

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

**Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

*Mémoire d'Ingénieur d'Etat en
Génie Biologique
Thème*

*Sélection des souches
d'actinomycètes productrices
d'agents antimicrobiens*

Présenté par :

M^{lle} BOUSSALAH Ferial

M^{lle} MERABTI Zineb

Membres de jury:

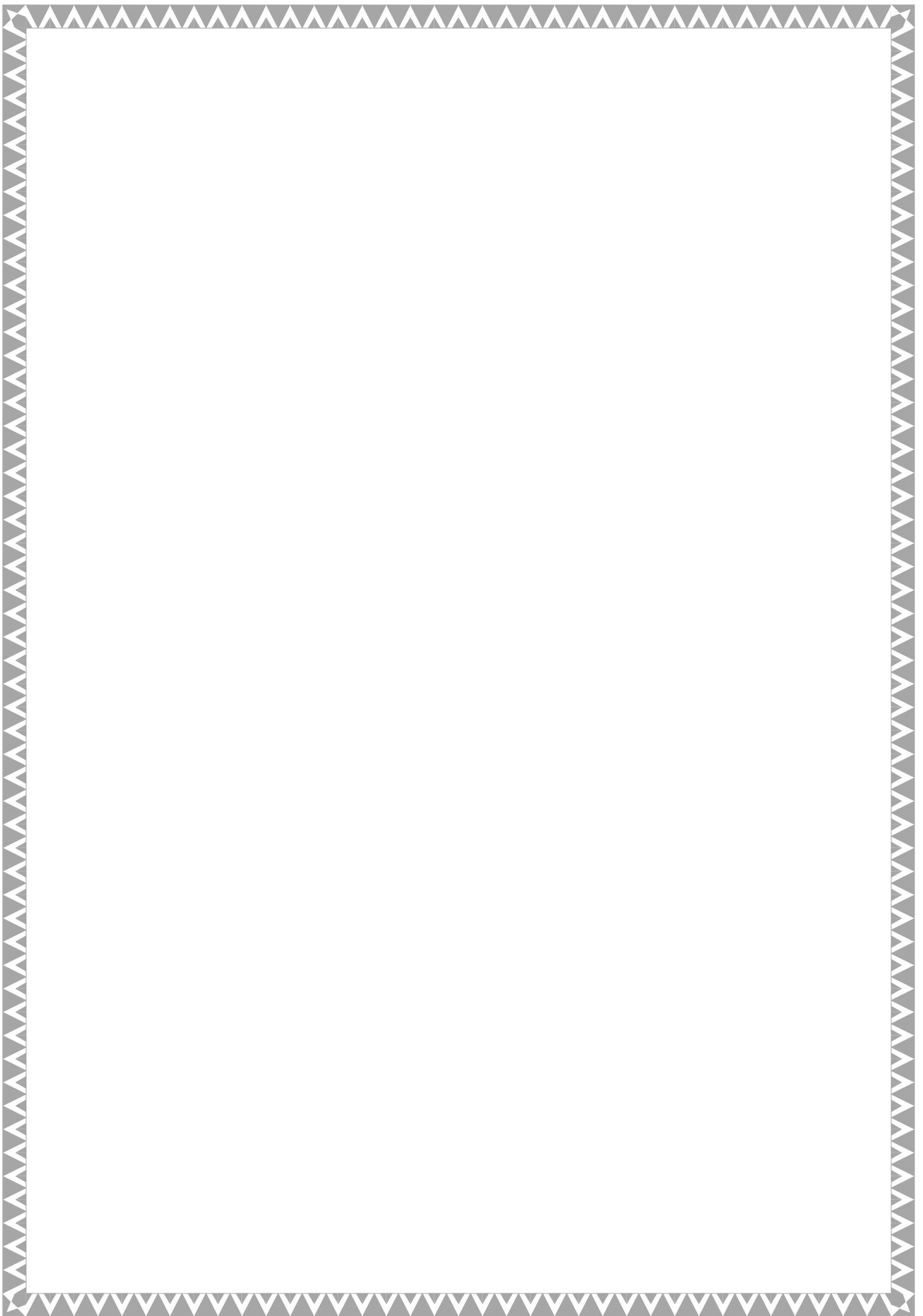
Présidente: *M^{lle} TITELI Fatiha*

Examinatrice: *M^{lle} BELHAMICHE Nabila*

Examinatrice : *M^{lle} TIGHIDET Salima*

Promotrice : *M^{me} BOUDRIES Samiha*

Promotion 2011/2012.



Remerciements

Nos profonds remerciements au bon Dieu qui a éclairé notre chemin et qui nous a donné la foi et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier en premier lieu notre promotrice Mme BOUDRIES. de nous avoir encadré et orienté, ainsi que pour son aide et ses précieux conseils tout au long de ce travail.

Nous exprimons aussi notre remerciement à tous les membres de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

M^{lle} TITELI Fatiha, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury et examiner ce travail, qu'elle reçoit, ici, l'expression de notre profonde gratitude.

M^{lle} BELHAMICHE Nabila, qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner ce travail, qu'elle reçoit, ici, l'expression de notre profonde gratitude.

M^{lle} TIGHIDET Salima pour avoir accepté de se joindre au jury et examiner ce travail.

Qu'Allah le clément et miséricordieux vous accorde son aide dans tous vos projets et toute votre vie quotidienne.

MERCI.

M^{lle} : Boussalah Ferial

M^{lle} : Merabti Zineb



Dédicaces

A celui qui m'a tout donné sans rien attendre en retour.

A la mémoire de mon grand-père Massaoud qui repose en paix,

A ceux qui m'ont encouragé et soutenue dans les moments les plus difficiles.

A ceux à qui je dois tant.

Mon très cher papa, pour son soutien moral et matériel tout au long de mes études, aucun remerciement ne serait être suffisant pour lui exprimer ma gratitude.

Ma très chère mère, pour son soutien inconditionnel et incommensurable, et ses encouragements qui m'ont permis de réaliser mes objectifs

A ma très chère grand-mère Yakout à qui je souhaite de se rétablir.

A mon chère frère Mounir qui j'aime beaucoup.

A mes chères sœurs Lamia et Nawal.

A mon oncle Malek et mes tantes ainsi que leurs familles.

A tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqué.

A ma collègue Zineb et toute sa famille.

A toute la promotion de Génie biologique 2011-2012.

FERJEL.



Dédicaces

*Avec l'aide du bon DIEU, le tout puissant, ce travail est achevé ;
Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui me sont chères :*

*A ma très chère grande mère que dieux la garde encor Longtemps.
Aux deux êtres les plus chères au monde qui ont donné sens à mon
existence, et qui m'ont soutenu nuits et jours et durant tout mon
parcours. Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je
lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.*

*À Celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la
volonté fait toujours les grands hommes : mon père soit toujours en bonne
santé et à mes cotés.*

*A mes très chers sœurs pour leurs disponibilités, leurs soutien moral
et leurs encouragement incessant que le dieu les protège et leurs donnent
une vie pleine de réussite et de bonheur*

A ma tente et sa famille surtout Youcef et Farah.

*A mes ancles et leurs familles surtout les petites Houda, Chaima et
Iman.*

*A mes chers cousins et cousines Samia, Zineb, Nabila Slimane Samir
et Lhacene.*

*Mes dédicaces ne seront pas completes sans citer mes copines Ferial et
Souhila.*

Zineb.



La liste des figures

Figure N°	Titres	page
1	Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes.	11
2	Pourcentage d'organismes vivants producteurs d'antibiotiques.	15
3	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar.	19
4	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits.	24
5	Histogramme représentant l'activité antimicrobienne des isolats STA11, S23et STA19(4) respectivement sur différents milieux de production.	28
6	Histogramme représentant l'activité antimicrobienne des isolats STECB3 et STA10 respectivement sur différents milieux de production.	29
7	Illustration du test des cylindres d'agars des souches d'actinomycètes sélectionnées.	30
8	Effet du pH sur l'activité antimicrobiens de l'isolat STA10 contre <i>C.albicans</i> et de l'isolat STA19(4) contre SARM sur MEM par la méthode des cylindres d'agar.	33
9	Coloration de Gram des isolats d'actinomycètes sélectionnés.	41
10	. Observation microscopiques des isolats d'actinomycètes après 21jours d'incubation à 28°C, grossissent (10 ×40).	42
11	Quelques tests physiologiques de la souche STECB3.	49
12	Histogramme représentant les résultats de l'antibiographie des extraits obtenus en milieu liquide.	51
13	Spectre UV-visible des extraits butanoliques des isolats sélectionnés	53

Les listes des tableaux

Tableau N°	Titre	page
I	Types glucidiques chez les Actinomycète	7
II	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	7
III	Principaux chimiotypes rencontrés chez les Actinomycètes	8
IV	Classification des antibiotiques d'après la structure chimique	13
V	quelques exemples d'agents d'antimicrobiennes produites par les actinomycètes	16
VI	Activité antagoniste des souches testées (STA11, STA10, STECB3b, S23, STA19 (4)) contre divers germes cibles	Annexe II
VII	Résultats des caractéristiques culturales des isolats d'actinomycètes sur les milieux ISP et GYEA.	36
VIII	Résultat de la recherche des acides aminés pariétaux et les sucres cellulaire des souches d'actinomycètes sélectionnées.	43
IX	Croissance à différentes des 5 isolats concentrations en Na Cl.	44
X	Croissance des 5 isolats à différents pH.	45
XI	Croissance des 5 isolats à différentes températures.	45
XII	Dégradation des sucres par les 5 isolats.	46
XIII	Dégradation de quelques sels de sodium.	47
XIV	Résistance à quelques agents physiques.	47
XV	Dégradation d'autres composés organiques	48

Liste des abréviations

- **ADNr:** Acide Désoxyribonucléique ribosomique
- **ARNr :** Acide Ribonucléique ribosomique
- **ATCC:** American type culture collection
- ***Asp. niger* :** *Aspergillus niger*
- ***B. subtilis* :** *Bacillus subtilis*
- ***C. albicans* :** *Candida albicans*
- **C.C.M:** Chromatographie sur couche mince
- **DAB:** Acide Diamino Butyrique.
- **DAP:** Acide Diamino Pimélique.
- ***E.coli* :** *Escherichia coli*
- **GC%:** Pourcentage Guanine-Cytosine.
- **GYEA:** Glucose-Yeast Extract Agar.
- **HPLC:** Haut Performance Liquide Chromatographie
- **ISP:** International *Streptomyces* Project.
- ***L. innocua* :** *Lesteria innocua*
- **LMA :** Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
- **M H:** Muller Hinton
- **M₂ :** Milieu Williams Modifié.
- **MA :** mycélium aérien.
- **MS:** Mycélium de Substrat.
- **ND :** Non déterminé
- ***P. aeruginosa* :** *Pseudomonas aeruginosa*,
- **RF:** *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses)
- ***S. aureus* :** *Staphylococcus aureus*
- ***S. Typhie* :** *Selmonella typhi*
- **SARM :** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline
- **U. F. C:** Unité formant colonie
- **UV:** Ultra violet
- ***V. cholera* :** *Vibrio cholerae*

