etude taxonomique des isolats sélectionnés.....	86
❖ Détermination du genre.....	86
5.1. L'étude morphologique	86
❖ Caractérisation de l'isolat S5T2H1.....	89
5.2. Étude physiologique.....	89
5. 3. Etude biochimique.....	90
Conclusion.....	93
Références bibliographiques	96
Annexes.....	117

Introduction

Introduction

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde, mais leur efficacité est confrontée à des préoccupations cliniques graves, surtout en raison d'émergence de bactéries résistantes (**Maestro et Sanz, 2007**).

De nouvelles approches pour le développement de nouveaux antibiotiques ont été adoptées, telles que les outils de la chimie combinatoire, mais seulement quelques nouveaux antibiotiques sont produits par l'industrie pharmaceutique (**Coates et Hu, 2007**). D'autres stratégies comprennent la synthèse organique (**Abbanat et al., 2003**), la modification de la pharmacocinétique des médicaments grâce à la nanotechnologie et la recherche de molécules avec des mécanismes d'action inédits (**Lockwood et Mayo, 2003**).

La recherche de nouvelles souches microbiennes, non encore testées pour leur activité antibactérienne est toujours d'actualité et ce pour produire des molécules innovantes ou pour les utiliser comme modèles utiles pour le développement de nouveaux antibiotiques (**Sofia et Boldi, 2006**). Les habitats peu ou pas exploités tels que les milieux sahariens et marins sont bien indiqués en raison de leurs caractères physicochimiques particuliers. En effet l'environnement peut affecter le métabolisme microbien et, par conséquent, les microorganismes qui produisent ainsi de nouvelles molécules bioactives (**Gandhimathi et al., 2008**).

La mer, couvrant plus de 70% de la surface de la Terre, contient une diversité biologique exceptionnelle, représentant plus de 95 % de l'ensemble de la biosphère (**Qasim, 1999**). La diversité microbienne constitue un réservoir infini de composés chimiques, constituant une source précieuse pour la biotechnologie innovante (**Berdy, 2005; Fenical et Jensen, 2006**). Le fond des océans s'est révélé ces dernières années comme un écosystème contenant de nombreuses et uniques formes de microorganismes en particulier les Actinomycètes (**Fenical et Jensen, 2006**).

Les caractéristiques dues à l'adaptation des actinomycètes (**Maldonado et al., 2005 ; Jensen et al., 2005b**) au milieu marin en font une source de recherche intéressante pour de nouvelles espèces et une source prometteuse de composés importants en pharmacie (**Fenical et Jensen, 2006**). Malgré cet avantage, relativement peu de travaux ont été effectués sur les actinomycètes marins (**Lam, 2006**).

L'objectif de notre travail est d'isoler des souches d'actinomycètes marines au niveau du littoral, précisément la côte ouest de la wilaya de Bejaia pour son caractère encore

relativement non pollué et de tester leur aptitude à produire des substances bioactives (antibiotiques et/ou enzymes). L'isolement et le screening sont basés sur l'utilisation d'un nombre important et varié de milieux de culture et de microorganismes cibles (bactéries, levures et moisissures).

Le présent document est structuré en quatre parties :

- Une synthèse bibliographique pour présenter l'état de la question
- Une partie expérimentale qui englobe matériel, méthodes, résultats et discussion où nous présentons nos résultats.
- Une conclusion générale

Et enfin, les références bibliographiques et les annexes en rapport avec cette étude.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes marins

1-Historique

Le milieu marin est un habitat unique qui a des caractéristiques particulières que les zones terrestres n'ont pas, comme la pression hydrostatique et la concentration en sels élevées et la teneur faible en matière organique. Ainsi, les micro-organismes vivants dans les milieux marins et les milieux terrestres devraient être totalement différents.

Waksman (1959) a rapporté qu'il y avait très peu de rapports disponibles concernant la présence d'actinomycètes dans la mer et ce jusqu'à l'année 1959. Une étude ultérieure a rapporté que la présence d'actinomycètes dans cet environnement était due à la contamination du sol ou à leur présence sur les algues flottantes à la surface de la mer, ou au fait que des échantillons d'eau ont été obtenus à proximité des bassins versants.

L'isolement des actinomycètes de sédiments marins côtiers a été fait par **Grein et Meyers (1958)**. En se basant sur l'absence de différences morphologiques et biochimiques apparentes entre les isolats marins et terrestres, ils en ont conclu que les actinomycètes ne pouvaient provenir que de la terre mais ils se sont adaptés à l'eau de mer saline.

Okami et Okazaki (1974) ont étudié le transport de spores d'actinomycètes en mer profonde. L'étude explique que ces spores pourraient être transférées de la terre à la mer par la pluie drainée par les rivières. Les spores précipitent sous l'effet de NaCl, puis atteignent les sédiments marins, plus tard **Okazaki et Okami (1975)** ont montré que quelques souches d'actinomycètes terrestres pourraient bien pousser sur les milieux préparés avec de l'eau de mer, et montré un large éventail d'halotolérance, alors que l'halotolérance des souches sensibles au NaCl pourrait être induite par l'exposition progressive à des concentrations croissantes. Cependant, l'existence d'actinomycètes marins autochtones avait été signalée par **Weyland (1969)** sur la base du nombre d'actinomycètes isolés de sédiments marins profonds.

En outre, **Jensen et al. (1991)** ont également signalé que le nombre maximum d'actinomycètes isolés des sédiments près des côtes dans deux sites d'échantillonnage ; profonds et peu profonds, montre une distribution bimodale en fonction de la profondeur. Cela a été caractérisé par une baisse évidente des streptomycètes avec la profondeur. Par ailleurs, 98% des streptomycètes ont été obtenus à partir de la profondeur $\leq 3\text{m}$ et le pourcentage diminue drastiquement avec la profondeur. Cependant, le nombre d'actinomycètes augmentait jusqu'à 33m de profondeur minimum. Ces découvertes sont de nature à indiquer que la théorie selon laquelle les actinomycètes d'origine marine sont

originaires de la terre pourrait être juste. En outre, ils ont prouvé que près des côtes les actinomycètes des sédiments marins sont bien adaptés et font partie de la communauté microbienne marine. **Jensen et al. (1991)** ont rapporté que les actinomycètes isolés d'environnements marins sont métaboliquement actifs et se sont adaptés à la vie dans la mer. En outre, des études sur l'isolement des actinomycètes de sédiments marins ont suggéré qu'ils étaient capables de survivre dans les conditions marines en raison de leur tolérance au sel.

Selon **Ghanem et al. (2000)**, le nombre des actinomycètes marins isolés de sédiments ont dépassé de loin ceux trouvés dans l'eau de mer. Ainsi, les sédiments sont encore le meilleur fournisseur de ces micro-organismes.

La confirmation de la croissance et de l'adaptation des actinomycètes dans le milieu marin a été signalé notamment après l'isolement de genre *Salinispora* (**Maldonado et al., 2005, Jensen et al., 2005a**) qui a été décrit comme le premier genre marin obligatoire en raison de son exigence stricte de l'eau de mer pour sa croissance.

Principalement en raison de leurs applications importantes en biotechnologie et de leur capacité à produire de nouveaux métabolites bioactifs, les efforts d'isolement de ces organismes dans le milieu marin ont de plus en plus augmenté.

2-Définition et caractéristiques générales

Les actinomycètes constituent un groupe bactérien à Gram positif, qui ont une teneur élevée en guanine et en cytosine dans leur ADN (> 55% en mole). La plupart sont aérobies et neutrophiles. Leur morphologie, cependant, varie entre les différents genres, de cocci et bâtonnets polymorphes jusqu'aux filaments ramifiés qui se décomposent en cellules sphériques ou qui donnent un mycelium aérien avec de longues chaînes de spores (**Erikson, 1949**) (**Fig.1**).

La paroi cellulaire des actinomycètes est une structure rigide qui maintient la forme de la cellule et empêche son éclatement sous l'effet de hautes pressions osmotiques (**Goodfellow et al., 1998 ; Manuselis et Mahon, 2007**). Cette paroi est constituée d'une grande variété de complexes y compris les composés du peptidoglycane, l'acide téichoïque et teichuronique et les polysaccharides. Le peptidoglycane est constitué de glycanes (polysaccharides) de chaînes alternées de N-acétyl-D-glucosamine (NAG) et de N-acétyl-D-acide muramique (NAM) et d'acide diaminopimélique (DAP).

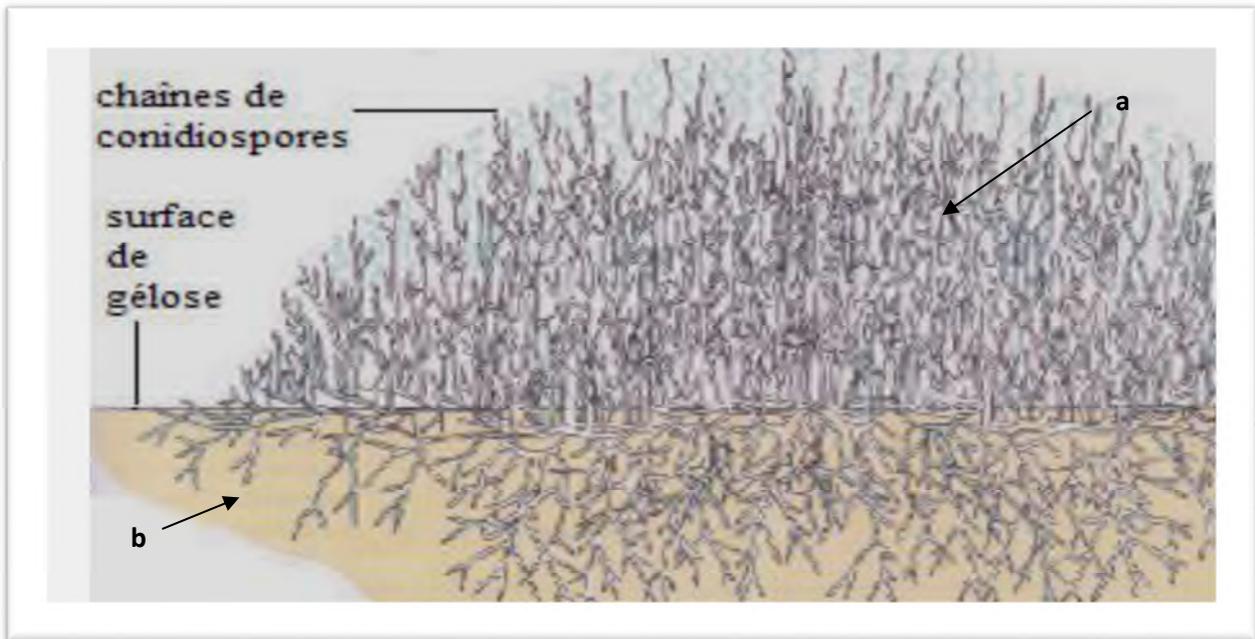


Fig.1 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète (Prescott et al., 2003).

a : le mycélium aérien le, b : le mycélium de substrat.

La composition chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes est similaire à celle des bactéries à Gram positif, mais en raison de leur morphologie bien développée (hyphe) et les caractéristiques culturelles, les actinomycètes ont été considérées comme un groupe à part, et séparé d'autres bactéries communes (Cummins et Harris, 1956 ; Das et al., 2008).

En général, les conditions optimales pour la croissance des actinomycètes sont une température de 25 à 30 °C et à un pH neutre (Colquhoun et al., 1998) .

3-Identification et classification

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

Diverses approches pour l'identification des actinomycètes sont données brièvement ci-dessous:

3-1- L'approche moléculaire

Des études phylogénétiques basées sur le séquençage d'ADNr 16S sont utilisées dans la systématique des actinomycètes. En effet le séquençage d'ADN ribosomique 16S permet de

construire un arbre phylogénétique pour l'étude de l'évolution des actinomycètes et fournit également la base pour l'identification (**Sivakumar, 2007**).

3-2- L'approche chimiotaxonomique

La chimiotaxonomie est l'étude des variations chimiques des micro-organismes et l'utilisation des caractères chimiques pour leur classification et l'identification. Elle est l'une des méthodes intéressantes pour identifier les genres d'actinomycètes.

L'utilisation des critères chimiques dans un but taxonomique appliquée aux actinomycètes a été initiée par **Becker et al. (1964)** ainsi que par **Lechevalier et Lechevalier (1970)**. Après l'analyse des constituants de la paroi cellulaires, ces chercheurs ont défini plusieurs chimiotypes basée sur :

➤ Les acides aminés

Les plus importants sont l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être sous forme LL (*iso*) ou DL (*meso*) et la glycine qui est, soit présente ou absente. Cependant, chez quelques actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (**Becker et al., 1965**), ce qui définit plusieurs types pariétaux.

➤ Les sucres

Les sucres caractéristiques sont principalement les couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose, ainsi que le madurose ou 3-D-méthyl galactose (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis (**Tableau I**).

Tableau I : Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires des actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

Type parietal	Le genre
Type I : LL- DAP, Glycine	<i>Streptomyces, Streptoverticillium, Nocardioides, Intrasporangium, Kineosporia, Sporichthya, Arachnia, Pimelobacter.</i>
Type II : Meso DAP, Glycine, Arabinose	<i>Micromonospora, Glycomyces, Actinoplanètes Actinoplane, Ampullariella, Catellatospora, Dactylosporangium, Pilimelia.</i>
Type III : Meso DAP, Galactose	<i>Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces, Nocardiosis, Streptosporangium, Geodermatophilus, Microtetrastora.</i>
Type IV : Meso DAP, Arabinose, Galactose	<i>Kibdelosporangium, Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora.</i>
Type V : Lysine, Ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
Type VI : Lysine, acide Aspartique	<i>Actinomyces bovis, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Arcanobacterium.</i>
Type VII : DAB Glycine, Lysine (+/-)	<i>Agromyces, Clavibacter.</i>
Type VIII : Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomona.</i>

DAP : Acide Diaminopimélique.

DAB : Aide Diaminobutyrique.

➤ Les lipides

Il est indispensable d'analyser les lipides cellulaires (pariétaux et membranaires), principalement les phospholipides (lipides polaires), les ménaquinones (à noyau quinone méthylé), les acides gras et les acides mycoliques (ce dernier étant des lipides complexes insaturés).

La diversité des phospholipides a permis à **Lechevalier et al.(1977)** de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques (**Tableau II**).

Tableau II : Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes (**Lechevalier et al. ,1977**).

Types de phospholipides	Phosphatidyl Ethanolamine (PE)	Phosphatidyl Choline (PC)	Phospholipides avec glucosamine (PG)	Phosphatidyl glycérol
PI	-	-	-	V
PII	+	-	-	-
PIII	-	+	-	V
PIV	+	-	+	-
PV	-	-	+	+

Note : Tous les actinomycètes possèdent le phosphatidyl inositol, (+) : présent, (-) : absent, **V**: variable suivant les espèces d'un même genre.

3-3- L'approche classique

L'approche classique de la classification des actinomycètes emploie l'aspect morphologique, physiologique, et les caractères biochimiques. Les méthodes classiques décrites dans la clé d'identification par **Nonomura (1974)** et dans le " **Bergey's Manual de systématique et de la classification en Bactériologie** " (**Buchanan et Gibbons, 1974**) sont très utiles dans l'identification et dans la taxonomie des streptomycètes depuis de nombreuses années et elles sont les suivantes :

➤ La couleur de mycélium aérien

La couleur du mycélium aérien mature et sporulé enregistrée est généralement (blanche, grise, rouge, verte, bleue ou violette). Lorsque le mycélium aérien présente deux couleurs, à la fois les couleurs sont enregistrées.

➤ **Les pigments mélanoïdes**

On peut regrouper les actinomycètes par rapport à la production de pigments mélanoïdes (brun verdâtre, brunâtre noir ou brun distinct, ou pigment modifié par d'autres couleurs). Les souches sont regroupées comme productrices de pigments mélanoïdes (+) ou non productrices (-).

➤ **Les pigments non diffusibles ou de substrat**

Les souches sont divisées en deux groupes, en fonction de leur capacité à produire des pigments caractéristiques sur la face arrière de la colonie, à savoir, distinctif (+) et non distinctif (-). Dans le cas, d'une couleur avec une faible saturation comme le jaune pâle, olive ou brun jaunâtre, il est inclus dans le second groupe (-).

➤ **Les pigments solubles**

Les souches sont divisées en deux groupes selon leur capacité à produire des pigments solubles autres que la mélanine: à savoir, une souche productrice (+) ou pas (-). Les couleurs enregistrées sont (rouge, orange, verte, jaune, bleue ou violette).

➤ **La chaîne de spores et morphologie**

En ce qui concerne les chaînes de spores, les souches peuvent être regroupées en "sections". Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* sont divisées en trois sections (Shirling et Gottlieb, 1966), à savoir Rectus flexibilis (RF), Retinacula aperti (RA) et Spiralis (S). Quand une souche forme deux types de chaînes de spores, les deux sont notés (par exemple SRA).(Fig.2)

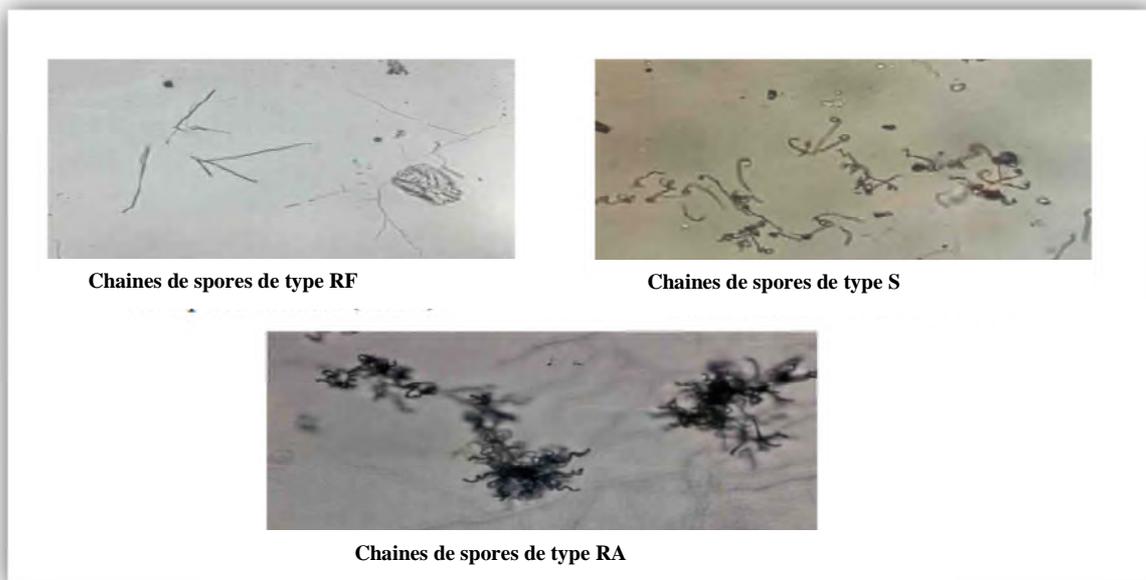


Fig.2 : Photographie de différentes chaînes de spores au microscope optique. Gr : X400 (Sivakumar, 2007).

Les caractéristiques des hyphes et les chaînes de spores peuvent être déterminées par l'observation directe de la surface de la culture au microscopique. Le grossissement (X400) pourrait être utilisé pour voir la présence ou l'absence de chaînes de spores et la nature des sporophores.

➤ **la surface de la spore**

La morphologie des spores et ses caractéristiques de surface sont fournies grâce au microscope électronique à balayage. La grille d'électrons doit être nettoyée et un ruban adhésif est placé sur la surface de la grille. Les spores matures de la souche doivent être soigneusement placées sur la surface de la bande adhésive et le revêtement d'or doit être appliqué pendant une demi-heure. L'échantillon peut être examiné sous le microscope électronique à des agrandissements différents et la spore peut être caractérisée comme lisse, épineuse, crénelée et ondulée.

➤ **L'assimilation de la source de carbone**

La capacité de différentes souches d'actinomycètes pour l'utilisation de divers composés carbonés en tant que source d'énergie doit être étudiée selon la méthode recommandée par " l'International Streptomyces Project " (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les sources de carbone à tester pourraient être l'arabinose, le xylose, l'inositol, le mannitol, le fructose, le rhamnose, le saccharose et le raffinose. En comparant les propriétés des souches isolées avec les espèces représentatives trouvées dans la clé de **Nonomura (1974)** et le " Bergey's Manual de systématique et de la classification en Bactériologie " (**Buchanan et Gibbons, 1974**) cela peut aider à l'identification de l'espèce. Si la souche isolée ne peut pas être attribuée à l'un des représentants valables énumérés dans la clé du Manuel de **Nonomura (1974)** et dans le " Bergey's Manual de systématique et de la classification en Bactériologie " (**Buchanan et Gibbons, 1974**), il est possible de l'identifier sur la base de la taxonomie numérique.

3-4- L'approche de taxonomie numérique

La taxonomie numérique implique l'examen de nombreuses souches par rapport à un grand nombre de caractères avant d'attribuer l'organisme d'essai à cluster sur la base de caractéristiques communes (**Sivakumar, 2007**).

. Dans le " Bergey's Manual de systématique et de la classification en Bactériologie ", les actinomycètes ont été inclus dans plusieurs sections du quatrième volume, dans l'ordre des *Actinomycetales* divisé en quatre familles *Streptomycetaceae*, *Actinomycetaceae*, *Actinoplanaceae* et *Mycobacteriaceae* (**Williams et al., 1989**).

Dans le “Bergey’s Manual de systématique et de la classification en Bactériologie” (édition 2) la classification des actinomycètes a été réarrangée comme montré sur la figure 3 :

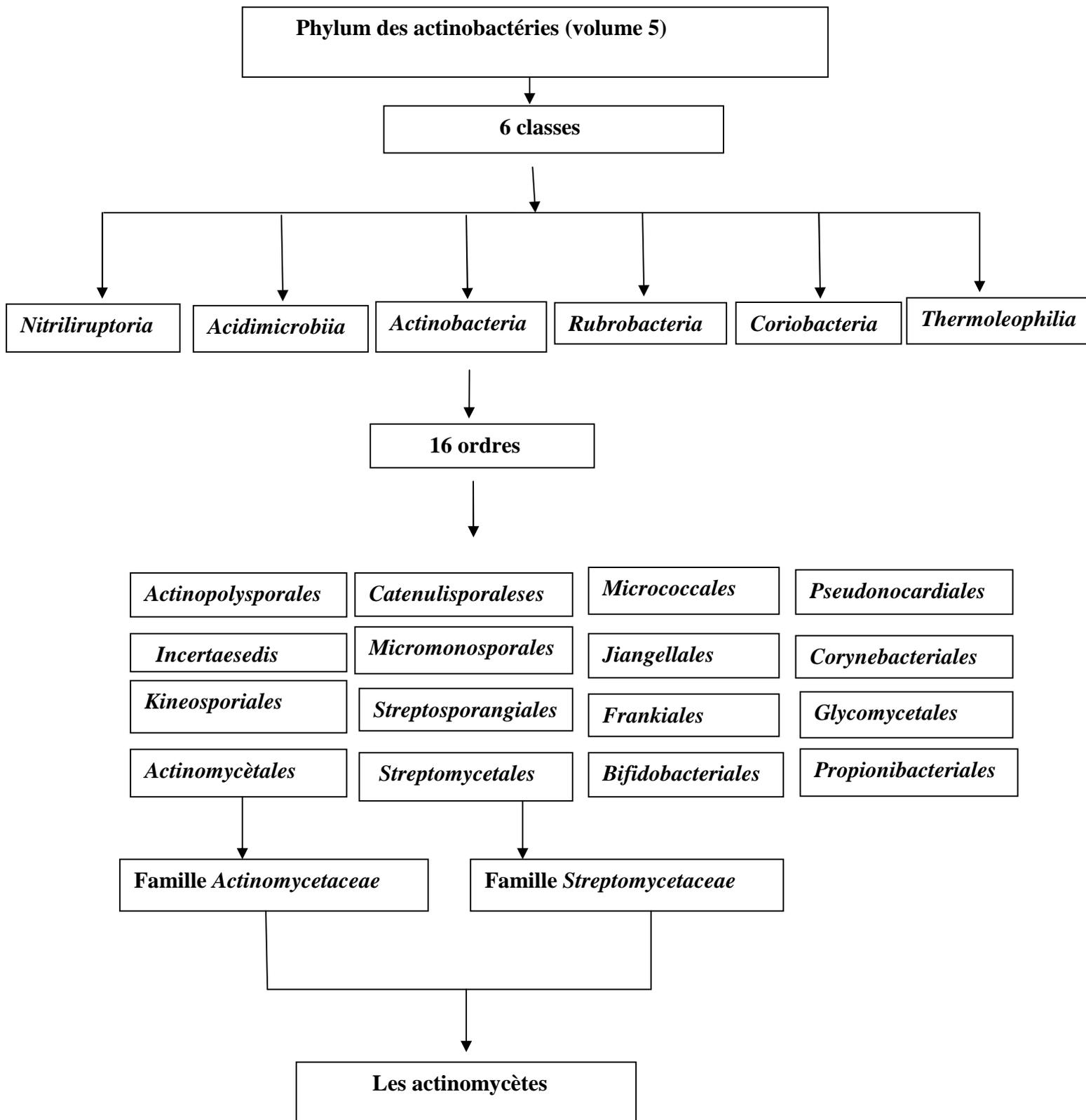


Fig. 3: Diagramme de la classification des actinomycètes selon le “Bergey’s Manual de systématique et de la classification en Bactériologie” (Goodfellow et al., 2012).

4-L'isolement

Au cours de ces dernières années, l'isolement des actinomycètes du milieu marin s'est développée afin de découvrir de nouveaux métabolites bioactifs (**Hughes et al., 2009; Gartner et al., 2011**). Et les techniques d'isolement peuvent être très importantes pour la réussite de la culture de ces microorganismes. Bien que certaines des méthodes d'isolement des actinomycètes à partir des échantillons terrestres sont utilisés pour isoler leurs homologues marins, différentes approches pour atteindre les différentes espèces sont à l'essai dans plusieurs projets de recherches.

4-1- Echantillonnage et prélèvement

Le développement de dispositifs autonomes de prélèvement d'échantillons de sédiments à des profondeurs jamais atteintes a permis l'accès à de nombreuses niches écologiques inexploitées et par conséquent à des petites nouvelles molécules biologiquement actives.

4-2-Le prétraitement

Les sédiments et les éponges sont les échantillons marins les plus étudiés pour l'isolement des actinomycètes. L'échantillonnage loin de la côte permet d'éviter l'isolement des actinomycètes terrestres provenant du ruissellement (**Fenical et Jensen, 2006**). Les échantillons de sédiments ou de boues sont dilués avec de l'eau distillée, eau de mer stérile ou avec une solution de Ringer diluée au quart (**Bredholdt et al., 2007**) et ensuite transférés dans des boîtes de Pétri après avoir été vortexés ou agités (**Jensen et al., 1991**). Cependant, différentes applications de prétraitement ont été utilisées par plusieurs chercheurs en particulier, le séchage dans une hotte à flux laminaire, la dilution avec l'eau de mer et chauffage avant l'inoculation (**tableau III**). Ces prétraitements inhibent la croissance des genres non recherchés et stimulent la germination des spores d'autres genres appartenant aux actinomycètes.

Tableau III : Différentes méthodes de prétraitement pour isolement sélectif des actinomycètes marins (Uzel *et al.*, 2012).

Prétraitement des sédiments	La référence
Mécanique	
-Agiter avec des billes en verre pendant 1 h dans un tube à hémolyse.	Maldonado <i>et al.</i>, 2009
Physique	
Séchage	
-Séchage sous hotte à flux laminaire, estampillage.	Gontang <i>et al.</i>, 2007
-Séchage sous hotte à flux laminaire, dilutions.	Jensen <i>et al.</i>, 2005
Chauffage	
-Dilutions, incubation au bain Marie (50 °C, 60 min).	Jensen <i>et al.</i>, 1991
-Incubation au bain Marie à 55 °C pendant 6 min.	Mincer <i>et al.</i>, 2002; 2005
-Dilution, Incubation au bain Marie à 55 °C pendant 6 min.	Jensen <i>et al.</i>, 2005
-Dilution, Incubation au bain Marie à 55 °C pendant 6 min et à 60 °C, 10 min.	Jensen <i>et al.</i>, 2005
-Echantillons séchés (speedvac 30 °C, 16 h), chauffage (120 °C, 60 min).	Bredholdt <i>et al.</i>, 2008
Congélation	
-Congélation (-20 °C, 24 h), décongélation, dilutions.	Jensen <i>et al.</i>, 2005

Tableau III : (suite)

-Congélation (-20 °C, 24 h), décongélation, dilutions, incubation à température ambiante pendant 48 h.	Jensen et al., 2005
-Congélation à (-18 °C).	Bredholdt et al., 2007
<i>Radiation</i>	
-Radiation UV pendant 30 s (distance 20 cm, 254 nm 15 W).	Bredholdt et al., 2007
-Radiation à très haute fréquence dans un four à micro-ondes pendant 45 s (2460MHz, 80W).	Bredholdt et al., 2007
-Radiation à fréquence extrême (1 kHz dans une bonde à une longueur d'onde de 8–11.5 mm).	Bredholdt et al., 2007
<i>Séchage et radiation</i>	
-Séchage à température ambiante pendant 14 jours, Séchage (55 °C, 30min), radiation au micro onde (80W30 s).	Eccleston et al., 2008
<i>Centrifugation</i>	
-Centrifugation différentielle.	Maldonado et al., 2005b
Physique et /ou chimique	
-Phénol (1.5%, 30 min à 30 °C) pour échantillon sec (speedvac 30 °C, 16 h).	Bredholdt et al., 2008
-Séchage à sec (120 °C, 60 min), phénol (1.5%, 30min à 30 °C) pour échantillon sec (speedvac 30 °C, 16 h).	Bredholdt et al., 2008
-Séchage à sec (120 °, 60 min) et chlorure de benzethonium (0.02%, 30min à 30 °C) pour échantillon sec (speedvac 30 °C, 16 h).	Bredholdt et al., 2008

4-3- L'enrichissement

Magarvey *et al.* (2004) ont décrit une nouvelle procédure d'enrichissement sélectif, à base de cellulose ou d'agar pour l'isolement des actinomycètes à croissance lente à partir d'échantillons de sédiments. Dans cette procédure, du papier Whatman N°1 coupé pour s'adapter à la boîte de Pétri est stérilisé, puis déposé sur des boîtes de gélose (NaST21Cx) et ensuite l'échantillon de sédiment est dispersé sur les surfaces du papier en cellulose.

4-4- L'isolement

Plusieurs méthodes sont utilisées pour réussir l'isolement des actinomycètes marins citant :

4-4-1-L'isolement par les méthodes classiques

Il est évident que l'élément le plus important pour la croissance des microorganismes autochtones du milieu marin y compris les actinomycètes est le sodium (Maldonado *et al.*, 2005). En effet, les milieux contenant différentes concentrations de l'eau de mer, eau de mer artificielle ou de l'eau déminéralisée complétée avec 3% de NaCl ont été utilisés avec succès pour cultiver les actinomycètes marins.

L'utilisation de l'amidon soluble, le glycérol, le mannitol et le raffinose comme sources de carbone et les sources d'azote telles que la peptone, l'extrait de levure, la caséine, le nitrate, l'histidine et L-asparagine dans les milieux de culture ont permis de réussir l'isolement des actinomycètes marins, de plus, l'extrait des sédiments, l'extrait des éponges et les extraits d'eau de mer naturelle ont également été utilisés seuls ou en complément afin de reproduire les conditions environnementales naturelles (Gontang *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2009).

En général, les milieux de culture les moins riches en éléments nutritifs sont les plus favorables pour un meilleur isolement des actinomycètes marins obligatoires provenant de différentes sources marines (Cho et Giovannoni, 2004 ; Gontang *et al.*, 2007).

➤ La technique de l'estampillage

Dans ce procédé, la teneur en humidité de l'échantillon est retirée par séchage sous une hotte à flux laminaire; l'échantillon est ensuite légèrement broyé avec un pilon et un mortier. Un écouvillon stérile qui contient une éponge ronde en fibre de polyester (2 cm de diamètre) est enfoncée sur l'échantillon séché et estampillé sur la surface de milieu de culture solide. Cet « étiquetage » est effectué en tapotant doucement la tige sur la surface d'agar. Un

D'autre part dans les méthodes d'enrichissement et d'isolement en culture pure, les microorganismes à croissance rapide ont souvent été source de contamination. Alors, au cours de la dernière décennie, des stratégies de culture innovantes ont été développées pour surmonter ces limitations parmi elles les stratégies HTC. En général, le succès des procédés HTC repose sur deux principes essentiels: en premier lieu ; les bactéries dans l'échantillon sont séparées et mises à incuber individuellement, ainsi, la répression de la croissance souches à croissance lente y compris les actinomycètes par les bactéries à croissance rapide peut être évitée. Deuxièmement ; les milieux de culture utilisés pour la croissance des bactéries sont des milieux pauvres en éléments nutritifs, ainsi, les bactéries qui ont besoin de faibles concentrations en nutriments et une période d'incubation longue auront une chance de se développer. Les techniques de HTC peuvent être classées comme indiqué ci-dessous.

➤ **Extinction de la culture**

Dans l'approche d'extinction de la culture, la charge microbienne est diluée à un nombre très petit allant d'une cellule à 10 par tube; ensuite, la croissance microbienne est estimé par cytométrie de flux (**Button et al., 1993**). **Connon et Giovannoni (2002)** ont développé le concept de culture en extinction en utilisant les matrices de cellules dans des microplaques. **Bruns et al. (2003)** ont entièrement automatisé cette approche en utilisant le système "MicroDrop@microdispenser" pour la détermination du nombre de bactéries cultivables. Avec cette technique, des échantillons d'eau naturelle ou des suspensions chargées en bactéries obtenues à partir d'échantillons de sédiments peuvent être divisés en volumes aussi petits que 170 pl par l'ajustement d'une bactérie dans un seul aliquote. En outre, l'inoculation de 96 échantillons en moins de 1 min sans passer par la dilution des échantillons initiaux, qui est un processus laborieux, est devenue possible.

Un inconvénient majeur de cette approche est que les bactéries à croissance rapide peuvent empêcher la croissance des bactéries à croissance lente en les étalant sur les boîtes de Pétri qui contiennent le milieu de culture ou par leur introduction dans les bouillons de culture, et il est difficile alors de cultiver les souches à croissance lente à partir d'échantillons naturels comme les sédiments et éponges, bien que les sédiments sont principalement colonisés par les bactéries à croissance lente.

Connon et Giovannoni (2002) ont apporté un degré d'innovation à ce concept en utilisant des milieux de culture de très faible concentration en éléments nutritifs dans les microplaques. Ainsi, les bactéries à croissance lente auront une chance de se développer dans un milieu à faible concentration en éléments nutritifs pour une incubation plus longue

périodes sans être réprimées par des bactéries à croissance rapide. Bien que seulement un petit nombre d'actinomycètes marins ont été obtenus en utilisant la méthode d'extinction de la culture cette dernière a suscité un intérêt scientifique.

➤ **L'encapsulation des cellules individuelles**

En 2002, **Zengler et al.** ont développé une technique qui combine l'encapsulation en parallèle des cellules environnementales contenues dans une culture microbienne chargée dans un gel en "microdroplet" (dans des conditions d'un flux en faible nutriments), suivie par une cytométrie de flux afin de détecter des microgouttelettes contenant les microcolonies.

Les cellules provenant de différents échantillons de l'environnement tels que l'eau de mer, les éponges et les sédiments marins sont concentrées par un gradient de centrifugation. Les cellules sont d'abord mélangées avec de l'agarose fondu puis émulsionnées avec de l'huile pour produire des microgouttelettes qui ont des diamètres variant entre 20 et 70 µm. La concentration cellulaire initiale est ajustée de sorte que la majorité de microgouttelettes qui contiennent une seule cellule soit un facteur critique (**Czechowska et al., 2008**).

Zengler et al. (2002) ont formé environ 10^7 microcapsules en utilisant de l'agarose et les microgouttelettes formées. Environ 10% d'entre-elles étaient occupés par une seule cellule. Les microgouttelettes ont été placées dans une colonne de chromatographie stérile équipée d'un filtre de 0,1 µm à l'entrée et un filtre de 8 µm à la sortie et contenant 25 ml de milieu.

Le milieu est pénétré dans la colonne de fermentation à travers un filtre de 0,1 µm et le filtre à la sortie permet le lavage de cellules sans vie (morte). Après un certain temps, la colonne ne contient que les microcapsules. Cette colonne peut être remplie avec un milieu de culture qui simule l'environnement naturel tel que l'eau de mer naturelle, éponges ou extraits de sédiments dilués, à partir duquel on recueille les cellules. (**Fig.5**).

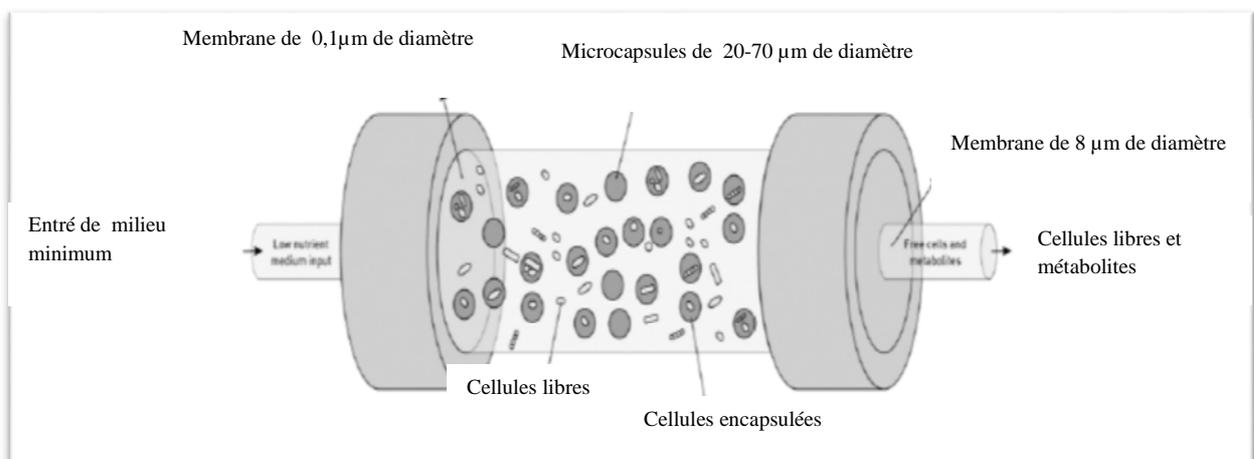


Fig. 5 : Illustration de l'utilisation d'encapsulation à haut débit pour la culture de microorganismes de l'environnement. (**Uzel et al., 2012**).