Sommaire

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Rétrospective sur les actinomycètes	3
1. Caractéristiques principales.....	3
2. Habitat des actinomycètes	4
3. Taxonomie et critères d'identification	4
3.1. Taxonomie	4
3.2. Critères actuels d'identification	5
3.2.1. Caractères morphologiques.....	5
3.2.1.1Caractères macromorphologiques.....	5
3.2.1.2 Caractères micromorphologiques	5
3.2.1.3 Caractères chimiques	
a) Les acides aminés.....	6
b) Les sucres.....	6
c) Les lipides	7
3.2.3. Caractères physiologiques	9
3.2.4. Critères moléculaires	9
4. Importance des actinomycètes	10
4.1. En agronomie	10
4.2. En biotechnologie	10
4.3. En pathologie	12
4.4. Autres rôles	12
II. Les antibiotiques	12
1. Définition	12
2. Classification	13
3. Les microorganismes producteurs d'antibiotiques	14
4. Les antifongiques	15
4.1. Classification	15
5. les antibactériens.....	16
5.1. Classification	17

Matériel et méthodes

I. Matériel	18
1. Matériel analytique.....	18
2. Matériel biologique	18
2.1 Souches d'actinomycètes	18
2.2. Microorganismes cibles	18
II. Méthodes	18
1. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes sur quatre milieux	18
2. Effet du pH du milieu MEM sur la production d'antimicrobiens	20

Sommaire

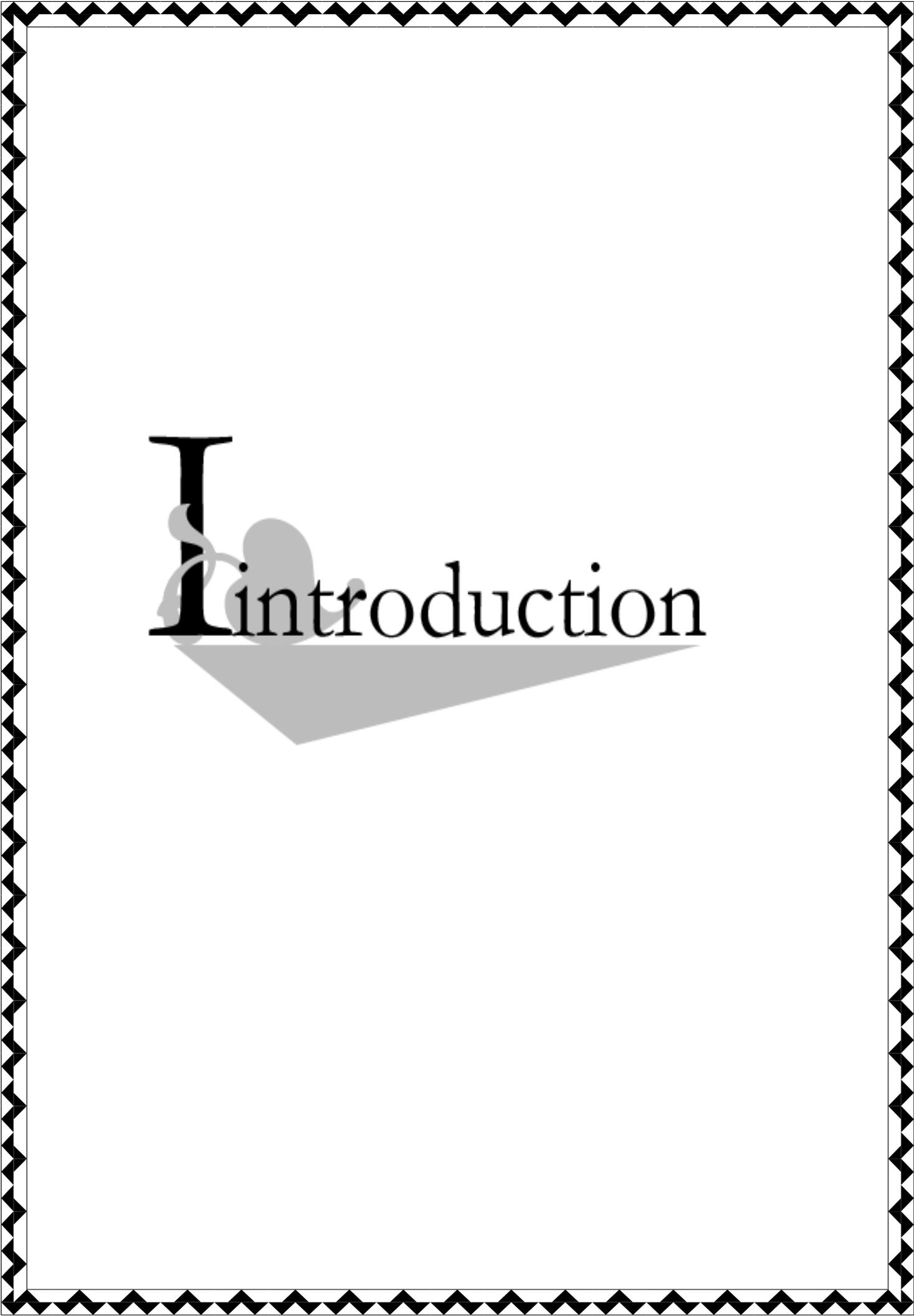
3. Etude taxonomique des actinomycètes sélectionnés	20
3.1. Etude morphologique.....	20
a) Macromorphologie	20
b) Micromorphologie.....	20
3.2. Chimiotaxonomie	20
a) Les acides aminés	21
b) Les sucres	21
3.3. Etude des caractères physiologiques.....	22
a) Tolérance au NaCl sur le milieu MEM solides	22
b) Croissance à différents pH	22
c) Croissance à différentes Température	22
d) Production des pigments mélanoides	22
e) Production de nitrate réductase	22
f) Dégradation de divers composés organiques.....	23
III. Production, extraction d'antibiotiques en milieu liquide et la détection des non polyéniques.....	23
1. Production d'antibiotiques en milieu liquide	23
1.1. Préculures.....	23
1.2. Cultures.....	23
2. Extraction des antibiotiques par le butanol à partir du surnageant	23
3. Antibiographie : Méthode de diffusion des puits	24
4. La détection des antifongiques non polyéniques.....	24

Résultats et discussion

1. Test des cylindres d'agar sur différents milieux de production d'antimicrobiens	26
2. Effet du pH du milieu MEM sur la production d'antimicrobiens	32
3. Etude taxonomiques des 5 isolats sélectionnés	34
3.1. Détermination du genre	34
3.1.1. Etude des caractères morphologiques.....	34
a) Macromorphologie	34
b) Micromorphologie.....	40
3.1.2. Chimiotaxonomie.....	43
3.2. Etude physiologiques	44
a) Tolérance au NaCl sur le milieu MEM solides	44
b) Croissance à différents pH	45
c) Croissance à différentes Températures.....	45
d) Autres tests physiologiques.....	46
4. Extraction des antibiotiques par le butanol	50
4.1 Antibiographie : test des puits	50
4.2 Recherche des polyéniques	51
Conclusion.....	54

Références bibliographiques

Annexes.

A decorative border with a repeating black and white zigzag pattern surrounds the entire page.

I Introduction

Introduction

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration dans l'espérance de vie a été constatée. Cependant, leur mal utilisation et de manière intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multirésistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes et ceci particulièrement dans les pays en voie de développement (OMS, 1997). Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antibiotiques.

Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices de ces molécules bioactives.

L'origine des molécules antimicrobiennes peut être naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques (Watve *et al.*, 2001). En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes (Zerizer, 2006). C'est en 1940, après la découverte de l'actinomycine, que ces bactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches et elles sont extrêmement exploitées durant les années 80, en conséquence, de nouvelles structures et surtout celles des antibiotiques sont continuellement isolées à partir de ce groupe bactérien. Ainsi, ces bactéries sont devenues les premiers fournisseurs de ces métabolites (Donadio *et al.*, (2002).

Les actinomycètes filamenteux sont à l'origine de 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde. Le genre *Streptomyces*, qui sécrète plus de 80% de ces molécules, est très intensément exploité (Watve *et al.*, 2001).

L'exploration des écosystèmes extrêmes (température, pH, aération ou stress osmotique) favorise la détection d'actinomycétales pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérien et/ou antifongique important (Williams Cross, 1971). Les sols de palmeraies d'Algérie, qui constituent un écosystème assez particulier, ont montré une biodiversité surprenante en actinomycètes, particulièrement en actinomycètes d'habitude rarement isolés de par le monde (Sabaou *et al.*, 1998 ; Zerizer, 2006). D'autre part, plusieurs travaux exploitant d'autres écosystèmes particuliers en Algérie sont réalisés tel que les sebkhas salines (Boughachiche *et al.*, 2005), les sols salins de la région de Bejaia (Souagui, 2009 ; Djinni, 2009). Parmi ces microorganismes rares, des actinomycètes autres que *Streptomyces*, se sont révélés être une source potentielle d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2001).

Introduction

Cependant, le taux de nouvelles découvertes à partir des cultures d'actinomycétales isolées des sols des régions méditerranéennes et tempérées est en diminution remarquable **(Zerizer, 2006)**.

Vue leur importance dans la production d'antibiotiques, une collection de souches actinomycétales a été exploitée dans notre travail afin de :

- ✓ sélectionner des souches actinomycétales productrices d'antimicrobiens sur différents milieux de culture envers 10 germes cibles ;
- ✓ étudier l'effet du pH sur la production des antimicrobiens des souches sélectionnées;
- ✓ identifier les souches sélectionnées;
- ✓ extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures des souches sélectionnées ;
- ✓ la mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur le milieu liquide; et
- ✓ la recherche des polyéniques.

Partie I.

Synthèse bibliographique

I. Rétrospective sur les actinomycètes

1. Caractéristiques principales

Les actinomycètes sont des bactéries généralement filamenteuses à Gram positif caractérisées par un ADN riche en G+C (guanine+cytosine supérieure à 55%) (**Reyma et Vijayakumar, 2008**). Généralement compris entre 60 et 75% (**Ensign, 1979; Larpent et sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des Actinomycétales (**Maria et Sebald, 1990**), qui comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia, Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces, Actinomadura, Micromonospora, etc.*) (**Lacey, 1973; Athalye et al., 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997; Oskay et al., 2004; Mitali et al, 2006**). Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier) surmonté par mycélium aérien sporulant (reproduction asexuées) (**cité par Lamari, 2006**).

En général, les actinomycètes sont hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi d'une croissance chimio autotrophe (**Ensign et al., 1993**), et aérobie (**cité par Kecha, 1996**). La plus part des actinomycètes, sont mésophiles et neutrophiles (**Badji, 2006**). Cependant, quelques espèces de *Streptomyces* sont acidophiles (**Kim et al., 2004**), et d'autres sont alcalinophiles (**Lie et al., 2005**), et thermophiles (**Al-Tai et al., 1999**).

La plupart de ces bactéries sont immobiles, cependant certains genres produisent des spores flagellées permettant la dispersion dans des habitats aquatiques (**Perry et al., 2004**).

Les actinomycètes possèdent une structure procaryote, mais leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons (**Kalakoutski et Agre, 1976**). Leur temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Ottow et Math, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989**). Le diamètre de ses filaments varie entre 0,5 et 0,2µm (**Lamari, 2006**). La plupart sont saprophytes mais quelques uns peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (**Suzuki et al., 1994**).

2. Habitat des actinomycètes

Ils représentent le groupe des microorganismes le plus largement distribué dans la nature (Narayana *et al.*, 2008). Ce sont des micro-organismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants. La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, eaux, compostes, fourrages, fumiers, grains ...etc.) et dans des zones géographiques variées : l'extrême nord, l'arctiques, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (Lacey, 1997). Les actinomycètes sont également rencontrés sur les débris des végétaux, les champs de riz (warij *et al.*, 2006), les caravanes naturelles (Lee, 2006), des hydrocarbures ou du pétrole (Baniyadi *et al.*, 2009), les boues activées (Sin, 1970), de l'écorces d'arbres (Pulen *et al.*, 2002) et d'autres se comportent comme des parasites intra cellulaires des spongiaires (Hamdhinathi *et al.*, 2007). Ces microorganismes ont été également isolés dans de nombreux environnements aquatiques : des eaux de mères et sédiments marins (Jensen *et al.*, 1991 ; Chanan *et al.*, 2000) ; d'eaux douces (Kitouni *et al.*, 2005) et dans des marécages salés (Al-zarban *et al.*, 2002 ; Bougachiche *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2005).

La présence des actinomycètes est très influencée par les conditions environnementales d'humidité, température, pH et végétation (Basilio *et al.*, 2003). Beaucoup sont capables de sporuler, ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (Zaitlin *et Watson*, 2006). Cette propriété joue un rôle principal dans leur distribution.

Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à un climat aride, se sont révélés riches en actinomycètes parfois réputé rares de par le monde (Boudemagh, 2007).

3. Taxonomie et critères d'identification

3.1. Taxonomie

Les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des Actinobacteria, à la sous classe des Actinobacteridae, et l'ordre des Actinomycetales créé par Buchanan en 1917. Cette classe est subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycetales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces (Bergey's, 2007). *Streptomyces* est le genre le plus large avec 562 espèces valides jusqu'à un 2009 (Ningthonjam *et al.*, 2009). Tous les membres de cet ordre (Actinomycetales) sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines

Corynebacteries, à plus de 70% chez les *Streptomyces* et *Frankia*, et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie (**Ventura et al., 2007**).

3.2. Critères actuels d'identification

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : Morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires (**Boudjella, 2007**).

3.2.1. Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques ont trait aux caractéristiques culturaux et micromorphologiques.

3. 2. 1. 1. Caractères culturaux ou macromorphologiques

D'après **Abbas, (2006)**, les caractères culturaux contribuent parfois à différencier les genres d'actinomycètes entre eux. Ces caractères consistent en:

- la production ou non d'un mycélium aérien (MA) ;
- la présence et le type du mycélium de substrat (MS) ; et
- la détermination de la couleur du MA et du MS ainsi que des pigments diffusibles dans le milieu.

3. 2. 1. 2. Caractéristiques micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon **Lamari, (2006)** et **Boudjella, (2007)** sont:

- La fragmentation ou non du MS ;
- La formation de spores exogènes sur le MA et /ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaîne) ;
- La présence ou non de sporophores, la surface des spores (Lisse, épineuse, ou chevelue) ;
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporanges ainsi que la longueur des sporangiophores ;

Synthèse bibliographique

-La présence de spores mobiles (ex : *Planomospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...);

-La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les sclérotés, etc

3.2. 2. Caractères chimiques

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Soccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.) nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (**Boudjella, 2007**).

La chimiotaxonomie est basée sur l'analyse des acides aminés pariétaux, des glucides des cellules entières, et des lipides membranaires. Les ménaquinones n'étant analysés que pour certains groupes d'actinomycètes, ainsi que les acides mycoliques (**Wang et al., 2004**).

✓ Les acides aminés

Deux acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont : l'acide diaminopimélique (DAP : forme isomérique LL ou DL), qui peut être parfois remplacé, chez certains genres, par l'ornithine, ou la lysine ou par l'acide diaminobutyrique (DAB) et la glycine qui peut être présente ou absente (**Lechevalier et Lechevalier, 1970a**). En général, des techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince) sont utilisées pour la détermination de la composition en acides aminés pariétaux chez les actinomycètes (**Hasegawa et al., 1983**) ou l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) pour la séparation des stéréoisomères du DAP (**Takahachi et al., 1989**).

✓ Les sucres

Dans les cellules entières des actinomycètes, divers sucres peuvent être retrouvés, dont certains ont une importance taxonomique (Tableau I) (**Lamari, 2006**).

Synthèse bibliographique

Tableau I : Types glucidiques chez les actinomycètes (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**).

TYPE	SUCRES CARACTERISTIQUES	GROUPES D'ACTINOMYCTES
A	Arabinose + Galactose	Nocardioformes : (<i>Nocardia</i> ; <i>Saccaropolyspora</i> , etc.)
B	Madurose	Maduromycètes : (<i>Actinomadura</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Microtetraspora</i> , etc.)
C	Pas de sucres caractéristiques	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardiopsis</i> , etc.
D	Xylose + Arabinose	Actinoplanètes : (<i>Actinoplanes</i> , <i>Micromoraspora</i>)
E	Rhamnose + Galactose	Les Actinosynnema : (<i>Saccharothrix</i> , <i>Lentzea</i> , etc.)

✓ Les lipides

Les lipides importants en taxonomie, sont représentés par les phospholipides, les ménaquinones, les acides mycoliques et les acides gras (**Badji, 2006 ; Boudjella, 2007**).

• Les phospholipides

Les lipides polaires les plus courants chez les actinomycètes sont les phospholipides (**Minnikin et al., 1977**). Les cinq profils phospholipidiques caractéristiques des actinomycètes définis par **Lechevalier et al., (1977)** sont présentés dans le tableau II suivant.

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

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

Note : tous les actinomycètes possèdent le phosphatidylinositol.(+) : présent, (-) : absent, V: variable suivant les espèces d'un même genre

• Les ménaquinones

Les ménaquinones pourraient être utilisés en combinaison avec des caractères morphologiques et chimiotaxonomiques dans la classification des actinomycètes jusqu'au

Synthèse bibliographique

niveau du genre (**Ruan et al., 1985**). Ce sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique contenant des unités isoprènes (**Zitouni, 2005**).

- **Les acides mycoliques**

Ce sont des acides gras pariétaux complexes, insaturés, contenant 20 à 90 atomes de carbone. Ils sont présents uniquement chez certains genres d'actinomycètes ayant le chimiotype IVA tel que *Mycobacterium* (80 carbones), *Nocardia* (50C) et *Corynebacterium* (30C). Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (**Mordarska et al., 1972**).

- **Les acides gras**

La composition chimique en acides gras permet également de distinguer entre certains genres (**Boudjella, 2007**). Les acides gras les plus connus chez les actinomycètes appartiennent soit aux molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques (**Mordarska et al., 1972 ; Larpent et Sanglier, 1989**).

Les actinomycètes ont été classés ainsi en chimiotypes selon leur composition en acides aminés et en sucres, d'après respectivement **Becker et al., (1965)** ; **Yamaguchi, (1965)** et **Lechevalier et Lechevalier, (1970)**. Les Principaux chimiotypes rencontrés chez les Actinomycètes sont présentés dans le tableau III.

Synthèse bibliographique

Tableau III : Principaux chimiotypes rencontrés chez les Actinomycètes.

Chimiotype	Les acides aminés							Les sucres					Exemple de genre
	DAP Forme LL	DAP Forme DL	Glycine	Ornithine	Lysine	Ac.aspara-	DAB	Arabinose	Glactose	Madurose	Rhamnose	Xylose	
I C		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces,</i> <i>Nocardioïdes,</i> <i>Sporichthya</i>
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>Actinoplane,</i> <i>Dactylosporangium,</i> <i>Micromonospora,</i> <i>Glycomyces</i>
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Streptosporangium,</i> <i>Planomonospora,</i> <i>Planobispora,</i> <i>Actinomadura</i>
III C	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>Nocardiosis,</i> <i>Thermomonospora,</i> <i>Thermoactinomyces</i>
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>Saccharothrix,</i> <i>Kutzneria</i> <i>Actinosynnema</i>
IV A	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Nocardia,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Amycolatopsis,</i> <i>Pseudonocardia</i>
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Actinomyces</i>
VI	-	-	-	-	+	+	-	/	/	/	/	/	<i>Oerkovia,</i> <i>Promicromonospora</i>
VII	-	-	+	-	v	-	+	/	/	/	/	/	<i>Agromyces,</i> <i>Clavibacterium</i>
VIII	-	-	-	+	-	-	-	/	/	/	/	/	<i>Agromyces,</i> <i>Clavibacterium</i>

+ : présence ; - : absence ; / : non déterminé ; v : variable ; Ac. : acide. I, II, III et IV, définis par Becker *et al.*, (1965), Yamagushi (1965), Lechevalier et Lechevalier (1970b); V, VI, VII et VIII, définis par Stackebrandt *et al.*, (1994) et Labeda *et al.*, (1989).