L'un des principaux avantages de cette approche est qu'elle permet aux espèces à croissance lente présentes dans les milieux naturels de former des microcolonies dans les microcapsules. Après une période d'incubation appropriée, les micro-organismes à croissance lente, qui restent dans les microcapsules, sont distingués de ceux à croissance rapide qui envahissent et éclatent la microcapsule en triant les cellules activées par fluorescence (FACS). De nombreux chercheurs ont suggéré que les interactions cellule-cellule sont également des facteurs importants pour les micro-organismes incultivables (**Zengler et al., 2002; D'Onofrio et al., 2010**). L'encapsulation sépare les cellules, mais elle permet à leurs métabolites de traverser les microcapsules; par conséquent, différentes microcolonies peuvent communiquer les unes avec les autres, comme en leur environnement naturel.

➤ **Chambres de diffusion, les pièges microbiens et puces d'isolement**

Un autre progrès récent est basé sur l'hypothèse que les micro-organismes non cultivables parmi eux les actinomycètes peuvent croître *in vitro* si les composants chimiques de leurs milieux naturels sont fournis.

Kaeberlein et al. (2002) ont rapporté que les micro-organismes ont besoin des signaux spécifiques de microorganismes voisins qui indiquent la présence d'un environnement favorable ou connu, alors des chambres de croissance spécialisées ont été conçues pour simuler l'environnement marin naturel de ces micro-organismes afin d'augmenter le taux d'isolement de cultures pures. Dans le cas des actinomycètes marins, les échantillons des sédiments sont dilués en série avec l'eau de mer, mélangés avec de l'agar et placés dans des chambres de diffusion. Ces dernières sont ensuite incubées dans un aquarium qui simule les conditions environnementales du site d'échantillonnage ou, quand c'est possible, les chambres sont placées dans le site d'échantillonnage naturel. Ainsi, 2 à 40% des cellules ont été inoculées, ce taux est beaucoup plus élevé par rapport à l'isolement en utilisant des méthodes de culture conventionnelles.

❖ **Les chambres de diffusion**

Sont conçues pour mettre les cellules dans leur environnement naturel en fournissant une incubation environnementale « *in situ* » qui est très similaire à leur habitat naturel (**Kaeberlein et al., 2002; Zhang et al., 2005**). Une membrane ayant des pores de taille 0,03- μm est collée à un côté d'une bague d'étanchéité en acier inoxydable; l'anneau est ensuite

rempli avec un inoculum de cellules de l'environnement et de l'agar chaud. Après solidification de la gélose, une seconde membrane scellée l'anneau de diffusion de côté opposé. Une fois que la chambre est assemblée, elle est ensuite placée dans le milieu d'échantillonnage ou dans un environnement simulée à l'endroit naturel dans le laboratoire. Les membranes ayant des pores de taille 0,03- μm permettent la diffusion des nutriments à partir du milieu (environnement) dans la chambre et la diffusion des métabolites vers le côté opposé (Lewis et al., 2010).

❖ Les pièges microbiens

Sont une autre version de chambres de diffusion qui sont spécifiquement destinées à la culture de micro-organismes filamenteux, en particulier les actinomycètes. Dans ce cas, une membrane ayant des pores de taille de 0,03 μm est collée d'un côté d'une bague d'étanchéité en acier inoxydable, et la chambre est remplie seulement avec l'agar stérile. L'étanchéité de l'autre côté est obtenue à l'aide d'une membrane à pore de taille de 0,2 μm qui permis aux filaments minces des actinomycètes de pénétrer dans la chambre au cours de l'incubation. Les actinomycètes peuvent passer à travers les pores de 0,2 μm , et ils peuvent pénétrer dans la chambre stérile après une période d'incubation de 2-3 semaines. Une fois que les microcolonies auront formé une tranche de gélose cette dernière est découpée à partir de la chambre et placée sur boîte de Pétri pour une subculture (Gavrish et al., 2008). Lewis et al. (2010) ont utilisé cette méthode pour analyser la terre d'un jardin. Ils ont constaté que la majorité des micro-organismes qui ont poussé dans les trappes sont des actinomycètes, dont certains représentent des espèces rares et inhabituelles. Étant donné que ce procédé est tout à fait nouveau, il n'est pas couramment utilisé dans les environnements marins, mais il peut être facilement adapté pour l'isolement des actinobactéries incultivables à partir des sédiments marins.

❖ Puces d'isolement

Les (iChip) sont une version plus sophistiquée de chambres de diffusion qui ont été introduites par Lewis et al. (2010). Les ichips consistent en des centaines de chambres de diffusion miniaturisés qui sont assemblées dans une partie, appelée l'unité centrale. Les membranes semi-perméables qui recouvrent l'unité centrale permettent la diffusion des nutriments dans les cellules et limitent le mouvement de ces dernières vers l'extérieur dans la chambre de diffusion. Deux panneaux de supports tiennent des deux côtés le système en même temps. Contrairement aux chambres de diffusion, l'iChip contient des centaines de

cellules d'un diamètre approximatif de 1 mm. La dilution initiale des micro-organismes isolés à partir d'un environnement tel que les sédiments marins est ajustée à une concentration précise de sorte que chaque cellule de l'iChip contient une cellule en moyenne. **Nichols et al. (2010)** ont récemment comparé l'iChip et les boîtes de Pétri classiques pour l'isolement des bactéries d'eau de mer et du sol. Ils ont obtenu plus de 40% et 50% d'isolats à partir d'eau de mer et du sol, respectivement, et les transferts répétés des isolats à travers les chambres typiques conduit à la capacité des cellules à se développer durablement dans des boîtes de Pétri. Cela signifie qu'une fois une bactérie incultivable est cultivée dans une chambre d'isolement, il est alors possible de la cultiver en boîte de Pétri classique. Il est intéressant de signaler que **Nichols et al. (2010)** ne pouvaient pas isoler des actinobactéries avec le iChip. Cela est probablement dû à la période d'incubation limitée utilisée, (à savoir deux semaines).

4-4-3- La méthode de co-culture

Parmi toutes ces méthodes, la co-culture a fait ses preuves qu'elle est la méthode la plus largement utilisée pour la culture de micro-organismes rares et non cultivables. Récemment, **D'Onofrio et al. (2010)** ont décrit expérimentalement le succès des méthodes de co-culture sur la culture de bactéries non cultivables. En bref, des paires de colonies distantes de 2 cm les unes des autres ont été sélectionnées à partir des boîtes très chargées (50-200 colonies par boîte) et sont ré-étalées à proximité les unes des autres. Chacun des deux isolats est étalé sur une moitié d'une plaque et en croix-striés par le centre de la boîte.

Le résultat était des régions proximales, distantes, ou chevauchantes. En utilisant cette méthode, une bactérie marine incultivable *Maribacter polysiphoniae* a été isolée en présence de la souche de *Micrococcus luteus* qui a été isolé du même environnement. Ceci est due au fait que certains micro-organismes non cultivables ne peuvent se développer sur une boîte de Pétri qu'en présence d'autres espèces du même environnement via la syntrophie (**D'Onofrio et al., 2010**).

4-5-L'approche moléculaire pour la recherche des actinobactéries marines

La présence des actinobactéries autochtones a été confirmée par des études d'approche moléculaire (les cultures indépendantes) (**Sun et al., 2010**). Ces méthodes de culture indépendantes utilisent l'extraction directe des acides nucléiques des échantillons (**Mincer et al., 2005**). Elles impliquent souvent l'amplification d'ADN ou d'ADNc à partir d'ARN extrait

à partir d'échantillons de l'environnement par PCR et l'analyse subséquente de la diversité des molécules amplifiées (communauté d'empreintes digitales) (Bull et al., 2005). Les produits amplifiés peuvent être clonés et séquencés pour identifier et dénombrer les nouvelles ou rares actinobactéries présentes dans les échantillons (Riedlinger et al., 2004). Monciardini et al. (2002) ont élaboré des ensembles d'amorces pour l'amplification par PCR sélective d'ADNr 16S de familles d'Actinomycetales : *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Streptosporangiaceae* et *Thermomonosporaceae*, et du genre *Dactylosporangium*. Chaque jeu d'amorces, évalué sur l'ADN génomique à partir de souches de référence, a montré une forte spécificité et une bonne sensibilité. L'application de ces amorces d'échantillons environnementaux a permis l'apparition fréquente de ces groupes d'actinobactéries.

Une méthode avancée est le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (**T-RFLP**), le polymorphisme de mesure de taille des fragments de restriction terminaux à partir d'un marqueur amplifié par PCR (Wawrik et al., 2005). Il combine au moins trois technologies, y compris la génomique comparative RFLP, la PCR et l'électrophorèse. De plus, une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) et en TGGE (GES thermique) sont des méthodes par lesquelles des fragments d'ADN de la même longueur mais de différentes séquences peuvent être résolus par électrophorèse (Wawrik et al., 2005). La séparation est basée sur l'électrophorèse des ADN double brin partiellement dénaturé et dont la mobilité est réduite dans des gels de polyacrylamide contenant un gradient linéaire d'un réactif dénaturant ou un gradient de température linéaire. La **PCR-DGGE** a été largement utilisée pour déterminer la diversité de la communauté des actinobactéries dans les échantillons environnementaux (Nimnoi et al., 2010).

5- La répartition et la diversité des actinomycètes dans le milieu marin

5-1-La répartition

Dans le milieu marin, deux localisations ont été distinguées: la zone littorale et côtière et la zone des sédiments de fonds marins. Il a été constaté que la population des actinobactéries ainsi que d'autres micro-organismes est plus dense dans la mer peu profonde qu'en mer profonde (Weyland, 1969), cependant, des études récentes ont confirmé que les actinimycetes sont largement distribués dans les différents habitats marins. En effet, les deux méthodes de cultures : dépendantes et indépendantes ont montré que les actinomycètes marins sont omniprésents dans les sédiments marins (Maldonado et al., 2005; Jensen et al., 2005a) et

sont présents sur toute la gamme de profondeurs océaniques (**Madrid et al., 2001**), de la surface des océans, comme dans le littoral et les environnements inter-marée, jusqu'à dans l'abîme le plus profond, comme les sédiments sous-sol (**Parkes et Wellsbury, 2004**), et dans les fonds océaniques pour les récifs coralliens, et en symbiose avec les invertébrés et les plantes (éponges et algues). Sachant que les sédiments des océans profonds contiennent plus de 1 milliard de cellules /cm³ (**Fenical et Jensen, 2006**), **Bull et al. (2005)** ont montré que les Actinobactéries comptent jusqu'à 9% dans les sédiments marins. Cette répartition des actinomycètes dans l'environnement marin est influencée principalement par des paramètres environnementaux qui sont ; la pression, la température, les concentrations de nutriments et la salinité (**Tableau IV**).

Tableau IV : La répartition des actinobactéries cultivables dans les sédiments marins (**Bull et al., 2005**).

Profondeur (m)	Actinobactéries (%)			
	Weyland (1981)	Goodfellow et Haynes (1984)	Takizawa et al. (1993)	Colquhoun et al. 1998)
0–200	0,06–6,0	0,04–2,0	0,2–9,0	
200–2000	0,1–17 (60a)			<0,01–0,4 (65b)
2000–6000	4,7–14 (26c)	0		0–0,8
>6000		0,8		0–0,5

a: Océan Atlantique Nord. b: Fosse Okinawa c : Golfe de Gascogne

5-2-La diversité

Des études de cultures indépendantes ont montré que les sédiments marins contiennent une grande diversité d'actinomycètes et de nombreux taxons uniques sont très différents de leurs homologues terrestres (**Gontang et al., 2007**).

Ainsi, cette diversité énorme constitue une portée immense pour la découverte de nouveaux métabolites bioactifs. Cependant, la distribution des actinomycètes dans la mer est largement inexplorée et la présence de actinomycètes marins autochtones dans les océans reste insaisissable (**Lam, 2006**).

Les représentants des genres *Micromonospora* et *Streptomyces* sont largement abondants dans les écosystèmes aquatiques et l'emportent souvent sur les autres groupes d'actinomycètes (Terkina et al., 2006), en effet, un grand nombre de *Micromonospora*, , peut être isolée à partir des sédiments lacustres autant que 10-50% de la population microbienne totale .

Dharmaraj (2010) a examiné en détail la diversité des genres d'actinomycètes marins et leur potentiel bioactif. Les genres d'Actinobactéries représentatifs d'aires marines comprennent *Actinomadura*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Marinophilus*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Williamsia*, *Verrucosipora* et plusieurs autres. Ces derniers, diffèrent largement dans leur morphologie, physiologie, et leurs activités biochimiques de leurs homologues terrestres.

❖ Les actinomycètes marins obligatoires

Le genre *Salinispora*, un actinomycète marin obligatoire a été rapporté en 2005 (Maldonado et al., 2005), cette découverte a été suivie par la découverte d'autres genres tels que *Demequina*, *Lamerjespora*, *Serinicoccus*, *Marinactinospora* et *Sciscionella* qui semblent être des microorganismes marins obligatoires (Subramani et Aalbersberg, 2012).

6-Rôle des actinomycètes en milieu marin

Les Actinomycètes ont un rôle multiple dans le milieu marin (Das et al., 2006). L'activité cellulolytique des actinomycètes marins a été décrite par Chandramohan et al. (1972), les actinomycètes chitinolytiques ont été signalés par Pisano et al. (1992) et diverses enzymes importantes dans la production industrielle sont produites par des actinomycètes (Ramesh et Mathivanan, 2009). Ces dernières sont également signalées comme pouvant contribuer au recyclage des composés organiques (Goodfellow et Haynes, 1984). En outre, ils jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, de fixation d'azote, l'amélioration des paramètres physiques et enfin de la protection de l'environnement (Das et al., 2006).

Chapitre II : Les métabolites bioactifs des actinomycètes marins

Les actinomycètes sont sans doute les micro-organismes les plus grands producteurs de métabolites secondaires ayant des activités biologiques. Parmi les métabolites microbiens connus, 45% (environ 10,000 composés) ont été extraits à partir de différentes espèces d'*Actinomycetales* dont 75% provenaient de genre *Streptomyces* et 25% l'étaient à partir d'actinomycètes rares (Berdy, 2005).

1-Généralités sur les métabolites bioactifs

Les métabolites bioactifs sont des produits du métabolisme primaire et secondaire de différents organismes (plantes, animaux, champignons, bactéries). Ils font souvent preuve d'une activité biologique (Demain et Sanchez, 2009). Les métabolites secondaires ont des structures chimiques différentes et inhabituelles, et sont souvent de faible masse moléculaire (Donadio et al., 2002), contrairement aux métabolites primaires, ils ne jouent aucun rôle dans le cycle de vie des cellules. Ils ne sont pas nécessairement exprimés en continu (Demain et Fang, 2000) et leur absence n'entraîne pas une mort immédiate, ou peut-être aucun changement significatif ne sera observé (Demain, 1992). Les métabolites secondaires sont souvent limités à un nombre restreint d'espèces au sein d'un groupe, en effet ils sont caractéristiques des groupes spécifiques d'organismes (Berdy, 2005). Les métabolites secondaires microbiens comprennent les antibiotiques, les pigments, les toxines, les phéromones, les inhibiteurs d'enzymes, les agents immunomodulateurs, les antagonistes, des pesticides, et des agents anti-tumoraux (Demain et Fang, 2000).

Les actinobactéries sont connues pour avoir la capacité de production d'une grande variété de métabolites secondaires. En effet, chaque souche d'actinobactéries est susceptible d'avoir le potentiel génétique pour la production de 20 à 30 métabolites secondaires (Lam, 2006; Medema et al., 2010).

2-La redécouverte des métabolites bioactifs

Il est important de discuter sur les raisons du taux élevé de redécouverte de composés antimicrobiens. Selon Stach (2010), les raisons sont susceptibles d'inclure des insuffisances dans les programmes de recherche tel que les limites de l'isolement dans la nature car plusieurs streptomycètes, isolés à partir de différents environnements, peuvent produire les mêmes composés connus, probablement en raison de l'échange génétique fréquent (Bredholdt et al., 2007).

Au cours de la dernière décennie, les chercheurs ont essayé plusieurs méthodes telles que le clonage (Peiru et al., 2005), l'expression hétérologue de groupes de gènes de biosynthèse, l'interférence avec les voies de régulation (Laureti et al., 2011), en faisant varier les conditions de culture (Sanchez et al., 2010), les co-cultures (Kurosawa et al., 2008), l'évolution adaptative (Charusanti et al., 2012) et d'autres stratégies (Baltz, 2011) et ce pour stimuler la production de nouveaux composés.

Les activités de screening précédentes semblaient se concentrer sur la diversité d'un nombre d'espèces limité, et ces quelques espèces produisent un certain nombre de composés communs. L'immense diversité de l'habitat marin et donc sa sous-exploitation attire les chercheurs pour découvrir de nouveaux producteurs de métabolites.

3- Les caractéristiques des métabolites bioactifs des actinomycètes marins

Plusieurs études décrivant des molécules biologiquement actives extraites d'actinomycètes marins ont été récemment publiées (Goodfellow et Fiedler, 2010; Mayer et al., 2011). En effet en 2008, plus de 1 000 métabolites d'origine marine ont été décrits (Blunt et al., 2010) dont plus de 30 composés sont en cours d'essais cliniques ou précliniques pour leur activités notamment anticancéreuses (Blunt et al., 2011).

Les métabolites marins montrent une forte diversité structurale et présentent un large éventail d'activités biologiques : antimicrobienne, contre les protozoaires, et les parasites (antipaludiques), et des anti-tumoraux (Manivasagan et al., 2013). La plupart des produits naturels dérivés d'actinomycètes marins possèdent des caractéristiques structurales uniques, rarement ou jamais trouvées parmi les composés extraits à partir des sources terrestres. Il n'est donc pas surprenant que leurs modes d'action moléculaires les sont parfois aussi. Ces derniers, peuvent servir de base pour la synthèse de nouveaux médicaments (Solanki et al., 2008).

Les lactames bicycliques inhabituels, Salinosporamides A et B (Fig .6) sont extraits à partir de *Salinospora*. La capacité des espèces du genre *Salinospora* pour produire de nouveaux métabolites secondaires peut être liée à leur adaptation aux conditions marines. Le salinosporamide A est un inhibiteur du protéasome, oralement actif qui induit une apoptose dans plusieurs cellules de myélome (Chauhan et al., 2005). Il est développé par Nereus Pharmaceuticals, Inc. (NPI- 0052) et a été prévu pour entrer en études cliniques pour le traitement du cancer chez l'Homme en 2006. Le salinosporamide B diffère de salinosporamide

A par le manque de chlore. Son activité est inférieure à celle du salinosporamide A par un facteur de 500.

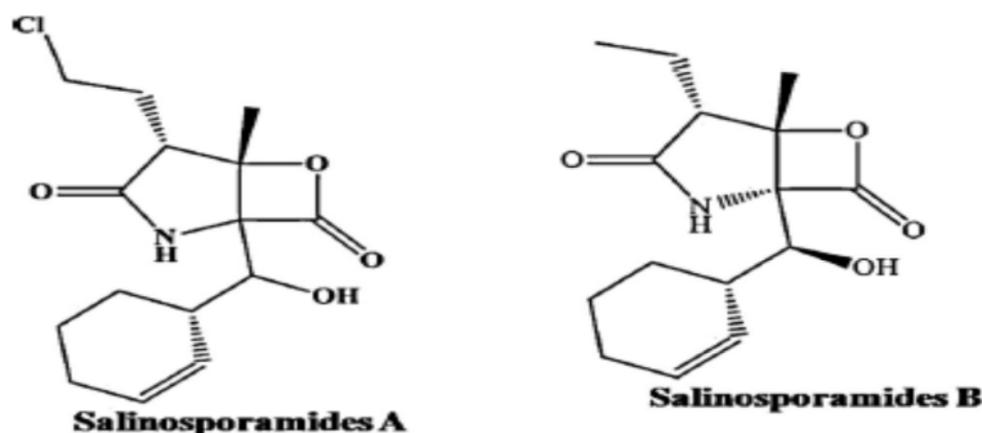


Fig. 6 : Structure chimique de deux lactames bicycliques inhabituels, salinosporamides A et B (Chauhan *et al.*, 2005).

4- Les genres d'actinobactéries producteurs de nouveaux métabolites bioactifs

Parmi les actinomycètes filamenteux, la majorité de métabolites sont produits par les espèces du genre *Streptomyces* (Lam, 2006). Cependant, les espèces des genres *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* et *Streptosporangium* semblent, de plus en plus, jouer un rôle important dans la production d'un large éventail de métabolites et d'antibiotiques antimicrobiens (Bull *et al.*, 2005; Lam, 2006).

Dans les environnements marins, les chercheurs ont trouvé de nouveaux genres de manière régulière telle que *Salinospora* et *Marinophilus* (Jensen *et al.* 2007). Les bactéries appartenant à ces genres produisent des composés qui peuvent être considérés comme des marqueurs chimiques. La capacité de ces deux genres à produire de nouveaux métabolites secondaires peut être liée à leur adaptation aux conditions particulières de l'environnement marin.

Parmi les genres d'actinomycètes marins rares, dicristis, les genres *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Actinoplanes* et *Micromonospora* ont été exploités comme une source prolifique de nouveaux métabolites secondaires (Dasari *et al.*, 2012). Toutefois les genres moins exploités concernent ; *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Kitasatospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Marinispora*, *Serinicoccus* et *Verrucosisporea*.

Ces impacts soulignent la nécessité de poursuivre les recherches dans ce domaine et les investissements dans les actinomycètes marins peuvent être considérés comme étant complètement justifiés.

5- Origines géographiques des métabolites bioactifs

La microbiologie marine se développe fortement dans plusieurs pays avec un accent particulier sur les composés bioactifs. L'origine géographique des composés et des extraits ayant des activités biologiques issus des espèces d'actinomycètes marins jusqu'en 2003 indique que 67% de produits naturels marins provenaient des sites d'Australie, des Caraïbes, de l'océan Indien, du Japon, de la Méditerranée, et de l'ouest de l'océan Pacifique (Blunt, 2007).

6-Classification des métabolites bioactifs

Les actinomycètes marins constituent une source importante de composés bioactifs (Colwell et Hill, 1992). Les conditions environnementales de la mer sont extrêmement différentes des conditions terrestres, alors ils produisent des métabolites uniques par rapport à ceux qui sont isolés des milieux terrestres (Lam, 2006). On les distingue comme suit :

6-1-Les antibiotiques

La plupart des antibiotiques sont des métabolites extracellulaires (Bode et al., 2002) et qui sont utilisés comme divers médicaments (Charoensopharat et al., 2010). Les actinomycètes marins sont connus pour produire différents types d'antibiotiques à savoir : des peptides ou des glycopeptides (Kimura et al., 1997), des angucyclinones (Sun et al., 2007), des tétracyclines (Hatsu et al., 1992), des phénazines (Maskey et al., 2003), des macrolides (Tanaka et al., 1998), des anthraquinones (Takahashi et al., 1988), des polyènes (Lemriss et al., 2003), des anthracyclines (Maeda et al., 1995), des bêtalactamines (Aoki et al., 1976), des piercidines (Hayakawa et al., 2007), des octaketides (Radzom et al., 2006), des benzoxazolophenanthridines (Doull et al., 1994), des heptadecaglycosides (Singh et al., 2000) et des lactones (Imai et al., 1987). Selon l'effet exercé, on distingue :

6-1-1-Les substances antibactériennes

La diminution de l'efficacité des antibiotiques et l'augmentation de la résistance des agents pathogènes ont imposé la nécessité de trouver de nouvelles alternatives (Ravikumar et al., 2010b). Pour remédier à ce problème, le développement de nouveaux médicaments

efficaces sans effets secondaires est urgent. Les actinomycètes marins sont ainsi largement étudiés pour leurs activités antibactériennes. La Caboxamycine est un nouvel antibiotique (benzoxazole) détecté par criblage HPLC- DAD dans des extraits de *Streptomyces sp.* NTK 937, une souche qui a été isolée à partir des sédiments du bassin des îles Canaries. La Caboxamycine a montré une activité inhibitrice contre des bactéries Gram-positives et contre plusieurs lignées de cellules tumorales (**Hohmann et al., 2009a**).

6-1-2-Les substances antifongiques

Beaucoup d'antibiotiques ont été isolés à partir de ces microorganismes; cependant, les études sont toujours en cours pour la recherche de nouveaux antibiotiques efficaces contre les champignons pathogènes (**Atlas et Bartha, 1986**). Les actinobactéries marines sont une source importante de substances antifongiques contre les champignons (**Okami et Hotta, 1988**). La souche marine *Streptomyces sp.* DA11 isolée du sud de la Chine, est une souche associée à une éponge *Craniella australiensis*, qui produit une chitinase ayant montré une activité antifongique contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans* (**Han et al., 2009**).

Le N (2-hydroxy-phényl) -2-phenazinamine (PSN) est un nouvel antibiotique isolé de *Nocardia dassonvillei*, qui possède une activité antifongique significative contre *C. albicans*, (**Gao et al., 2012**).

6-1-3-Les substances anticancéreuses

Le cancer reste l'une des maladies humaine les plus graves. Beaucoup de substances antitumorales incluses dans les médicaments sont produites par des actinobactéries marines (**Ravikumar et al., 2012a**). Des extraits purs de la souche marine *Salinispora tropica* ont montré des effets inhibiteurs de cellules malignes (**Prudhomme et al., 2008**) en particulier, le salinosporamide A (**Jensen et al., 2007**). L'accent est mis sur les actinomycètes marins rares pour leur capacité à produire des métabolites secondaires biologiquement actifs parmi eux les substances antitumorales (**Mayer et al., 2007; Williams, 2009**). Un grand nombre de polyketide de type I, composés, ayant une activité antitumorale ont été isolés à partir des actinomycètes marins.

6-1-4-Les substances cytotoxiques

La resistoflavine est un composé cytotoxique, extrait à partir de *Streptomyces chibaensis* AUBN1 / 7. Celui-ci a montré une activité cytotoxique contre un adénocarcinome gastrique humain HMO2 et de lignées cellulaires d'un carcinome hépatique HepG2 (**Gorajana et al., 2007**).

6-1-5-Les substances anti-inflammatoires

Les maladies inflammatoires sont la première cause de décès dans les pays tropicaux. Le taux de mortalité par ces maladies est aussi en augmentation dans les pays développés (Pinner et al.,1996). Jones et al. (2008) ont rapporté l'émergence de 335 maladies infectieuses entre 1940 et 2004. Ces tendances négatives sur la santé appelle à accorder plus d'intérêt à la prévention et au développement de stratégies efficaces de traitement de ces maladies. La Cyclomarine A est un antibiotique cyclique isolé de *Streptomyces* sp. qui possède une activité anti-inflammatoire à la fois dans des essais *in-vivo* et *in-vitro* (Renner et al., 1999).

6-1-6-Les substances antiparasitaires

Les substances anti-parasitaires sont une classe de médicaments indiqués pour le traitement des maladies parasitaires causées en particulier par *L. major* et *T. brucei* qui causent la leishmaniose et la maladie du sommeil africaine, respectivement. Un taux de mortalité alarmant causés par ces parasites et l'émergence de la résistance aux antibiotiques souligne la nécessité pour des médicaments nouveaux et efficaces.

Pimentel-Elardo et al. (2010) ont isolé *Streptomyces* sp. à partir d'éponges méditerranéennes. Trois composés cycliques ; valinomycine depsipeptidique, staurosporine alcaloïde indolocarbazole et buténolide ont été extraits et purifiés à partir de cette souche. Ces derniers présentent des activités anti-parasitaires contre ces deux parasites.

La malaria est causée par des parasites protozoaires intra-érythrocytaires du genre *Plasmodium*. Il est responsable de plus de 300 million de cas cliniques et plus de 2 millions de décès par an. *Plasmodium falciparum* qui cause la maladie la plus mortelle, est de plus en plus résistant presque à tous les médicaments disponibles dans la lutte anti-malaria (Reynolds et al., 2007).

Les trioxacarcines sont des composés complexes présentant une activité anti-paludique, antitumorale et antibactérienne. Les trioxacarcin A, B et C ont été obtenus à partir de *Streptomyces ochraceus* et *Streptomyces bottropensis* (Maskey et al., 2004). Certains de ces composés possèdent une activité antiplasmodiale extrêmement élevée, par comparaison à celle obtenue par l'artémisinine, qui est la molécule la plus active contre *P. falciparum*.

6-1-7-Les substances antivirales

Actuellement, il semble qu'il n'y a eu que peu de composés ayant une activité antivirale qui sont dérivés des actinomycètes marins. Le Ben-zastatin C, un alcaloïde 3-chloro-tetrahydroquinolone obtenu de *Streptomyces nitrosporeus*, a montré une activité antivirale contre le virus herpès simplex (HSV-1), et contre le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), respectivement (Lee et al., 2007).

6-2-Les substances antioxydantes

Une substance antioxydante est toute substance qui retarde ou qui empêche la détérioration, le dommage ou la destruction par oxydation (Dekkers et al., 1996). Il s'agit de plusieurs substances organiques, y compris les vitamines C et E, A et le sélénium, un groupe de composés connu sous le nom de caroténoïdes (Dekkers et al., 1996 ; Kaczmarek et al., 1999). Les Dermacozines AG sont de nouveaux pigments de type phenazines réduites ou oxydées de *Dermacoccus* isolé de sédiments de (10898 m de profondeur) de la Mariana Trench (Pathom-Aree et al., 2006). La Dermacozine G dispose d'une activité cytotoxique modérée contre des lignées cellulaires K562 responsable de la leucémie et ce comme piègeur de radicaux de ces cellules (Abdel-Mageed et al., 2010).

6-3-Les enzymes

Les actinobactéries marines ont un large éventail d'activités enzymatiques et sont capables de catalyser diverses réactions biochimiques (Das et al., 2006). Différentes enzymes commerciales ont été obtenues à partir de ces bactéries à savoir :

6-3-1-Les amylases

Les enzymes amylolytiques sont actuellement étudiées pour améliorer les processus industriels de dégradation de l'amidon. Chakraborty et al. (2012) ont isolé une souche de *Streptomyces* (souche A3) d'un environnement marin productrice d'une 'alpha-amylase stable ion calcium- indépendante et qui est en même temps un agent tensioactif qui a des applications étendues comme détergent et en industrie pharmaceutique.

6-3-2-Les protéases

Plusieurs études ont été faites sur les enzymes protéolytiques d'actinomycètes mésophiles (Boeckle et al., 1995). Ramesh et al. (2009) ont isolé des actinobactéries de sédiments marins qui produisent des caséinases, des gélatinases et des protéases.

6-3-3-Les cellulases

Les enzymes nécessaires pour l'hydrolyse de la cellulose comprennent les endoglucanases, exoglucanases et beta -glucosidases (Matsui et al., 2000). Les

endoglucanases hydrolysent la cellulose de manière aléatoire et produisent alors des oligosaccharides, le cellobiose et le glucose, alors que les exoglucanases hydrolysent des liaisons -1,4-D-glucosidiques dans la cellulose libérant du cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice. **Murugan et al. (2007)** ont isolé 35 souches marines d'actinomycètes et ont été étudiées pour leur activité cellulasique.

6-3-4-Les chitinases

Les chitinases sont produites par de nombreux organismes, tels que les virus et les bactéries (**Gooday, 1990**). Elles hydrolysent les liaisons 1,4 en chitine, ce qui donne essentiellement du N, N-diacétylchitobiose, qui est ensuite dégradé par les N-acétylglucosaminidases en monomères GlcNAc (**Tsujibo et al., 2003**). En outre, les chitinases ont un potentiel antifongique à travers leur activité de dégradation de la chitine (**Mathivanan et al., 1998**). Parmi les actinobactéries, le genre *Streptomyces* est le mieux étudié pour ses chitinases (**Miyashita et al., 1991**).

6-3-5-les xylanases

Le xylane, est le composant dominant de l'hémicellulose, est l'une des substances organiques les plus abondantes sur terre. Il a une grande application dans l'industrie des pâtes à papiers (**Chen et al., 1997**). Le bois utilisé pour la fabrication de la pâte est traité à température élevée et à pH basique, ce qui implique que les procédures enzymatiques nécessitent des protéines présentant une haute stabilité thermique et une activité dans un large intervalle de pH (**Georis et al., 2009**). Le traitement avec les xylanases à des températures élevées perturbe la structure de la paroi cellulaire. Ceci, par conséquent, facilite l'élimination de la lignine au cours des différentes étapes de blanchiment. Les xylanases pour un tel but doivent manquer d'activité cellulytique pour éviter l'hydrolyse des fibres de cellulose, avoir une faible masse moléculaire pour faciliter leur diffusion dans la pâte des fibres, et le plus important, des rendements élevés de l'enzyme doivent être obtenus à un coût très faible (**Niehaus et al., 1999**).

6-4-Les inhibiteurs enzymatiques

Les actinobactéries marines sont une source potentielle de production d'inhibiteurs d'enzymes (**Imada et al., 2005**), tel que , la glucosidase, la Nacetyl- β -D-glucosaminidase, la pyroglutamyl peptidase, l'alpha-amylase. **Raja et al. (2010)** ont isolé 17 souches d'actinobactéries à partir des sédiments marins de la rhizosphère des mangroves et ont signalé leur production d'inhibiteur de l'amylase.

6-5-Les probiotiques

Quoi qu'ils soient la source de plusieurs nouveaux antibiotiques, les espèces de *Streptomyces* marines ont reçu moins d'attention comme probiotiques dans l'aquaculture. **You et al.(2005)** ont décrit le potentiel de *Streptomyces* contre le pathogène des crevettes *Vibrio spp.* et ont recommandé que les souches *Streptomyces* marines ont un potentiel probiotique en raison de leur capacité à dégrader les macromolécules comme l'amidon et des protéines en culture d'eau de l'étang, pour produire des agents antimicrobiens et à former des spores qui résistent à la chaleur et dessiccation. **Das et al.(2006)** ont rapporté une étude préliminaire sur l'utilisation de *Streptomyces* incorporé dans l'aliment en tant que source probiotique pour la croissance des crevettes. **You et al.(2007)** ont rapporté l'activité de *Streptomyces* marins comme microorganismes potentiels contre la formation des biofilms produits par *Vibrio spp.* Il est à noter que malgré l'existence de tous les éléments importants d'une bonne probiont, les actinobactéries sont à peine utilisés comme probiotiques dans l'aquaculture (**Das et al., 2008, 2010; Suguna, 2012**).

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes

1- Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances bioactives

1-1- Origine et prélèvement des échantillons

L'isolement des souches d'actinomycètes marines a été réalisé à partir d'échantillons de sédiments marins prélevés durant les mois de Mai, Juin et Juillet 2013 de quatre sites du littoral de la côte Ouest de la wilaya de Bejaia. Cette opération s'est faite avec la contribution des plongeurs de la protection civile. Il s'agit des plages de Tazeboujth à des profondeurs de 50cm, 5m, et 10m, de Saket à des profondeurs de 50cm et 8m, de Cap Sigli à des profondeurs de 7m et 10m et du port de pêche Tala yelef à une profondeur de 6m (**tableau V**).

La méthode de prélèvement consiste à racler des sédiments marins avec une spatule stérile à partir de chacune des profondeurs citées et les mettre dans des récipients (préalablement stérilisés et codés), ceux-ci ils sont refermés in situ.

Les échantillons prélevés ont été transportés au laboratoire LMA en une durée n'excédant pas 4 heures. Ces derniers ont été utilisés pour l'isolement des actinomycètes selon différentes méthodes.

Tableau V : Caractéristiques physicochimiques des sédiments marins prélevés.

Site de prélèvement	N°d'échantillon	les paramètres				
		Profondeur (m)	T (°C)	pH	Richesse apparente en matière organique (*)	Date de prélèvement
Tazeboujth	1	0,50	20	8,00	++++	10 mai 2013
	2	05	20	8,00	++++	
	3	10	20	7,98	++++	
Saket	4	0,50	22	7,35	+++++	09 juin 2013
	5	8	22	7,58	+++++	
Cap Sigli	6	7	22	7,56	+++++	13 juillet 2013
	7	10	22	7,18	+++++	
Le port de pêche (Thala Yelef)	8	6	21	7,90	++	22juillet 2013

(*) : Présence de débris végétaux et d'organismes marins. (+) : appréciation visuelle.

1-2- Les méthodes et les milieux de culture utilisés pour l'isolement

Les échantillons de sédiments marins prélevés ont été traités chacun suivant les méthodes 1, 2, 3, 4, et 5 retenues selon les recommandations d'Uzel *et al.* (2012), **tableau XI (annexe I)** qui a dressé une liste des milieux de culture utilisés avec succès pour l'isolement d'actinomycètes marins.

La méthode 1 : Technique d'estampillage

Dans ce cas, 10 ml de chacun des sédiments humides sont séchés sous une hotte à flux laminaire ensuite, ils sont légèrement broyés avec un pilon et un mortier. Un écouvillon stérile qui contient une éponge ronde en fibre de polyester (2 cm de diamètre) est enfoncé sur l'échantillon séché et estampillé sur la surface de milieu de culture solide. Cet « étiquetage » est effectué en tapotant doucement le même écouvillon sur la surface de la gélose donnant un effet de dilution en série (**Fig.4**) (Mincer *et al.*, 2002 ; Gontang *et al.*, 2007) . Les milieux d'isolement utilisés sont M1, M2, et M3 (Amayaly *et al.*, 2012) , NPS, NRS, SMP (Jensen *et al.* , 2005a), et le milieu M2 (Mincer *et al.*, 2002).