3.2.3. Caractères physiologiques

L'étude physiologique permet de distinguer les espèces d'actinomycètes appartenant à un même genre. Plusieurs types de tests sont ainsi utilisés. Ils portent sur la dégradation ou non de plusieurs composés glucidique, lipidique, protidique ou autre et la sensibilité ou la

résistance à quelques agents physiques et chimiques (pH, température, concentration ioniques, antibiotiques....) (**Lamari, 2006**).

Ces critères ne sont cependant pas suffisants pour l'identification des espèces, car ils doivent être complétés par des études moléculaires (**Badji, 2006**).

3.2.4. Critères moléculaires

La biologie moléculaire s'est imposée comme un utile puissant en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par leur analyse génétique. Ces études génétiques ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes. De regrouper ou de séparer des espèces entre elles ou fusionner des genres entre eux (**Zitouni, 2005**).

Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes sont la détermination du pourcentage en (G+C), l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ADNr ou l'ARNr 16S et 23S (**Zhitang et al., 2003**).

4. Importance des actinomycètes

❖ 4.1. En agronomie

Les actinomycètes ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité de dégrader des substances complexes et incapables d'être décomposées par les autres bactéries non mycéliennes et les champignons (**Lamari, 2006**), telles que la lignine, la cellulose, la chitine, la kératine (**cité par Bakour, 2006**). Ils participent donc activement à la fertilisation des sols et décomposent les déchets urbains à haute teneur en produits chimiques.

Les actinomycètes exercent une influence sur la croissance des plantes, et protègent les racines contre les invasions des champignons (**Yilma et al., 2008**).

Certains antibiotiques sécrétés par les actinomycètes ont trouvé une application dans la lutte contre quelques maladies des plantes, comme c'est le cas de la kasugamycine, les polyoxines et la blasticidine. Ces derniers ont été isolés grâce à leur très forte activité contre certaines maladies du riz et sont utilisés depuis longtemps et à grande échelle dans l'agriculture japonaise (**Lamari, 2006**).

Synthèse bibliographique

Frankia est un genre fixateur de l'azote atmosphérique vivant en symbiose dans les racines de plantes dicotylédones arbustives autres que les légumineuses, comme le Casuarina, l'aulne, l'orme etc.... (Duhoux et Nicole, 2004). La plupart d'entre eux sont saprophytes mais quelques uns peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes (Zaitlin et Watson, 2006).

❖ 4.2. En biotechnologie

Ce sont des microorganismes d'intérêt industriel par excellence, un producteur important des antibiotiques et d'autres molécules et substances bioactives (Yamci, 2006). Jusqu'ici, environ deux tiers des antibiotiques connus ont été sécrétés par les actinomycètes (Xue, 2009), le genre *Streptomyces* sécrète plus de 80% de ces molécules est très exploité (Badji et al., 2009) (Figure n°1).

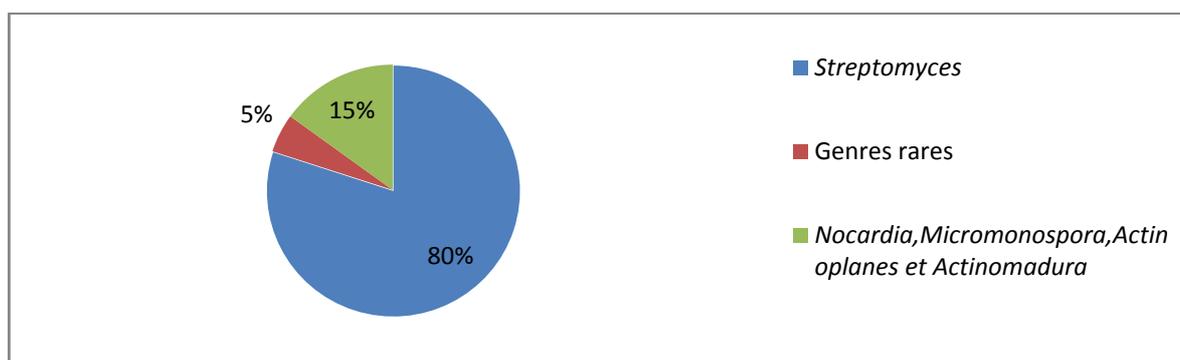


Figure n° 1: Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes (Cité par Bakour, 2006).

La majorité des antifongiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisé par les actinomycètes, en particulier, par *Streptomyces* (Badji et al., 2005). En ce qui concerne l'activité antifongiques des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'entend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (Sanasam et Ningthoujam, 2010), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophytum rubrum* (Lakshmipathy et Krishnan, 2009).

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. Certains sont utilisés en industrie agro-

alimentaire (glucose isomérase), en thérapeutique (cholestérol oxydase), dans le domaine vétérinaire, comme additif pour l'élevage (**Zitouni, 2005**), ou encore en industrie chimique comme les protéases ajoutés au détergents (**Bakour, 2006**), les cellulases et les xylanases utilisés dans le traitement des déchets (**Saadoun et al., 2007**), ainsi que les vitamines (B₁, B₂, B₆, B₁₂, acide folique), (**Bugrigourt, 1999**).

Ces microorganismes produisent aussi un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activité tel que : les inhibiteurs d'enzymes, les immunosuppresseurs, des toxines et des pesticides (**Dairi, 2005 ; Pizzul, 2006**), des antiparasitaires (**Oskay et al., 2004**), des antitumoraux (**Kim et al., 2006**) et les herbicides (**Pary, 2006**).

❖ 4.3. En pathologie

Contrairement aux bactéries et aux champignons, seuls quelques espèces d'actinomycètes sont pathogènes (**Badji, 2006**). Par exemple *Mycobacterium tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose, *Mycobacterium leprae* est le bacille de la lèpre (**Leclerc et al., 1983**), *Nocardia asteroides* est responsable de la nocardiose; infection pulmonaire sévère de l'Homme et de l'animal, le genre *Rhodococcus* d'origine animal est un pathogène opportuniste pour l'Homme (**Kariptas et al., 2001**) et *Streptomyces somaliensis* est responsable de mycétomes; pseudotumeurs affectant les tissus sous-cutanés et éventuellement l'os (**Mariat et Sebald, 1970**). Les actinomycètes phytopathogènes sont peu nombreux et appartiennent en grande majorité au genre *Corynebacterium* et à un degré moindre au genre *Streptomyces* (**Zitouni, 2005**).

❖ 4.4. Autre rôle

De nombreux actinomycètes peuvent dégrader différents polluants, y compris plusieurs pesticides, par exemple, des membres du genre *Arthrobacter* dégradent le chlorophénol (**Pizzul, 2006**) et certains genres comme *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* et *Corynebacterium* se révèlent être d'une grande importance dans la dégradation des hydrocarbures (**Lacey, 1997**).

Certaines espèces d'actinomycètes se sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxinogènes (mycotoxines), certaines substances, comme la piramicine sont utilisées pour le traitement, les emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (**Boudjella, 2007**).

La géosmine qui donne à la terre une odeur de moisi (terreux) et à l'eau des réservoirs un goût et une odeur désagréables, est produite par certaines espèces d'actinomycètes appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardiosis*, etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983).

II. Les antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

A l'origine, le mot « antibiotique » désigne tout produit microbien qui, même de très faible concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes. On l'emploie maintenant dans le sens plus large pour inclure en outre toute substance synthétique ou semi synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 1994).

2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

a. Le spectre d'action : il s'agit de la liste des groupes ou d'espèces des microorganismes sur lesquels les antibiotiques sont actifs et selon l'antibiotique ce spectre peut être large (tétracycline, céphalosporine C) ou étroite (novobiocine, polymyxine).

b. Le type d'action : il existe des antibiotiques bactériostatiques qui induisent un arrêt de la croissance microbienne comme la tétracycline et le chloramphénicol et d'autres induisant la mortalité des germes cibles comme la pénicilline et la kanamycine.

c. Le mode d'action : les antibiotiques agissent essentiellement par inhibition de réaction de synthèse variée en se fixant sur des sites précis ou cibles moléculaires. Ces derniers correspondent à six niveaux différents de cellule bactérienne ou fongique: la paroi, la membrane plasmique, le génome (réplication et transcription de l'ADN), les ribosomes et le métabolisme respiratoire et intermédiaire (Zitouni, 2005).

d. La structure chimique: près de 7000 molécules ont été classées par Berdy *et al.*, 1987) dans 9 familles et dans de nombreuses sous famille, et ce, d'après leur structure chimique assez proche (tableau IV).

Synthèse bibliographique

Tableau IV : Classification des antibiotiques d'après la structure chimique (**Berdy et al., 1987**).

Famille	Principale sous famille	Exemple d'antibiotique
Antibiotique contenant des glucides	Glucide purs Aminoglycosides Glycopeptides	Nojirimycine Streptomycine, gentamycine, kanamycine. Vancomycine, risotocétine
Lactones macrocycliques	Macrolides Polyènes Macrolactames	Erytromycine, spiramycines Nystamines, amphotéricine Maytansines
Quinone et antibiotiques apparentés	Composés polycycliques linéairement condensés Anthraquinones Naphtoquinones Benzoquinones	Tétracyclines Amthracyclines Rubomycine Mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	Dérivés d'acide aminés Homopeptides Peptides Lipopeptides	Pénicilline, cyclosporines Bacitracine Valinomycine Plymyxines
Antibiotique hétérocycliques contenant de l'azote	Hétérocycles non condensés Hétérocycles condensés	Midiomycine Phénazine
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	Dérivés de furane Polyéthers	Monensine
Antibiotique aromatiques	composés benzénique Composés aromatiques condensés Autre dérivés	chloramphénicol griséofulvine novabiocine
Antibiotiques alicycliques	dérivés du cylo-alcane terpène oligoterpènes	cycloheimide acide marasmique acide furique
Antibiotique aliphatiques	Dérivés d'alcanes Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques Composés contenant du phosphore	Elaiomycine Cérolénine Fosfomycine

3. Les microorganismes producteurs d'antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être produits par divers microorganismes (figure 2), Parmi les quels, près de 10% sont synthétisés par des bactéries non mycéliennes, 20% par les champignons et environ 70% par des actinomycètes (Berdy *et al.*, 1987).

Plusieurs antibiotiques peuvent être produits par un même microorganisme et inversement divers microorganismes taxonomiquement éloignés peuvent synthétiser le même antibiotique comme c'est le cas d'acide fusidique (traitement d'infection à Staphylocoques) isolé à partir des genres *Fusidium*, *Cephalosporium*, *Microsporium*, *Mucor* et *Chrysosporum* (Von Dahlen *et al.*, 1997).