La méthode 2 : Dilutions suivies par un traitement thermique modéré

Dans cette méthode, plusieurs dilutions ont été réalisées, différents milieux d'isolement ont été utilisés et différents traitements thermiques ont été appliqués :

- **Approche 1** : Selon Amayaly *et al.*(2012), des dilutions décimales de chacun des sédiments marins sont réalisées jusqu'à 10^{-3} . Ces dilutions sont incubées à l'étuve à 55°C pendant 5 min pour favoriser la germination des spores et donc l'augmentation du taux de récupération des actinomycètes, puis 0,1 ml de chaque dilution sont inoculés en surface de chacun des milieux M1, M2, et M3 (Gontang *et al.*, 2007).
- **Approche 2** : Selon Jansen *et al.*.(2005a), chacun des sédiments secs est ajouté à de l'eau de mer stérile (dilutions 1: 3 et 1: 6), chauffé à l'étuve à 55°C pendant 6 minutes, puis des volumes de 50µl et 75 µl sont prélevés successivement de chacune des dilutions précédentes puis inoculés à la surface des milieux de culture gélosés suivants : NPS,NRS,SMP et étalés avec un râteau étaleur stérile.

- **Approche 3 :** Selon **Mincer et al.(2002)** ,1ml de chacun des sédiments humides est ajouté à 4 ml d'eau de mer stérile, chauffés pendant 6 min à 55 ° C à l'étuve , vortexés vigoureusement, et dilués une deuxième fois à quart (1: 4) dans de l'eau de mer stérile, puis 50µl de chaque dilution sont inoculés par étalement avec un râteau étaleur sur le milieu d'isolement M2.

La méthode 3: Par dilutions sans traitement

On distingue dans ce cas trois approches qui sont :

- **Approche 1 :** 0,5 g de chacun des sédiments séchés a été dilué avec 5 ml d'eau de mer stérile . La suspension obtenue est vortexée, et laissée pour décanter pendant 10 minutes, puis 50 µl de cette dernière sont inoculés et étalés à la surface des milieux de culture gélosés : NPS, NRS, SMP (**Jensen et al, 2005a**).
- **Approche 2 :** Selon **Poosarla et al. (2013)**, l'isolement des actinomycètes est réalisé par la technique des dilutions et ensemencement sur boîtes Pétri, en utilisant le milieu SCA (Starch,Caseine,Agar) (**Ellaiah et al., 1996**).1 g de chaque sédiment marin est ajouté à 50 ml d'eau de mer (à 50 %), stérile contenue dans des Erlenmeyers de 250 ml, puis mis sur un agitateur rotatif pendant 30 min pour détacher les chaînes de spores. Les suspensions ainsi obtenues sont mises à décanter pendant 15 min afin de permettre aux particules en suspension de se sédimenter puis elles sont diluées en série jusqu'à 6 fois.1 ml de chacune de ces dilutions est ajouté aux 50 ml de milieu en surfusion (45°C) ; bien mélangé et versé rapidement dans des boîtes de Pétri.
 - **Approche 3:** Selon **Sudha et al. (2012)**, 1 g de chaque sédiment marin est ajouté à 99 ml d'eau de mer (à 50 %), stérile puis une série de dilutions décimales est effectuée. 100µl de chaque dilution sont ensemencés dans une boîte de Pétri contenant le milieu SCA en surfusion (45°C).

La méthode 4 : Avec enrichissement

Environ 50 mg de chacun des sédiments humides sont utilisés pour inoculer une boîte Pétri contenant la gélose NaST21Cx, en effet ce milieu est utilisé comme milieu d'enrichissement. Des disques en papier Whatman (N°1) stériles, prédécoupés pour les adapter à la surface de la boîte de Pétri sont placés sur la gélose, et les sédiments sont dispersés chacun de façon uniforme sur les surfaces des disques de cellulose. Après

incubation, les colonies sélectionnées sont repiquées sur le milieu ISP2. (Magarvey et al., 2004).

La méthode 5 : Avec traitement antibiotique (antifongique)

1g de chaque sédiment est mélangé avec 10 ml d'eau de mer stérile. Une série de dilutions décimales sont réalisées puis 100 µl de chaque dilution sont ensemencés sur une boîte de Pétri contenant chacune le milieu M2. Ce dernier est supplémenté avec 1% d'extrait de sédiment préparé en broyant 20 g de chaque sédiment dans un mortier contenant 20 mL d'eau de mer stérile; l'homogénat est filtré à travers de la gaze, stérilisé pendant 15 min à 121°C et centrifugé pour récupérer le surnageant qui sert comme extrait de sédiment. Dans ce cas les bichromates de potassium ($K_2Cr_2O_7$) sont ajoutés au milieu à une concentration finale de 50µg /ml. Le $K_2Cr_2O_7$ joue le rôle d'un inhibiteur de la croissance fongique (Zhang et al., 2006).

1-3- Purification et conservation des isolats

La purification et la conservation des isolats d'actinomycètes pures (à 4°C) ont été effectuées sur les mêmes milieux de culture utilisés pour l'isolement.

Remarque :

- Le pH des milieux de culture utilisés pour l'isolement est ajusté à 8 afin de pouvoir isoler des actinomycètes alcalophiles et leurs compositions chimiques sont données en (annexe I).
- Chaque ensemencement est effectué sur 3 boîtes du milieu d'isolement correspondant.
- Les actinomycètes apparaissent généralement après 2 à 6 semaines d'incubation à 28 °C et sont considérés comme toutes colonies avec une texture dure, aspect sec ou plié, incrustée dans la gélose et présentant des filaments ramifiés de substrat avec ou sans mycélium aérien.
- Les isolats sont codés par référence aux sites d'isolement, à la profondeur, et au nom du milieu de culture utilisé.

2-Mise en évidence de l'activité antibiotique, et enzymatique des isolats sur milieu solide

Parmi les isolats obtenus, seules seront retenues (raison de chronophagie), pour les tests d'activité, ceux qui ont un temps d'incubation inférieur ou égal à 15 jours (02 semaines).

2-1- Mise en évidence de l'activité antibactérienne

2- 1-1-Les bactéries cibles

Les isolats retenus sont testés pour leurs activités antibactériennes vis-à-vis des bactéries cibles suivantes : (entre parenthèses : la provenance des souches).

- **Bactéries à Gram positif**

-*Staphylococcus aureus* ; ATCC25923 (LMA)

- SARM ; ATCC43300 (Institut Pasteur d'Algérie)

-*Listeria innocua* ; CLIP 74915 (LMA)

-*Bacillus subtilis* ; ATCC 6633 (SAIDAL Antibiotical d'Alger)

- **Bactéries à Gram négatif**

-*Escherichia coli* ; ATCC 25922 (LMA)

-*Klebsiella pneumoniae* ; ATCC 700603 (Institut Pasteur d'Algérie)

-*Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC 27853 (Institut Pasteur d'Algérie)

- *Enterococcus faecalis* ; (CHU Khellil AMRANE de Bejaia)

-*Proteus sp.* ; (CHU Khellil AMRANE de Bejaia)

- ❖ **La standardisation des inocula bactériens**

Après leurs revivifications, une culture de 18h dans des tubes de 5ml de bouillon nutritif incubée à 37°C à été réalisée pour chacune des bactéries cibles citées précédemment, ces cultures sont considérées comme des solutions mères. Une série de dilutions décimales dénombrées chacune sur trois boîtes de milieu GN (incubation à 37°C pendant 24h) a été effectuée pour chacune des cultures précédentes. Les valeurs d'absorbances correspondantes aux dilutions ayant le nombre de 10^7 UFC/ml (spectrophotomètre Shimadzu UV mini. 1240) pour chacune des souches ont été retenus pour préparer des cultures de 18h qui ont servi pour le test d'activité (Billerbeck et al., 2002).

2-1-2-Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Muller Hinton selon **Bastide et al. (1986)**. Ce test consiste à ensemencer les isolats à tester sur leurs milieux de culture appropriés et incubés à 28°C pendant une à deux semaines selon les isolats tests. Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte pièce à partir de ces milieux et déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par la bactérie cible à raison de 10⁷UFC/ml. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 37°C à l'aide de pied à coulisse.

2-2-Mise en évidence de l'activité antifongique

Les isolats retenus sont testés pour leurs activités antifongiques vis-à-vis les champignons cibles suivantes :

2-2-1-Les germes cibles

- **Moisissures**

Aspergillus niger ; 939N (ENS-Kouba,Alger)

Aspergillus carbonarius ; (A731C) (ENS-Kouba)

Aspergillus faveus ; (NRRL) (ENS-Kouba,Alger)

Aspergillus ochraceus ; (NRRL3174) (ENS-Kouba,Alger)

Aspergillus parasiticus ; (CB5) (ENS-Kouba,Alger)

Mucor rammanianus ; NRRL 1829(ENS-Kouba,Alger)

Fusarium polyferatum ; (ENS-Kouba,Alger)

Botritis cinerea ; (Laboratoire de Mycologie)

- **Levure**

-*Candida albicans*: (CHU Khellil AMRANE,Bejaia)

❖ La standardisation des inocula des champignons

Les suspensions sporales des moisissures de 10^7 /ml dans l'eau physiologique utilisées pour le test d'activité antifongique ont été préparées suite à leurs dénombrement sur cellule de Malassez, (**Matan et Matan, 2008**) tandis que la standardisation pour la levure est effectuée comme pour les bactéries (**Billerbeck et al., 2002**).

2-2-2-Test d'activité antifongique

L'activité antifongique des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur de la gélose à l'extrait de malt selon **Patel et Brown, (1969)** pour les moisissures et sur de la gélose nutritive pour la souche de *Candida albicans*. Ce test est réalisé de la même façon que pour le test précédent (activité antibactérienne), en utilisant des suspensions sporales (10^7 spores/ml) pour les moisissures (**Matan et Matan, 2008**) et une suspension chargée de 10^6 UFC/ml pour la levure (**Billerbeck et al., 2002**). Les boîtes ensemencées ont été incubées aux températures appropriées pour chaque germe cible et les zones d'inhibition ont été mesurées après 24h d'incubation pour la levure et 48h pour les moisissures à l'aide de pied à coulisse.

2-3- Mise en évidence de l'activité enzymatique

Parmi les isolats d'actinomycètes marins testés précédemment, un nombre réduit d'isolats (les plus pertinentes) ont été testés pour leur potentiel enzymatique, il s'agit de celles qui ont montré des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes.

2-3-1- L'activité cellulasique

L'activité cellulasique des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar comme elle a été décrite précédemment, sur milieu de culture contenant du Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) comme seule source de carbone.

La révélation de l'activité CMCase est réalisée après incubation des boîtes, avec une solution de rouge Congo à 0,1% (m/v) pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min (**Ninranjane et al., 2007**). La visualisation des halos orange clairs autour des cylindres sur un fond rouge correspond aux zones d'hydrolyse de la CMC.

2-3-2- L'activité xylanasiq

L'activité xylanase des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu contenant le xylane comme seule source de carbone (Viet, 1991).

La révélation de l'activité xylanase est réalisée après incubation des boîtes, avec le n-butanol pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min (Teater et Wood, 1982). La visualisation des halos clairs autour des cylindres sur un fond marron correspond aux zones d'hydrolyse du xylane.

2-3-3- L'activité L-asparaginase

L'activité asparaginase des isolats est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Czapeck Dox (Gulati et al., 1997). L'activité asparaginase se traduit par le virage de la couleur de milieu de culture de marron clair au rose suite à l'alcalinisation de ce dernier.

Remarque :

- Pour tous les tests d'activité effectués précédemment un test témoin ou contrôle négatif est réalisé en parallèle. Il consiste à incuber dans les mêmes conditions une boîte non ensemencée contenant l'un des milieux utilisés pour le test d'activité.
- La composition chimique des milieux de cultures utilisés pour les tests d'activité est donnée en **annexe II**.
- Les tests d'activité sont réalisés à 28°C, et sont répétés trois fois.

3- Mise en évidence de la production des antibiotiques par l'isolat sélectionné sur milieu liquide

Le meilleur isolat retenu après les tests qui ont précédé au regard de son potentiel important de production de métabolites bioactifs fait l'objet d'une étude de la cinétique de production des antibiotiques en utilisant deux germes cibles sensibles *Staphylococcus aureus* et *Botritis cinerea*.

Pour ce faire, des pré-cultures de 5 ml sur milieu SCA liquide (milieu d'isolement) de cet isolat servent pour ensemencer des cultures de 50 ml du même milieu contenu dans des flacons de 250ml. Les flacons sont incubés à 28°C sous agitation à 250 rpm pendant un mois (Poosarla et al., 2013).

1ml de chacune des trois meilleures cultures est prélevé quotidiennement et centrifugés à 7000g/20min dans des tubes eppendorffs.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits (**Nouasri, 1996**). Pour cela des aliquotes de 200 µl de chaque surnageant de culture sont prélevés stérilement à partir des eppendorffs précédents puis sont introduit dans des puits (d'une épaisseur > 4mm) par ordre de jours de prélèvement, sur milieu Muller Hinton et gélose à l'extrait de Malt préalablement tapissés par une goutte de gélose blanche et ensemencés avec le germe cible (10^7 UFC/ml pour la bactérie et 10^7 spores /ml) pour le champignon, respectivement. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, les boîtes sont par la suite mises à incuber pendant 24 h et 48h à 37°C et 22°C pour la bactérie et le champignon respectivement. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés à l'aide de pied à coulisse.

4- Choix du meilleur milieu liquide pour la production des antibiotiques, et de la croissance d'isolat sélectionné.

Pour déterminer le meilleur milieu de culture menant à une production acceptable d'antibiotiques en temps optimal, nous avons comparé la production d'antibiotiques dans cinq milieux de culture liquides contenant diverses sources de carbone, d'azote et de sels minéraux. L'expérience a été menée sur les milieux suivants : Milieu synthétique à base d'amidon (MSA), ISP II, GYEA, Bennett et SCA (**Poosarla et al., 2013**).

La composition chimique de ces derniers est donnée en **annexe III**.

Des pré cultures de 5ml d'isolat sélectionné sont préparés à partir des milieux cités auparavant, ces pré cultures servent à ensemencer 50 ml de mêmes milieux dans des flacons de 280 ml puis sont mises en incubation à 28°C sous agitation de 250 rpm pendant un mois.

1ml de chacune des trois meilleures cultures de chaque milieu est prélevé quotidiennement et centrifugés à 7000g/20min dans des tubes eppendorffs préalablement tarés.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits comme décrite précédemment sur milieu SCA.

D'autre part, les culots sont lavés par centrifugation à deux reprises avec de l'eau distillée puis les échantillons sont traités à 100°C durant 24h à l'étuve et sont ensuite pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids sec de la tare.

L'évolution du pH de milieu est suivie quotidiennement en parallèle avec l'évolution de la biomasse durant la culture.

Remarque :

-Un test témoin a été réalisé pour chacune des cultures sur milieux liquides, il s'agit d'incuber dans les mêmes conditions un flacon non ensemencé contenant 50ml de chacun des milieux de culture liquides préparés précédemment.

-Le pH initial de toutes les cultures liquides est ajusté à 7,98.

5- Etude taxonomique des isolats sélectionnés

Ne sont concernés par cette étude que les isolats d'intérêt cités précédemment.

5-1- L'étude morphologique

- **L'étude macromorphologique**

Cette étude vise à déterminer la forme et la taille des colonies ; la couleur des mycéliums aériens (MA) et de substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits. Elle consiste à noter respectivement au 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours d'incubation à 28°C, les caractéristiques culturales des colonies sur différents milieux de culture préconisés par l' « International Streptomyces Project » (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5,ISP7,ISP9) (Shirling et Gottlieb, 1966) et sur le milieu GLM, GYEA, Bennett, Czapeck, GN, MH, GEM ,OGA, (Athalye et al., 1981) et SCA (Poosarla et al., 2013) .

- **L'étude micromorphologique**

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika-180) à deux grossissements (X40 et X10) après 7 à 14 jours d'incubation.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (Williams et al., 1989).

5.2. Etude physiologique

- **Croissance à différentes concentrations de NaCl**

Les colonies d'actinomycètes sont ensemencées sur milieu de Bennett gélosé à différentes concentration en NaCl qui sont 0 ; 3,5 et 6,5 % (m/v). Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies toutes les 24h (**Athalye et al., 1985**).

- **Croissance à différents pH**

Ce test est réalisé sur milieu Bennett gélosé ajusté à différents pH (5, 7, 8 et 9.5). Les isolats sont ensemencés et incubés à 28°C. La croissance est observée et notée après 7, 14 et 21 jours (**Athalye et al., 1985**).

- **Température de croissance**

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur le milieu de culture Bennett à raison de trois boîtes de Pétri, par isolat pour chaque température d'incubation. La croissance est suivie pendant 21 jours d'incubation à 0, 28, 30, 37 et 45°C (**Athalye et al., 1985**).

- **Sensibilité aux différents agents chimiques**

Ce test consiste à ensemencer les isolats en stries sur le milieu GYEA préconisé par **Athalye et al. (1985)** additionné du composant à tester, puis à incubé pendant 3 semaines à 28°C.

Les agents chimiques testés sont :

- Crystal violet (0,001%)
- Azide de sodium (0,001% et 0,01%)
- Phénol (0,01% et 0,05%)
- Tellurite de potassium (0,01% et 0,05%).

- **Sensibilité aux antibiotiques**

La sensibilité aux antibiotiques est effectuée sur le milieu Muller Hinton (**Athalye et al., 1985**). Les isolats testés sont ensemencés en stries à la surface de la gélose. Chaque disque d'antibiotique est déposé à l'aide d'une pince afin de s'assurer de son application. Puis elles sont incubées pendant 7 à 14 jours à 28°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. Les charges d'antibiotiques testés, leurs abréviations sont données dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Les antibiotiques testés à l'égard des isolats d'actinomycètes.

Antibiotiques	Charge (µg)	La famille
Lincomycine (L)	10	Lincosamides
Erythromycine(E)	15	Macrolides
Vancomycine (VA)	30	Glycopeptides
Oxacycline (OX)	5	Tétracyclines
Pristinomycine (PT)	15	Streptogramines (synergistines)
Acide fusidique (FA)	10	Fusidanines
Tetracycline (TE)	30	Tétracyclines
Ampicilline(Amp)	10	Bêta-lactamines
Ciprofloxacine(CIP)	5	Quinolones

5.3. L'étude biochimique

- **La production de pigments mélanoides**

La mise en évidence de la production de pigments mélanoides par les isolats est réalisée sur milieu gélosé IPS7 dont le virage, du milieu, au brun marron est reconnaissable (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les isolats sont ensemencés en spot ou en touches à la surface de la gélose, et incubés à 28°C. L'observation est effectuée quotidiennement après le troisième jour pendant un mois.

- **Hydrolyse de l'amidon**

Ce test est réalisé sur de la gélose nutritive contenant 10% (m/v) de l'amidon soluble selon la méthode de **Marchal et Bourdon, (1987)**. Après 14 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. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

- **Dégradation de la gélatine**

Les isolats sont ensemencés sur de la gélose nutritive contenant 0,4% (m/v) de gélatine, puis incubées 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% (m/v) est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Williams et Cross, 1971**).

- **Dégradation de la tyrosine**

La dégradation de cet acide aminé est réalisée selon la méthode préconisée par **Gordon et al. (1974)**. 0,4 g de tyrosine est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée puis stérilisé à l'autoclave (120°C/20 min). La suspension est ensuite complétée à 100 ml de gélose nutritive, refroidi à 45°C et distribuée dans des boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C, la lecture est effectuée après le 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour, et se traduit par l'apparition de zones claires, synonymes de dégradation de la tyrosine.

- **Dégradation de la caséine de lait**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Gordon et al. (1974)**. 10g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7, 5), puis stérilisés à l'autoclave. 100ml d'eau distillée (pH 7, 5) contenant 3,6g d'agar sont parallèlement autoclavés.

Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Les souches testées sont ensemencées en touches ou en stries à la surface de la gélose et incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies témoigne de la dégradation de la caséine.

- **Dégradation du tween 80**

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en spots sur milieu contenant du tween 80. La lecture est effectuée après 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours d'incubation à 28°C.

L'apparition d'une auréole opaque autour des colonies est synonyme de dégradation du tween 80 par ces dernières (**Sierra, 1957**).

- **Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone**

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu ISP 9 préconisé par **Pridham et Gottlieb (1948)**.

Les glucides testés comme seule source de carbone sont les suivants : sucrose, L arabinose, D mannitol, D⁺xylose, D glucose, lactose, D⁺ galactose, D⁺saccharose, fructose, et D sorbitol.

Après ensemencement, et une incubation de 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celles obtenues sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9 contenant le glucose (témoin positif).

- **Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone**

Ce test vise à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence des acides aminés en utilisant le milieu ISP 9 préconisé par **Pridham et Gottlieb (1948)**. Les acides aminés testés comme seule source de carbone sont les suivants : cystéine, L-asparagine, tyrosine, L-lysine, L-arginine, glycine et L-leucine, L-proline, L-tryptophane, et L-méthionine.

Après ensemencement et une incubation de 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif).

- **Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone**

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur milieu contenant des sels de sodium comme seule source de carbone. Les sels de sodium testés sont les suivants : acétate de sodium, citrate de sodium, oxalate de sodium, tartrate de sodium et potassium, et propionate de sodium. La dégradation de ces sels est notée positivement après virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du jaune au rouge-rose (**Gordon et al., 1974**).

- **Production de nitrate réductase**

Le test de nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté (**Marchal et Bourdon, 1987**). La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide de deux réactifs NR1 et NR2. Après 7 à 10 jours d'incubation, le test positif se

manifeste par l'apparition d'un halo de couleur rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés s'il ya :

- Apparition de la couleur rouge : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
- Absence de coloration : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

- **Recherche de la catalase**

Ce test est réalisé selon la méthode sur lame. La colonie est dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (v/v), sur une lame d'observation microscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène tel que rapporté par **Kitouni (2005)**.

Remarque : la composition chimique des milieux de culture utilisés pour l'étude chimio taxonomique est donnée en **annexe IV**.

II -Résultats et discussion

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et les discussions des cinq parties de ce travail, relatifs à l'isolement des souches d'actinomycétales marines, la mise en évidence de leurs activité antibiotique et enzymatique sur milieu solide, la mise en évidence de la production des antibiotiques par l'isolat sélectionné sur milieu liquide suivi par choix de meilleur milieu liquide pour la production des antibiotiques, et de la croissance de cet isolat et en fin une caractérisation taxonomique des isolats sélectionnés.

1-Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens

1-1- Origine et prélèvement des échantillons

Suite aux différents traitements appliqués à ces échantillons par les 5 méthodes décrites nous avons pu isoler et purifier 45 isolats d'actinomycètes marins présentant des morphologies variables mais caractéristiques des actinomycètes (**tableau XII, annexe V**).

La figure 7 qui suit représente le nombre d'isolats d'actinomycètes obtenus selon les sites d'échantillonnage.

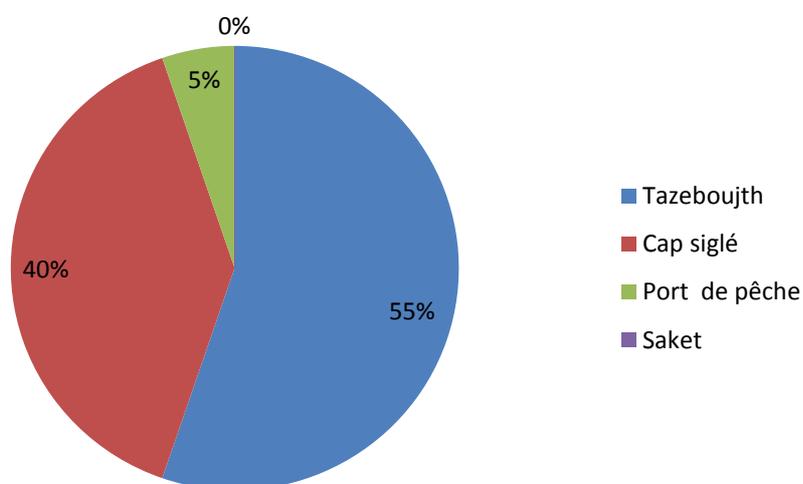


Fig.7: Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon le site d'échantillonnage.

La majorité des isolats d'actinomycètes marines (55%) proviennent des sédiments de la plage de Tazeboujth, qui est peut être un site où les conditions favorables sont réunies pour l'installation de la microflore des actinomycètes tel que la richesse en matière organique (**Fig.7**). Ceci est corroboré par plusieurs travaux qui affirment que le nombre des actinomycètes est en corrélation positive avec le pourcentage de la matière organique (**Hayakawa et al., 1988 ; George et al., 2010**).

I-2- Les méthodes et les milieux de culture utilisés pour l'isolement

Les échantillons de sédiments marins prélevés ont été traités chacun suivant les méthodes 1, 2, 3, 4, ou 5 retenues selon les recommandations d'Uzel et al.(2012) (tableau XI, annexe 1) qui ont dressé une liste des milieux de culture utilisés avec succès pour l'isolement d'actinomycètes marins.

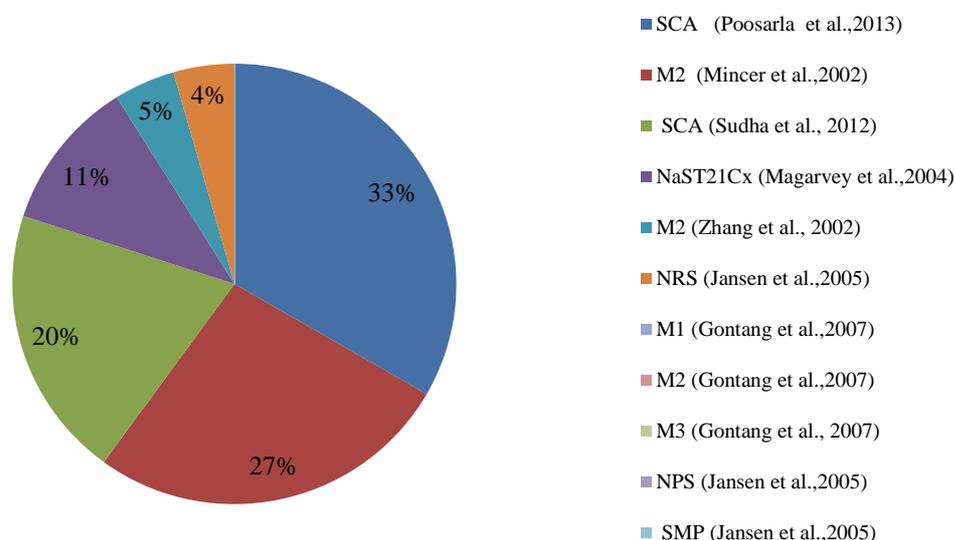


Fig.8: Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon le milieu de culture utilisé (avec ou sans traitement).

Les colonies d'actinomycètes apparaissent après 15 à 30 jours d'incubation, sur certains milieux d'isolement utilisés. Ces colonies sont reconnaissables par leur aspect macroscopique (colonies dures, incrustées dans la gélose) et microscopique (aspects filamenteux ramifiés avec des tailles différentes (petite, moyenne, grande) de forme variable (lisse, bombée, aplatie...etc.) possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (grise, blanche, marron...etc), parfois le mycélium aérien est absent.

Selon la **figure 8** ci-dessus, le milieu caséine amidon agar (SCA) semble être le meilleur milieu d'isolement des actinomycètes dans notre cas. En effet, 53 % d'isolats (soit 24 isolats) ont été obtenus sur ce milieu ; 33% (15 isolats) ont été obtenus sur SCA (**Poosarla et al., 2013**) et 20% (9 isolats) sur SCA (**Sudha et al., 2012**) alors que 27 % (12 isolats) ont été isolés sur M2 (**Mincer et al., 2002**), 11% (5 isolats) ont été isolés à partir du quatrième milieu NaST21Cx (**Magarvey et al., 2004**), 2 isolats (5%) sur M2 (**Zhang et al., 2002**), et 2 sur NRS (**Jensen et al., 2005a**) et aucun isolat n'est obtenu sur les autres milieux .

Cette différence s'expliquerait par la présence, dans le milieu SCA, d'amidon et de caséine, qui stimulent la croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries

(**Boughachiche et al ., 2005**). Plusieurs travaux ont confirmé que ce milieu est efficace pour l'isolement sélectif des actinomycètes à partir d'écosystèmes variés.

Dans le cas de l'environnement marin, **Kumar et Kannabiran (2010)** ont utilisé différents milieux pour l'isolement des actinomycètes à partir des sédiments collectés de la baie du Bengale en Inde et parmi eux la gélose à l'amidon et à la caséine s'est avérée être très efficace pour l'isolement d'actinomycètes marins par rapport aux autres médias, à savoir la gélose au nitrate et à l'amidon, et le milieu glycérol asparagine agar, en effet ,environ 23 actinomycètes ont été isolés ; 13 en utilisant SCA, et 10 en utilisant le glycérol asparagine agar.

Les milieux à faible concentration en nutriments organiques, tels que NPS et NRS retardent la croissance des bactéries non filamenteuses (à croissance rapide) pendant une période suffisante à l'apparition des colonies d'actinomycètes. (**Crawford et al., 1993**), néanmoins dans notre cas, nous n'avons pu obtenir que deux isolats sur NRS.

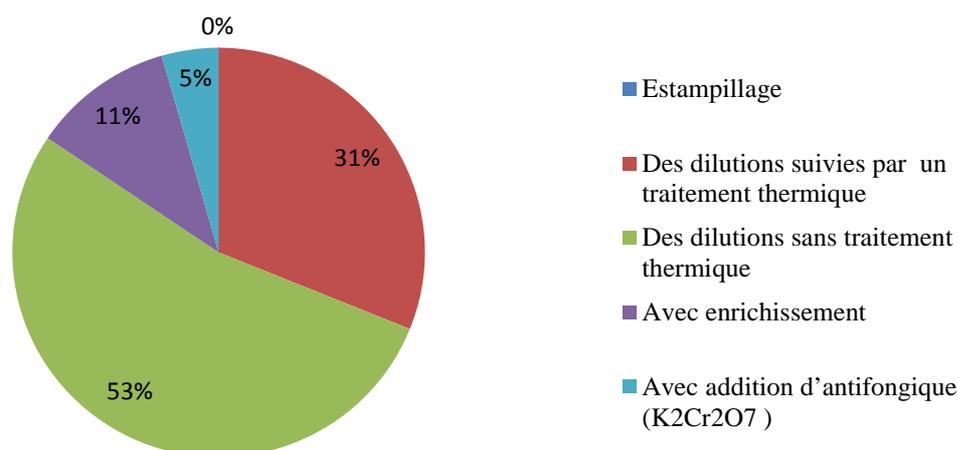


Fig.9 : Répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes selon la méthode d'isolement.

Des procédures différentes de prétraitement et d'utilisation de milieux d'isolement sélectifs sont recommandées pour l'isolement de nouveaux actinomycètes. Il n'existe pas de technique universelle d'isolement mais il faut toujours varier les méthodes et les milieux dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**Boudemagh, 2005**). C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé cinq méthodes d'isolement afin d'augmenter la chance d'obtenir des actinomycètes marins (**Valli et al ., 2012**).

❖ Des dilutions sans traitement thermique

Ainsi que le montre la figure 9, nous constatons qu'avec la technique des dilutions sans traitements thermiques, nous avons obtenu le plus grand nombre d'isolats soit 53%.

❖ Des dilutions suivies par un traitement thermique

Le prétraitement d'échantillons d'habitats naturels par séchage et le chauffage stimule l'isolement des actinomycètes rares selon **Kim et al. (1995)**. Dans notre cas, nous avons obtenu 31% d'isolats (14 isolats) suite au traitement thermique modéré à 55°C pendant 5 à 6min (**Amayaly et al.,2012**). Selon **Mincer et al. (2002)** une abondance en actinomycètes a été constatée dans des échantillons de sédiments marins prélevés à des profondeurs de 0 à 30 m suite au même traitement thermique utilisé dans notre étude.

❖ Technique d'estampillage

Avec cette technique nous n'avons pas isolé des actinomycètes marins. Contrairement à **Jose et Jebakumar, (2013)**, le traitement de l'échantillon des sédiments par cette méthode a permis d'isoler 68% des souches d'actinomycètes, elle s'est avérée être une méthode très efficace pour cultiver les actinomycètes et le résultat est en accord avec celui rapporté par **Gontang et al.(2007)**.

❖ Avec enrichissement

Cette procédure d'enrichissement sélectif abouti à l'isolement d'un grand nombre de nouvelles actinobactéries. Les souches isolées développent des anneaux concentriques qui s'étendent vers l'extérieur de la matière de sédiments. Cette technique nous a permis d'isoler 11% d'isolats d'actinomycètes (5isolats) tandis que **Magarvey et al. (2004)** ont isolé 100 souches à partir de 192 échantillons de sédiments marins.

❖ Avec traitement antifongique

Pour maximiser l'isolement des actinobactéries, **Zhang et al.(2008)** ont utilisé 12 différents milieux de culture. Tous les milieux ont été complétés avec une concentration finale de 50g /ml de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) qui inhibe la croissance des champignons (**Webster et al., 2001**). Ce traitement leur a permis d'isoler environ 106 souches d'actinomycètes, dans notre cas deux isolats uniquement (5%) ont été isolés.

Remarque : Le nombre d'isolats d'actinomycètes isolés selon le site d'échantillonnage, le milieu d'isolement, et la méthode d'isolement utilisée sont présentés dans les (**annexe VI**).

N.B. : Parmi les isolats obtenus, 18 isolats seulement sont retenus pour les tests d'activité ultérieurs, il s'agit de ceux qui ont une durée d'incubation inférieure à 15 jours (**annexe V**). Les résultats des tests d'activités antibiotique et enzymatique sur milieu solide de ces isolats sélectionnés sont décrits dans ce qui suit :

2. Mise en évidence de l'activité antibiotique et enzymatique sur milieu solide

2. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes par la technique des cylindres d'agar, afin de sélectionner les isolats les plus producteurs de substance(s) antimicrobienne(s). La bioactivité des isolats étaient dissemblables entre des souches bactériennes Gram positives et Gram négatives. Les résultats obtenus sont donnés sous forme de tableaux ; **tableaux XVI (annexe VII) et tableau XVII (annexe VIII)** et de figures présentées ci-dessous :

2.1.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes test vis-à-vis des bactéries pathogènes à Gram positif

➤ **Activité antibactérienne d'isolats d'actinomycètes contre *Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques sont parmi les agents pathogènes les plus couramment rencontrés dans la pratique clinique. *S. aureus* est une cause majeure d'infections nosocomiales, d'intoxication alimentaire, d'ostéomyélite, d'endocardite, de syndrome de choc toxique, et d'un large éventail d'autres troubles (**Rubin et al., 1999**). Il ya eu une augmentation alarmante des infections nosocomiales par des souches de staphylocoques résistants à plusieurs antibiotiques (**Hiramatsu et al., 1997**), cette situation a conduit à la réévaluation des agents pathogènes staphylococciques potentiellement résistants à tout antibiotique (**Rubin et al., 1999**). De ce fait la nécessité de la recherche de nouvelles molécules pour lutter contre ce germe est devenue urgente.

Dans notre étude, 6 isolats d'actinomycètes parmi les 18 testés (soit 33 %) se sont avérés producteurs de substances anti *S.aureus* particulièrement l'isolat S5T2H1 qui possède l'activité la plus importante avec un diamètre de zone d'inhibition de 35mm. Le même résultat a été rapporté par **Kokare et al.(2004) et Sirisha et al.(2013)** .

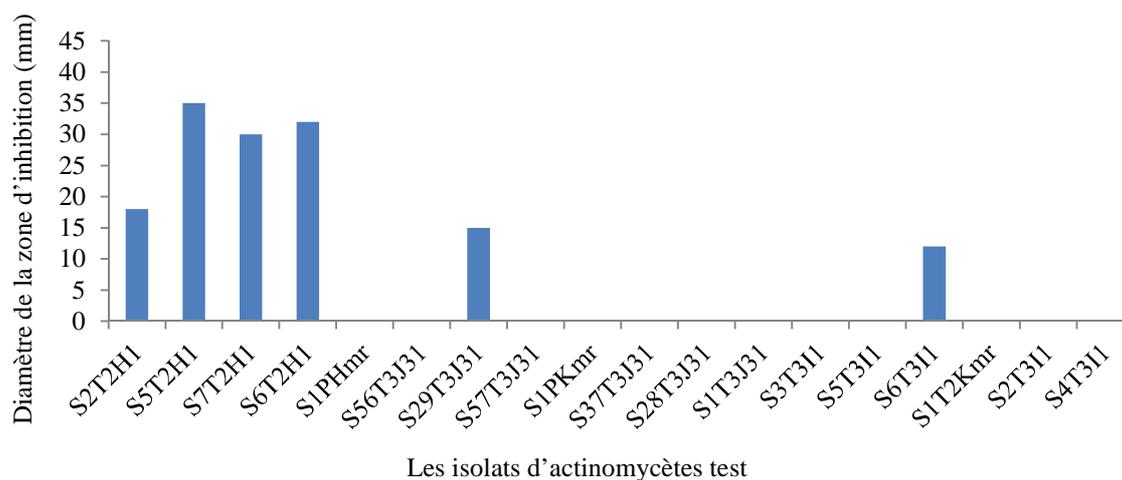


Fig.10 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Staphylococcus aureus*.

➤ **Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre SARM**

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est devenu une cause commune d'infections en particulier dans l'environnement hospitalier, en raison de sa résistance aux antibiotiques au cours d'infections systémiques. En outre, des études ont montré une augmentation significative de la résistance à la méthicilline dans les isolats cliniques de *S. aureus* dans les pays européens, jusqu'à 20 pour cent. Ainsi, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques exige de découvrir de nouveaux agents efficaces contre le SARM. Les Actinomycètes de sol ont longtemps été considérés comme source pour les antibiotiques actifs contre cet agent pathogène résistant aux antibiotiques. Les Streptomycètes marins, sont mal connus et seulement quelques rapports sont disponibles concernant les actinomycètes de mangroves et marais.

Dans notre étude, six (06) isolats (soit 33 %) se sont avérés actifs vis à vis de ce germe (**Fig.11**). La plus grande zone d'inhibition a été relevée avec l'isolat S5T2H1 (30 mm). Récemment, une étude entreprise par **Kannan (2014)** visant l'utilisation du poisson-zèbre comme un modèle embryonnaire pour étudier et évaluer le nouveau composé produit par une souche de Streptomyces marine *S. rubrolavendulae* ICN3 a montré des propriétés antagonistes l'égard de l'isolat clinique SARM avec une zone d'inhibition de 21 mm.