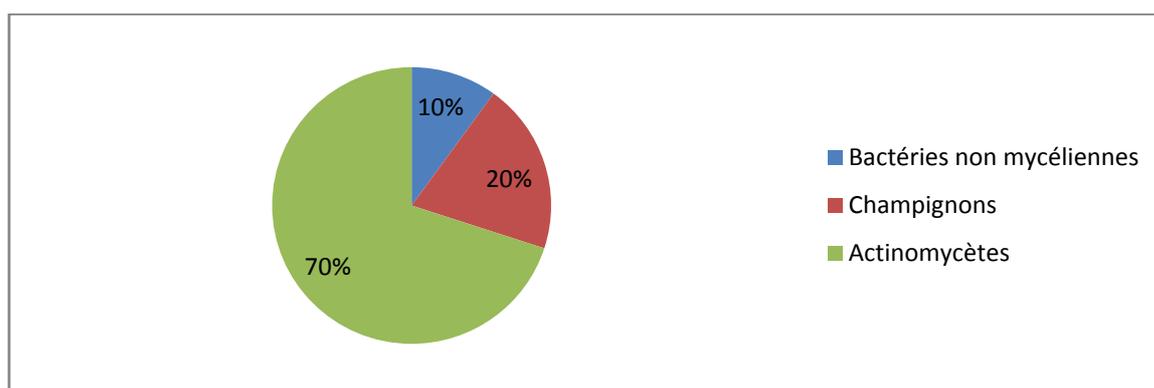


Figure 2 : Pourcentages d'organismes vivants producteurs d'antibiotiques (Berdy *et al.*, 1987).

4. Les antifongiques

Parmi tout l'arsenal de molécules naturelles ou de synthèses disponibles, l'antifongique bien toléré n'existe pas (Montrvers *et al.*, 2003). La thérapeutique antifongique dispose à vrai dire, d'un petit nombre de produit, on particulier contre les mycoses profondes (Odd, 1995; Vincent *et al.*, 1998; Terrel *et al.*, 1999 ; McNeil *et al.*, 2001; Carle, 2003).

4.1. Classification

D'après **Maur, (1990)**, les antifongiques actuels peuvent être classés selon plusieurs critères tels que l'origine d'obtention (antifongiques d'origine naturelle, molécule de synthèse chimique), le spectre antifongique, le mode d'administration et selon le leur mécanisme d'action (inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol : azole, polyène; inhibiteur de squalène-époxydase : terbinafine; inhibiteur du glucane-synthase : cilofungine).

Les antifongiques de structure polyénique, actif essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyéniques pouvant être sauvant antibactériens. (**Berdy et al., 1987**).

a. Les antifongiques polyéniques

Les polyènes sont des antifongiques qui agissent sur les stérols membranaires des cellules eucaryotes (champignon, animaux). Leur activité non spécifique touchant même les cellules animales rend leur utilisation difficile, ce qui limite leur utilisation en thérapie.

Les polyènes sont subdivisés en plusieurs sous groupes ou chacun d'entre eux est caractérisé par des maximums d'absorption en UV-visible. La majorité de ces molécules est produite par des souches de *Streptomyces* (**Watve et al., 2001**).

b. Les antifongiques non polyéniques

D'après **Berdy et al. (1987)**, ces substances appartiennent à plusieurs familles d'antifongiques, telle que les aminoglycosides (kasugamicine, validamycine), quinones (anthracycline, nanocycline), peptide (cyclosporine A, saramycetine), hétérocycles azotés (iodinine, tunicamycine, blasticidine, polyoxinètes) et les polyéthers (monensine, nigéricine).

Le tableau (V) illustre quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

Synthèse bibliographique

Tableau V: Quelques exemples de substances d'antimicrobiennes produites par les actinomycètes.

Actinomycètes producteurs	antibiotiques	références
1. Agents antibactériens		
<i>Micromonospora sp</i>	Clostrymicine	Takahashi et al., 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicine	Jinenez et al., 2009
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	Luiet et al., 2007
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	Inoue et al., 2007
<i>Marinispora sp</i>	Marnomycine	Sturdikova et Strurdik, 2009
2. Agents antifongiques		
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacéline	Hwang et al., 2001
<i>Nocardia tansvalensis</i>	Transvalentate	Mukai et al., 2006
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	Carle et al., 2003

5. Les antibactériens

Sont des substances anti-microbiennes à activité sélective, produites par les bactéries et certains champignons qui agissent sur les bactéries ayant un site d'action bien défini et un mécanisme précis permettant leur utilisation dans la majorité des infections. Ils peuvent être obtenus par synthèse (Yala et al., 2001).

5.1. Classification

Les antimicrobiens qui sont utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon les critères précédemment cités: (l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action), pour qu'ils soient toxiques pour les bactéries, mais inoffensifs pour l'hôte à qui on administre le traitement, des antibiotiques ont pour cibles principales les constituants moléculaires proprement bactériens. Actuellement, les molécules disponibles agissent en priorité au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines, et l'ADN bactériens (Walsh, 2000).

Partie II.

Matériel et méthode

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sien du laboratoire de Microbiologie de l'université A/MIRA-Bejaia, sous la direction de M^{me} BOUDRIES, pendant la période allant du 01/03/2012 au 30/05/2012).

I-Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel analytique et les milieux de cultures utilisés sont mentionnés dans l'annexe I.

2. Matériel biologique

2.1. Les souches d'actinomycètes

91 souches d'actinomycètes, isolées en Janvier 2011 par M^{me} BOUDRIES à partir de deux stations d'épurations « Béjaia et Aoukas » sur milieu Williams additionnée de 5% de NaCl (M₂ 5%) ont fait l'objet d'un criblage pour leur capacité de production d'antibiotiques.

2.2. Microorganisme cibles

Nous avons testé dix germes pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes. 4 bactéries à Gram positif (SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lesteria innocua* CLIP 74915 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923); 4 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginos* ATCC 27853, *Selmonella typhiona* et *Vibrio cholerae*); une levure (*Candida albicans*) et un champignon filamenteux (*Aspergillus niger*).

Les bactéries cibles sont gracieusement offertes par l'Institut Pasteur d'Algérie, quant aux champignons, ils sont gracieusement offerts par l'université de Tiaret.

II-Méthodes

1. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes

L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes est évaluée par la méthode des cylindres d'agar. La charge de l'inoculum utilisé est de 10⁷UFC/ml pour les bactéries (Billerbeck *et al.*, 2002) et pour *C. albicans* et de 10⁷ spores /ml pour *Asp. niger*. (Matan et Matan, 2008).

Les souches à tester sontensemencées (stries serrés) sur les milieux : M₂ à 5% de NaCl, M₂, GEM (Gauss-eau de mère) et MEM (Mincer-eau de mère). Après incubation à 28°C pendant 10 jours, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement avec un emporte pièce, puis déposés à la surface d'un milieu Muller- Hinton préalablement

Matériel et méthodes

ensemencé (par écouvillonnage) avec les germes cibles. Les boîtes de Petrie portant les cylindres d'agar sont mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives éventuellement produites, puis incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et la levure et à 28°C /48 h pour le champignon filamenteux. Les lectures sont effectuées par mesure du diamètre des zones d'inhibitions (en mm) autour des cylindres (le diamètre du cylindre étant pris en compte).

Un cylindre des milieux : M₂ à 5% de NaCl, M₂, GEM et MEM est utilisé comme témoin négatif.

Remarque :

- Le mycélium est en contact avec la gélose.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au-delà de 15 mn après sa préparation.

Le test des cylindres d'agar est illustré dans la figure 3.

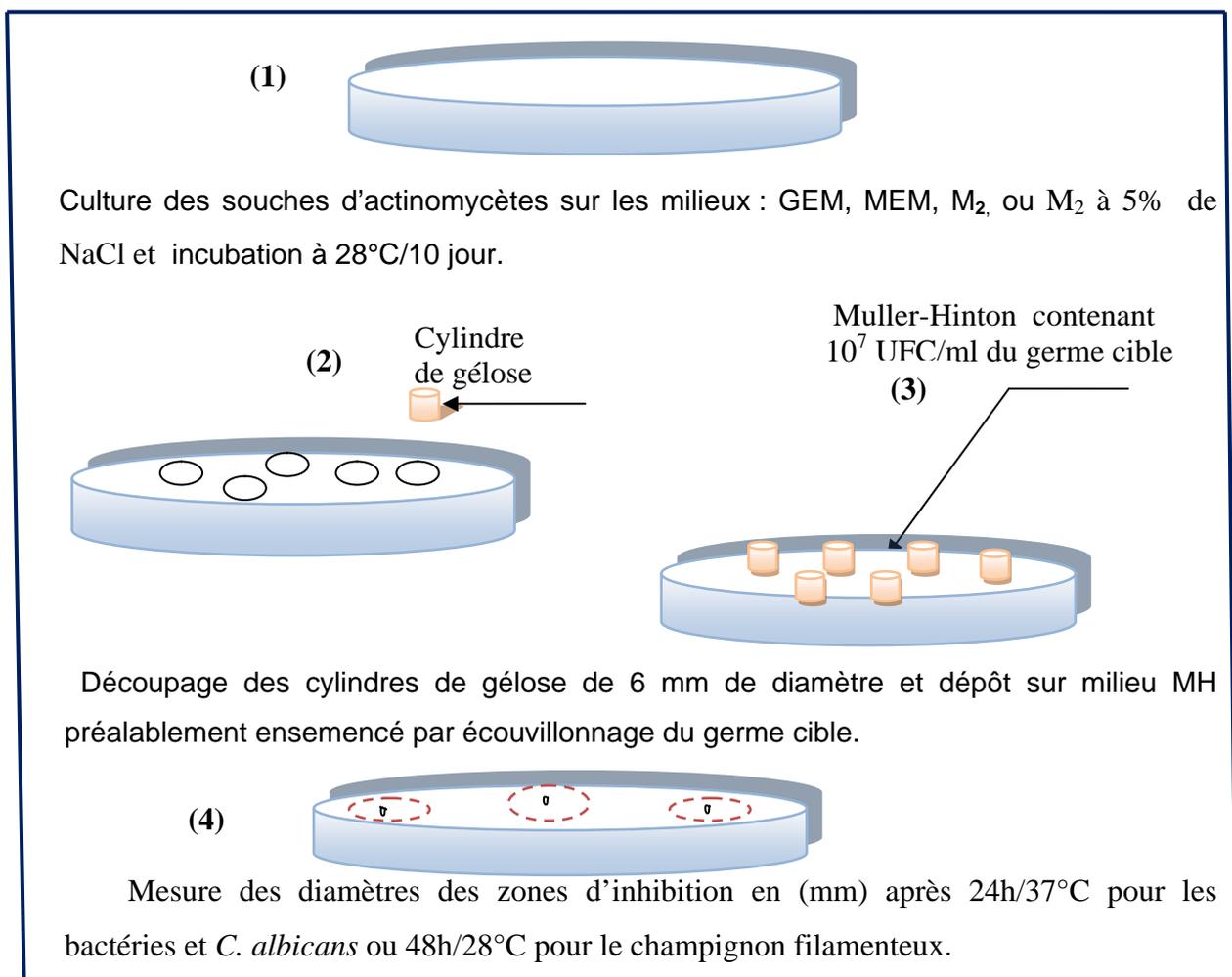


Figure3 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes par la méthode des cylindres d'agar.