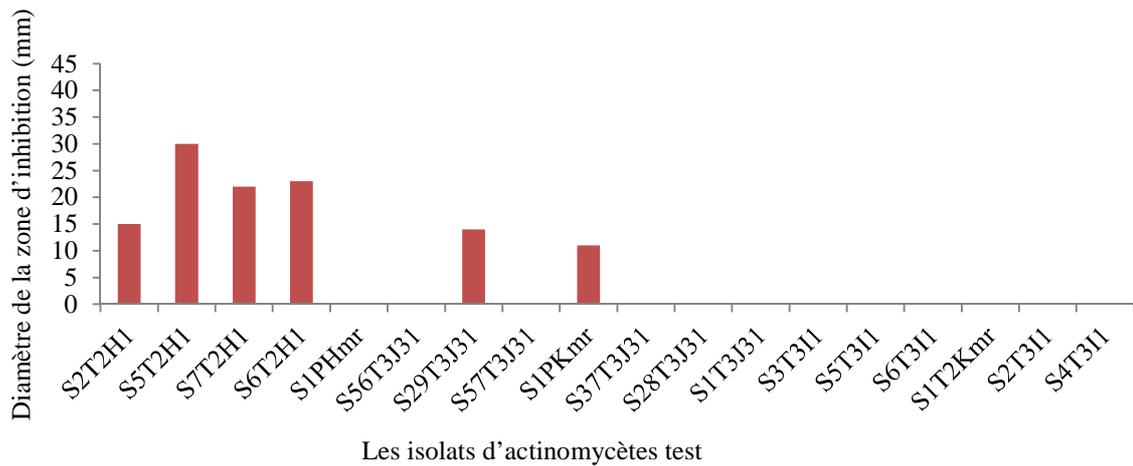


Fig.11 : Activité antibactérienne des isolats d’actinomycètes contre SARM.

➤ **Activité antibactérienne des isolats d’actinomycètes contre *Listeria innocua***

La seule espèce de *Listeria* qui soit pathogène pour l’Homme est *L. monocytogenes*, qui cause la listériose. Elle peut traverser la barrière intestinale et la barrière placentaire, pouvant alors provoquer des infections éventuellement mortelles du fœtus, du nouveau-né, ou des accouchements prématurés.

Dans cette étude la souche de *L.innocua* a été utilisée pour le test d’activité vue sa forte ressemblance avec la souche pathogène *L. monocytogenes*.

Cinq (05) isolats soit (27%) se sont avérés actifs vis à vis de cette souche (**Fig.12**), parmi eux l’isolat S5T2H1 montre une zone d’inhibition maximale de 28mm.

Peu d’études sont rapportées sur l’activité *anti-Listeria* par les souches d’actinomycètes marines et parmi ces dernières on peut citer celle de **Kennedy (2008)**.

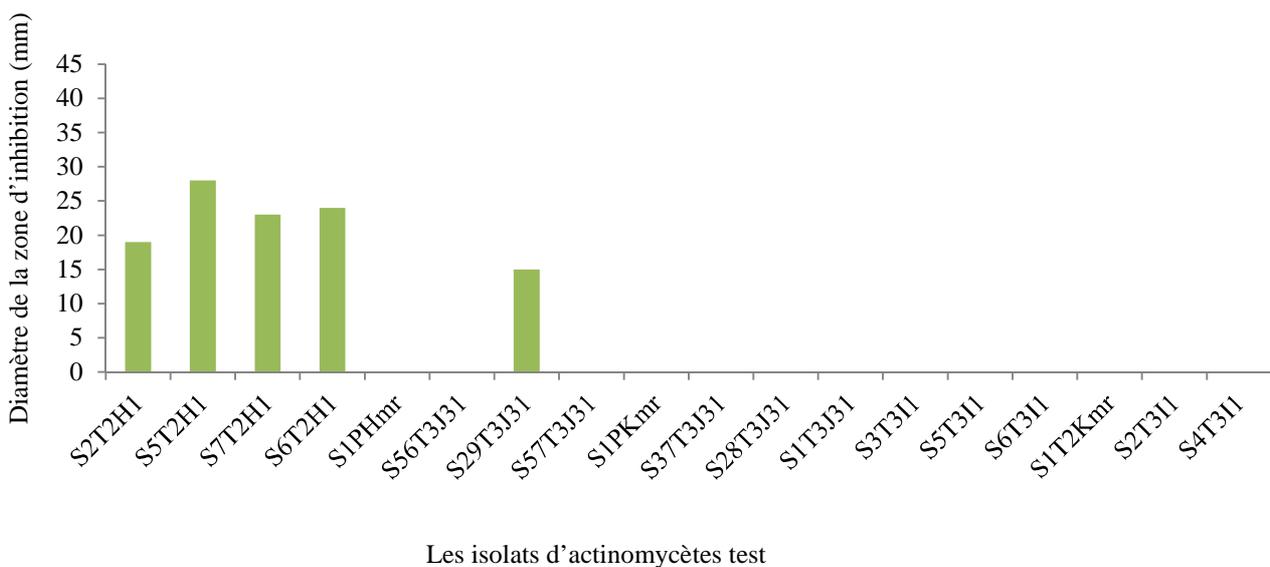


Fig.12 : Activité antibactérienne des isolats d’actinomycètes contre *Listeria.innocua*.

➤ **Activité antibactérienne des isolats actinomycètes contre *Enterococcus faecalis***

Enterococcus faecalis est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'Homme et le singe, particulièrement dans l' environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin.

Les résultats obtenus montrent que 6 isolats d'actinomycètes marins parmi les 18 testés soit (33%) montrent une activité anti- *E.faecalis*. Cette activité a été retrouvée par **Rajan et Kannabiran (2013)** qui ont isolé des actinomycètes marins avec une zone d'inhibition de 25mm.

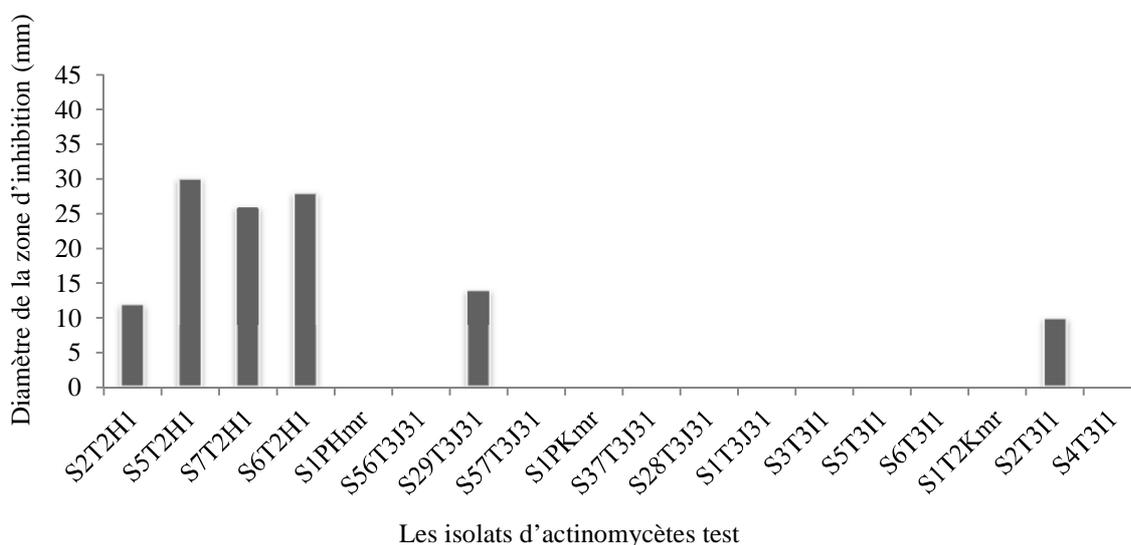


Fig.13: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Enterococcus faecalis*

➤ **Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Bacillus subtilis*.**

La souche *B.subtilis* est un germe connu pour sa sensibilité lors des tests d'antibiogramme, ici 07 isolats sur les 18 testés (soit 38%) ont montré une activité contre ce germe, avec des zones d'inhibition de 28mm, 26mm et 22mm respectivement pour S5T2H1, S29T3J31 et S1T2Kmr (**Fig.14**). Dans l'étude réalisée par **Valli et al.(2012)**, des espèces de *Streptomyces* marines ont montré une bonne activité antimicrobienne contre *B. subtilis* .

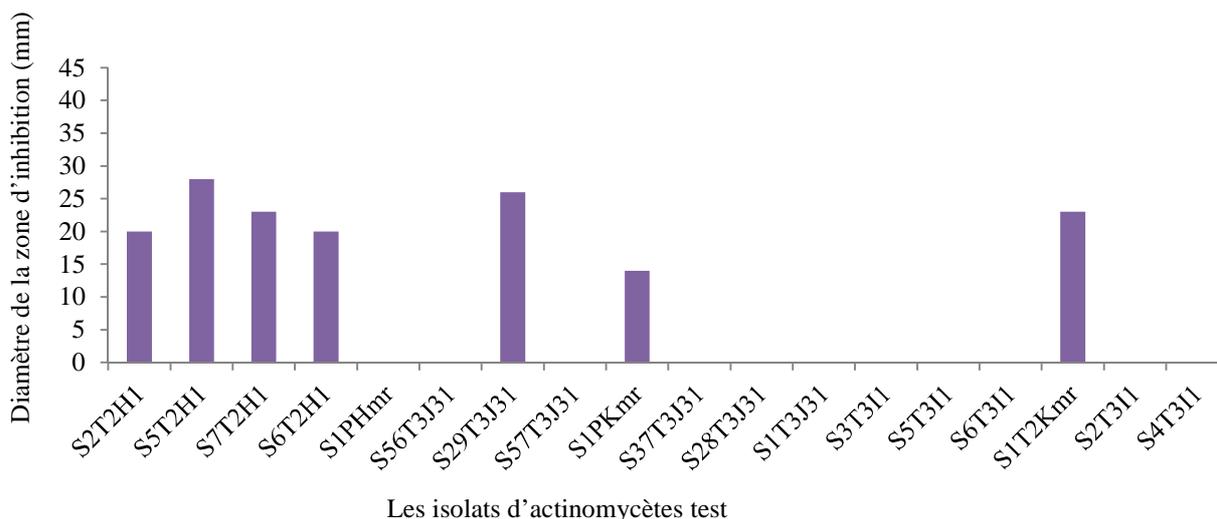


Fig.14 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Bacillus subtilis*.

2.1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes test vis-à-vis de bactéries pathogènes à Gram négatif.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif, l'activité antibactérienne a été enregistrée contre *E.coli* et *P.aeruoginosa* et aucun des 18 isolats d'actinomycètes testés n'est actif contre *Proteus sp* .et *K. pneumoniae*.

➤ **Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Escherichia coli***

Escherichia coli, est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de la flore intestinale aérobie. C'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites... etc.

La souche à Gram négatif *E.coli* ATCC 25922 était insensible aux substances produites par les souches actives vis-à-vis des Gram positifs à savoir : le SARM, *S.aureus*, *L.innocua* et *B.subtilis* probablement en raison de son caractère multi résistant. On constate que c'est l'isolat S1PKmr qui donne une zone d'inhibition de 32 mm, à coté de celles plus importantes de S57T3J31 et S37T3J31 avec des valeurs respectives de 42 et 40mm. Soit seulement 16% d'isolats actifs. Il serait intéressant de connaître le mécanisme d'action des molécules produites par ces isolats. Ces résultats sont sensiblement les mêmes que ceux rapportés par **Kumar (2011)**.

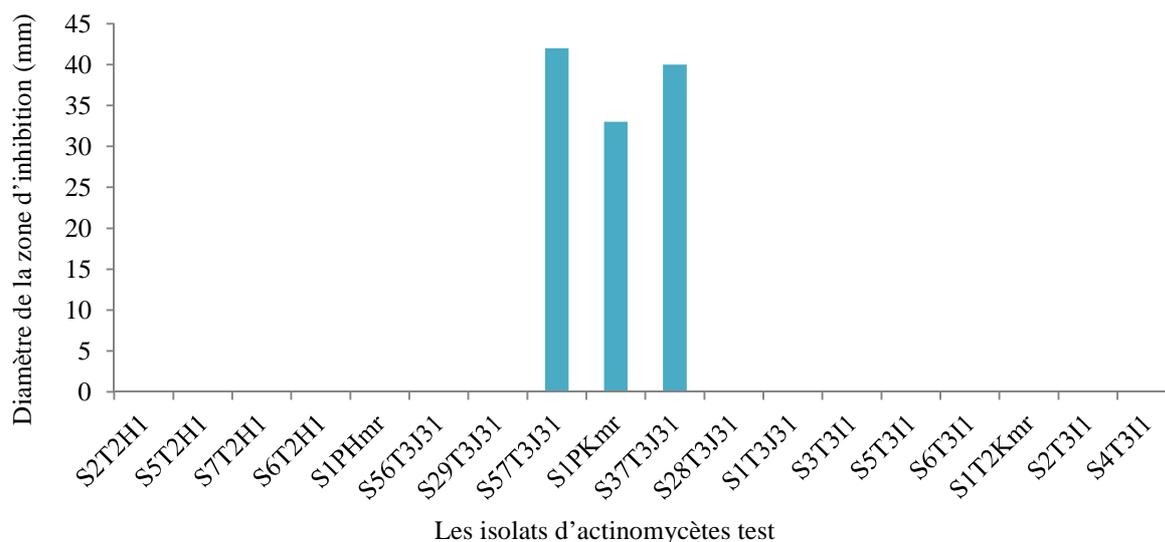


Fig15 : Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Escherichia coli*.

➤ **Activité antibactérienne d'isolats d'actinomycètes contre *Pseudomonas aeruginosa***

P.aeruginosa est un agent pathogène important associé à des infections nosocomiales graves telles que la pneumonie et la septicémie. Il est également associé à plusieurs mécanismes de résistance à divers agents antimicrobiens. Le traitement des infections dues au *Pseudomonas* présente souvent un défi pour les cliniciens et la thérapie de combinaison est couramment utilisée pour prévenir l'apparition de la résistance (**Tam et al., 2005**).

d'inhibition allant de 20 à 28 mm , cette dernière valeur obtenue avec S29T3J31 qui semble plutôt actif vis à vis des souches à Gram négatif .

Selon **Kokare et al.(2004)** , au cours de la recherche de nouveaux métabolites secondaires, les souches marines d'actinomycètes isolés ont montré également une activité significative contre l'espèce à Gram négatif *P. aeruginosa* .

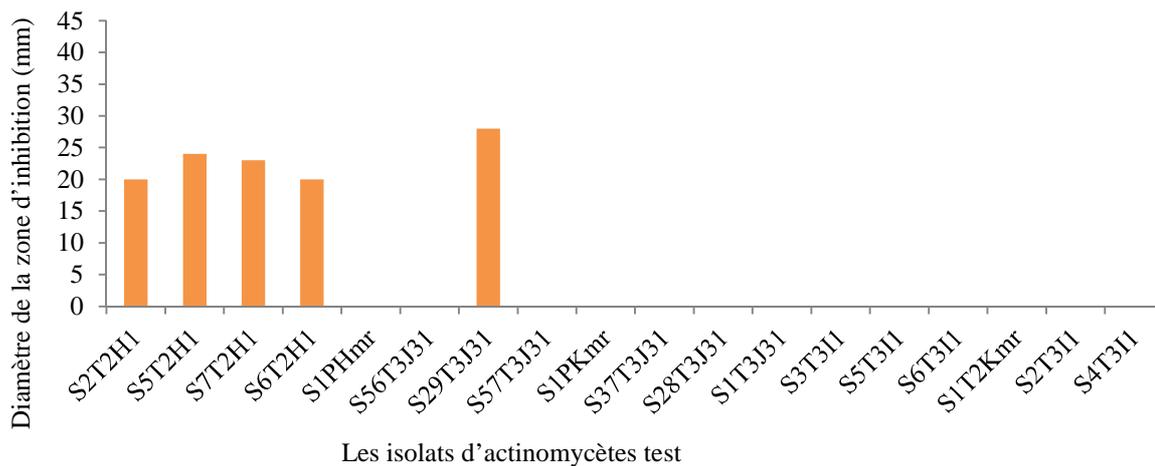


Fig.16: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans notre cas ce germe était sensible aux substances produites par 05 isolats sur les 18 testés soit 27 % qui ont montré une activité contre ce germe à Gram négatif, avec des zones

La majorité des actinomycètes isolés au cours de ce travail (11 isolats) soit 61 % ont montré une activité antimicrobienne contre au moins une bactérie test. En effet plusieurs travaux antérieurs ont corroboré le pouvoir antibactérien remarquable de ces bactéries (Amsaveni, 2012).

Les résultats des tests d'activité antimicrobienne obtenus montre que certains isolats d'actinomycètes testées (S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1, S6T2H1),soit 22%,sont actifs sur la totalité des souches test à Gram positifs (*S.aureus,SARM ,E.faecalis,B.subtilis,et L.innocua*) alors, que deux isolats seulement à Gram négatif (*E.coli,P. aeruginosa*) parmi les quatre testés sont avérés sensibles aux 18 isolats d'actinomycètes testés. Cela, peut-être attribué à la différence morphologique qui existe entre les deux types bactériens. En effet les bactéries de coloration de Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positive qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (Sateesh et al., 2011).

2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'ensemble des résultats des tests d'activité antifongique d'isolats testés sur milieu solide sont présentés dans le **tableau XVII (Annexe VIII)**.

➤ L'activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre les souches *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie de la biotechnologie, néanmoins certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'Homme, les animaux et les plantes. Les mycoses provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. Certaines espèces peuvent produire des mycotoxines comme les aflatoxines (par *Aspergillus flavus*) ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*). D'autre par l'espèce *Aspergillus niger* provoque l'aspergillose du conduit auditif où elle produit l'ochratoxine.

Dans ce test, peu d'isolats ont montré des activités anti-*Aspergillus*, les isolats actifs sont les même qui ont une activité antibactérienne prononcée contre les bactéries à Gram positif et qui semble produire des molécules différentes ou ayant des effets double (antibactérien et antifongique). Les zones d'inhibition obtenues avec l'isolat S5T2H1 sont de 20mm et 13mm contre *As. carbonarius* et *As. ochraceus* respectivement (**Fig.17**) alors qu'aucune activité antifongique n'a été enregistrée contre les espèces *As. flavus*, *As.niger* et *As. parasiticus*.

Nos résultats sont corroborés par ceux de **Manivasagan et al.(2009)** qui ont isolé une souche marine *Streptomyces PM-32* à partir de sédiments marins prélevés d'une baie de la côte du Bengale et qui a montré une activité antimicrobienne contre un groupe d'agents pathogènes bactériens mais une activité anti fongique modérée contre les espèces d'*Aspergillus*.

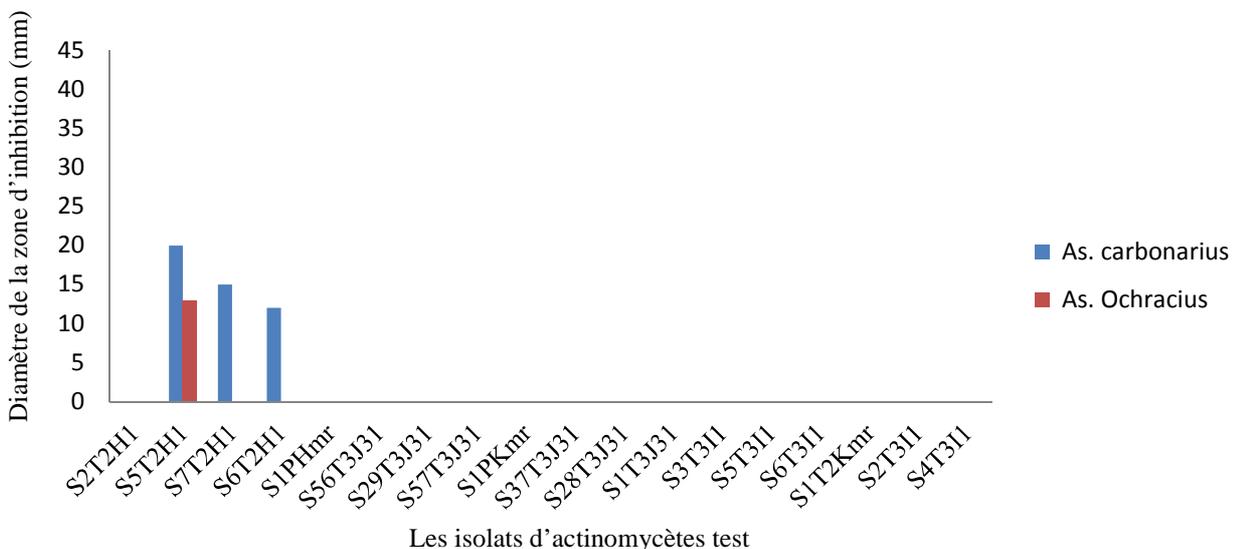


Fig17. Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre les souches *Aspergillus*.

➤ **Activité antifongique d'isolats actinomycètes contre *Fusarium polyferatum***

Le genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes, provoquant des maladies appelées fusarioses. Les espèces de *Fusarium* (en particulier *F. polyferatum*) sont une source importante de mycotoxines dans les aliments suite à leurs contaminations des produits agro-alimentaires, en particulier les céréales et le maïs. Les zones d'inhibition obtenues sont modérées et sont dues aux mêmes souches que celles citées précédemment.

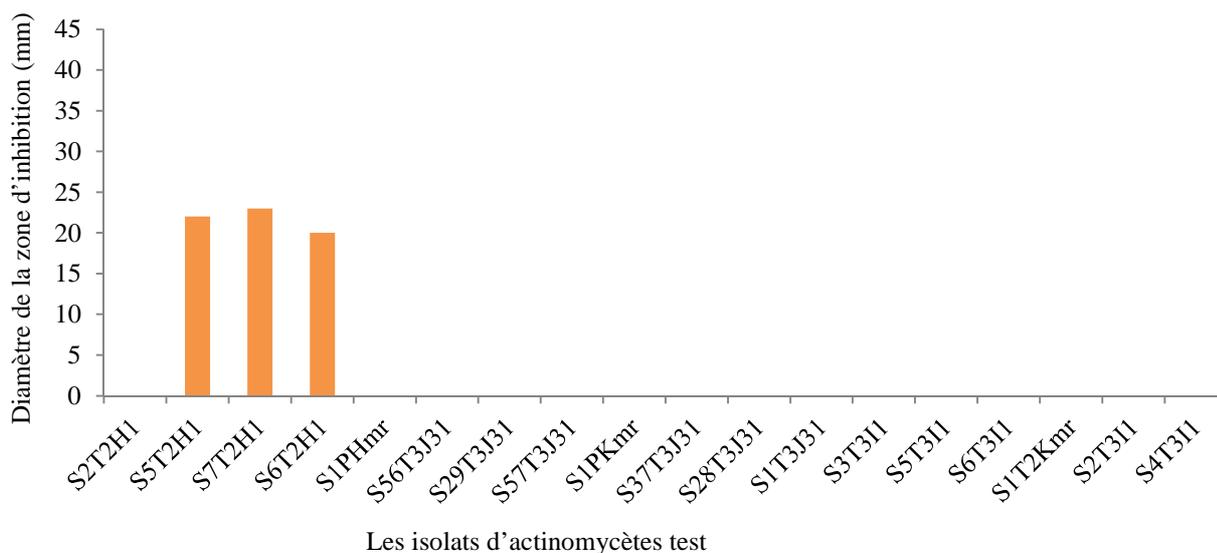


Fig 18. Activité antifongique des isolats test contre *Fusarium polyferatum*.

➤ **Activité antifongique d'isolats d'actinomycètes contre *Botrytis cinerea*.**

Botrytis cinerea est une espèce de champignons haploïde de la famille des *Sclerotiniaceae*, Ce champignon phytopathogène est responsable de la pourriture grise, maladie cryptogamique qui sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, le tournesol, la tomate et la fraise.

Les isolats d'actinomycètes marins ayant montré les activités antifongiques précédentes sont les mêmes qui sont actifs à l'égard de *B.cinerea* avec des zones d'inhibition de 25 mm pour les isolats S6T2H1 et S7T2H1 et de 35mm pour l'isolat S5T2H1, ce dernier , en plus des ces effets antibactériens semble avoir un métabolisme varié qui aboutit à de nombreuses molécules actives .Une activité anti *B. cinerea* qui correspondre a une zone d'ihibition de 19 mm a été obtenue avec la souche *Streptomyces albidoflavus* (Haggag et al. ,2014)

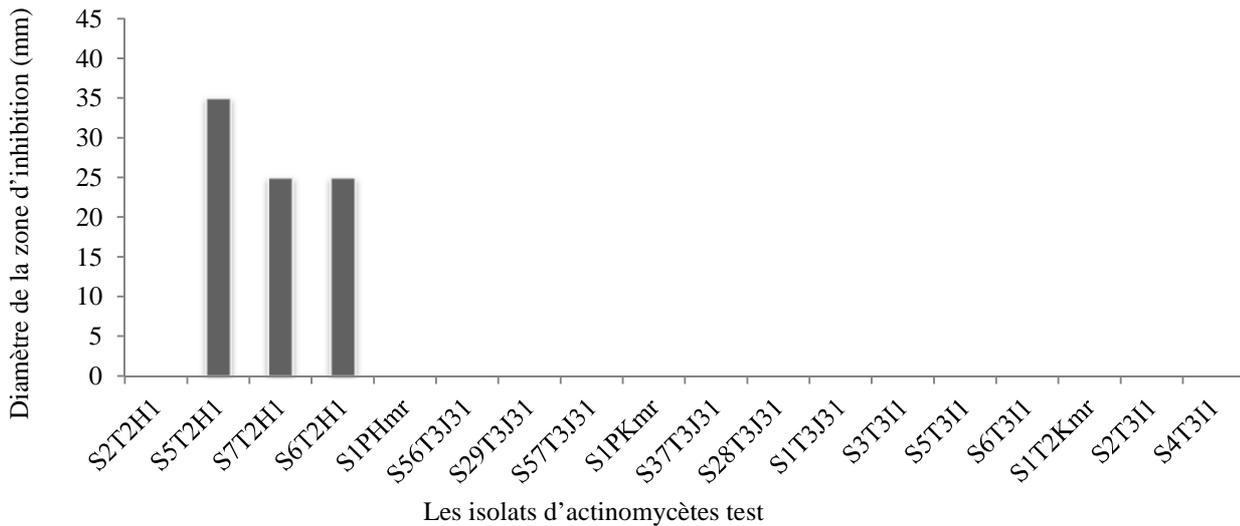


Fig.19 Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre *Botrytis cinerea*.

➤ **Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre *Mucor ramanianus***

La moisissure, *M. ramanianus* est parmi les moisissures les plus sensibles à l'effet des antifongiques naturels (Bastide et al., 1986). C'est un bon indicateur de production de molécules actives par les germes à tester.

Les zones d'inhibition obtenues sont modestes, et serait parfois dues à l'effet d'enzymes, les chitinases, libérées dans le milieu par les actinomycètes.

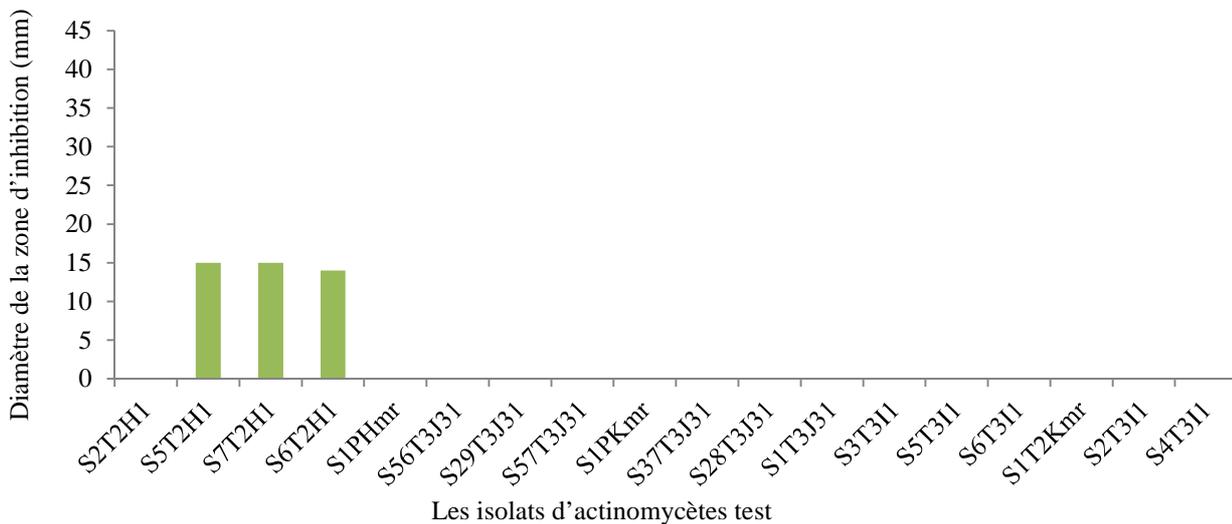


Fig.20: Activité antifongique des isolats d'actinomycètes contre *Mucor ramanianus*.

➤ **Activité anti levurale des isolats d’actinomycètes contre *Candida albicans*.**

Candida albicans est l'espèce de levures la plus importante et la plus connue du genre *Candida* qui n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. C'est un organisme commensal saprophyte. Le pouvoir pathogène de cette levure est dû au fait qu'elle provoque des infections fongiques (candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse.

Dans cette étude, 9 isolats parmi les 18 isolats testés (soit 50 %) sont actives vis à vis de celle-ci, une activité maximale est obtenue avec l’isolat S4T3I1, ce dernier est inefficace vis à vis de tous les autres germes cibles. Une étude faite par **Ravikumar et al. (2010)** a montré que 3 souches parmi les 5 souches d’actinomycètes marines sélectionnées et testées vis-à-vis *C.albicans* se sont avérées actives vis à vis ce germe, avec des zones d’inhibition modérées de 8mm pour toutes les souches.

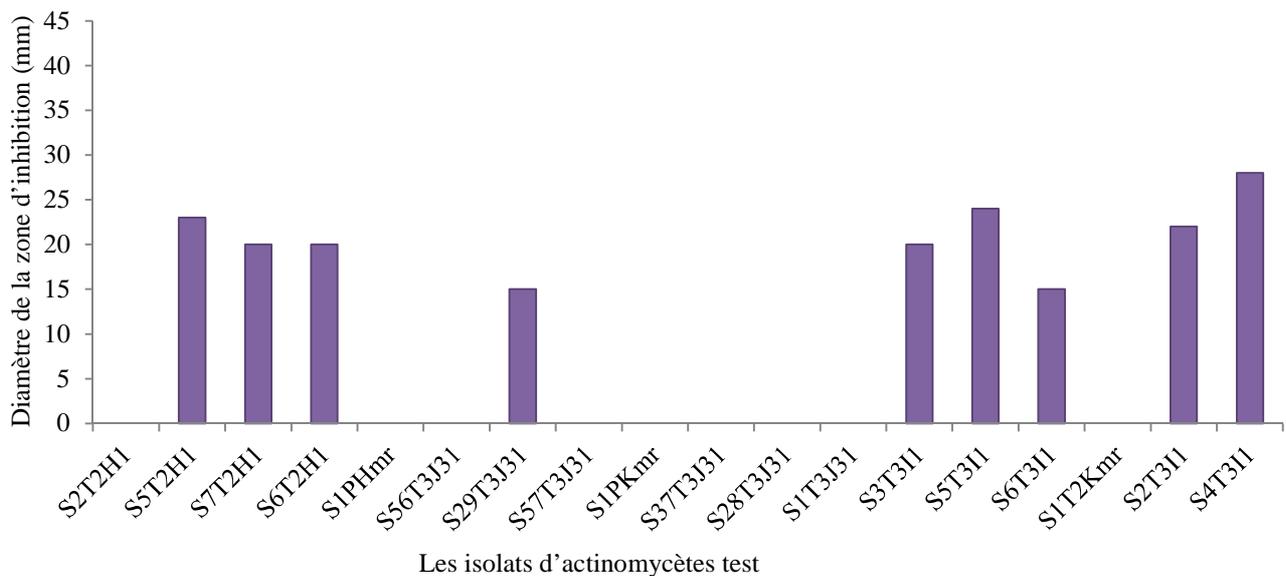


Fig. 21: Activité anti levurale des isolats d’actinomycètes contre *Candida albicans*.

Les résultats de tests d’activité antifongiques obtenus montre que 50% (9 isolats) des isolats testés possèdent une activité antifongique vis-à-vis au moins d’un germe cible. L’isolat ayant le spectre le plus large est L’isolat S5T2H1. Celui-ci est actif contre les 5 moisissures (*As.carbonarius, As.cchraceus, M.amanianus, F.polyfeatumr, et B.cinerea*) et contre la levure *C.albicans*.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus dans le cas de l'activité antibactérienne, on remarque que les actinomycètes avaient une activité antibactérienne, plutôt qu'anti-fongique, ceci est en accord avec les résultats rapportés par **Berdy (2005)** et **Sunaryanto et Marwoto (2010)**.

Au total, dans cette étude nous avons réussi à mettre en évidence l'activité antibactérienne et /ou antifongique de 14 isolats d'actinomycètes marins par la technique des cylindres d'agar à l'égard de 7 bactéries, 5 moisissures et une levure. Cependant quatre isolats (S1PHMR, S56T3J31, S28T3J31, S1T3J31) n'ont montré aucune activité antibiotique.

Remarque : Le **tableau XVIII (annexe IX)** présente des photographies de tests d'activité antibiotique sur milieu solide par méthode des disques d'agar des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.

3.3. Mise en évidence de l'activité enzymatique

L'utilisation d'enzymes, a connu des applications considérables dans de nombreux procédés industriels. Au cours des dernières années, les enzymes microbiennes ont remplacé les catalyseurs chimiques dans la fabrication de produits chimiques, des textiles, de produits pharmaceutiques, de papier, et des produits chimiques agricoles.

Dans le cas d'actinomycètes terrestres, beaucoup de chercheurs ont rapporté la production de divers enzymes industrielles (**Mohamedin 1999; Pandhare et al., 2002 Sharma et al., 2005**). Mais à ce jour, il n'y a pas de nombreux rapports sur les enzymes extracellulaires des actinomycètes marins. La plupart des études sur les souches de *Streptomyces* marin étaient axées sur la production d'antibiotiques, et seuls quelques travaux ont insisté sur leur potentiel enzymatique tel que les protéases, les lipases, les chitinases et les alginates lyases ont été rapportés (**Dharmaraj, 2010**).

Dans cette étude, les quatre isolats S2T2H2, S5T2H2, S7T2H1, et S29T3J31 sélectionnés pour leurs aptitudes à produire des antibiotiques, ont fait l'objet d'une investigation de leur pouvoir enzymatique cellulasique, xylanasique, et L-asparaginasique.

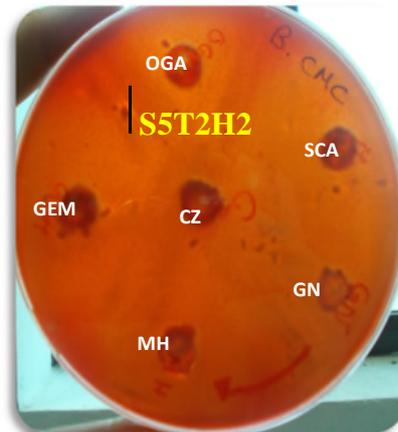
2.3.1. Mise en évidence de l'activité cellulasique

Après avoir repiqué arbitrairement les isolats sur les milieux de culture ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, et SCA pour l'isolat S₂T₂H₁, sur les milieux OGA, SCA, GN, MH, GEM, et Cz pour l'isolat S₅T₂H₁, sur les milieux SCA, GLM, MH, BT et Cz pour l'isolat S7T2H1 et sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, et ISP7 pour l'isolat S29T3J3, des cylindres d'agar de chaque gélose ont été découpés puis sont déposés sur le milieu à base de CMC. Les boîtes ont été ensemencées pendant 14 jours à 28°C et des observations journalières ont été effectuées.

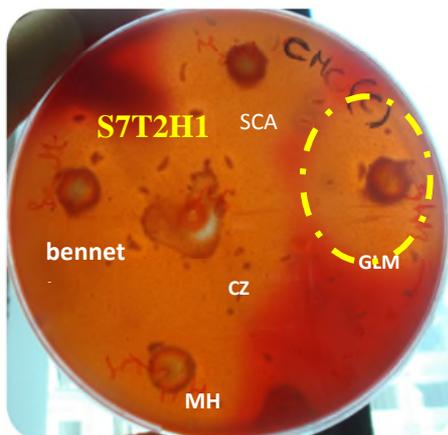
La révélation de l'activité CMCase est réalisée après incubation des boîtes, avec une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min (Ninranjane *et al.*, 2007).



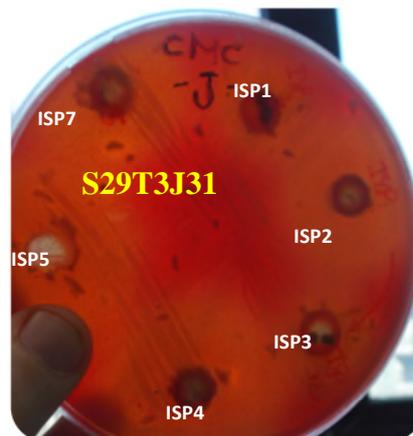
(a) : l'isolat S2T2H1



(b) : l'isolat S5T2H1



(c) : l'isolat S7T2H1



(d) : l'isolat S29T3J31



(e) : Boite témoin de milieu de culture à base de CMC (avant lavage avec une solution de NaCl).

Fig.22 : Mise en évidence de l'activité cellulase des isolats S2T2H1(a), S5T2H1(b), S7T2H1(c) et S29T3J31(d) issus de différents milieux.