2. Effet du pH du milieu MEM sur la production d'antimicrobiens

Les souches sélectionnées pour leur activité antimicrobienne sur le milieu MEM sont ensemencées sur ce dernier à différentes valeurs de pH correspondant à 3, 5, 7, 9 et 11, puis le test des cylindres d'agar est réalisé de la même manière que précédemment décrit.

3. Etude taxonomique des actinomycètes sélectionnés

L'étude taxonomique est réalisée sur des souches sélectionnées selon le diamètre des zones d'inhibition et leur spectre d'action.

3.1. Etude morphologique

➤ Macromorphologie

Cette études consiste à noter respectivement au 7^{ème}, 14^{ème}, et 21^{ème} jours d'incubation à 28°C, la croissance, la forme et la taille des colonies ; la couleur des mycélia aériens (MA) et de substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits sur différents milieux de culture : ISP « l'International *Streptomyces* Project » préconisés par (Shirling et Gottlieb, 1966): ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et l'ISP7, sur le milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981) ainsi que sur le milieu M₂ à 5% de NaCl. Les colonies d'actinomycètes cultivées sur les différents milieux cités précédemment sont observées à la loupe binoculaire (au grossissement 10 x 0,8 et 10 x 2,5).

➤ Micromorphologie

Il s'agit de déterminer les structures et la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) et arien (MA), ainsi que la sporulation (caractéristique du genre). Des observations directement sur boîte de Pétri ont été réalisées sous microscope optique en utilisant le grossissement (10x40) après 7 à 14 jours d'incubation à 28°C.

Les isolats ont fait objet d'une coloration de Gram.

3.2. Chimiotaxonomie

En plus des études morphologiques, la détermination des genres nécessite l'analyse des constituants cellulaires afin de confirmer l'appartenance d'une souche à un genre donné. Ces analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, par chromatographie ascendante sur gel de silice pour la caractérisation de l'isomère de l'acide diaminopimélique DAP (forme LL ou DL), la présence ou non de la glycine et de lysine ainsi que l'identification des sucres.

Matériel et méthodes

a. Les acides aminés

L'acide diaminopimélique (DAP) est un composé pariétal de la cellule des actinomycètes ; il peut être parfois accompagné par la glycine ou la lysine. Il s'agit alors de déterminer l'isomère de DAP (LL ou DL=*méso*) et de noter la présence ou non de la glycine et de la lysine.

Après culture, à 28°C pendant 10 jours, sur le milieu liquide de production d'antibiotiques, le mycélium des souches sélectionnées est récupéré après centrifugation à 3000 g/ 20mn à 4°C.

La méthode utilisée est celle de **Becker *et al.* (1964)** modifiée. Elle consiste en :

- une hydrolyse acide de 10mg du mycélium sec dans 1ml du HCl 1N pendant 18h à 100°C ;
- filtration des hydrolysats sur verre fritté ;
- évaporation des filtrats à sec dans un bain de sable à 100°C ;
- lavage du résidu plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à élimination du HCl.
- reprise des résidus secs obtenu dans 0,3ml d'eau distillée puis 20µl sont soumis à une chromatographie sur gel de silice; 10µl d'une solution de DAP (Fluka) ; à 0,01 M ; qui est un mélange des isomères LL et DL et de solutions de glycine et de lysine à 0,2 % sont utilisées comme standards. La plaque est développée dans un solvant composé de méthanol, eau distillée, HCl 10 N et de pyridine (8 / 17,5/ 2,5/ 10 v/v). Le chromatogramme est révélé par une solution à 0,2% (m/v) de ninhydrine dans de l'acétone puis chauffé durant 5 min à 100°C. Les taches de l'acide DAP sont de couleur olive-brunâtre virant au jaune (la forme LL migre plus rapidement que la DL), la glycine est colorée en violet-brun et les autres acides aminés en violet ou en rose.

b. Les sucres

L'hydrolyse acide est effectuée selon la méthode de **Lechevalier et Lechevalier (1970)**. La méthode consiste en :

- une hydrolyse acide ménagée de 50mg du mycélium dans du 2ml H₂SO₄ 1N à 100°C pendant 2h,
- neutralisation des hydrolysats avec une solution saturée d'hydroxyde de Baryum,
- élimination du précipité blanc par centrifugation à 4000 rpm/20mn à 4°C;
- évaporation à sec du surnageant à 40°C puis récupération, dans 0,3ml d'eau distillée.

Une chromatographie ascendante sur gel de silice est réalisée pour ces extraits. Des solutions aqueuses de sucres témoins (à 0,1%) suivants sont utilisées : arabinose, galactose, glucose, ribose, rhamnose et xylose. La plaque est développée par chromatographie ascendante ayant comme système de solvant la partie supérieure d'un mélange composé de : η-butanol, eau

Matériel et méthodes

distillée, pyridine et toluène (5- 3- 3- 4 v/v). La révélation est réalisée avec une solution d'acide phtalique (3,2 g dans 100ml de butanol).

Les pentoses apparaissent de couleur rose ou bleu et les hexoses de couleur brune.

3.3. Etude des caractères physiologiques

Une série de tests physiologiques a été réalisée pour la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les tests effectués sont les suivants.

➤ Tolérance au NaCl sur le milieu MEM solide

Une colonie d'actinomycète est ensemencée sur le milieu MEM solide à différentes molarités de NaCl correspondant à 1M ; 1,5M ; 2,5M ; 3M ; 3,5M ; 4M et 5M. Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies chaque 24h pour toutes les souches sélectionnées. Le développement des colonies et les caractéristiques macromorphologiques pour chacune des concentrations sont notées.

➤ Croissance à différents pH sur le milieu MEM solide

Il s'agit d'ensemencer une colonie d'actinomycètes sur le milieu MEM à différentes valeurs de pH correspondant à 3, 5, 7, 9 et 11. Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies chaque 24h pour toutes les souches sélectionnées.

➤ Croissance à différentes températures sur le milieu MEM solide

La croissance des isolats est étudiée à trois températures (28, 37 et 44°C) sur le milieu MEM. La lecture est faite chaque 24h.

➤ Production des pigments mélanoïdes

La production de pigments mélanoïdes par les isolats, est observée sur le milieu gélosé ISP7 dont le virage, du milieu, au brin marron est reconnaissable (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

➤ Production des nitrates réductases

La production de nitrate réductase se traduit par la dégradation des nitrates contenues dans un milieu décrit par **Marchal et Bourdon (1973)**. Après 7 jours d'incubation à 28°C des souches sur bouillons nitraté, la réduction des nitrates est mise en évidence à l'aide du réactif de Griess et après l'ajout de la poudre de zinc. Le test positif se manifeste par l'apparition d'un halo de couleur rouge.

➤ Dégradation de divers composés organiques

Les tests réalisés sont les suivants :

- ❖ Dégradation des glucides : Le milieu de base utilisé est ISP9 préconisé par **Goodfellow (1971) ou Pridham et Gottlieb (1968)** auquel sont additionnés les sucres suivants à raison de 1%: Glucose, arabinose, adonitol, raffinose, saccharose, sorbitol, levurose, galactose, ribose, salicine, maltose, trehalose, inositol, glycine et mannose. Le milieu ISP9 sans sucre est utilisé comme témoin négatif.
- ❖ Dégradation du tween 80 (**Sierra, 1957**)
- ❖ Utilisation des sels de sodium : Acétate; Citrate et Oxalate (**Gourdon et al., 1974**).
- ❖ Dégradation de l'amidon (**Marchal et Bourdon, 1973**)
- ❖ Dégradation de la caséine du lait (**Gourdon et al., 1974**)
- ❖ Dégradation de la gélatine (**Marchal et Bourdon, 1973**)
- ❖ Dégradation de la tyrosine (**Gourdon et al, 1974**)

L'étude de ces quatre derniers composés est réalisée sur des milieux de gélose nutritive additionnés du composant à tester (Voire l'annexe II).

➤ Sensibilité à quelque agent chimique

- ❖ Sensibilité au tellurite de potassium : une concentration de 0,01% est testée.
- ❖ Sensibilité au phénol : une concentration de 0,01% est testée.

III. Production, extraction d'antibiotiques en milieu liquide et la détection des non polyéniques.

1. Production d'antibiotiques en milieu liquide

1.1. Pré-culture

Les isolats sélectionnés pour leurs activités antimicrobiennes sur milieu solide sont ensemencés dans des tubes de 10ml de leur milieu de production, puis incubés à 28°C/8 jours.

1.2. Culture

Le contenu de chaque tube incubé à 28°C/ 8 jours est transféré dans un flacon de 100ml de milieu liquide de production, puis incubé à 28°C/10 jours.

Matériel et méthodes

2. Extraction des antibiotiques par le butanol à partir du surnageant

Cette méthode consiste à extraire les antibiotiques des surnageants de culture après centrifugation à 3000g/ 20mn (à 4°C) par le n-butanol, dont 100ml de ce solvant sont ajoutés à un même volume du surnageant de chaque souche dans des ampoules à décanter. Après décantation, les phases organiques sont récupérées, évaporées à sec à 40°C à l'aide d'évaporateur rotatif, puis les résidus secs sont repris dans un minimum de méthanol, filtrés par un filtre à sering des 0,45µm de porosité avant d'être testés par antibiographie (méthode des puits).

3. Antibiographie

Le milieu utilisé est celui de Muller Hinton préalablement ensemencé (par écouvillonnage) avec des germes cibles à raison de 10^7 UFC/ml. Des puits (de 6 mm de diamètre) sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce. Une aliquote de 100µl de l'extrait butanolique de chaque isolats est testée par la méthode des puits. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h afin de permettre une diffusion des substances actives éventuellement produites avant d'être incubé à 37°C. Le même volume de méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif.