La capacité des souches à assimiler la CMC sur un milieu gélosé comme seule source de carbone et d'énergie se traduit dans le milieu solide par la formation de zones claires autour des cylindres d'agar (Teather et al. 1982). Cette observation s'explique probablement par la sécrétion d'enzymes cellulolytiques dans le milieu extracellulaire caractérisant ainsi la production de cellulases extracellulaires (Fig. 22).

Tous les quatre isolats testés semblent être producteurs de CMCase quel que soit leur milieu de repiquage initial. Cependant, il apparaît que les deux isolats S2T2H2, S5T2H2 ont la meilleure activité CMCase, résultat qui est expliqué par la disparition totale de la couleur rouge de la boîte (rouge de Congo) après lavage avec la solution NaCl. Néanmoins, selon (Kroothilaganandh, 2000), le test du rouge de Congo est assez sensible pour un screening primaire des bactéries cellulolytiques, mais la taille de la zone d'hydrolyse n'est pas toujours significative de l'activité cellulosique. Une étude a montré que, parmi 77 isolats bactériens thermotolérants cultivés sur milieu CMC, l'isolat à activité enzymatique la plus élevée était celui qui présente la zone claire la moins large.

La cellulose est la forme la plus abondante du carbone fixé dans la biosphère. Elle est insoluble et sa dégradation est largement restreinte à des groupes spécifiques de micro-organismes qui produisent de multiples cellulases (Lynd et al., 2002). De nombreux micro-organismes dégradent la cellulose amorphe, alors que seulement quelques-uns peuvent dégrader complètement la cellulose hautement cristalline. Dans les milieux terrestres, la cellulose est très lignifiée et donc difficile à se dégrader. Les champignons et les actinomycètes peuvent accéder à la cellulose dans les tissus ligneux en raison de leurs hyphes de croissance (McCarthy, 1987). En comparaison avec les micro-organismes terrestres, seuls des groupes limités des écosystèmes aquatiques sont connus pour leur aptitude à la dégradation de la cellulose, parmi eux les Micromonosporas (Wohl et McArthur, 1998 ; Arunachalam et al., 2010). Selon de nombreux auteurs, la capacité de dégrader des polysaccharides complexes comme la cellulose et la chitine est commune parmi les micromonosporas (Park et al, 1993; Damude et al, 1993, Kawamoto, 1984). Une cellulase alcaline à partir d'une souche de *Streptomyces alcaliphiles* KSM-9 a été signalée (Dasilva et al., 1993). De même, une cellulase à partir de *Streptomyces alcaliphiles* sp. souche S36-2 active dans une plage de pH de 8 à 9 a été décrite par Singh et al.(2004).

2.3.1. L'activité xylanase

Le xylane est le principal composant des hémicelluloses, c'est probablement le second polymère de sucres le plus abondant des plantes (Timell, 1967). Les xylanes sont des polysaccharides hétérogènes composés d'un squelette lié à des résidus D-xylopyranosyle (Whistler et Richards, 1970). Les enzymes de dégradation du xylane ont suscité un intérêt

conduisant à de nouvelles perspectives d'applications, y compris le blanchiment des pâtes de papier kraft et la récupération des sucres fermentescibles (Viikari *et al.*, 1986)..

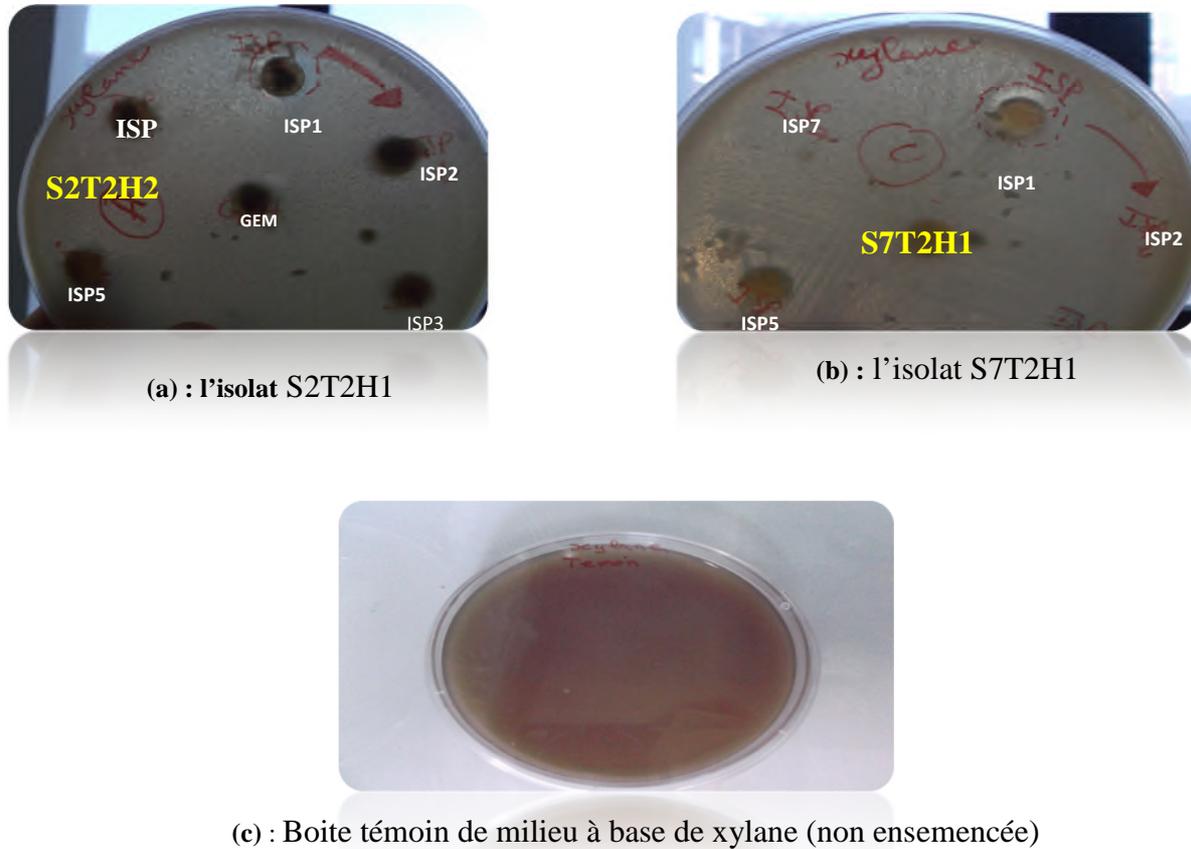


Fig 23: Mise en évidence de l'activité xylanasiqne des isolats S2T2H1 (a) et l'isolat (b) S7T2H1 issus de différents milieux.

L'activité xylanase des isolats a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur un milieu contenant le xylane comme seule source de carbone (Viet, 1991).

La visualisation des halos clairs autour des cylindres sur un fond marron correspond aux zones d'hydrolyse du xylane.

Parmi les quatre isolats (S2T2H2, S5T2H2, S7T2H1, et S29T3J31) testés pour leur activité xylanasiqne uniquement les deux isolats S2T2H2 et S7T2H1 semble être actifs (une zone d'hydrolyse de 9 mm), et parmi les milieux de cultures sur lesquels ces deux l'isolat ont été repiquées initialement l'activité xylanasiqne est observé avec le milieu ISP1 (Fig.23). L'activité xylanase des souches d'actinomyètes a été mise en évidence par les travaux de Ninawe *et al.*(2006).

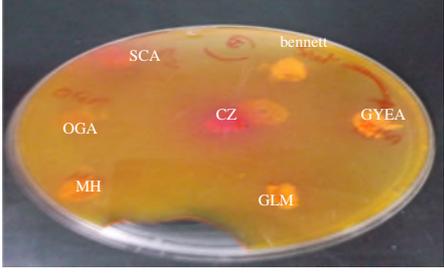
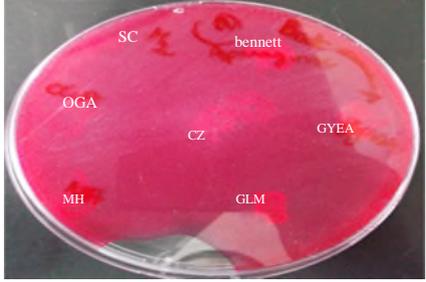
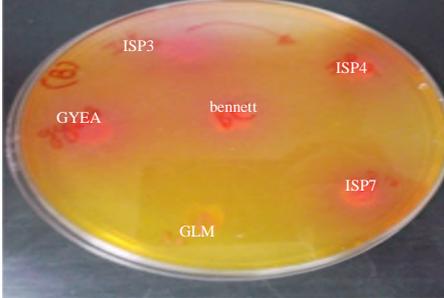
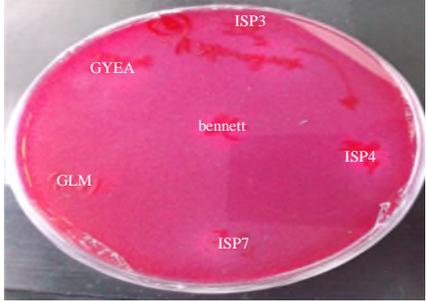
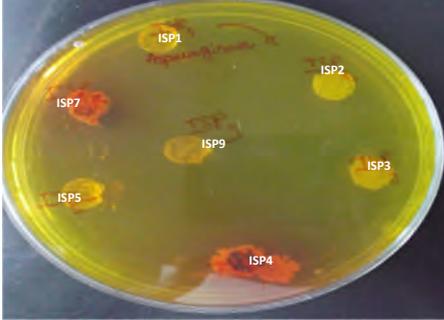
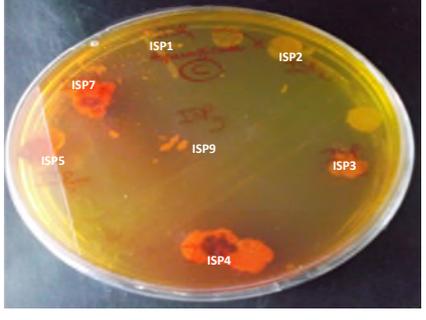
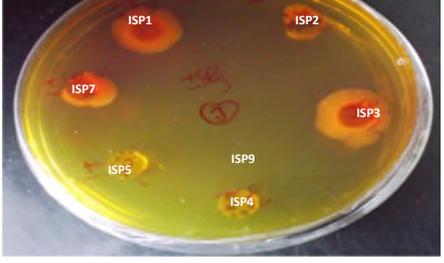
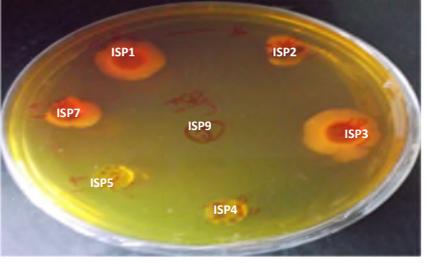
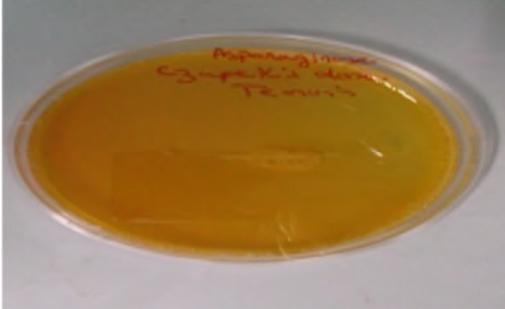
2.3.3. L'activité L- asparaginase

Les souches de *Streptomyces* représentent une bonne source de L-asparaginase, une enzyme qui convertit la L-asparagine en acide L-aspartique et ammoniac (**Fisher et Wray, 2002**). La L-asparaginase a reçu une attention accrue au cours des dernières années pour son potentiel anticancéreux (**Manna et al., 1995**). La L- asparaginase est un agent antinéoplasique utilisé dans la chimiothérapie de la leucémie lymphoblastique (**Keating et al., 1993**). L'action clinique de cette enzyme est attribuée à la réduction de la L-asparagine, de sorte que les cellules tumorales incapables de synthétiser cet acide aminé sont sélectivement tuées par la L-asparagine.

Dans cette étude, l'activité L- asparaginase des isolats sélectionnés S2T2H2, S5T2H2, S7T2H1, et S29T3J31 a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Czapeck Dox.

Le **tableau VII** montre que la couleur des milieux ensemencés avec les isolats a viré vers le rose, alors que la couleur de la boîte témoin est inchangée, ce qui prouve que ces isolats produisent la L-asparaginase. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Gulati et al. (1997)**, qui montrent que l'activité L-asparaginase est caractérisée par un virage de la couleur vers le rose à pH basique dans un milieu de culture contenant le rouge de phénol comme indicateur de pH. Les travaux menés par **Jain et al (2012)** en utilisant la même technique ont mis en évidence également la production de la L-asparaginase par les souches *Fusarium oxysporum* et *E.coli VRY-15* respectivement.

Tableau VII : Mise en évidence de l'activité L-asparaginase des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3H3 issus de différents milieux de culture.

L'isolat	Après 7 jours	Après 14 jours
S2T2H1		
S5T2H1		
S7T2H1		
S29T3H31		
Boite témoin de milieu Czapeck Dox.		

L'isolat S2T2H1 cultivé sur les milieux SCA et Czapeck montre une activité asparaginase après le 7^{ième} jour d'incubation. Au bout de 14 jours le milieu de culture est devenu totalement rose due à une forte sécrétion de l'asparaginase qui a dégradé l'asparagine de milieu. Suite à cette dégradation, les ions ammoniacque secrétées dans le milieu de culture a rendu le milieu Czapeck basique ce qui se traduit par le virage de la couleur de rouge de Congo de vers au rose.

L'isolat S5T2H1 cultivé sur les milieux ISP3, ISP4, ISP7, GYEA, et Bennet semble produire de l'asparaginase après le 7^{ième} jour d'incubation. Le milieu de culture est devenu totalement rose après 14 jours d'incubation.

Les deux isolats S7T2H1 et S29T3J31 semble être moins actifs par rapport aux deux isolats précédents. En effet, l'isolat S7T2H1 n'a montré une activité asparaginase qui est faible que lorsqu'il est cultivé sur les milieux ISP4 et ISP7 après le 7^{ième} et même après le 14^{ième} jour. Tant que l'isolat S29T3J31 a montré une faible activité qui correspond à des zones très restreinte ou le milieu de culture a viré vers le rose. Il s'agit des milieux ISP1, ISP3 et le milieu ISP7 (**tableau VII**).

Plusieurs Streptomyces terrestre comme *S. karnatakensis*, *S. venezualae*, *S. longsporusflavus*, *S. albidoflavus* sont capables de produire des quantités détectables de L-asparaginase (**Narayana et al., 2008**), mais il ya peu de travaux sur la production de cette enzyme à partir de Streptomyces marins, on peut citer *S. aurantiacus* (**Gupta et al., 2007**), Streptomyces sp. S3, S4 et K8 (**Basha et al., 2009**). L'enzyme est produite par cultures submergées et à l'état solide. Les L-asparaginases extra-cellulaires sont plus avantageuses que celles intracellulaires, car elles peuvent être produites abondamment dans le bouillon de culture.

Dans notre cas on remarque que les deux isolats S2T2H1 et S7T2H1 produisent à la fois les trois enzymes cellulase, xylanase et L-asparaginase, Cette propriété est relevée aussi par (**Sirisha et al., 2013**) qui ont isolé 22 souches de la baie du Bengale qui produisent beaucoup d'enzymes à la fois ; des lipases, des caséinases, de gélatinases, de cellulases et d'amylases. De même, **Leon et al. (2007)** ont isolé de nombreux actinomycètes dans les sédiments marins de la côte centrale du Pérou avec des activités enzymatiques multiples. L'activité enzymatique des isolats sur milieu solide est un criblage primaire qui permet de sélectionner les isolats actifs, un test quantitatif sur milieu liquide doit se faire pour chacune des isolats précédents afin de pouvoir sélectionner les plus performants.

3- Mise en évidence de la production des antibiotiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide

L'isolat S5T2H1 est retenu sur la base des tests précédant à l'égard de son potentiel important de production de métabolites bioactifs. Néanmoins plusieurs auteurs ont relevé que la production des antibiotiques sur les milieux solides peut ne pas se faire sur milieux liquides. De ce fait un suivi de la cinétique de production des antibiotiques sur le milieu liquide SCA (milieu d'isolement) a été effectué en utilisant deux germes cibles sensibles aux substances produites par notre isolat et qui sont *Staphylococcus aureus* et *Botrytis cinerea*. Pour ce faire, des pré cultures de cet isolat sur milieu SCA ont servi pour réaliser des cultures sur le même milieu pendant 19 jours à 28°C sous agitation à 250rpm. Durant la période d'incubation des fractions de 1 ml de surnageant de culture ont été récupérées quotidiennement. Ces dernières ont été testées, par la suite, chacune par la technique des puits contre les deux germes cibles cités précédemment sur les milieux Muller Hinton (bactéries) et gélose à l'extrait de malt (champignons) respectivement. Les résultats en termes de diamètres des zones d'inhibition en fonction de jours d'incubation sont représentés sur les deux figures qui suivent :

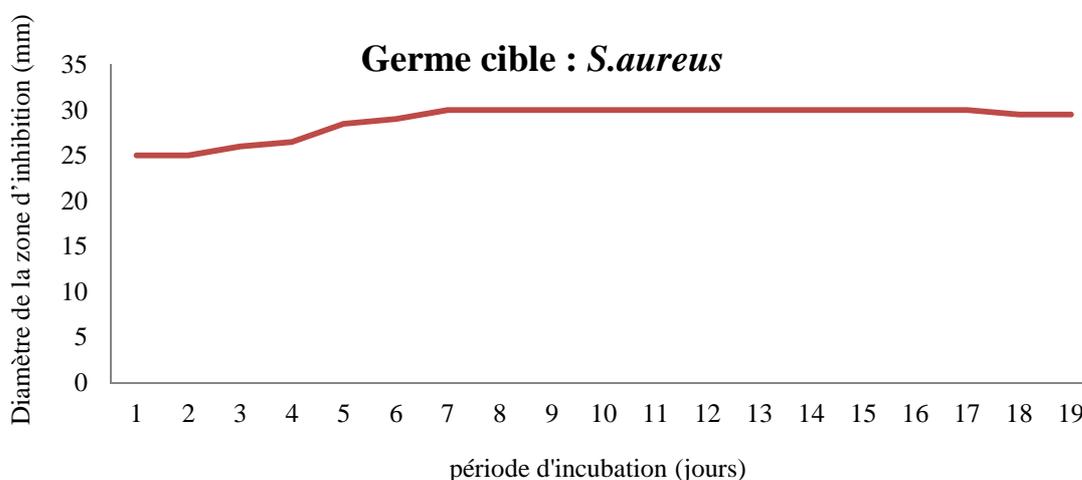


Fig.24: Suivi de la production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide SCA vis-à-vis de *S. aureus*.

La figure ci-dessus met en évidence l'activité antibiotique de l'isolat S5T2H1 obtenue sur le milieu liquide SCA vis-à-vis du germe cible *S.aureus*. On remarque un début précoce de cette activité qui correspond un diamètre de la zone d'inhibition de 25mm dès le 1^{ier} jour d'incubation. Cette dernière augmente à partir de 3^{ième} jour et ce jusque au 7^{ième} jour

d'incubation où on observe une stabilité de l'activité antibiotique qui correspond à une zone d'inhibition optimale de 30mm pendant 11 jours alors que sur le milieu solide nous avons enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de 35mm .Une diminution de diamètre de la zone d'inhibition est observée après le 18^{ième} jour d'incubation. Ceci signifie que la culture peut être arrêtée au bout de 7 à 8 jours car la production de la substance active n'augmente plus.

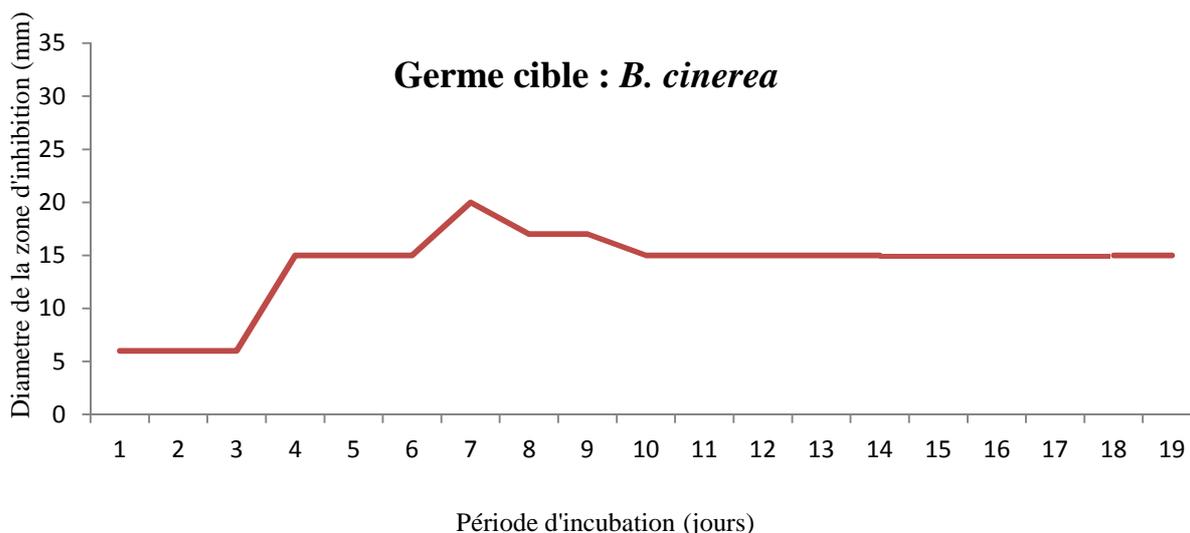


Fig.25 : Suivi de la production d'antifongiques de l'isolat S5T2H1 sur milieu liquide SCA vis-à-vis de *B.cinerea*.

La figure précédente mit en évidence l'activité antifongique de l'isolat S5T2H1 vis-à-vis le germe cible *B.cinerea* sur le milieu liquide SCA.

Contrairement à l'activité antibactérienne précédente, l'activité antifongique n'est observée qu'après le 4^{ième} jour d'incubation (un diamètre de zone d'inhibition de 15mm). Cette valeur est restée stable jusqu'au sixième jour d'incubation. L'activité antifongique a augmenté par la suite pour atteindre un maximum de 20 mm au bout de 7^{ième} jours alors que sur le milieu solide nous avons enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de 35mm. Par la suite une diminution de cette activité est observée à partir de 10^{ième} jour.

En effet, plusieurs auteurs ont remarqué que la production des antibiotiques ne se fait que sur les milieux solides et le passage au milieu liquide pose quelques problèmes, soit par l'arrêt de la synthèse des antibiotiques ou bien par une diminution de leur production. Sharma et al, 2011 ; Singh et al., 2006, expliquent cela soit par la variation de la répartition des nutriments avec le temps de la fermentation alors que la distribution de ceux-ci autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie que très peu (**Badji et al. 2005**), ou par la différence

de la morphologie des actinomycètes lorsqu'ils évoluent respectivement dans le milieu liquide et solide (**Bushell,1993**), Généralement la production des antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments de mycélium. En effet en milieu liquide et à cause de l'agitation, les filaments mycéliens se fragmentent, et les petits fragments se trouvent incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques (**Reghioua et al, 2008**), contrairement au milieu solide où la fragmentation de mycéliums peut être évitée ce qui favorise la production importante d'antibiotique (**Gurung et al, 2009**).

4- Choix de meilleur milieu liquide pour la production des antibiotiques, et de la croissance de l'isolat S5T2H1

La capacité des micro-organismes à produire des antibiotiques n'est pas une propriété fixe, mais peut être largement augmentée ou complètement perdue dans différentes conditions de nutrition et /ou de culture (**Krassilnikov, 1960**). Afin d'obtenir des rendements élevés de produits, il est indispensable de concevoir un milieu de production approprié pour un processus de fermentation efficace (**Macedo et al., 2007**). Les milieux utilisés pour la culture de micro-organismes doivent contenir tous les éléments dans une forme appropriée pour la synthèse de substances et de cellules pour la production de produits métaboliques. Un milieu de culture parfaitement équilibré est obligatoire pour une production maximale d'un composé cible.

Les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance, et varient avec la souche utilisée et le métabolite secondaire synthétisé. Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et pendant la phase de production des métabolites secondaires, des milieux offrant un bon compromis ont dû être développés. Dans cette optique nous avons testé cinq milieux de culture préconisés dans la littérature scientifique pour la production des substances antimicrobiennes et que sont : SCA, MSA, ISP2, GYEA et Bennett.

Dans cette étude des prés cultures de 5 ml de l'isolat S1T2H1 sont préparées à partir les milieux cités précédemment, celles-ci ont servi à ensemercer des cultures de 50 ml du même milieu puis sont mises en incubation à 28°C sous agitation de 250 rpm. Des prélèvements ont été effectués quotidiennement à partir des trois meilleures cultures de chaque milieu, centrifugés à 7000g/20min dans des tubes eppendorfs préalablement tarés.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des puits (**Nouasri, 1996**) sur milieu Muller Hinton et gélose à l'extrait de malt après 24 h à 37°C et 48h à 22°C pour *S.aureus* et

B. cinerea respectivement. D'autre part, les culots sont lavés par centrifugation avec de l'eau distillée puis, séchés et après pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids sec de la tare.

L'évolution du pH du milieu est suivie quotidiennement en parallèle avec l'évolution de la biomasse durant la culture.

Les résultats de cette étude sont montrés dans les figures qui suivent :

4-1-Choix de meilleur milieu de croissance et de production de l'antibiotique antibactérien par l'isolat S1T2H1 à l'égard de *S.aureus*

➤ Sur le milieu SCA

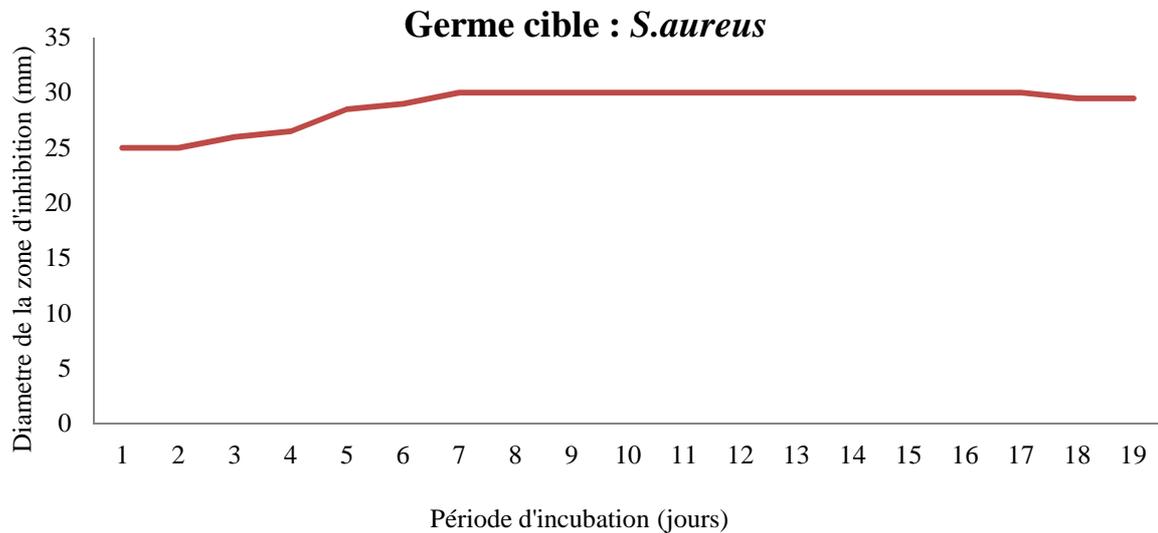


Fig.24: Cinétique de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu SCA.

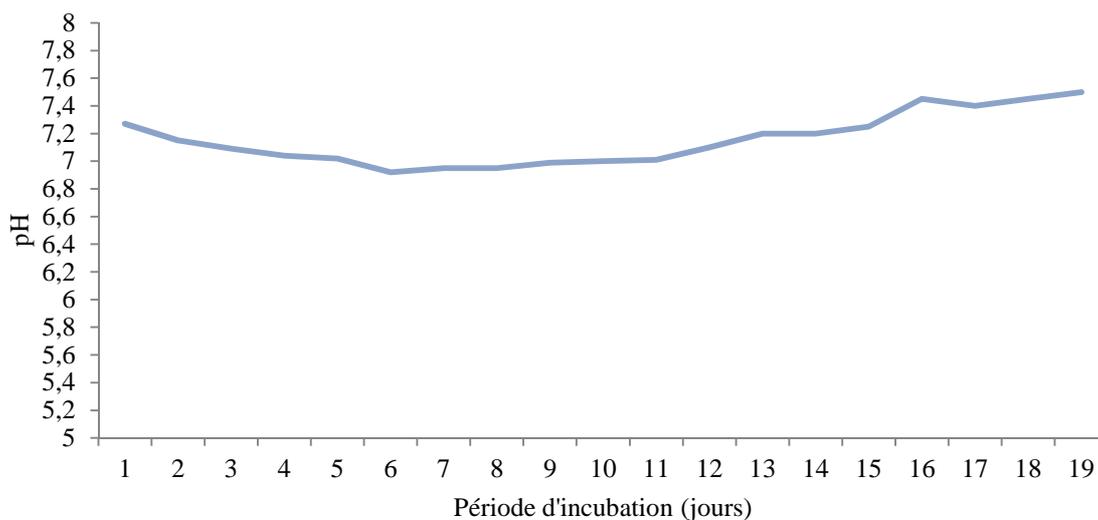


Fig.26 : Suivi de l'évolution du pH du milieu SCA inoculé par l'isolat S5T2H1.

L'allure générale de la courbe de cinétique de production (**Fig.26**) suggère une activité anti-staphylococcique déjà présente dans la pré culture et qui est très précoce durant la culture du germe producteur ce qui pourrait laisser présager la synthèse d'une substance de nature protéique de type peptidique (de courte chaîne) ou enzyme ayant une activité antibiotique ; celui-ci agira par la suite en synergie avec la ou les substances secondaires secrétées. Une activité antibactérienne maximale correspondant à une zone d'inhibition de 30 mm est enregistrée sur ce milieu sur une période maximale de 11 jours, suivie d'une diminution à partir de 18^{ième} jour d'incubation.

Des variations de pH allons de 6,92 à 7,87 ont caractérisé la culture sur ce milieu.

Remarque :

Le suivi de poids sec de l'isolat S5T2H1 n'est pas présenté sur la figure à cause du fait que nous avons obtenu des résultats inexploitable.

➤ Sur milieu MSA

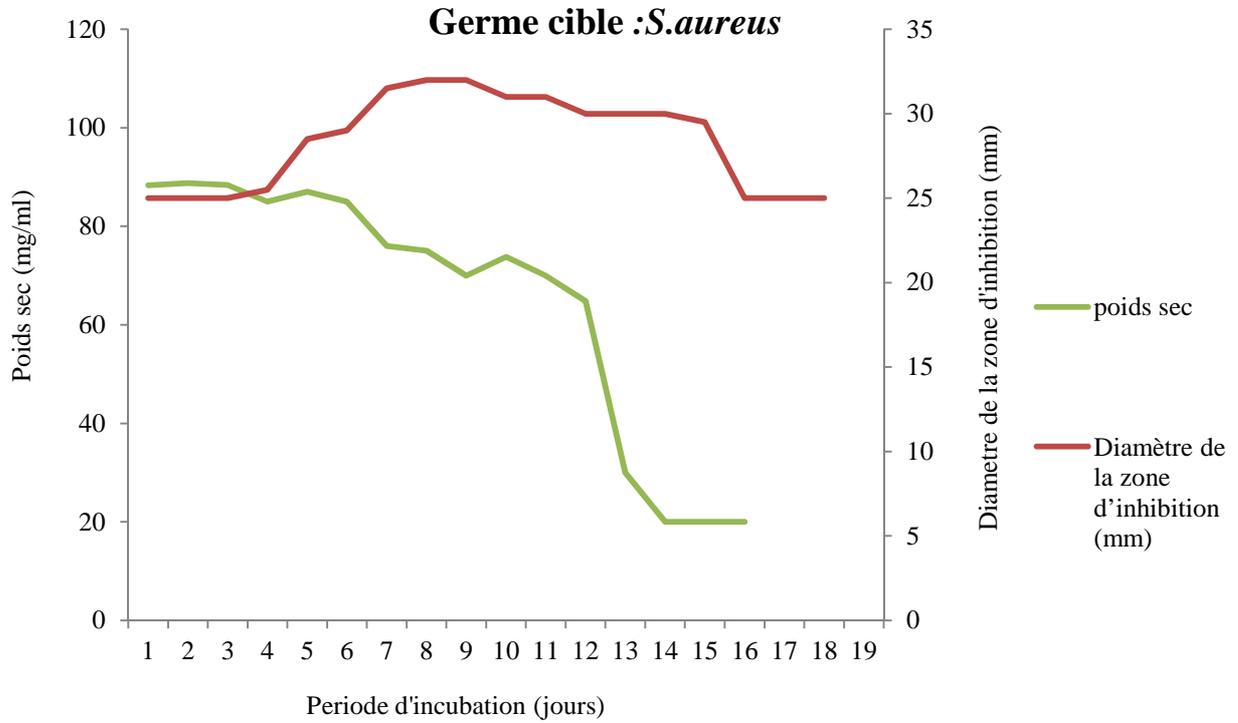


Fig.27 : Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu MSA.

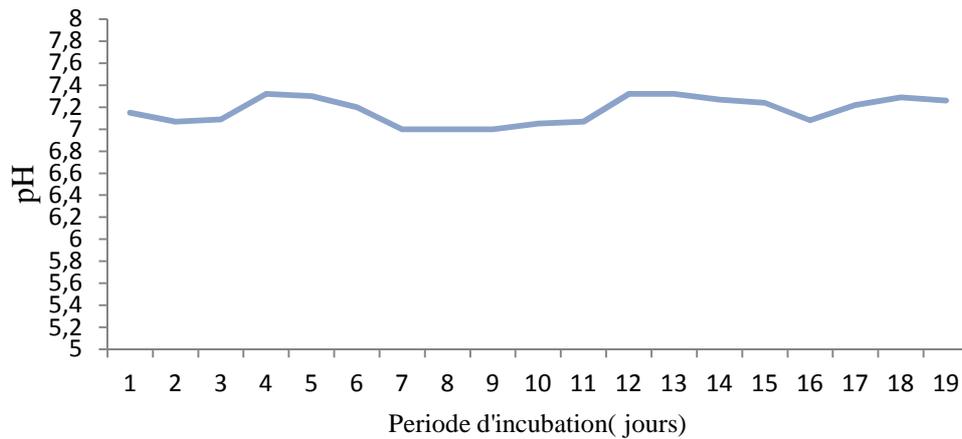


Fig.28 : Suivi de l'évolution du pH du milieu MSA inoculé par l'isolat S5T2H1.

La culture de l'isolat S5T2H1 sur milieu MSA, se déroule à un pH quasiment stable aux alentours de 7, (**Fig.28**). La production de l'agent antibactérien a déjà commencé pendant le préculture comme pour le milieu précédant et des valeurs de zone d'inhibition de 25 mm ont été enregistrées pendant les trois premiers jours d'incubation. La production a été jugée maximale après 08 jours de culture ce qui correspond à un diamètre de zone d'inhibition en moyenne de 32 mm durant une période plus courte relativement au milieu précédant (9 jours) (**Fig .27**). Des le 5^e jour, nous constatons une baisse drastique du poids sec, donc des cellules, mais vu la nature mycélienne de ces microorganismes producteurs (les actinomycètes), cette méthode reste relativement subjective surtout si elle n'est pas accompagnée d'une sonication en vue d'homogénéiser les échantillons.

➤ **Sur milieu ISP2**

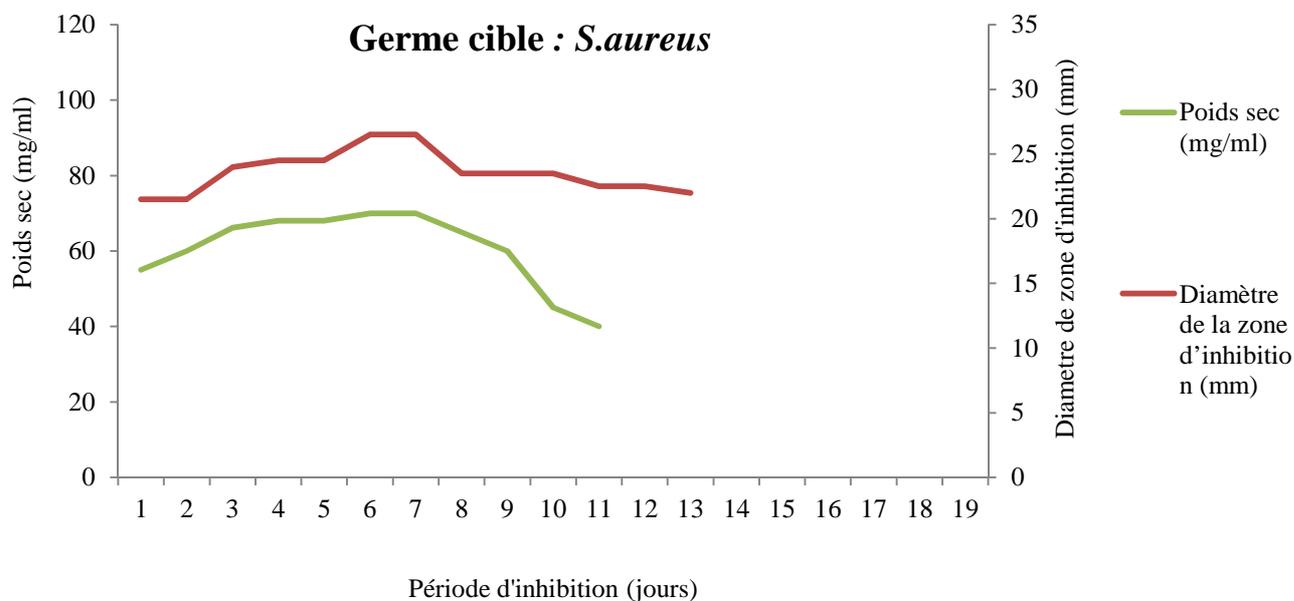


Fig.29: Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu ISP2.

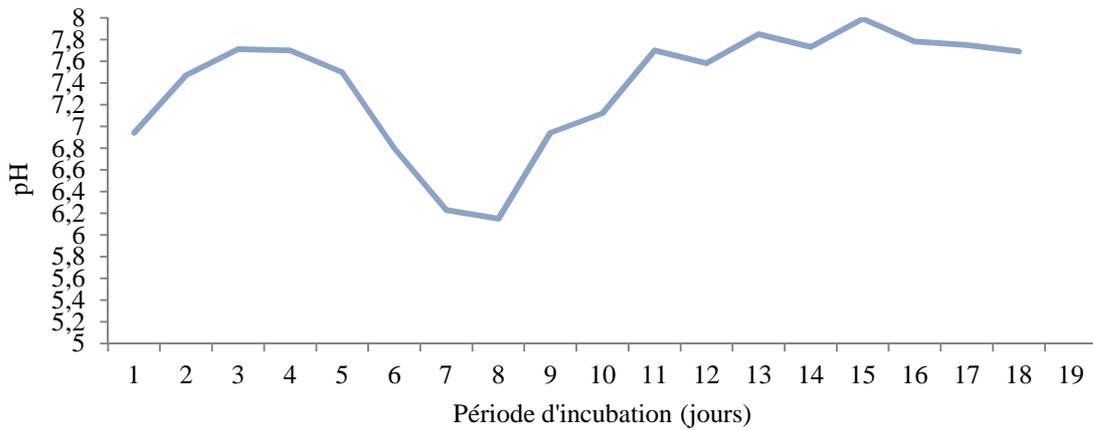


Fig.30 : Suivi de l'évolution du pH du milieu ISP2 inoculé par l'isolat S5T2H1.

Sur le bouillon ISP2 la production de l'agent antibactérien a été jugée maximale après seulement 06 jours de culture (**Fig.29**). Néanmoins une diminution de l'activité antibactérienne et de poids sec est observée juste après le 7^{ième} jour, ce qui serait synonyme d'autolyse et/ ou d'épuisement des nutriments essentiels du milieu.

Des variations de valeurs de pH allant de 6,15 à 7,99 sont enregistrées pendant cette culture (**Fig.30**).

➤ **Sur milieu GYEA**

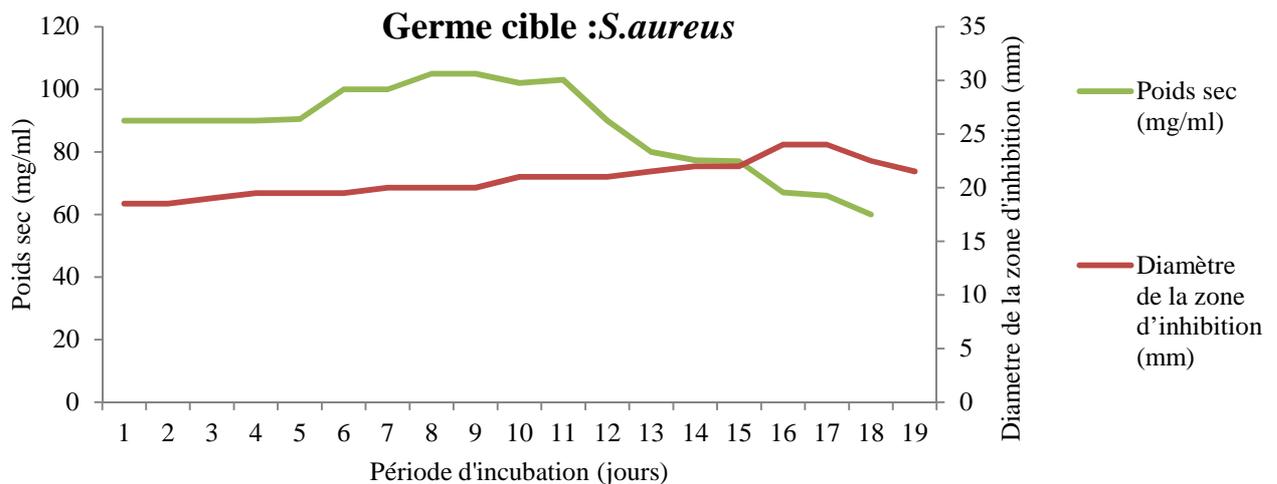


Fig.31: Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu GYEA.

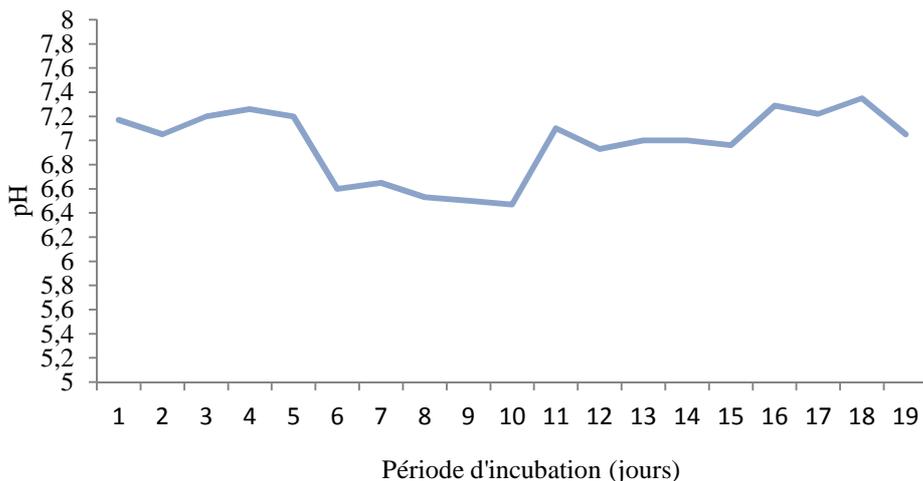


Fig.32 : Suivi de l'évolution du pH du milieu GYEA inoculé par l'isolat S5T2H1.

La culture de cet isolat S5T2H1 sur le bouillon GYEA, se déroule à un pH fluctuant entre 6.4 à 7 (Fig.32) L'allure de la courbe suggère que ce milieu n'est pas très favorable à la croissance, ni à la production de substance active car les valeurs obtenues sont pratiquement stables depuis le début de la culture jusqu'au 17^{ème} jour. La production de l'agent antibactérien a été jugée maximale après 16 jours de fermentation sur ce bouillon (Fig. 31), cette période est excessivement longue et de ce fait ce milieu ne sera pas retenu. La phase d'adaptation de l'isolat dure 06 jours puis le poids sec connaît une légère augmentation jusqu'au 12^e jour, ceci est corrélé positivement à l'évolution du pH du milieu.

➤ **Sur milieu Bennett**

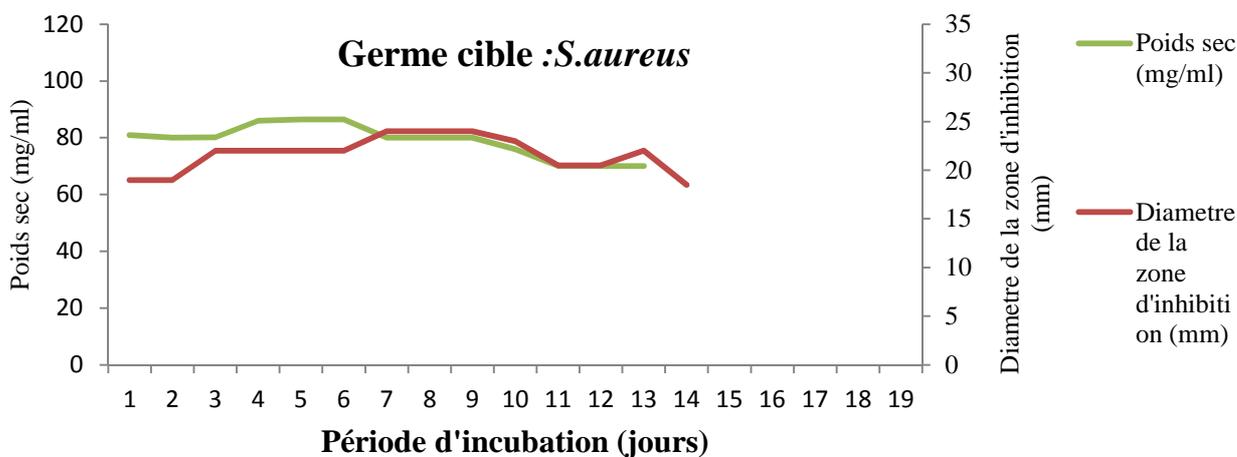


Fig.33 : Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques antibactériens de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett.

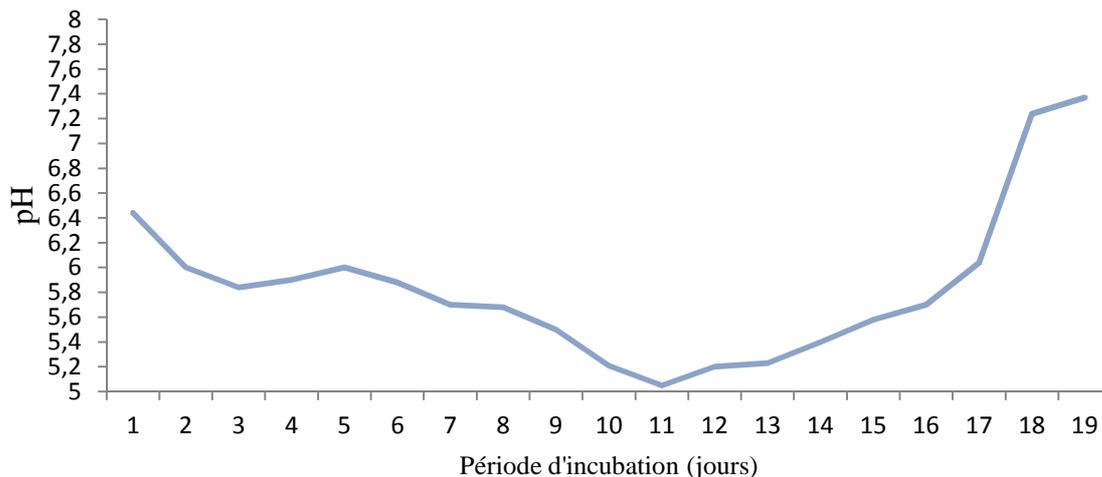


Fig.34 : Suivi de l'évolution du pH du milieu Bennett inoculé par l'isolat S5T2H1.

La culture de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett, se déroule à un pH de 6.4 au début de la culture, qui s'abaisse jusqu'à 5 après onze jours de culture, probablement en raison de la forte activité enzymatique de dégradation de la source de carbone, en l'occurrence le glucose, puis remonte du fait d'une alcalinisation du milieu. Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou "effet glucose") (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990**).

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (**Lounès et al., 1995**) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol. L'allure de la courbe suggère également que ce milieu n'est pas très favorable à la croissance, ni à la production de substances actives car les valeurs obtenues pour la croissance et la production sont pratiquement stables depuis le début de la culture jusqu'au 14^e jour. La production de l'agent antibactérien a été jugée maximale après le 7^{ème} jour de culture dans ce bouillon (**Fig.33**) de ce fait ce milieu, ne sera pas retenu.

4-2-Choix de meilleur milieu de croissance et de production de l'antifongique par l'isolat S1T2H1 à l'égard de *B.cinerea*

➤ Sur milieu SCA

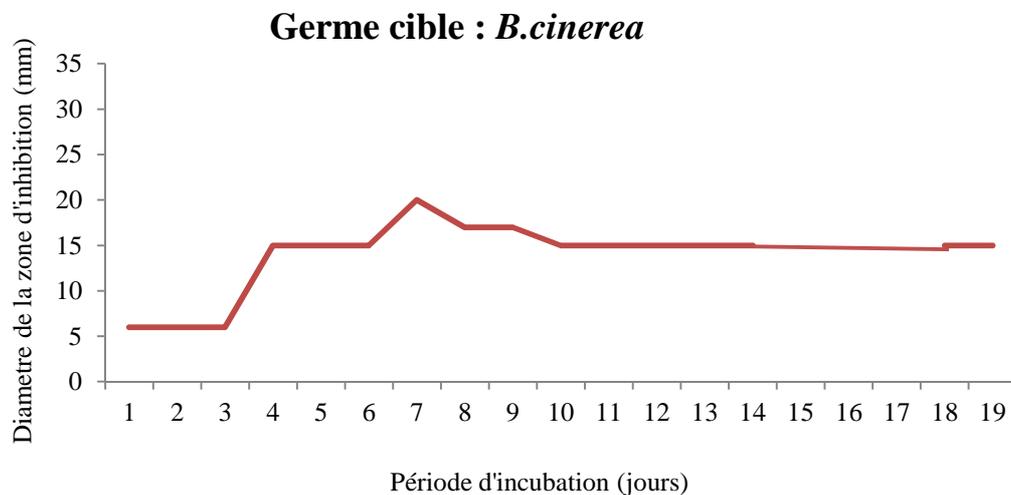


Fig.25 : Cinétique de production d'antifongiques de l'isolat S5T2H1 sur milieu SCA

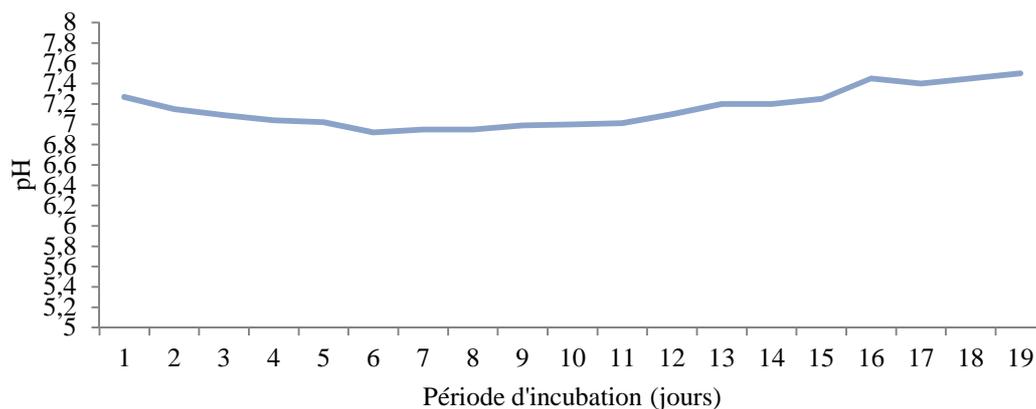


Fig.26 : Suivi de l'évolution du pH du milieu SCA inoculé par l'isolat S1T2H1.

D'après la **fig.25** on remarque que la production de la substance antifongique anti-*Botrytis cinerea* sur bouillon SCA commence au bout de 4^{ème} jour avec une zone d'inhibition de 15 mm et augmente sensiblement pour atteindre un maximum le 7^e jour (20 mm de zone d'inhibition). Le pH du milieu reste constant pratiquement durant toute la culture.

➤ Sur milieu MSA

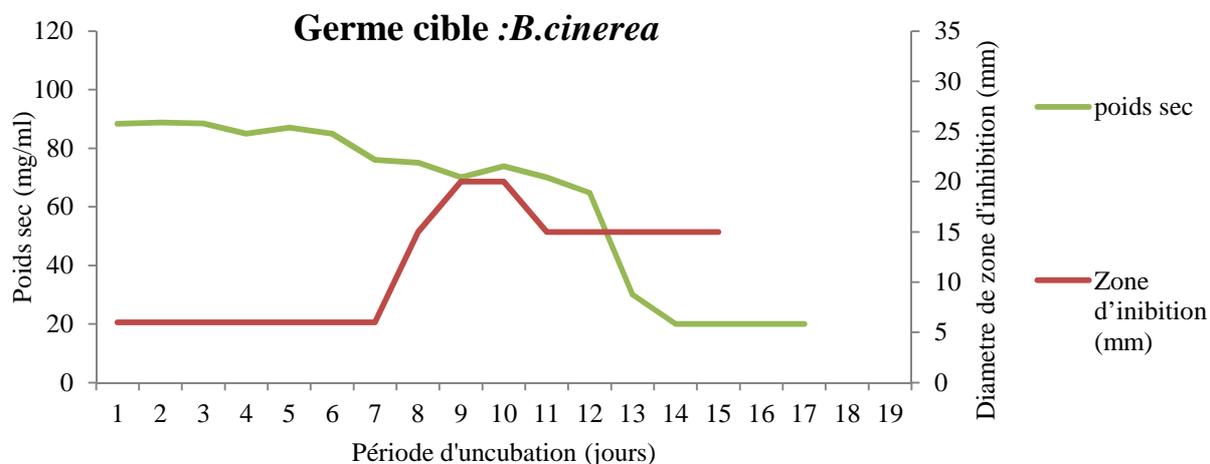


Fig. 35: Cinétique de croissance et de production d'antifongiques de l'isolat S5T2H1 sur milieu MSA.

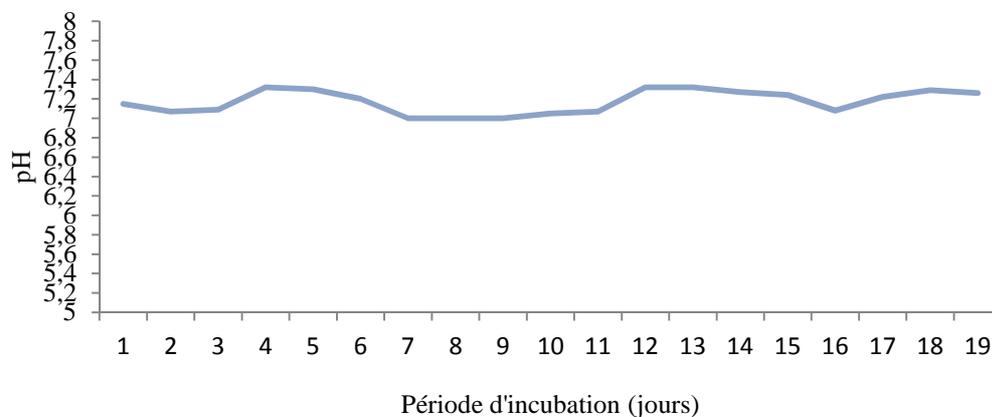


Fig. 28 : Suivi de l'évolution du pH du milieu MSA inoculé par l'isolat S5T2H1.

Le suivi de la culture et de la production de substances antifongiques sur le bouillon MSA montre un début de synthèse de substance anti-*B.cinerea* qui se fait vers le 8^{ème} jour avec 12 mm de diamètre de zone d'inhibition, puis, la production augmente progressivement pour atteindre un maximum le 11e jour (20 mm de zone d'inhibition). Le pH du milieu reste là aussi pratiquement constant durant toute la culture. La substance active semble être produite au milieu de la phase stationnaire de croissance. En effet la croissance évolue rapidement

dans le cas de l'utilisation d'un substrat carboné complexe (amidon), la pré culture aurait permis à l'isolat de s'adapter assez vite pour cette catégorie de microorganismes et de synthétiser les enzymes nécessaires à la dégradation de ce substrat.

- **Remarque :** dans le cas de cinétique de production et de croissance de l'isolat S5T2H1, sur le milieu ISP2, nous avons obtenus des résultats inexploitable et c'est pour cela qu'ils ne sont pas présentés.
- **Sur milieu GYEA.**

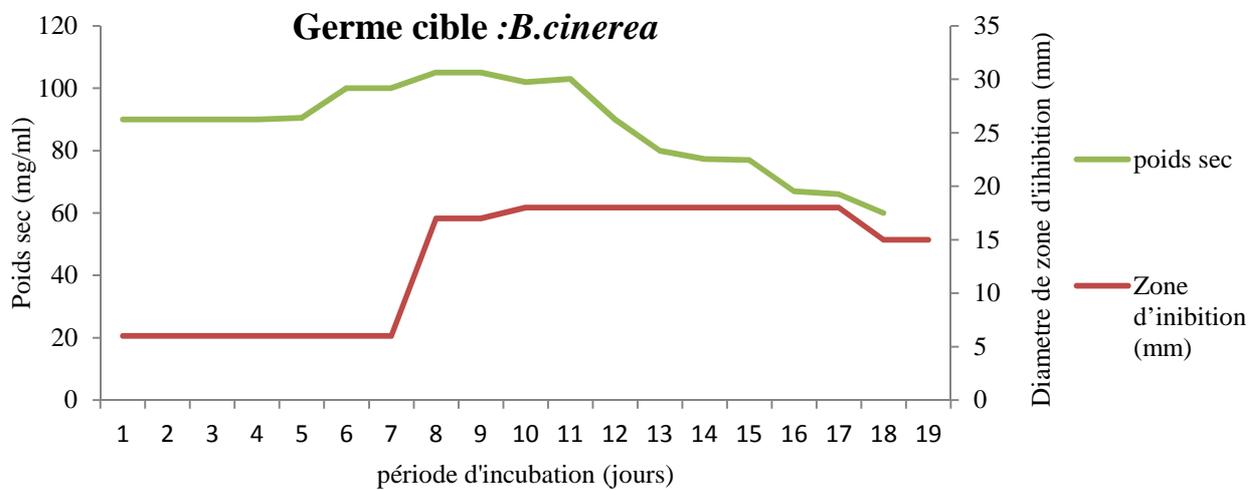


Fig.36 : Cinétique de croissance et de production d'antifongiques de l'isolat S5T2H1 sur milieu GYEA.

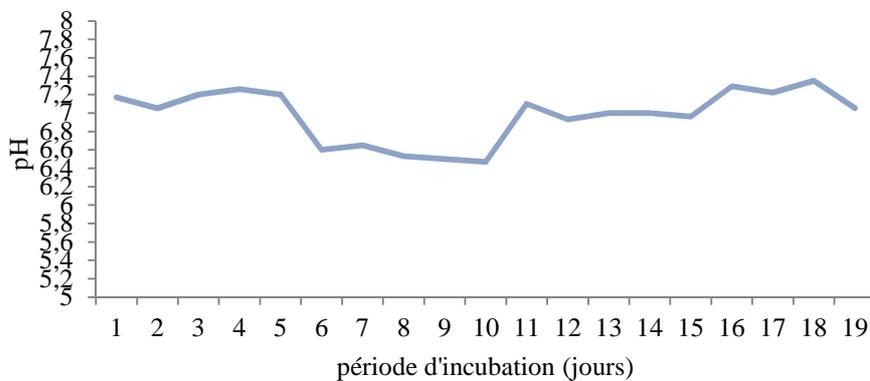


Fig. 32 : Suivi de l'évolution du pH du milieu GYEA inoculé par l'isolat S5T2H1.

Le suivi de la culture et de la production de substances antifongiques sur milieu **GYEA** montre que la substance active semble être produite bien après l'entame de la phase stationnaire de croissance. La croissance relativement rapide et dense s'explique par le fait que la source de carbone qui est le glucose est facilement assimilable par cet isolat, celle-ci commence à ralentir à partir du 11^{ème} jour ce qui correspond à la fin de la phase stationnaire. La figure (**Fig.36**) montre que le début de synthèse de substance anti-*Botrytis cinerea* a lieu vers le 8^{ème} jours puis la production a augmenté sensiblement pour atteindre un maximum le 10^{ème} jour (18 mm de zone d'inhibition) pour une période de 8 jours. Par ailleurs Le pH du milieu varie durant la culture entre 6.4 et 7.2.

➤ **Sur milieu Bennett**

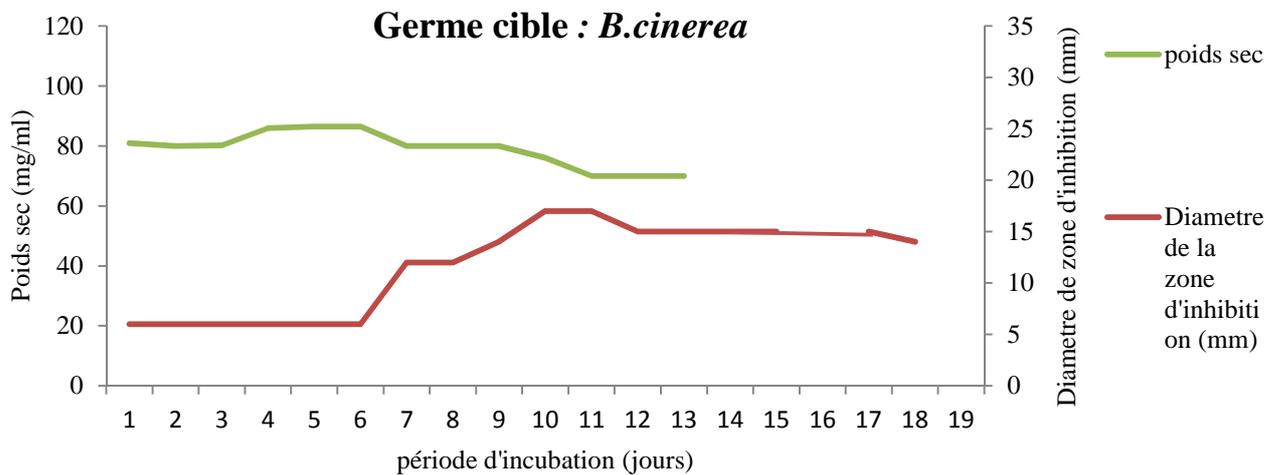


Fig.37 : Cinétique de croissance et de production d'antifongiques par l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett.

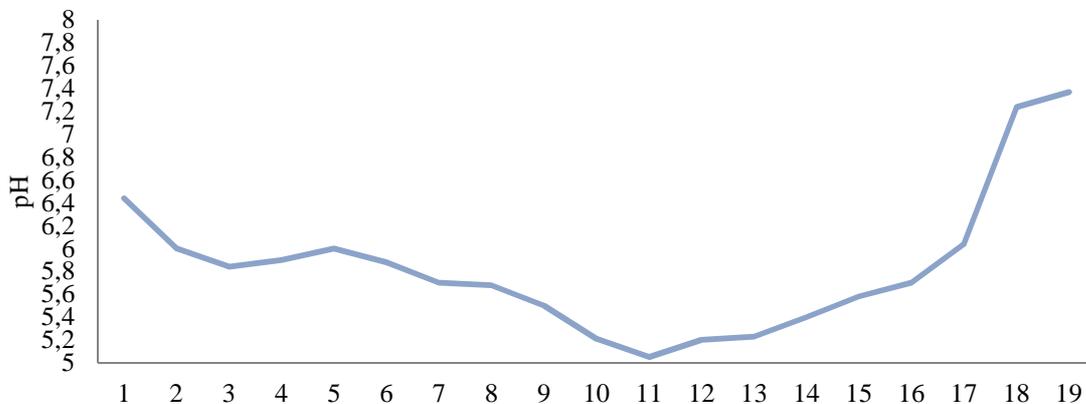


Fig.34 : Suivi de l'évolution du pH du milieu Bennett inoculé par l'isolat S5T2H1.

La culture de cet isolat sur milieu Bennett, se déroule à un pH fluctuant, soit entre 6.4 au début de la culture, puis s'abaisse jusqu'à 5 après 11 jours de culture pour remonter ensuite à 7.2 probablement en raison de la forte activité enzymatique de dégradation de la source de carbone en l'occurrence le glucose au début de la croissance (**Fig. 34**). La production de la substance antifongique commence le 7^{ème} jour d'incubation et atteint son maximum le 10^{ème} et le 11^{ème} jour d'incubation (**Fig.37**).

D'après les résultats obtenus, on remarque que le bouillon SCA donne de grandes zones d'inhibition (moyenne : 30 mm), après 3 jours d'incubation et pendant une période maximale de 11 jours pour le test d'activité antibactérienne vis-à-vis *S. aureus* et le même milieu (SCA) nous a permis d'aboutir à une activité antifongique importante à l'égard de *B.cinerea*. Ces résultats nous amènent à retenir ce milieu pour la production des substances bioactives. En effet, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les travaux de (**Badji et al, 2005**), (**Vasavada et al., 2006**) et (**Haggag,2014**).

Les résultats obtenus confirment que la composition des milieux de culture, en particulier la nature et la concentration des sources de carbone et de nitrogène, influent considérablement sur la quantité ainsi que la qualité des substances antimicrobiennes sécrétées par les actinomycètes (**Arasu et al, 2009 ; Song et al, 2012**).

Les variations de zones de lyse sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture. Ainsi, le choix des milieux de culture et des microorganismes-tests est d'une importance capitale pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des actinomycètes.

Le meilleur milieu pour la production de la biomasse semble être le GYEA qui nous a permis d'obtenir un maximum de poids sec soit : 105mg/ml au bout du 8^{ème} et 9^{ème} jour d'incubation. Nous concluons alors que les conditions permettant une croissance cellulaire rapide et la production de la biomasse sont différentes des conditions de production de métabolites, comme l'a observé (**Russell,1974**) et (**Miao et al. 2006**).

Remarque :

Le **tableau XIX**, (**annexe X**), montre quelques photographies de résultats de la cinétique de production d'antibiotiques par l'isolat S5T2H1 sur différents milieux liquides.

5. Etude taxonomique des isolats sélectionnés

L'isolat S5T2H1 a été sélectionné, en raison sa capacité à produire de nombreux métabolites biactifs (antibiotique et enzymatique).

❖ Détermination du genre

5.1. L'étude morphologique

5.1.1. L'étude macromorphologique

: Les caractères macromorphologiques de l'isolat S5T2H1.

Le milieu de culture	La croissance	La sporulation	La couleur de mycélium aérien	La couleur de mycélium de substrat	La production de pigment diffusibles	L'aspect des colonies
ISP3	+++	++++	Gris	Jaune pale	-	
ISP4	+++	+++	Blanc	Jaune pale	-	
ISP5	++	-	Blanc	Jaune	-	
ISP7	+++	+++	Blanc	Maron	marron	
ISP9	+++	-	Beige	Jaune	-	ND
GLM	++++	-	Blanc	Creme	-	
GYEA	++++	+++	Rose clair	Jaune foncé	-	
Bennett	++++	++++	Blanc	Jaune foncé	-	
GN	+	-	-	Jaune	-	

Tableau VIII (suite)

Le milieu de culture	La croissance	La sporulation	La couleur de mycélium aérien	La couleur de mycélium de substrat	La production de pigment diffusibles	L'aspect des colonies
MH	+	-	-	Cèrme	-	
GEM	+++	+++	Blanc	Maron	-	ND
OGA	++++	++	Beige	Jaune pale	-	
SCA	++++	++++	Blanc	Jaune pale	-	
M2 W	+++	+++	Blanc	Jaune pale	-	ND

Remarque

++++ : Croissance très abondante ; +++ : croissance abondante ; ++ : bonne croissance ; + : croissance faible ; - : croissance nulle.

Les colonies de l'isolat S5T2H1 cultivées sur divers milieux à 28°C pendant 21 jours sont essentiellement de forme circulaire d'aspect cotonneux et duveteux sur certains milieux (ISP3, ISP4, ISP5, Bennett, GYEA et SCA) et rugueux sur d'autres (GEM et OGA) avec un diamètre variant de 2-10 mm. L'isolat présente une croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP3, ISP4, Bennett, GYEA et GEM. La croissance est relativement moyenne sur milieu ISP5, GLM et OGA ; elle est par contre faible voir absente sur les milieux MH et GN. Le mycélium aérien est stable et non fragmenté de couleur blanc ou beige et celui du substrat varie selon le milieu utilisé, de jaune à marron du a la production de pigments mélanoides. Les colonies présentent un aspect de craie, poudreux et rugueux sur OGA, GEM et ISP3 et se présentent sous forme de cratères sur Bennett, avec des diamètres de 2-6 mm. La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique est rapportée dans le **tableau (VIII)**.

5.1.2. L'étude micromorphologique

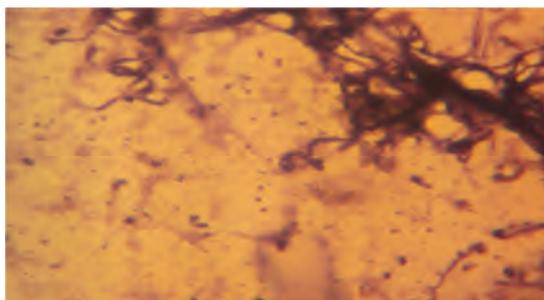


Fig.38 : Observation de la coloration de Gram à l'objectif à immersion de l'isolat S5T2H1.

Ainsi que le montre la figure ci-dessus, au grossissement X 100, la souche mycélienne ramifiée est à Gram positif.



Fig.39 : Micromorphologie de l'isolat S5T2H1 cultivé pendant 21 jours à 28°C sur milieu SCA, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien (chaines de spores en forme de verticilles).Gr : X400.

Le mycélium du substrat de l'isolat S5T2H1 est ramifié et non fragmenté sur les milieux solides. Le mycélium aérien se présente sous forme de filaments épais portant des chaînes de spores courtes et agencées en verticilles primaires ou secondaires. Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents. **La figure (47)** montre les chaînes de spores de type spiralées portées par des filaments du mycélium aérien, une forme typique des *Streptomyces* observée au microscope optique (X 400).

❖ **Caractérisation de l'isolat S5T2H1**

5.2. Étude physiologique

Le tableau IX illustre les résultats des tests physiologiques réalisés pour l'isolat S5T2H1 dont certaines spécificités physiologiques sont notées.

Tableau IX: Les caractères physiologiques de l'isolat S5T2H1.

Croissance en présence de NaCl	
0%	-
3,5%	+++
6,5%	++
Croissance à	
pH 5	+++
pH 7	+++
PH 8	++
pH 9,5	++
croissance à	
4°C	-
28°C	++++
30°C	+++
37°C	++
45°C	-
Croissance en présence de	
Tellurite de K (0.01%)	++
Tellurite de K (0.05%)	+
Azide de sodium (0.001%)	+
Azide de sodium (0.01%)	-
Cristal violet (0.001%)	+
Phénol (0.01%)	+
Phénol (0.05%)	-
Résistance ou la sensibilité aux antibiotiques	
Lincomycine L10	R
Erythromycine E15	I
Vancomycine VA30	S
Oxacycline OX5	I
Pristinomycine PT15	I
Acide fusidique FA10	R
la tétracycline TE 30	S
L'ampicilline Amp 10	R
Ciprofloxacine CIP 5	S

5. 3. Etude biochimique

Le tableau X illustre les résultats des tests biochimiques réalisés pour l'isolat S5T2H1.

Tableau X: Utilisation de substrats organiques simples et complexes par l'isolat S5T2H1.

Caractère	Résultat
Dégradation de :	
Amidon	+
Caséine de lait	+
Gélatine	+
Tyrosine	+
Tween 80	+
Dégradation des sucres	
D ⁺ Glucose	+
Fructose	+
D Mannitol	+
D ⁺ Saccharose	+
Lactose	+
D ⁺ Sorbitol	+
L Arabinose	+
Sucrose	+
D ⁺ galactose	+
D ⁺ xylose	+
Dégradation des acides aminés	
L proline	+
L lysine	+
L methionine	-
L tryptophane	-
L asparagine	+
L arginine	-
Cysteine	-
Glycine	ND
L leucine	+
Décarboxylation des sels de sodium	
Tartrate	+
Citrate	+
Oxalate	+
Propionate	+
Acétate	+
Production de :	
Pigments mélanoides	+
Nitrate réductase	-
Catalase	+

L'isolat S5T2H1 a l'aptitude de dégrader l'ensemble des substrats suivants ; l'amidon, la caséine de lait, la gélatine, et le tween 80 et les hydrates de carbone testés. Il peut croître en présence de tous les sucres ; le D⁺ glucose, le fructose , le D- mannitol, le D -saccharose, le lactose, D⁻ sorbitol, L -arabinose, le sucrose, le D⁻ galactose et le D⁺ xylose , comme il pousse correctement en présence des acides aminés suivants : L proline , L asparagine, leucine et lysine.(**tableau X**).

Les pigments mélanoides sont produits par l'isolat S5T2H1 sur milieu ISP7, il possède une catalase et la croissance est observée aux températures 28°C, 30°C et 37°C, l'optimum étant à 28°C à pH 7. Cet isolat est capable de se développer à des concentrations importantes en NaCl atteignant 6.5 % soit 65g/l. La croissance optimale a été enregistrée vers 3,5 g/l (**Fig.40**). Les figures ci-dessous illustrent quelque uns de nos résultats.

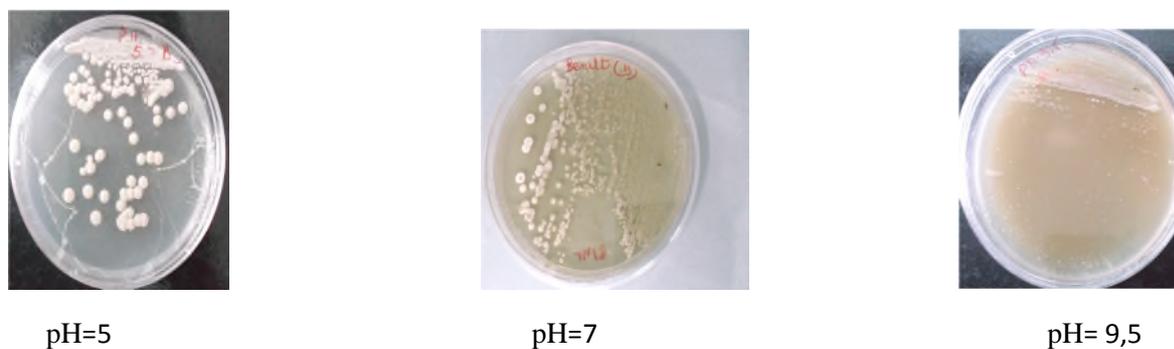


Fig. 40: Croissance de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett aux pH 5, 7, et 9,5.

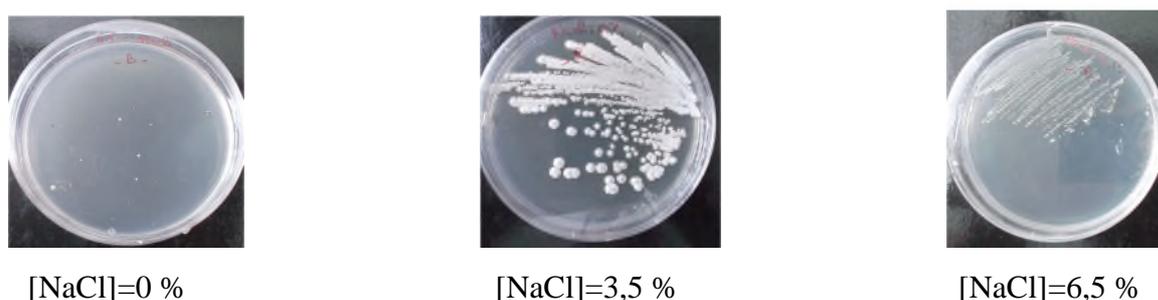


Fig41 : Croissance de l'isolat S5T2H1 sur milieu Bennett aux concentrations différentes en NaCL.