La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des puits après 24h. Le test est illustré dans la figure (4)

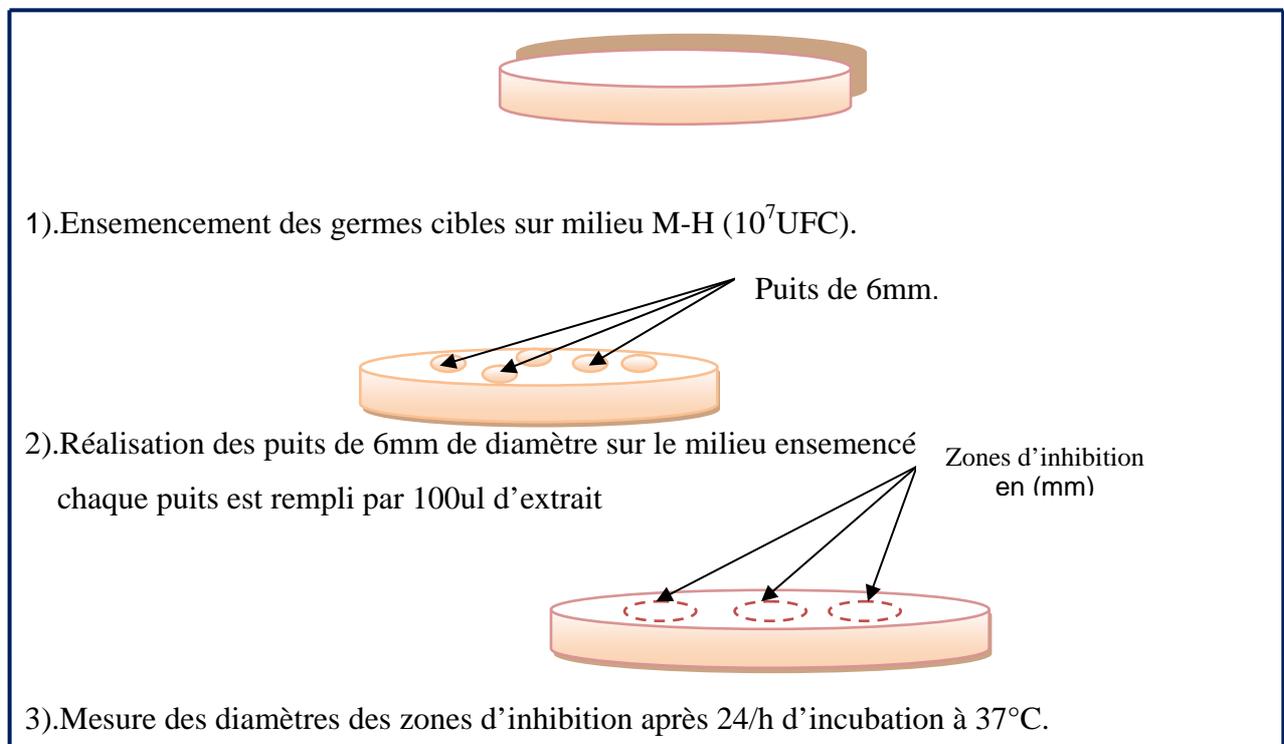


Figure 4 : mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits.

4. La détection des antifongiques non polyéniques

Les antibiotiques polyéniques peuvent être facilement détectés par spectroscopie UV-visible. Ces molécules présentent trois maxima caractéristiques entre 291 et 405nm (**Martin, 1979; Dinya et Sztaricskai, 1986**). Pour cela, 40ml de filtrat de culture de chacune des souches sur leur milieu de production, sont extraits avec le même volume du n-butanol. Les extraits butanoliques sont évaporés à sec puis repris dans 5ml de méthanol. Les spectres des extraits méthanoliques sont déterminés par la lecture des absorbances entre 190-500nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Partie III.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Dans cette partie seront présentés les résultats de la sélection des souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens, de l'étude taxonomique et physiologique des isolats sélectionnés, de l'extraction des antibiotiques à partir des surnageants des cultures liquides ainsi que la recherche des molécules non polyéniques.

Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les actinomycètes (**Strub, 2008**). Pour cette raison, l'activité antimicrobienne des 91 souches d'actinomycètes a été testée sur quatre milieux de culture afin de choisir le meilleur milieu de production d'antimicrobiens.

1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de souches étudiées

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé, elle permet une meilleure visualisation des zones d'inhibition. C'est aussi une méthode où l'inoculum des germes cibles est standardisé contrairement à celle des stries croisées. Cependant, cette dernière a été adoptée par plusieurs laboratoires de recherche mais la tendance actuelle donne une orientation pharmacologique ou phytopathologique au screening en utilisant dès le début des tests plus spécifiques dirigés contre une cible bien déterminée : agent pathogène ou une enzyme (**Badji, 2006**).

Ce test est réalisé sur milieu Muller-Hinton vis-à-vis des cultures jeunes de cellules bactériennes, de *C. albicans* et de spores de champignons filamenteux. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition est faite après 24 à 36h pour les bactéries et la levure et de 48h à 5 jours pour les champignons filamenteux.

Les 91 souches d'actinomycètesensemencées sur 4 milieux de culture (MEM, GEM, M₂ et M₂ à 5% de NaCl, seules 13 souches sont actives sur au moins un germe cible. 5 isolats ont été choisis selon le diamètre des zones d'inhibition et leurs spectre d'action.

Les 5 souches sélectionnées présentent une activité antimicrobienne à l'égard de 3 bactéries à Gram positif (SARM, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*), 2 bactéries à Gram négatif (*Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa*) et de la levure (*Candida albicans*). Ces souches se sont révélées inactives sur les 2 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*), une bactérie à Gram positif (*Bacillus subtilis*) ainsi que le champignon filamenteux (*Aspergillus niger*).

Résultats et discussion

Sur les 10 germes testés, *E. coli* apparaît comme la souche la plus résistante, contrairement à ce qui est remarqué dans les travaux de **Boughachiche et al. (2005)** ainsi que *V. cholera* et *Asp. niger*, tandis que *C. albicans*, SARM et *L. innocua* sont les plus sensibles aux antimicrobiens produits par les actinomycètes sélectionnées.

Selon les résultats présentés dans le tableau (VI annexe II) et représentés en histogrammes (figure 5 et 6), nous remarquons que 4 souches (STA11, STA19(4), S23 et STECB3) parmi les 5 sélectionnées présentent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

D'une manière général, l'isolat STA11 montre une activité antifongique importante contre *C. albicans* sur divers milieux (GEM, MEM et M₂ à 5% de NaCl) avec des zones d'inhibition de: 26, 14 et 12 mm respectivement et une activité antibactérienne vis-à-vis de *L. innocua* et *S. aureus* sur le milieu GEM avec des zones d'inhibition de : 18 et 16 mm respectivement et à l'égard de SARM sur le même milieu avec une zone d'inhibition de : 12 mm.

Les isolats S23 et STA19(4) sont dotés d'une capacité de production d'antibactériens sur le milieu M₂ à 5% de NaCl dont S23 s'est révélée active à l'égard de SARM, *S. aureus*, *L. innocua*, *S. typhi* et *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition de 10, 8, 9, 9 et 8 mm respectivement. Alors que la souche STA19(4) est active à l'égard de SARM et *L. innocua* avec des zones d'inhibition de : 18 et 16 mm respectivement.

La souche STECB3 montre une activité antimicrobienne sur GEM vis-à-vis de *C. albicans* et SARM (25 et 26mm respectivement) et sur M₂ à 5% de NaCl à l'égard de SARM et *S. typhi* avec des zones d'inhibition de : 12 et 11 mm respectivement.

L'isolat STA10 présente une activité antimicrobienne sur les deux milieux MEM et M₂ à 5% de NaCl à l'égard de *C. albicans* (22mm) et de *L. innocua* (14mm).

Selon le spectre d'action des isolats sélectionnés sur les germes cibles testés, les souches STA11 et S23 se sont révélées comme des souches les plus productrices d'antimicrobiens parmi les 5. Même l'isolat S23 est doté d'une activité exclusivement antibactérienne.