L'isolat S5T2H1 apparaît résistant à lincomycine (L10), à l'acide fusidique (FA10) et à l'ampicilline (Amp 10). Ces antibiotiques ont comme mécanismes d'actions ce qui suit : La **lincomycine** inhibe la synthèse protéique bactérienne par fixation au ribosome bactérien en effet elle se fixe spécifiquement à la grande sous unité 50S du ribosome avec différents effets.

L'**acide fusidique** est un antibiotique bactériostatique (inhibiteur de la synthèse protéique chez les bactéries) qui bloque la traduction en se liant au facteur d'élongation EF-G. Ceci bloque la translocation ou la progression du ribosome sur l'ARN messager. L'**Ampicilline** est un antibiotique à spectre large, capable de pénétrer dans une bactérie à Gram-négatif ou elle inhibe la troisième et la dernière étape de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, conduisant ainsi à la lyse cellulaire.

L'isolat S5T2H1 par contre est sensible à la **Vancomycine**, ce dernier est un antibiotique de la famille des glycopeptides, au même titre que les β -lactamines, inhibitrices de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Mais, du fait de son poids élevé, elle ne peut pas emprunter les porines de la membrane externe des Gram négatifs. Son spectre d'action touche donc uniquement les Gram positifs. Cet isolat est également sensible à la **Tétracycline** qui est un antibiotique de la classe des cyclines (ou tétracyclines). La tétracycline empêche la fixation de l'aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome. L'isolat S5T2H1 est sensible à la **Ciprofloxacine** qui est un antibiotique à large spectre, habituellement efficace sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, les germes atypiques (intracellulaires) et certains genres anaérobies. Elle inhibe l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme de la famille des topoisomérases, nécessaire à la réplication de l'ADN de la bactérie.

Une résistance intermédiaire de l'isolat S5T2H1 est enregistrée vis avis les antibiotique ; **Erythromycine E15, Oxacycline OX5, et la Pristinomycine PT15.**

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels. Ainsi, nos quatre isolats ont fait l'objet d'une étude morphologique, bio chimique et physiologique (limitée). Il est donc impossible de confirmer l'espèce pour tous les isolats, à ce stade d'étude.

Remarque :

Les résultats obtenus suite à l'étude taxonomique des isolats : S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31 sont résumés en **tableaux XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV et XXVI (annexe XI).**

Conclusion

Conclusion

L'incidence de la multi résistance aux antibiotiques est en constante augmentation et elle est devenue une préoccupation mondiale. Les antibiotiques ont été parmi un large éventail d'activités de recherche de métabolites bioactifs les plus étudiés à travers l'histoire. Il ya un besoin urgent de nouveaux médicaments efficaces contre les agents pathogènes résistants aux antibiotiques actuels et contre les pathogènes opportunistes.

La recherche de métabolites secondaires actifs produits par des isolats de l'environnement, tels des micro-organismes peu explorés, pourrait être une nouvelle source pour découvrir de nouveaux composés bioactifs. Une attention particulière est actuellement accordée à l'isolement et la caractérisation des *Streptomyces* d'habitats mal explorés compte tenu des prémices que le criblage de ces microorganismes annonce la perspective de découvrir de nouveaux produits naturels qui peuvent être développé comme ressource biotechnologique (**Bredholt et al., 2008**; **Eccleston et al., 2008**).

Les objectifs visés par ce travail, étaient l'isolement et la sélection de souches d'actinomycètes issus d'un environnement peu exploité ; le milieu marin. L'investigation de leurs activités antibiotiques et enzymatiques, et un essai de caractérisation des isolats les plus actifs.

Ces isolats ont été isolés à partir d'échantillons de sédiments marins prélevés de quelques plages de la côte ouest de Bejaia que sont : les plages de Tazeboujth, Saket, Cap Sigli et le port de pêche de Tala Yelef.

Nous avons traité nos échantillons par cinq méthodes différentes qui sont ; la technique d'estampillage, dilutions suivies par un traitement thermique modéré, par dilutions sans traitement , avec enrichissement, et avec traitement antibiotique (antifongique) et nous avonsensemencé les échantillons ainsi traités sur 11 milieux de cultures ,du moins riche en matière organique (**milieu NPS**) au plus riche (**SCA**) ,cela afin d'augmenter nos chances d'isoler le maximum de souches d'actinomycètes ils s'agit de ; **SCA** selon (**Poosarla et al.,2013**), **M2** selon (**Mincer et al.,2002**), **SCA** selon (**Sudha et al., 2012**), du milieu **NaST21Cx** (**Magarvey et al.,2004**), **M2** selon (**Zhang et al., 2002**), **M1, M2 et M3** selon (**Gontang et al., 2007**), **NRS ,NPS et SMP** selon (**Jansen et al.,2005**). Ce qui, nous a permis d'isoler 45 isolats de morphologie caractéristique des actinomycètes. Le maximum d'isolats a été obtenu avec le milieu **SCA** (**Poosarla et al.,2013**) par dilutions sans traitement (15 isolats).

Par la suite, seules 18 isolats ont été retenus sur la base du nombre de jours d'incubation inférieur à 15, afin de tester leurs activités antibiotiques et enzymatiques.

L'activité antibactérienne des isolats sectionnés a été faite par la technique des cylindres d'agar contre 4 bactéries pathogènes à Gram positif : *Staphylococcus aureus* : **ATCC25923**, *SARM* : **ATCC43300**, *Listeria innocua* : **CCIP 74915**, *Bacillus subtilis* ; **ATCC 6633** et contre 5 bactéries pathogènes à Gram négatif : *Escherichia coli* ; **ATCC 25922**, *Klebsiella pneumoniae* ; **ATCC**, *Pseudomonas aeruginosa* ; **ATCC 27853**, *Enterococcus faecalis* et *Proteus sp.*

Les résultats de ce test ont montré que parmi les isolats d'actinomycètes testées, quatre d'entre-eux (S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1, S6T2H1) soit 22% sont actives sur la totalité des souches test à Gram positif (*S. aureus*, *SARM*, *E. faecalis*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*) alors, que deux souches seulement à Gram négatifs (*E. coli*, *P. aeruginosa*) se sont avérées sensibles aux 18 isolats testés.

Ceci est dû au fait que les bactéries Gram négatives sont intrinsèquement plus résistantes aux antimicrobiens que les organismes à Gram positif, ce qui a été attribué à l'exclusion combinée de composés antimicrobiens par la double barrière de la membrane et l'efflux transmembranaire présent dans ce groupe de microorganismes (**Zgurskaya et Nikaido, 2000**).

Les résultats de tests d'activité antifongiques fait par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis les moisissures ; *Asp. niger* ; **939N**, *Asp. carbonarius* ; **A731C**, *Asp. flavus* ; **NRRL**, *Asp. Ochraceus* ; **NRRL3174**, *Asp. parasiticus* ; **CB5**, *Muc. ramanianus* ; **NRRL 1829**, *Fus. polyferatum* ; **ENS**, et *B. cinerea* (**Laboratoire de Mycologie**) et contre la levure *Candida albicans* d'origine clinique, montre que 50% (9 isolats) des isolats testés possèdent une activité antifongique vis-à-vis d'au moins un germe cible. L'isolat ayant le spectre le plus large est S5T2H1. Celui-ci est actif contre les 5 moisissures (*Asp. carbonarius*, *Asp. ochraceus*, *Muc. ramanianus*, *F. polyferatum*, et *B. cinerea*) et contre la levure *C. albicans*.

Au total, nous avons réussi à mettre en évidence l'activité antibactérienne et/ou antifongiques de 14 isolats d'actinomycètes marins par la technique des cylindres d'agar à l'égard de 8 bactéries, 8 moisissures et une levure. Quatre isolats (S1PHMR, S56T3J31, S28T3J31, S1T3J31) n'ont montré aucune activité antibiotique.

Les isolats ayant montré le spectre d'activité le plus large (spectre antibactérien et antifongique) sont : l'isolat S5T2H1 (le plus performant), S6T2H1, S7T2H2 et S29T3J31. Ces derniers ont fait, en sus, l'objet d'une mise en évidence de leurs activités enzymatiques à savoir ; l'activité cellulase, xylanase, et L-asparaginase. Les résultats obtenus ont

montré que S5T2H1 et S7T2H1 produisent à la fois les trois enzymes cellulase, xylanase et L-asparaginase, Cette propriété est confirmée par plusieurs travaux antérieurs tels que l'étude de **Leon et al., (2007)** qui ont isolé de nombreux actinomycètes dans les sédiments marins de la côte centrale du Pérou avec des activités enzymatiques multiples.

L'isolat S5T2H1 a été retenu sur la base des tests précédents vue son potentiel important de production de métabolites bioactifs. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont relevé que la production des antibiotiques sur les milieux solides peut ne pas se faire sur milieux liquides. De ce fait un suivi de la cinétique de production des antibiotiques sur le milieu liquide SCA (milieu d'isolement) a été effectué en utilisant deux germes cibles sensibles aux substances produites par notre isolat et que sont *Staphylococcus aureus* et *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus ont montré que cette souche est capable de produire les antibiotiques sur ce milieu, ce qui nous a poussés à déterminer le meilleur milieu de culture qui va permettre une production et une croissance maximale de l'isolat sélectionné.

Cinq milieux de culture préconisés dans la littérature scientifique pour la production des substances antimicrobiennes qui sont : MSA, ISP2, GYEA Bennett et SCA sont étudiée. D'après les résultats obtenus, on a remarque que le bouillon SCA donne de grandes zones d'inhibition (moyenne 30 mm), après seulement 3 jours d'incubation et pendant une période maximale de 11 jours pour le test d'activité antibactérienne vis avis *S. aureus* et le même milieu (SCA) nous a permit d'aboutir à une activité antifongique importante à l'égard de *B.cinerea*. Ces résultats nous ont amené à retenir ce milieu pour la production des substances bioactives. Le meilleur milieu pour la production de la biomasse semble être le GYEA qui nous a permit d'obtenir un maximum de poids sec soit : 105 mg/ml au bout des 8^{ieme} et 9^{ieme} jour d'incubation. Nous concluons alors que les conditions permettant une croissance cellulaire rapide et la production de la biomasse sont différentes des conditions de production de métabolites, comme l'a observé **Audhya Russell (1974)** et **Miao et al. (2006)**.

Une caractérisation morphologique (macro et micromorphologie) nous a permis de rattacher les isolats sélectionnés, S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J32 au genre *Streptomyces*. L'étude physiologique effectuée sur ces derniers, nous a permis de déterminer les différences quant à l'utilisation et la dégradation des composés organiques utilisés.

Dans un travail ultérieur, il serait judicieux de purifier et caractériser les substances produites et d'identifier les germes producteurs.

Références bibliographiques

A

Abbanat, D., Macielag, M., Bush, K. (2003): Novel antibacterial agents for the treatment of serious Gram-positive infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 12: 379-399.

Abdel-Mageed, W.M., Milne, B.F., Wagner, M., Schumacher, M., Sandor, P., Pathom-aree, W. (2010): Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Organic and Biomolecular Chemistry* . 8: 2352-2362.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* .59:143-169.

Amayaly, B.E., Kelle, C., Freil, P.R.J., Irma, E., Soria, M. (2012): Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite. *Journal of Microbiology*.102:3.

Aoki, H., Sakai, H., Kohsaka, M., Konomi, T., Hosoda, J., Nocardicin, A. (1976): A new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*. 29:492.

Arasu, M.V., Duraipandiyar, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2008): Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26. recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale* .18:147–153.

Arunachalam R, Wesely, E.G., George, J., Annadurai, G. (2010): Novel Approaches for identification of *Streptomyces noboritoensis* TBG-V20 with cellulase production. *Current Reserch Bacteriology*. 3(1): 15-26. DOI: 10.3923/crb.2010.15.26

Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., White, R.P. (1985): Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *International journal of systematic bacteriology*. 35: 86-98.

Athalye, M., Lacey, J., Goodfellow, M. (1981): Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Journal of Applied Bactériologie*. 51: 289-297.

Atlas, R.M., Bartha, R. (1986): Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th edition. New York, Benjamin: *Cummings Publishing*. p. 174-217.

B

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

Basha, S.N., Rekha, R., Komala, M., Ruby, S. (2009): Production of extracellular anti-

leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged Fermentation: Purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8:353-360.

Bastide, A ., de Méo, M ., Andriantsoa, M., Laget, M., Duménil. G. (1986) : Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*. 2 : 453-466.

Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E., Lechevalier, H.A. (1964): Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*.12:421-424.

Becker, B., Lechevalier, M., Lechevalier, H.A. (1965): Chemical composition of cell-wall préparation from strain of various form- genera of aerobie Actinomycetes. *Applied Microbiology*. 13: 236-243.

Berdy, J. (2005) : Bioactive microbial metabolites *.The Journal of Antibiotics* 58:1-26.

Billerbeck, V.G ., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P. (2002) : Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Hygiene Review*. N°3.

Blunt, J.W., Copp, B., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2010): Marine natural products. *Natural Product Reports*. 27 :165-237.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H ., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2011): Marine natural products. *Natural Product Reports* :28:196-268.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2007): Marine natural products. *Natural Product Reports* . 24 : 31-86.

Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. (2002): Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*.3: 619-627.

Boeckle, B., Galunsky, B., Mueller, R. (1995): Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology* .61: 3705-3710.

Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua. (2005): Isolation and molecular identification of actinomycetes microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal of Medecine and Mycology*. 15: 39-44.

Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A. (2005). Isolation of actinomycetes producer the antimicrobial substances from Sebkhah of Ain Melila. *Science Technology*. 23: 5-10.

Bredholdt, H., Tjaervik, E., Johnsen, G., Zotchev, S.B., (2008): Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. *Marine Drugs* .6: 12–24.

Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B. (2007): Rare Actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. 9: 2756-2764.

Bruns, A., Hoffelner, H., Overmann, J. (2003): A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:161–171.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology. (Eighth edition), *The Williams and Wilkins Co., Baltimore*, p.747 - 842.

Bull, A.T., Stach J.E.M., Ward, A.C., Goodfellow, M. (2005): Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87:65-79.

Bushell, M.E. (1993): A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of Streptomyces isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 76 : 89-93.

Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., Robertson, B.R., (1993): Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 881–891.

C

Chakraborty, S., Raut, G., Khopade, A., Mahadik, K., Kokare, C. (2012): Study on calcium ion independent α -amylase from haloalkaliphilic marine Streptomyces strain A3. *Indian Journal of Biotechnology*. 11:427-437.

Chandramohan, D., Ramu, S., Natarajan, R. (1972): Cellulolytic activity of marine streptomycetes. *Current Science*. 41:245-246.

Charoensopharat, K., Thummabenjapone, P., Sirithorn, P., Thammasirirak, S. (2010): Antibacterial substance produced by *Streptomyces sp.* No. 87. *African Journal of Biotechnology* . 7:1362-1368.

Charusanti, P., Fong, N.L., Nagarajan, H., Pereira, A.R., Li, H.J., Abate, E.A., Su, Y., Gerwick, W.H., Palsson, B.O. (2012): Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS One* 7:e33727.

Chatterjee, S., Vining, L.C. (1981): Nutrient utilization in actinomycetes: Induction of α -glucosidases in *Streptomyces venezuelae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 27:639-645.

Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M. (2005): A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* . 8:407-419.

Chen, C.C., Adolphson, R., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., Adams, M.W.W., Westpheling, J. (1997): Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*. *Enzyme and Microbial Technology*. 20:39-45.

Cho, J.C., Giovannoni, S.J. (2004): Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 :432-440.

Coates, A.R.M., Hu, Y. (2007): Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*. 152: 1147-1154.

Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. (1998): Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 27-40.

Connon, S.A., Giovannoni, S. (2002): High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 :3878-3885.

Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A. (1993):"Isolation and Characterization of Actinomycetes Antagonists of a fungal Root pathogen". *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3899-3905.

Cross, T. (1981): Aquatic Actinomycetes: A Critical Survey of the Occurrence, Growth and Role of Actinomycetes in Aquatic Habitats. *Journal of Applied Bacteriology*. 50: 397 -423.

Cummins, C.S., Harris, H. (1956): A comparison of cell-wall composition in *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium* and *Propionibacterium*. *Journal of general microbiology*;15:ix.

Czechowska, K., Johnson, D.R., van der Meer, J.R. (2008): Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Current Opinion in Microbiology*. 11:205-212.

D

Damude, H. G., N. R. Gilkes, D. G. Kilburn, R. C. Miller, R. Antony, and J. Warren. (1993). Endoglucanase CasA from alkalophilic *Streptomyces* strain KSM-9 is a typical member of family B of b-1,4-glucanases. *Gene* 123:105– 107.

Das, S., Lyla, P., Khan, S.A. (2006): Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*. 90:1325-1335.

Das, S., Lyla, P.S., Khan, S.A. (2008): Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 26:166- 177.

Dasari, V.R., Muthyala, M.K., Nikku, M.Y., Donthireddy, S.R. (2012): Novel pyridinium compound from marine Actinomycete, *Amycolatopsis alba* var. nov. DVR D4 showing antimicrobial and cytotoxic activities in vitro. *Microbiological Research*. 167:346-351.

Dasilva R, Yim DK, Asquiere ER, Park YK (1993): Production of microbial alkaline cellulase and studies of their characteristics. *Review Microbiology*. 24: 269-274.

Dekkers, J., Van Doornen, L., Kemper, H. (1996): The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine*. (Auckland, NZ). 21:213-238.

Demain, A .L. (1992) : Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Foundation symposium* . 171:3-16.

Demain, A.L., Fang, A. (2000) : The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* . 69:1-39.

Demain, A.L., Sanchez, S. (2009): Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*.62 : 5-16.

Dharmaraj, S. (2010). Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 26:2123-2139.

Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L. (2002): Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolite. *Journal of Biotechnology*. 99: 187-198.

D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J., Lewis, K. (2010): Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry and Biology*. 17:254-264.

Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., Ling, L.L. (2010): Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J. Antibiot*. 63 : 468–476.

Doull, J.L., Singh, A.K., Hoare, M., Ayer, S.W. (1994): Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.13:120-125.

E

Eccleston, G.P., Brooks, P.R., and Kurtböke, D.I. (2008): The occurrence of bioactive Micromonospora in aquatic habitats of the sun-shine coast in Australia. *Mar. Drugs* 6, 243–261. doi:10.3390/md6020243

Ellaiah, P., Kalyan, D., Rao, V.S., Rao, B.V. (1996): Isolation and characterisation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Hindustan antibiotics bulletin* . 38: 48-52.

Erikson, D. (1949): The morphology, cytology and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 3: 23-54.

F

Fenical, W., Jensen, P.R. (2006): Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology* . 2:666-673.

Fisher SH, Wray Jr LV (2002) : *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *Journal of Bacteriology*. 184: 2148-2154.

G

Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G.S. (2008): Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *Journal de Mycologie Médicale*. 18:16-22.

Gartner, A., Ohlendorf, B., Schulz, D., Zinecker, H., Wiese, J., Imhoff, J.F. (2011): Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a micromonospora strain isolated from the mediterranean deep sea sediment. *Mar. Drugs*. 9: 98–108.

Gao, X., Lu, Y., Xing, Y., Ma, Y., Lu, J., Bao, W. (2012): A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. *Microbiological Research*. 167:616-622.

Gavrish, E., Bollmann, A., Epstein, S., Lewis, K. (2008). A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *J. Microbiol. Methods* 7: 257–262.

George, M., George, G., Hatha, M. A. A. (2010): Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. 28: 52-57.

Georis, J., Esteves, F.D.L., Lamotte-Brasseur, J., Bougnet, V., Giannotta, F., Frère, JM. (2009): An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study. *Protein Science*. (3):466-475.

- Ghanem, B.N., Soraya, A.S., Zeinab, M.E., Gehan, A.A.E. (2000):** Isolation and enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied Microbiology*. 46:105-111.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. (2007):** Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 3272-3282.
- Gooday, G.W. (1990):** The ecology of chitin decomposition. *Advances in Microbial Ecology*. 11:387-430.
- Goodfellow, M., Alderson, G., Chun, J. (1998):** Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 74: 3-20.
- Goodfellow, M., Fiedler, H.P. (2010):** A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 98: 119-142.
- Goodfellow, M., Haynes, J.A. (1984):** Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-ortiz L, Bojalil, L.F., Yokoleff, V. Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Orlando: *Academic press*. p. 453-472.
- Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. (2012):** Taxonomic outline of the phylum Actinobacteria. In:Whitman WB Editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. New York. 1 :2024.
- Go rajana, A., Vinjamuri, S., Kurada, B.V., Peela, S., Jangam, P., Poluri, E. (2007):** Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN 1/7. *Microbiological Research*. 162:322-327.
- Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E., Hor-Nay-Pang, C. (1974):** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *International journal of systematic bacteriology*. 24: 54-63.
- Grein, A., Meyers, S.P.(1958):** Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and materials suspended in sea water. *Journal of Bacteriology*. 76:457-463.
- Gulati, R.K.S., R, Gupta. (1997):** A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 24:23-26.
- Gupta N., Mishra, S., Basak U.C .2007:** Occurrence of *Streptomyces aurantiacus* in mangroves of Bhitarkanika. *Malaysian Journal of Microbiology*. 3: 7-14.
- Gurung, T. D., Sherpa, C., Agrawal, V. P., Lekhak, B. (2009):** Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*.10:173-182.

H

Haggag, M.W., SM Singer, S.M., Aly, M. (2014): Application of Broad-Spectrum of Marine *Streptomyces albidoflavus* as biofungicide and Plant Growth Promoting of tomato diseases. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.5/142.

Han, Y., Yang, B., Zhang, F., Miao, X., Li, Z. (2009): Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces sp. DA11*. associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Marine Biotechnology*. 11:132-340.

Hatsu, M., Sasaki, T., Watabe, H., Miyadoh S., Nagasawa, M., Shomura, T. (1992): A new tetracycline antibiotic with antitumor activity. I. Taxonomy and fermentation of the producing strain, isolation and characterization of SF2575. *The Journal of Antibiotics*. 45:320.

Hayakawa, M., Ishizawa, K., Nonomura, H. (1988): Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *Journal of Fermentation Technology*. 66: 367-373.

Hayakawa, Y., Shirasaki, S., Shiba, S., Kawasaki, T., Matsuo, Y., Adachi, K. (2007): Piericidins C7 and C8, new cytotoxic antibiotics produced by a marine *Streptomyces sp.* *The Journal of Antibiotics*. 60:196-200.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C. (1997): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40 : 135-136.

Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A.T. (2009a): Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces sp NTK 937*. *The Journal of Antibiotics*. 62:99-104.

Hughes, C.C., Mac Millan, J.B., Gaudencio, S.P., Jensen, P.R., Fenical, W. (2009): The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived streptomyces species. *Angewandte Chemie International Edition*. 48 : 725-727.

I

Imada, C. (2005): Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87:59-63.

J

Jain, R., Zaidi, K.U ., Verma, Y., Saxena , P. (2012): L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Scientific Research*. 5: 29-35.

Jensen, P., Dwight, R., Fenical, W. (1991): The distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:1102-1108.

Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W. (2005a): Culturable marine Actinomycetes diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*. 7:1039-1048.

Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W. (2005b): Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 43-48.

Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D.C., Zeigler, L., Fenical, W. (2007): Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:1146-1152.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* . 451:990-993.

K

Kaczmarek, M., Wójcicki, J., Samochowiec, L., Dutkiewicz, T., Sych, Z. (1999): The influence of exogenous antioxidants and physical exercise on some parameters associated with production and removal of free radicals. *Pharmazie* . 54:303-306.

Kaerberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S. (2002): Isolating ‘uncultivable’ microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. 296 : 1127-1129.

Kawamoto I. 1984. Genus *Micromonospora*, p 2442–2450. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed), Bergey’s manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Keating, M. J., Holmes, R., Lerner, S. H. (1993): Lasparaginase and PEG- asparaginase past, present and future. *Leukemia & Lymphoma*.10:153-157.

Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J.R., Dobson, A.D.W. (2009): Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*. 11 : 384-396.

Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Paul D Cotter.P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J.R., Dobson, A.D.W. (2008): Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*. 11:384-96.

Kim, C.J., Lee, K.H., Shimazu, A., Kwon, O.S., Park, D.J. (1995): Isolation of rare Actinomycetes in various types of soil. *Korean Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. 23:36-42.

Kimura, K., Kanou, F., Takahashi, H., Esumi, Y., Uramoto, M., Yoshihama, M. (1997): Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 50: 373.

Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S., Chopade, B.A. (2004a): Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India. *Current Science*. 86:593-597.

Krassilnikov, N.A. (1960): Intra-Strain and Intra-sp. Antagonism among Microorganisms, *Doklady Akademii Nauk*. 77: 117-119.

Krootdilaganandh, J. (2000): Isolation and selection Municipal waste. International Journal of Academic of thermo tolerant bacteria capable of producing Research, 2(6): 330-333. Cellulase. Chiang Mai University Press, Chiang Mai, 18. Talaro, A. and K. Talaro, 1996. Drugs, Microbes, pp: 20-21.

Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T.G., Lessard, P.A., Barbara, J.E., Rha, C., Sinskey, A.J. (2008) : Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society*. 130:1126-1127.

ℒ

Lam, K.S. (2006): Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 9:245-251.

Larpent, J.P., Larpent-Gourgaud, M. (1990) : Memento Technique de Microbiologie. Tec &Doc-Lavoisier, France.

Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L., Aigle, B. (2011): Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:6258-6263.

Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1970): A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: Prauser H (ed) The actinomycetes. Gustav F Ischer-Verlag, Jena, pp 393-405.

Lechevalier M.P. and 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. pp 225-291.

Lechevalier, M. P., De Bièvre, C., Lechevalier, H. A. (1977) : Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. 5 : 249-260.

Lee, J-G., Yoo, I-D., Kim, W-G. (2007): Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30:795-797.

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

Leon J, Liza L, Soto I, Cuadra D, Patino L, Zerpa R. 2007: Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *Revi Peru Boil.* 14:259–270

Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., Ling, L.L., 2010. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J. Antibiot.* 63 : 468–476.

Lockwood, N.A., Mayo, K.H. (2003): the future for antibiotics: bacterial membrane disintegrators. *Drugs of the Future.* 28: 911-923.

Lounes, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G., Germain, P. (1995): Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Canada Journal of Microbiology.* 41: 800-808.

Lynd, L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., and Pretorius I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol BioloReviews,* 66, 506–577.

M

Macedo, J.A., Sette, L.D., Sato, H.H. (2007): Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces sp.* *Electronic Journal of Biotechnology.* 10:618-626.

Madrid, V.M., Aller, J.Y., Aller, R.C., Chistoserdov, A.Y. (2001): High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud off French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *FEMS Microbiology Ecology.* 37:197-209.

Maeda, A., Nagai, H., Yazawa, K., Tanaka, Y., Imai., Mikami, Y. (1995): Three new reduced anthracycline related compounds from pathogenic *Nocardia brasiliensis*. *ChemInform .* 26:976-981.

Maestro, B., Sanz, J.M. (2007): Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 2:188-196.

Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D.H. (2004): Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology.* 70:7520-7529.

Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Mincer, T.J., Wrad, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M. (2005): *Salinispora arenicola* gen. nov., and *Salinispora tropica* nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 55:1759-1766.

Maldonado, L.A., 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.

Manivasagan, P., Gnanam, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. (2009): Antimicrobial and cytotoxic activities of an actinobacteria (*Streptomyces* Sp. PM32) Isolated from offshore sediments of the Bay of Bengal in Tamil. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 3:231-236.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S-K. (2013): Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*. 168:311–332.

Manuselis, G., Mahon, C.R. (2007): Textbook of diagnostic microbiology. In: Manon CR, Lehman DC, Mauselis G, Editors. Saunders, p. 3-13.

Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.I. (1987) : Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Doin editor*. Paris, p. 67-122.

Maskey, R.P., Helmke, E., Kayser, O., Fiebig, H.H., Maier, A., Busche, A. (2004): Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine Streptomyces and their absolute stereochemistry. *The Journal of Antibiotics*. 57: 771-779.

Maskey, R.P., Kock, I., Helmke, E., Laatsch, H. (2003): Isolation and structure determination of phenazostatin D, a new phenazine from a marine actinomycete isolate *Pseudonocardia* sp. B6273. *Zeitschrift fur naturforschung B*. 58: 692-694.

Matan, N., Matan, N. (2008): Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration and Biodegradation*. 62: 75-78.

Mathivanan, N., Kabilan, V., Murugesan K. (1998): Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasitete groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 646-651.

Matsui, I., Sakai, Y., Matsui, E., Kikuchi, H., Kawarabayasi, Y., Honda, K. (2000): Novel substrate specificity of a membrane-bound α -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS Lett*. 467:195-200.

Mayer, A., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G., Hamann, M.T. Marine pharmacology in 2003-4 (2007): marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry, Physiology, Toxicologie and Pharmacologie*. 145:553-581.

Mayer, A.M., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G., Fusetani, N. (2011): Marine pharmacology in 2007–8: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Partie C: toxicologie et de pharmacologie*. 153 : 191-222.

McCarthy, A. J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Review.* 46:145-163.

Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M.T, Ronning, C.M., Nierman, W.C, Bovenberg, R.A., Breitling, R., Takano, E. (2010): The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biology and Evolution.* 2: 212-224.

Miao, L., Kwong, T.F.N., Qian, P.Y. (2006): Effect of culture conditions on mycelia growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 72: 1063-1073.

Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. (2002): Wide spread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* 68:5005-5011.

Miyashita, K., Fujii, T., Sawada, Y. (1991): Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *Journal of general microbiology.* 137:2065-2072.

Mohamedin, A. (1999): Isolation, identification and some cultural conditions of a proteaseproducing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 43:13-21.

Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S. (2002): New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes1. *FEMS Microbiology Ecology.* 42:419-429.

Murugan, M., Srinivasan, M., Sivakumar, K., Sahu, M.K., Kannan, L. (2007): Characterization of an actinomycete isolated from the estuarine finfish. *Mugil cephalus* Lin. (1758) and its optimization for cellulase production. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 266: 388.

N

Narayana, K.J.P., Kumar, K.G., Vijayalakshmi, M. (2008): L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology.* 48:331-336.

Ng, Z. Y ., Amsaveni, S. (2012): Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. *Journal of Advanced Biomedical and Pathobiology .* 2:96-107.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S.S. (2010): Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Applied and Environmental Microbiology.* 76 : 2445-2450.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999): Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:711-729.

Nimnoi, P., Pongsilp, N., Lumyong, S. (2010): Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by Actinomycetes-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38:595-601.

Ninawe,S., R.Lal and R.C. Kuhad. 2006. Isolation of three xylanaseproducing strains of Actinomycetes and their identification using molecular methods. *Current Microbiology*. 53: 178–182.

Niranjane, A. P., Malhou, P., Stevenson, T.W. (2007): The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Micobial Technology*. 40:1464-1468.

Nonomura, H. (1974) : Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in ISP. *Journal of Fermentation Technology*. 52: 78 - 92.

Nouasri, A. (1996) : Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. *Thèse de Magister*. P. 130.

O

Okami, Y., Okazaki, T. (1974): Studies on marine microorganisms. III. Transport of spores of actinomycete into shallow sea mud the effect of salt and temperature on their survival. *Journal of Antibiotics*. 27: 240-247.

Okazaki, T., Okami, Y. (1975): Actinomycetes tolerant to increased NaCl concentration and their metabolite. *Journal of Fermentation and. Technology*. 53: 833-840.

Okami, Y., Hotta, K. (1988): Search and Discovery of New Antibiotics Actinomycetes in Biotechnology. New York: *Academic Press, Inc.* p. 33-67.

P

Park, Y.-H., Kim, E., Yim, D.-G., Kho, Y.-H., Mheen, T.-I. & Goodfellow, M. (1993). Supragenetic classification of *Thermoactinomyces vulgaris* by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Zentbl Bakteriol* **278**, 469±478.

Pandhare, J., Zog K. and Deshpande, V. (2002): Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. *Bio. Reso. Technol.*, 84 (2): 165-9.

Parkes, R.J., Wellsbury, P. (2004): Deep biospheres. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Edited by Bull AT. ASM Press: 120-129.

Parungao, M.M., Maceda, E.B.G., Villano, M.A.V. (2007): Screening of antibiotic-producing Actinomycetes from marine, brackish and terrestrial sediments of Samal Island, Philippines. *Journal of Computational Methods en sciences et en genie.* 4:329-338.

Patel, J.J., Brown. M.N., (1969): Interaction of Azobacter with rhizosphere and root- surface microflora. *Plant and soil.* 31:276-281.

Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M. (2006): Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles.* 10: 181-189.

Peiru, S., Menzella, H.G., Rodriguez, E., Carney, J., Gramajo, H. (2005) : Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 2539-2547.

Pimentel-Elardo, S.M., Kozytska, S., Bugni, T.S., Ireland, C.M., Moll, H., Hentschel, U. (2010): Antiparasitic compounds from *Streptomyces sp.* strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine Drugs.* 8:373-380.

Pinner, R.W., Teutsch, S.M., Simonsen L., Klug, L.A., Graber, J.M., Clarke, M.J. (1996): Trends in infectious diseases mortality in the United States. *Journal of the American Medical Association.* 275:189-193.

Pisano, M.A., Sommer, M.J., Taras, L. (1992): Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 36:553-555.

Poosarla, A., Venkata, R. L., Krishna. R.M. (2013): Isolation of potent antibiotic producing Actinomycetes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.*5:6-12.

Polpass Arul Jose and Solomon Robinson David Jebakumar (2012): Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin. *India Jose and Jebakumar Aquatic Biosystems.* 8:23.

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

Pridham, T.G., Gottlieb, D. (1948): The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetales as an Aid for Species Determination. *Journal Bacteriology.* 56: 107-114.

Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P. (2008): Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. *PLoS ONE.* 3: 2335.

Q

Qasim, S.Z. (1999): The Indian Ocean: images and realities. *Oxford and IBH, New Delhi.* pp. 57-90.

R

Radzom, M., Zeeck, A., Antal, N., Fiedler, H. (2006): Fogacin, a novel cyclic Octaketide produced by *Streptomyces* strain Tu6319. *The Journal of Antibiotics.* 9:31-317.

Raja, S., Ganesan, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. (2010): Screening of marine actinobacteria for amylase enzymes inhibitors. *Indian Journal of Microbiology.* 50:233-237.

Rajan, B.M., Kannabiran, K. (2013): Antagonistic activity of marine *Streptomyces* sp. VITBRK1 on drug resistant gram positive cocci. *Der Pharmacia Lettre.* 5:185-191.

Kannan, R.R., Iniyar A.M., Gnana, S., Vincent, P. (2014): Production of a compound against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from *Streptomyces rubrolavendulae* ICN3et its evaluation in zebrafish embryos. *Indian Journal of Medical Reserch.* 139: 913-920.

Ramesh, S., Mathivanan, N. (2009): Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 25: 2103-2111.

Ramesh, S., Rajesh, M., Mathivanan, N. (2009): Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 32: 791-800.

Ravikumar, S., Krishnakumar, S., Samuel Jacob Inbaneson, S.J., Gnanadesigan, M. (2010a): Antagonistic activity of marine actinomycetes from Arabian Sea coast. *Archives of Applied Science Research.* 2: 273-280.

Ravikumar, S., Thajuddin, N., Suganthi, P., Jacob, Inbaneson. S., Vinodkumar T.(2010b): Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens. *Journal of Environmental Biology.*31: 387-9.

Ravikumar S, Fredimoses M, Gnanadesigan M. 2012. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal Tropical Biomed.* 2(2):92-6.

Reghioua, S., Boughachiche, F., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahfrouf, A. (2008) : Separation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sciences and Technologie.* 28 :59-64.

Renner, M.K., Shen, Y-C., Cheng, X-C., Jensen, P.R., Frankmoelle, W., Kauffman, C.A. (1999): New anti-inflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp. *Journal of the American Chemical Society*. 121:11273-11276.

Reynolds, J.M., El Bissati, K., Brandenburg, J., Günzl, A., Mamoun, C.B. (2007): Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 7:7-13.

Riedlinger, J., Reicke, A., Zähner, H., Krismer, B., Bull, A.T., Maldonado, L.A, Ward, A.C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Süßmuth R.D., Fiedler, H.P. (2004) : Abyssomicins, inhibitors of the paraaminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *The Journal of Antibiotics* . 57:271-279.

Rubin, R.J., Harrington, C.A., Poon, A., Dietrich, K., Grene, J.A, Moiduddin, A. (1999): The economic impact of *Staphylococcus* infection in New York City hospitals. *Emerging Infectious Diseases journal*. 5: 9-17.

Russel, R. S. 1974: hlycology guidebook. – hlycological Society of America, University of Washington Press, Seattle.

S

Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Avalos, M., Guzmán-Trampe, S., Rodríguez- Sanoja, R., Langley, E., Ruiz, B. (2010): Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics* .63:442-459.

Sateesh, V. N., Rathod, J. L. (2011): Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. 3:48-53.

Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Much JC, Schloter M 2005 . Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microb Ecol*; 49:407–15.

Sharma. D, Kaur. T, Chadha. BS., Manhas. R. K. (2011). Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* December. Vol 10. N°: 6. pp: 801-808.

Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966): Methods for Characterisation of *Streptomyces* Species, *International journal of systemic Bacteriology*. 16: 313-340.

Sierra, G. (1957): A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Journal of Microbiology Serology*. 23: 15-22.

Shantikumar Singh, L., Indra, B., Bora, T. C. (2006): “Actinomycetes of Loktak Habitat; Isolation and Screening for Antimicrobial Activities”, *Biotechnology*, Vol.5, No. 2, pp. 217-221.

Singh, M., Petersen, P., Weiss, W., Kong, F., Greenstein, M. (2000): Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 2154-2159.

Singh. S, Baruah. I and Bora. T. C (2006). Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*. Vol 5: 217-221.

Sirisha, B ., Haritha, R ., YSY,V., Jagan, M., Siva Kumar, K ., Ramana, T.(2013): Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal. *International Journal Of Pharmaceutical Chemical and Biological Science*. 3: 257-264.

Sivakumar, K. (2007): Actinomycetes. Centre of Advanced Study in Marine Biology. Annamalai University.

Sofia, M.J., Boldi, A.M. (2006): In search of novel antibiotics using a natural product templates approach combinatorial synthesis of natural product- based libraries. *Bocca raton publisher*. CRS press. 185-207.

Solanki, R., Khanna, M., Rup Lal, R. (2008): Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology*. 48:410-431.

Song, Q., Huang, Y., Yang, H. (2012): Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by *Actinomycetes YJ1* Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Agricultural Science*. 4: 95-102.

Stach, J. (2010) : Antimicrobials: treasures from the oceans. *Microbiology Today*. 105:1-3.

Stewart, E.J. (2012): Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 194:4151-4160.

Subramani, R., Aalbersberg, W. (2012): Marine Actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*. 167:571-580.

Sudha, S., Masilamanib, S.M. (2012): Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2: 770-773.

Suguna, S. (2012): Production of probiotics from *Streptomyces sp.* associated with fresh water fish and its growth evaluation on *Xiphorous helleri*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*. 3:601-603.

Sun, C.H., Wang, Y., Wang, Z., Zhou, J.Q., Jin W.Z., You X.F. (2007): Chemomicin A, a new angucyclinone antibiotic produced by *Nocardia mediterranei* subsp. *Kanglensis* 1747-64. *The Journal of Antibiotics*. 60:211-215.

Sun, W., Dai, S., Jiang, S., Wang, G., Liu, G., Wu, H. (2010): Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* . 98:65-75.

Sunaranto, R., Marwoto, B. (2010): Marine Actinomycetes screening of Banten West Coast and their antibiotics purification. *Biodiversitas*.11 : 176-181.

T

Takahashi, I., Takahashi, K., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Ashizawa, T. (1988): DC 92-B, a new antitumor antibiotic from *Actinomadura*. *The Journal of Antibiotics*. 41: 1151-1153.

Tam, V.H ., Schilling, A.N., Nikolaou, M. (2005): Modelling time–kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 699-706.

Tanaka, Y., Komaki, H., Yazawa, K., Mikami, Y., Nemoto, A., Tojyo, T. (1998): Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: producing strain, isolation and biological activity. *Chemical Information*. 29: 1036-1041.

Teather, R.M., Wood, P.J. (1982): Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 3:777-780.

Terkina, I.A., Parfenova, V.V., Ahn, T.S. (2006): Antagonistic activity of actinomycetes of Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42:173-176.

Timell T.E. (1967) .Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci Technol*. 1:45-70.

Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., Inamori, Y. (2003): Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete. *Nocardopsis prasina OPC-131*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:894-900.

U

Uzel, B., Sözbilir, H., Özkaymak, Ç. (2012): Neotectonic evolution of an actively growing superimposed basin in Western Anatolia: The Inner Bay of İzmir.Turkey. *Journal of Earth Science*. 21:439-471.

V

Valli, S., Sugasini, S. S., Aysha, O., S, Nirmala., Vinoth Kumar P, Reena. (2012): An Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2: 469-473.

Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G. (2010): Strategies for culture of unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 309:1-7.

Vasavada S. H., Thumar J. T., Singh S. P. (2006): Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain *RJT-1*. *Current Science*. 91:1393-97.

Viet, D.N., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J., K, Izaki. (1991) : Purification et propriétés des bêta-1, 4-xylanase de *Aeromonas caviae* *W-61*. *Applied Environment Microbiology*. 57: 445-449.

Viikari L, Pauna M, Kantelinen A, Sundquist J, Linko M (1986): Bleaching with enzymes. In: Svenska TraË forskningsinstitutet, Svenska pappers(ed) Proceedings of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Stockholm, Stockholm Inst, pp 67±69.

W

Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G.J., Kukor, J.J. (2005): Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:2232-2238.

Waksman, S. A. (1959): The Actinomycetes, Vol I. Nature, occurrence and activities. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L., Hill, R.T. (2001): Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:434-444.

Weyland, H. (1969): Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature* . 223:858.

WHISTLERR, . H. A. & RICHARDSE, . L. (1970). Hemicellulose. In *The Carbohydrates*, pp. 447-469. Edited by W. Pigman and D. Horton. New York: Academic Press.

Williams, P.G. (2009): Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology*. 27:45-52.

Williams, S.T., Cross, T. (1971): Actinomycetes. In: Methods in microbiology. *Booth C. Ed., Academic Press, London*. 4: 295-334.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G. (1989): Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 399AL. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore. pp: 2452-2492.

Wohl, D. L., and J. V. McArthur. (1998). Actinomycete-flora associated with submersed freshwater macrophytes. *Fems Microbiology Ecology*. 26:135-140.

Y

You, J., Cao, L., Liu, G., Zhou, S., Tan, H., Lin, Y. (2005): Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio spp.* from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* . 21:679-682.

You, J.L., Xue, X.L., Cao, L.X., Lu, X., Wang, J., Zhang, L.X. (2007): Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76:1137-1144.

Z

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. (2002): Cultivating the uncultured. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 99 15681-15686.

Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., Filipowicz, W. (2002): Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO Journal*. p. 5875-5885.

Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M., Yu, W. (2008): A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93: 241-248.

Zhang, H., Lee, Y.K., Zhang, W., Lee, H.K., 2006. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* .90: 159–169.

Zhang, L., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J. (2005): Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current Opinion in Microbiology*. 8 : 276-281.

Zgurskaya, H.I.; Nikaido, H. (2000): Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*. 37 : 219-225.

Annexes

❖ Annexe I

Tableau XI : Les meilleurs milieux de culture utilisés pour l'isolement des actinomycètes marins à partir de sédiments marins (Uzel *et al.*, 2012).

Le milieu de culture	Composition chimique	Référence
M1	Amidon 10 g, extrait de levure 4 g, peptone 2 g, agar 18 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Zhang <i>et al.</i> , 2006; Abdelmohsen <i>et al.</i> , 2010
M2	Glycerol (100%) 6 ml, arginine 1 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0,5 g, agar 18 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Zhang <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2008
M3	Peptone 2 g, asparagine 0,1 g, propionate de sodium 4 g, K ₂ HPO ₄ 0,5 g, MgSO ₄ 0,1 g, FeSO ₄ , 0,01 g glycerol, 5 g, NaCl 20 g, 1 litre d'eau distillée.	Zhang <i>et al.</i> , 2008
M3	KH ₂ PO ₄ 0,466 g, Na ₂ HPO ₄ 0,732 g, KNO ₃ 0,10 g, NaCl 0,29 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,10 g, CaCO ₃ 0,02 g, propionate de sodium 0,20 g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 200 µg, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 180 µg, MnSO ₄ ·4H ₂ O 20 µg, agar 18 g, thiamine HCl 4 mg, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Colquhoun <i>et al.</i> , 1998 Maldonado <i>et al.</i> , 2005b
M4	Chitine 2 g, agar 18 g et 1 litre d'eau de mer naturelle.	Mincer <i>et al.</i> , 2002
M5	Agar 18 g et 1 litre d'eau de mer naturelle.	Mincer <i>et al.</i> , 2002
Glucose-yeast-malt extract agar (ISP2)	Glucose 4 g, extrait de levure 4 g, extrait de malt 10 g, agar 15 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Montalvo <i>et al.</i> , 2005 Maldonado <i>et al.</i> , 2009 Abdelmohsen <i>et al.</i> , 2010
Marine sponge agar (MSA)	Raffinose 10 g, L-histidine 1 g, sulfate ferreux 0,01 g, phosphate d'hydrogène dipotassique 1 g, carbonate de calcium 0,5 g, agar 15 g, chlorure de sodium 20 g, extrait de sédiment, 100 ml eau bidistillée 900 ml.	Gandhimathi <i>et al.</i> , 2008
M2 (NPS) ^b	Agar 8 g, NPS (nutrient poor sediment extract) 100 ml, l'extrait NPS a été préparé par lavage de 900 ml de sable collecté d'une plage avec 500 ml de l'eau de mer.	Jensen <i>et al.</i> , 2005
(NRS) ^b	Agar 8 g, NRS (nutrient rich sediment) 100 ml, l'extrait de NRS a été préparé en utilisant 300 ml de sédiments prélevés à marée basse d'un canal de mangrove.	Jensen <i>et al.</i> , 2005
(SMP) ^a	Agar 8 g, mannitol 500 mg, peptone 100 mg, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Jensen <i>et al.</i> , 2005
NaST21Cx agar	Solution A (750 ml d'eau de mer artificielle contenant K ₂ HPO ₄ 1 g et Bacto Agar 10 g) et solution B (250 ml d'eau de mer artificielle contenant KNO ₃ 1 g, MgSO ₄ 1 g, CaCl ₂ ·2H ₂ O 1 g, FeCl ₃ 0,2 g et MnSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 g). Les solutions A et B sont autoclavées séparément, mélangées et supplémenté avec 1 ml de solution d'oligo-élément.	Magarvey <i>et al.</i> , 2004
Raffinose histidine agar (RH)	Raffinose 10 g, L-histidine 1 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, MgSO ₄ ·5H ₂ O 0,5 g, FeSO ₄ 0,01 g, agar 15 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Maldonado <i>et al.</i> , 2009
Sponge agar (SA) ^d	Raffinose 10 g, L-histidine 1 g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,01 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, CaCO ₃ 0,02 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,5 g, agar 15 g, NaCl 20 g et 10% d'extrait aqueux ou organique d'éponge. L'extrait aqueux de tissu éponge a été préparé dans un tampon phosphate (PBS) et il a été stérilisé par filtration. L'extrait organique a été préparé à partir du tissu d'éponge par des extractions successives avec de l'hexane et de dichlorométhane et de méthanol (1: 1). L'extrait combiné a été concentré dans un évaporateur rotatif sous vide à 40° C.	Selvin <i>et al.</i> , 2004
Starch-casein-nitrate	Amidon soluble 10 g, caséine 0,3 g, K ₂ HPO ₄ 2g, KNO ₃ 2 g, NaCl 2 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,05 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Maldonado <i>et al.</i> , 2005b
Starch-casein-nitrate agar (SCN agar)	Amidon soluble 10 g, caséine 0,3 g, K ₂ HPO ₄ 2 g, KNO ₃ 2 g, NaCl 2 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,05 g, CaCO ₃ 0,02 g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,01 g, agar 15 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Maldonado <i>et al.</i> , 2005b
Starch-yeast extract-peptone-seawater (SYP-SW) agar	Amidon 10 g, extrait de levure 4 g, peptone 2 g, l'eau de mer artificielle, 33,3 g, agar 15 g, 1 litre d'eau de mer naturelle.	Kennedy <i>et al.</i> , 2009

La plupart des milieux d'isolement sont complétés avec des antibiotiques sélectifs afin d'éviter les contaminations par les champignons et les bactéries.

- Plus souvent, les antifongiques utilisés sont : la cycloheximide ($10-100 \text{ ug.ml}^{-1}$), la nystatine ($25-50 \text{ ug.ml}^{-1}$), l'amphotéricine B (30 ug. ml^{-1}), et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 ug. ml^{-1}).
- Les antibiotiques antibactériens utilisés sont les suivants; la novobiocine (25 ug.ml^{-1}), l'acide nalidixique ($10-25 \text{ ug .ml}^{-1}$), et la rifampicine (5ug.ml^{-1}).
- Ces composés antifongiques et antibactériens peuvent être utilisés dans différentes combinaisons:

a-actinomycètes marins facultatifs.

b-pour actinomycètes marins obligatoires.

c-spécialement pour actinomycètes (mycolate).

d-désignés pour les actinomycètes endophytes des éponges.

e- pour l'isolement des actinomycètes rares.

- **La composition chimique des milieux de cultures utilisés pour isolement des actinomycètes dans cette étude est ;**

1-Selon (Amayalay et al., 2012)

- Milieu M1 : 18 g agar et 1 litre d'eau de mer.
- Milieu M2 : 18 g agar, 0,5 g mannitol et 1 litre d'eau de mer.
- Milieu M3: 18 g agar, 1,0 g amidon, 0, 2 g bactopeptone, 0,4 g extrait de levure et 1 litre d'eau de mer.

2-Selon (Jensen et al., 2005)

Les milieux de culture utilisés sont : **NPS, NRS, SMP (tableau XI)**.

3-Selon (Mincer et al., 2002)

Le milieu d'isolement est **M2** : 6 ml of 100% glycerol, 1 g d'arginine, 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de MgSO_4 , 18 g d'agar et 1 litre d'eau de mer naturelle.

4-Selon (Poosarla et al., 2013)

Le milieu d'isolement est **SCA**: amidon 10, caséine 0,3, KNO_3 2, NaCl 2, K_2HPO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, CaCO_3 0,02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 et l'agar 18) , 1 litre d'eau de mer 50% (50% eau de mer et 50% eau distillée).

5- Selon (Sudha et al., 2012)

Le milieu d'isolement est **SCA** : 10g d'amidon soluble, 1g de la caséine ,18g d'agar et 1litre d'eau de mer 50%.

6- Selon (Magarvey et al., 2004)

Le milieu d'isolement est le milieu NaST21Cx (**tableau XI**).

7-Selon (Zhang et al., 2006)

Le milieu d'isolement est **M2 (tableau XI)**.

❖ **Annexe II** : Composition chimique des milieux de culture utilisés pour le test d'activité enzymatique (pour 1 litre d'eau de mer 50%).

- **L'activité cellulasique**

La composition du milieu de cultures (g/l) est : CMC 7 ; NaNO₃ 1.2 ; KH₂PO₄ 3.0 ; K₂HPO₄ 6.0 ; MgSO₄·7H₂O 0.2 ; CaCl₂ 0.05 ; MnSO₄·7H₂O 0.01 ; Zn SO₄·7H₂O 0.001, extrait de levure 1.0 ; NH₄Cl 2 ; NaCl 2.

- **L'activité xylanasiq**

La composition du milieu de cultures (g/l) est : (g/l) xylan 7 g/l, extrait de levure 2 g/l, NaCl 2.5 g/l, NH₄Cl 5 g/l, KH₂PO₄ 15 g/l, Na₂HPO₄ 30 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/l et l'agar 15 g/l.

- **L'activité asparaginase (Czapek Dox)**

La composition du milieu de cultures (g/l) est 6.0 g Na₂HPO₄·2H₂O; 3.0 g KH₂PO₄; 0.5 g NaCl; 5.0 g L-asparagine; 0.5 g MgSO₄·7H₂O; 0.014 g CaCl₂·2H₂O; 2.0% w/v glucose; et 20.0 g d'agar et 0,0001 g de rouge de phénol comme indicateur de pH.

❖ **Annexe III: Composition chimique des milieux de culture liquide testés pour choisir lequel permet une meilleure production d'antibiotique et de croissance de l'isolat S5T2H1.**

- **Le milieu SCA (Poosarla et al., 2013) : (annexe I.)**

- **Le milieu MSA Milieu synthétique a base d'amidon (MSA) : 0,2 % (NH₄)₂SO₄; 0,02 % MgSO₄·7H₂O; 0,05 % KH₂PO₄; 0,1 % K₂HPO₄; 0,2 % NaCl, additionné d'amidon (0,5 %)**

- **Milieu ISP2** : Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g, agar.
- **Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A)** : Extrait de levure : 10g; glucose : 10g.
- **Bennett** : Glucose 10 g, extrait de levure 1 g, caséine 2 g, extrait de viande de boeuf 1g.

Remarque : ces milieux de cultures sont préparés avec 1litre d'eau de mer 50% (50% eau de mer et 50% eau distillée).

- ❖ **Annexe IV** : Composition chimique des milieux de culture utilisés pour l'étude taxonomique des isolats d'actinomycètes S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1, S29T3J31.

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'«International *Streptomyces* Project» (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

1.1. Le milieu ISP1 : Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.2. Le milieu ISP2 : Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g, agar: 20 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.3. Le milieu ISP3 : Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

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

1.4. Le milieu ISP4 : Amidon: 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g ; NaCl: 1 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g ; CaCO_3 : 2 g ; solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g; 1litre d'eau de mer 50%.

1.5. Le milieu ISP7 (Production de pigments mélanoides) : Glycérol: 15 g ; L-tyrosine: 0,5 g ; L-asparagine: 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; NaCl: 0,5 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL ; agar: 18 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.6. Le milieu ISP9 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2,64g ; KH_2PO_4 : 2,38g ; K_2HPO_4 : 5,65g; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1g; Solution saline* : 1 ml; 1litre d'eau de mer 50% ; agar : 20g. Solution saline: $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,64g; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,11 g; $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,79 g; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

1.7. Le milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (annexe III)

1.8. Le milieu Muller Hinton (MH) ; extrait de viande 2 g, Hydrolysate acide de caséine 17,5 g, amidon 1,5 g, Agar 10 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.9. Le milieu M2 de WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964) : Amidon 10g, caséine 0,3 , KNO_3 2g, NaCl : (50/75g), K_2HPO_4 2g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05g, CaCO_3 0,02g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, glucose : 1g , 1 litre d'eau de mer 50%.

1.10. Le milieu GLM : Extrait de malt 3g, extrait de levure 3g, peptone 5g, glucose 10 g , agar 20g, 1litre d'eau de mer 50%.

1.11. Le milieu Czapeck : NaNO_3 3,0 g , $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g , KCl 0,5 g , $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g , K_2HPO_4 1,0 g, saccharose 30,0 g , agar 15,0 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.12. Le milieu de gélose nutritive : Extrait de levure.2, extrait de viande 1, peptone 5, NaCl . 5, agar 15; 1litre d'eau de mer 50%.

1.13. Le milieu Bennett (annexe III)

1.14. Milieu OGA : Extrait de levure 5,0 g, Glucose, 20,0 g, oxytétracycline., 0,1 g agar bactériologique. 15,0 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

1.15. –gélose à l'extrait de malt (GEM) : Extrait de malt, 30,0 g , agar bactériologique, 15,0 g ; 1litre d'eau de mer 50%.

2. Etude physiologique

2.1. La production de pigments mélanoides : milieu ISP7 (annexe IV)

2.2. Dégradation des glucides et dérivés : milieu ISP9 (annexe IV)

2.3. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987) : 10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive. Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

2.4. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987) : 4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.

2.5. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957) : Tween 80 : 10 ml ; NaNO_3 : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; 1litre d'eau de mer 50% ; agar : 18 g.*Solution saline: K_2HPO_4 : 0,25 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,125 g ; NaCl : 0,125 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,001 g ; MnSO_4 : 0,001 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

2.8. Dégradation des sels de sodium (Gordon et al., 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2 g, NaCl : 2 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 1 g ; KH_2PO_4 : 0,5g ; agar: 15 g ; rouge de phénol à 0,04% : 20 ml. 1L d'eau de mer 50%.

2.6. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon et al., 1974) :0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C.

2.7. Dégradation de la caséine du lait (Gordon et al., 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés.

❖ Annexe V

Tableau XII : Caractères morphologiques de quelques isolats actinomycètes isolés.

- En gras sont indiquées les 18 isolats d'actinomycètes testées.

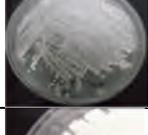
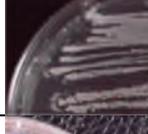
L'isolat	Le code attribué	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium du substrat	Pigments Solubles	Aspect de la colonie
S2T2H1	A	Jaune	Blanc	-	
S5T2H1	B	Jaune	Blanc	-	
S7T2H1	C	Jaune	Blanc	-	
S6T2H1	D	Jaune	Blanc	-	
S1PHmr	E	Orange	Orange	-	
S56T3J31	F	Marron	Blanc	-	
S37T3J31	G	Blanc	Beige	-	
S57T3J31	H	Beige	Blanc	-	
S1PKmr	I	Bleu	Bleu	-	
S29T3J31	J	Vert	Blanc	-	
S28T3J31	K	Blanc	Beige	-	
S1T3J31	L	Orange	Blanc	-	

Tableau XII (suite)

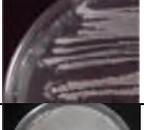
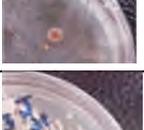
S3T3I1	M	Marron	Blanc	Violet	
S5T3I1	N	Marron	blanc	Marron	
S6T3I1	O	Jaune	Blanc	-	
S1T2Kmr	P	Jaune	Blanc	-	
S2T3I1	Q	Jaune	Blanc	-	
S4T3I1	R	Jaune	Blanc	-	
S1T2H1	U	Blanc	Gris	-	
S4cap2H1	W	Marron	Noire	Marron	
S2cap2Hmr	Y	Marron claire	Orange	Marron	
S4T3J31	Z	Orange	Blanc	-	
S7T3I1	AA	Vert	Blanc	Marron	
S54T3J31	AB	Blanc	Beige	-	
S4T2H1	AC	Jaune	Blanc	-	
S38T3J31	AD	Marron	Blanc	-	

Tableau XII (suite)

S32T3J31	AE	Bleu-vert	-	Marron	
S31T3J31	AF	Marron vert	-	Violet verdâtre	
S30T3J31	AG	Marron	-	Rose	
S2T3J31	AH	Orange	Blanc	-	
S1Cap2H	AI	Rouge	Rose	-	
S6Cap2H1	AJ	Orange	Beige	-	

❖ **Annexe VI** : Représentation de nombre d'isolats d'actinomyètes isolés en fonction de sites d'isolement, le milieu de culture utilisé et le traitement effectué (**tableau XIII, XIV, et XV** respectivement.)

Tableau XIII : Nombre d'isolats d'actinomyètes en fonction de sites d'isolement.

Le site de prélèvement	Nombre d'isolats
Tazeboujth	21
Cap sigli	15
Le port de pêche (Tala yelef)	2
Saket	0

Tableau XIV : Nombre d'isolats d'actinomyètes en fonction de milieu d'isolement.

Nombre d'isolats	Milieu d'isolement	Références
15	SCA	Poosarla <i>et al.</i> ,2013
12	M2	Mincer <i>et al.</i> ,2002
9	SCA	Sudha <i>et al.</i> , 2012
5	NaST21Cx	Magarvey <i>et al.</i> ,2004
2	M2	Zhang <i>et al.</i> , 2002
2	NRS	Jansen <i>et al.</i> ,2005
0	M1	Gontang <i>et al.</i> ,2007
0	M2	Gontang <i>et al.</i> ,2007
0	M3	Gontang <i>et al.</i> , 2007
0	NPS	Jansen <i>et al.</i> ,2005
0	SMP	Jansen <i>et al.</i> ,2005

Tableau XV : Nombre d'isolats d'actinomyètes en fonction de la technique d'isolement.

Technique d'isolement	Nombre d'isolats
Technique d'estampillage	0
Des dilutions suivies par traitement thermique	14
Des dilutions sans traitement thermique	24
Avec enrichissement	5
Avec addition d'antifongique	2

❖ **Annexe VII : Résultats de test d'activité antibactérienne d'isolats d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.**

Tableau XVI: Résultats de test d'activité antibactérienne des d'isolats d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.

Les isolats test	Diamètre de la zone d'inhibition (mm ± 0,025)								
	Les bactéries à Gram positif					Les bactéries à Gram négatif			
	<i>S. aureus</i>	<i>SARM</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. fécales</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P. sp</i>
S2T2H1	18	15	19	12	20	0	0	20	0
S5T2H1	35	30	28	30	28	0	0	24	0
S7T2H1	30	22	23	26	23	0	0	23	0
S6T2H1	32	23	24	28	20	0	0	20	0
S1PHmr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S56T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S29T3J31	15	14	15	14	26	0	0	28	0
S57T3J31	0	0	0	0	0	42	0	0	0
S1PKmr	0	11	0	0	14	33	0	0	0
S37T3J31	0	0	0	0	0	40	0	0	0
S28T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S3T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S5T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S6T3I1	12	0	0	0	0	0	0	0	0
S1T2Kmr	0	0	0	0	23	0	0	0	0
S2T3I1	0	0	0	10	0	0	0	0	0
S4T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

❖ **Annexe VIII : Résultats de test d'activité antifongique d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.**

Tableau XVII : Résultats de test d'activité antifongique d'isolats d'actinomycètes testés par la technique des cylindres d'agar.

Les isolats test	Diamètre de la zone d'inhibition (mm \pm 0,035)							
	<i>As. Carbonarius</i>	<i>As.favlaveus</i>	<i>As. Ochracius</i>	<i>As. niger</i>	<i>As. parasiticus</i>	<i>M. rammanianus</i>	<i>F. polyferatum</i>	<i>B. cinerea</i>
S2T2H1	0	0	0	0	0	0		0
S5T2H1	20	0	13	0	0	15	22	35
S7T2H1	15	0	0	0	0	15	23	25
S6T2H1	12	0	0	0	0	14	20	25
S1PHmr	0	0	0	0	0	0	0	0
S56T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S29T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S57T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S1PKmr	0	0	0	0	0	0	0	0
S37T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S28T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S1T3J31	0	0	0	0	0	0	0	0
S3T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0
S5T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0
S6T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0
S1T2Kmr	0	0	0	0	0	0	0	0
S2T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0
S4T3I1	0	0	0	0	0	0	0	0

- ❖ **Annexe IX** : Représentation des photographies de teste d'activité antibactérienne sur milieu solide par méthode de disque d'agar des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.

Tableau XVIII : Représentation des photographies de teste d'activité antibactérienne sur milieu solide par méthode de disque d'agar des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.

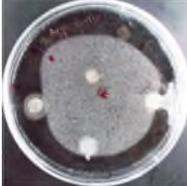
Isolats d'actinomycète	Type de germe cible		Nom du germe cible	Photographie de zones d'inhibition
S2T2H1, S5T2H1 et S7T2H1	Bactéries	Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	
			SARM	
			<i>Listeria innocua</i>	
			<i>Bacillus subtilis</i>	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Gram négatif		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Champignons	Moisissures	<i>Aspergillus carbonarius</i>	

Tableau XVIII (suite)

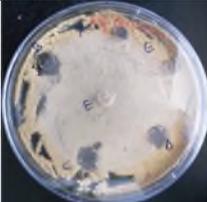
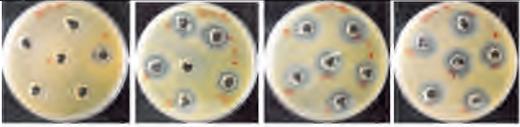
			<i>Aspergillus ochraceus</i>	
			<i>Mucor rammanianus</i>	
			<i>Botrytis cinerea</i>	
		Levure	<i>Candida albicans</i>	
S29T3J31	Bactéries	Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	
			SARM	
			<i>Listeria innocua</i>	
			<i>Bacillus subtilis</i>	

Tableau XVIII (suite)

			<i>Enterococcus fécalis</i>	
		Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Champignons	Levure	<i>Candida albicans</i>	

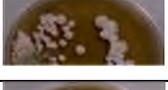
- ❖ **Annexe X** : Des photographies de résultats de la cinétique de production de des antibiotiques par l'isolat S5T2H1 sur différents milieux liquides.

Tableau XIX : Résultats de la cinétique de production des antibiotiques par l'isola S5T2H1 sur différents milieux liquides.

Germe cible	Milieu de culture liquide	Photographies
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSA	
	ISP11	
	GYEA	
	Bennett	
	CSA	
<i>Botrytis cinerea</i>	MSA	
	ISP11	
	GYEA	
	bennett	
	M2	

Annexe XI : Etude taxonomique des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1, S29T3J31

TableauXX : Aspect morphologique de l'isolat S2T2H1, sur différents milieux de culture.

La période d'incubation	Le milieu de culture	La croissance	La sporulation	La couleur de la spore	La couleur de Mycélium aérien	La couleur de Mycélium de substrat	Les pigments diffusibles	Aspect de la colonie
21 jours	ISP1	++++	++++	Blanche	Blanc	Jaune	–	
	ISP2	++++	++++	Grise	Blanc	Maron	–	
	ISP3	++++	++++	Grise	Blanc	Maron	–	
	ISP4	+++	++++	Grise	Blanc	Jaune pal	–	
	ISP5	+++	++++	Grise	Blanc	Jaune foncé	–	
	ISP7	+	++++	Grise	Blanc	Motard	Pigment maron	
	ISP9	+++	++	Blanche	Blanc	Beige	–	ND
	GLM	+++	+++	Grise	Blanc	Maron	–	
	GYEA	++++	++++	Grise	Blanc	Jaune	–	
	Bennett	++++	++++	Grise	Blanc	Jaune	–	
	Czapeck	++	++	Grise	Blanc	Jaune	–	
	GN	+++	+++	Blanche	Blanc	Jaune	–	
	MH	+++	+++	Blanche	Blanc	Maron	–	
	GEM	+++	++++	Grise	Blanc	Maron	–	ND
	OGA	+++	+	Blanche	Blanc	Jaune	–	
	SCA	++++	++++	Grise	Blanc	Jaune foncé	–	
	M2 Williams	++++	++++	Grise	Blanc	Jaune foncé		

TableauXXI : Aspect morphologique de l'isolat S7T2H1, sur différents milieux de culture.

La période d'incubation	Le milieu de culture	La croissance	La sporulation	La couleur de la spore	La couleur de Mycélium aérien	La couleur de Mycélium de substrat	Les pigments diffusibles	Aspect de la colonie
21 jours	ISP1	++++	++	Blanche	Blanc	Jaune pale	–	
	ISP2	++++	++	Blanche	Blanc	Rose clair	–	
	ISP3	++++	+++	Grise	Blanc	Jaune foncé	–	
	ISP4	++++	++++	Grise	Blanc	Jaune pale	–	
	ISP5	+++	++++	Blanche	Blanc	Jaune pale	–	
	ISP7	+++	++++	Grise	Blanc	Maron	Pigment maron	
	ISP9	++++	–	–	–	Maron clair	–	
	GLM	++++	++	Blanche	Blanc	Creme	–	
	GYEA	+++	+++	Blanche	Blanc	Creme	–	
	Bennett	+++	+++	blanche	rose	Blanc	–	

TableauXXI

Czapeck	++++	+++	Blanche	Blanc	Jaune clair	-	
GN	++++	-	-	-	Jaune	-	
MH	++++	-	-	-	Beije	-	
GEM	+++	++++	Gris	Blanc	Maron	maron	ND
OGA	+++	++++	Blanc	blanc	Jaune	-	
M2 WILIAMS	+++	++	Grise	blanc	Jaune	-	

Tableau XXII : Aspect morphologique de l'isolat S29T3J31, sur différents milieux de culture.

La période d'incubation	Le milieu de culture	La croissance	La sporulation	La couleur de la spore	La couleur de Mycélium aérien	La couleur de Mycélium de substrat	Les pigments diffusibles	Aspect de la colonie
21 jours	ISP1	++++	+++	Blanche	Blanc	Marron	-	
	ISP2	++++	+++	Blanche	Vert	Jaune	-	
	ISP3	+++	++	Blanche	gris	Jaune	-	
	ISP4	++++	+	blanche	Marron	Marron	-	
	ISP5	++++	-	-	Vert	Jaune	-	
	ISP7	+	-	-	Motard	Jaune pale	-	
	ISP9	++	-	-	Creme	Jaune	-	
	GLM	++++	-	-	-	Vert	-	
	GYEA	++	-	-	-	Jaune pale	-	ND
	Bennett	++++	-	-	-	Vert	-	

Tableau XXII (suite)

Czapeck	++++	++++	Blanche	Blanc	Jaune pale	-	
MH	+++	-	-	-	Jaune	-	
OGA	+++	++	blanche	blanc	jaune	-	
SCA	++++	-	-	-	Jaune	-	
M2 WILIAMS	++++	-	-	-	jaune	-	

Tableau XXIII : Caractéristiques physiologiques des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J1.

Substrat / Isolat	S2T2H1	S5T2H1	S7T2H1	S29T3J31
Hydrolyse de l'amidon				
Dégradation de la gélatine				
Dégradation de la Tyrosine				
Dégradation de la Caséine				
Dégradation de tween 80				

Tableau XXIV: Utilisation des composés glucidiques et des acides aminés comme seule source de carbone par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.

Sucres Isolat	Isolat		Acide aminé Isolat	Isolat			
	S5T2H1	S2T2H1		S5T2H1	S2T2H1	S7T2H1	S29T3J31
D. glucose			L-Lysine				
D. fructose			L-Méthionine				
D-Mannitol			L-Glycine				
D-Saccharose			L-Tryptophane				
D-Xylose			L-Asparagine				
D-Lactose			L-Arginine				
D-Sorbitol			L-Cystéine			ND	
L-Arabinose			L-Leucine				
D-Galactose			L-Proline	ND			

Tableau XXIV (suite)

D-Sucrose			ND	ND	ND
-----------	---	---	----	----	----

Tableau XXV : Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31.

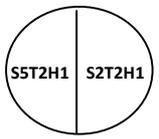
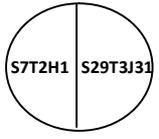
Isolat / Sel de sodium	Acétate de sodium	Citrate de sodium	Oxalate de sodium	Tartrate de sodium	Propionate de sodium
					
					

Tableau XXVI : Sensibilité des isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31 aux différents agents chimiques

Agent chimique isolat		S5T2H1 S2T2H1		S7T2H1 S29T3J31	
Phénol	0.01%				
	0.05%				
Tellurite de potassium	0.01%				
	0.05%				
Azide de sodium	0.001%				
	0.01%				
Cristal violet	0.001%			ND	
	0.01%	ND			

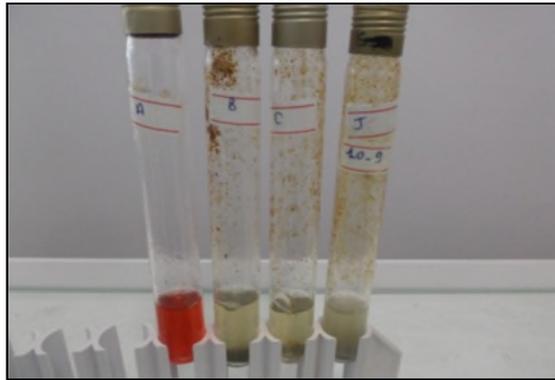


Fig.42: Test de production de nitrate réductase par les isolats S2T2H1, S5T2H1, S7T2H1 et S29T3J31

Résumé

Des échantillons de sédiments marins ont été prélevés à partir de quatre plages de la wilaya de Bejaia. Ces derniers ont été traités et ensemencés sur 11 milieux de culture différents. Cela a permis d'isoler 45 isolats d'actinomycètes. Sur la base du temps d'incubation jusqu'à maturité, 18 souches ont été choisies pour tester leur activité antimicrobienne vis-à-vis de 4 bactéries Gram positives et 5 bactéries Gram négatives, une levure et 8 champignons filamenteux, par la technique des cylindres d'agar. Parmi elles, 04 souches ont montré une activité contre au moins un germe-cible étudié. L'activité enzymatique de celles-ci est testée par la technique des cylindres d'agars. Deux souches : S2T2H2 et S7T2H1 ont montré des activités enzymatiques multiples ; cellulase, xylanase et asparaginase. La souche S5T2H1, qui s'est avérée la plus performante est sélectionnée pour mettre en évidence sa production d'antibiotiques sur milieu liquide contre *S. aureus* et *B.cinerea*, puis pour le choix de meilleur milieu pour la production de substances actives et la croissance. Les milieux SCA et GYEA sont avérés les plus appropriés pour la production d'antibiotiques et pour la croissance respectivement. La même souche a fait objet d'une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique, ce qui nous a permis d'affilier cette souche au genre *Streptomyces*.

Mots clés : Actinomycètes, sédiments marins, activité antibiotique.

Abstract

Marine sediment samples were collected from four near shores of Bejaia coast. These were treated and inoculated on 11 different culture media. A total of 45 isolates of Actinomycetes were collected. On the basis of their incubation time, 18 actinomycetes strains were retained to test their antimicrobial activity against 4 Gram positive and 5 Gram negative bacteria, yeast and 8 filamentous fungi, by the agar cylinders technique. Among them, 04 strains showed activity against at least one target germ studied. The enzymatic activity of 04 selected strains was investigated by the agars cylinders technique. Both of strains, S2T2H2 and S7T2H1 exhibited multiple enzymatic activities; cellulase, xylanase and L-Asparaginase. The strain S5T2H1 was selected to study its ability to produce antibiotics on liquid medium by testing against *S. aureus* and *B.cinerea*. The best medium for the production of bioactive metabolites and growth was, then determined. SCA and GYEA media appear to allow best production of antibiotics and growth respectively. This strain was subjected to a morphological, physiological and biochemical characterization, that allowed us to affiliate this strain to the genus *Streptomyces*.

Keywords: Actinomycetes, marine sediments antibiotic activity.

ملخص

تم جمع عينات الرواسب البحرية من أربعة شواطئ في ولاية بجاية. ثم تم علاجها وزرعها في 11 أوساط غذائية مختلفة. هذا مكن من عزل 45 سلالة من نوع الأكتينومييسات وقد تم اختيار 18 منها لاختبار قدرتهم على إنتاج المضادات الحيوية ضد 4 بكتيريا موجبة الجرام و 5 بكتيريا سالبة الجرام، خميرة و 8 فطريات خيطية، بطريقة الانتشار للمضادات الحيوية. 04 سلالات أظهرت نشاط ضد واحدة على الأقل من الجرثوم الهدف. بينت نتائج تقييم النشاط الأنزيمي للسلالات المختبرة أن السلالتان S2T2H2 و S7T2H1 تملكان أنشطة إنزيمية متعددة؛ سلولاز، كسلاناز، أسبراجناز. تم دراسة السلالة S5T2H1، التي ثبت أنها أكثر فعالية على إنتاجها من المضادات الحيوية وذلك في وسط سائل ضد بكتيريا *S.aureus* و الفطر الخيطي *B.cinerea* واختيار أفضل وسط لإنتاج المواد الفعالة و النمو. وقد ثبت أن الوسطين الغذائيين SCA و GYEA الأنسب لإنتاج المضادات الحيوية والنمو على التوالي. إن الدراسة المورفولوجية، الفزيولوجية، والكيميوجيوية، للسلالة S5T2H1 سمحت لنا بتصنيفها ضمن صنف *Streptomyces*.

كلمات البحث: الأكتينومييسات، الرواسب البحرية، النشاط المضاد الحيوي.