Résultats et discussion

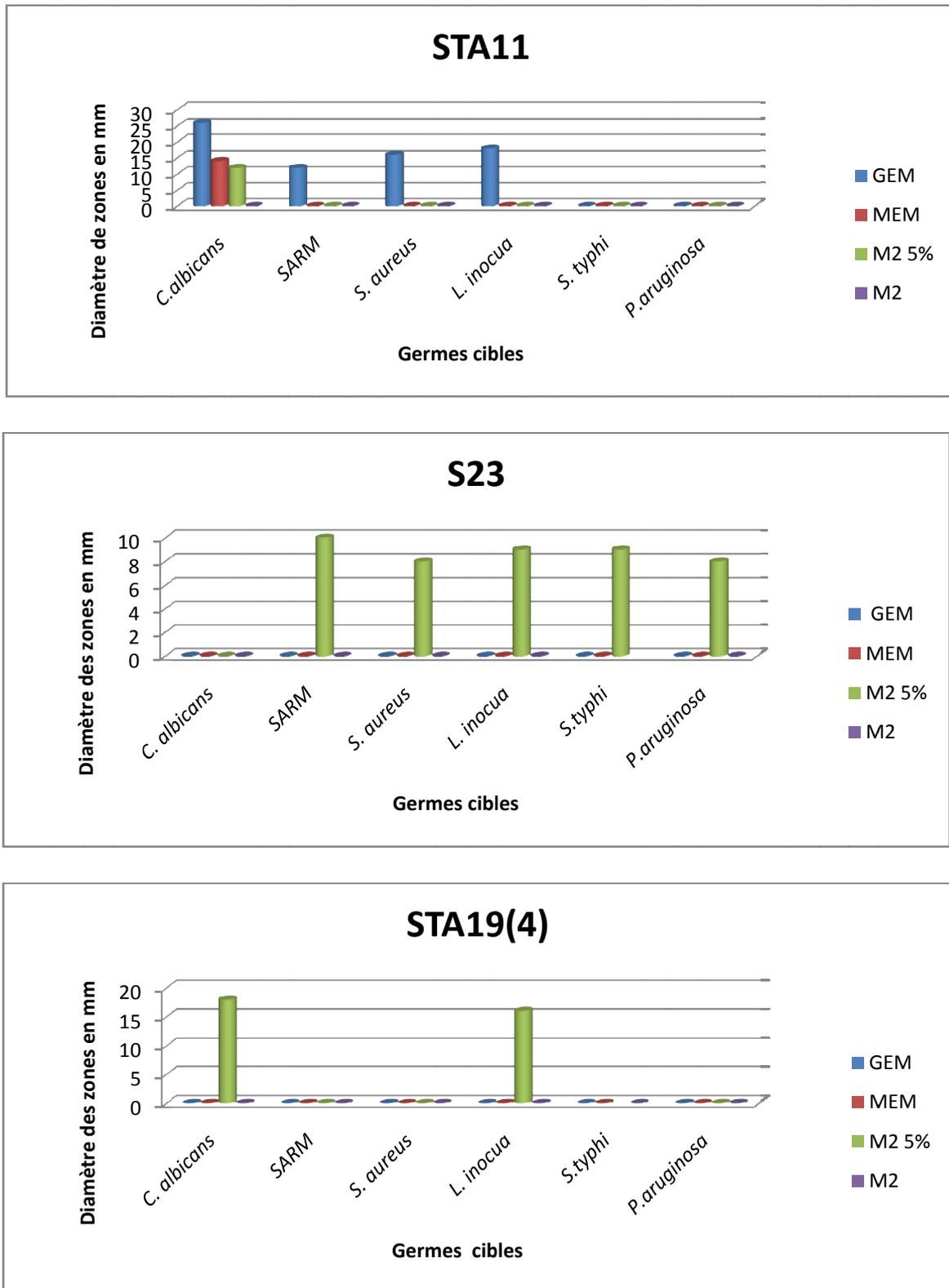


Figure 5: Histogrammes représentant l'activité antimicrobienne des isolats STA11, S23 et STA19(4) respectivement sur différents milieux de production.

Résultats et discussion

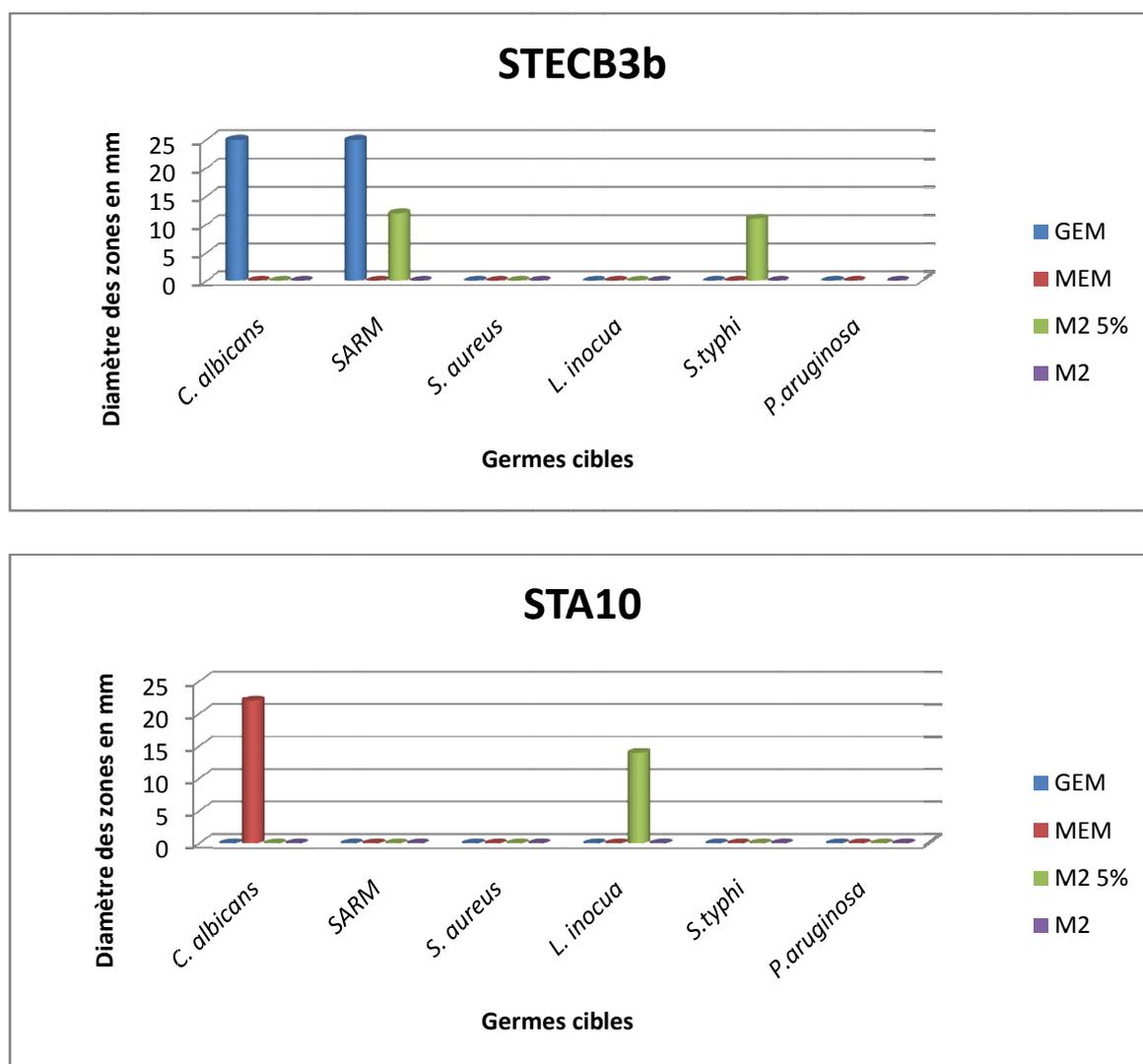


Figure 6: Histogrammes représentant l'activité antimicrobienne des isolats STECB3 et STA10 respectivement sur différents milieux de production.

Les résultats du test des cylindres d'agar sont illustrés dans la figure 7.

Résultats et discussion



Figure 6a : Germe cible *L*.

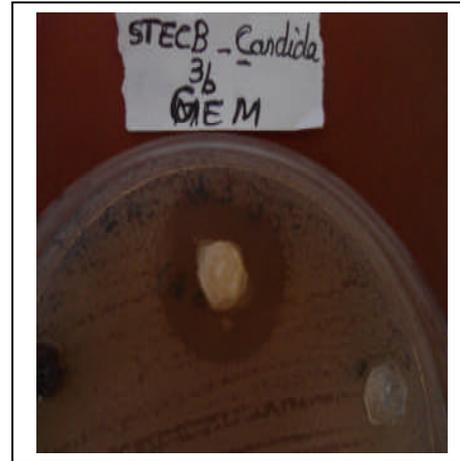


Figure 6b: Germe cible *C*.



Figure 6c : Germe cible *L. innocua*.



Figure 6d: Germe cible *S. aureus*.



Figure 6e: Germe cibles SARM.

Figure 6 : Illustration des résultats du tests des cylindres d'agar des souches d'actinomycètes sélectionnées.

Résultats et discussion

Ces constatations reflètent la variation de la production d'antibiotiques d'un milieu de culture à un autre et d'un germe test à un autre. **Boudemagh et al. (2005)** ; **Marshall et al., 1978**, expliquent les variations des zones d'inhibition par le fait qu'une souche peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différentes spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet ; les travaux de **Gesheva et al. (2005)**, ont montré que la nature des sources de carbone, d'azote, de potassium, de magnésium et des traces des éléments minéraux affirment fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique, la AR-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*. Egalement, l'origine d'une même source de carbone peut affecter la sécrétion des biomolécules par le microorganisme producteur. C'est le cas de l'antibiotique aminoglycoside. Il a été démontré par **Adynarayan et al. (2003)**, que la production de cette molécule par la souche *Streptomyces marinensis* est en fonction de l'origine céréalière de l'amidon utilisé comme source de carbone. (Cité par **Smaoui, 2010**)

D'après **Aharonowitz et Demain (1978)** ; **Omura et Tanaka (1986)** ; **Cheng et al., (1995)** ; **Sanchez et Demain (2002)**, la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la qualité et la quantité de métabolites secondaires produits par le microorganisme en question : la zone d'inhibition provoquée par les cylindres d'agar prélevés à partir du milieu de culture ISP2 inoculé par la souche E10 contre *Staphylococcus aureus* 118 est de l'ordre de 25 mm, ce diamètre est réduit à 17 mm contre la même bactérie test lorsque la souche E10 est cultivée sur le milieu de culture AF (Extrait de Malt 10g, Extrait de levure 4g, Glucose 2g, NaCl 2,5g, CaCO₃ 1g, Agar 15g, Eau distillée qsp 1000 ml, pH = 7,0) et cette activité antibactérienne disparaît totalement lors de la mise en culture de cette souche sur le milieu de culture CPC (Casaminoacides 1g, Peptone 2g, K₂HPO₄ 1g, KCl 0,5g, MgSO₄. H₂O 0,5g, FeSO₄. 7H₂O 0,01g, Glucose 30g, Agar 20g, Eau distillée qsp 1000 ml, pH = 7).

D'après les résultats mentionnés dans le tableau (VI en annexe II), il est remarquable que les 5 souches sélectionnées possèdent une activité antibiotique au moins sur un germe cible. Selon la production d'antibiotique, le milieu M₂ à 5% de NaCl s'est révélé comme meilleur pour la synthèse d'antibactériens par les isolats testés ; notamment pour celui S23 et STA19(4) ayant synthétisés des molécules exclusivement antibactériennes. Tandis qu'une

Résultats et discussion

activité antifongique n'est notée pour le milieu MEM des souches STA10 et STA11 vis-à-vis de *C. albicans*, alors qu'une activité à la fois antibactérienne et antifongique est notée pour le milieu GEM de l'isolat STA11 vis-à-vis de *C. albicans* et *S. aureus* et de l'isolat STECB3 à l'égard de *C. albicans* et de *SARM*. Ces résultats peuvent être dus à 2 molécules différentes (un antibactérien et un antifongique) ou bien à une molécule ayant à la fois les deux activités. Parmi, les antibiotiques des actinomycètes, 80% ont des propriétés assez diverses : antibactérienne, à la fois antibactérienne et antifongique, antiviral, antitumoral, insecticides, etc (**Bucking Ham, 1997**) et les 20% représentent les antifongiques (**Sanglier et al., 1993**).

Aucune activité antimicrobienne n'est notée pour les 5 souches sélectionnées sur le milieu M₂. Les travaux de **Bougachiche et al. (2005)**, ont montré que l'apparition des différentes activités antimicrobiennes, chez une souche d'actinomycètes est en fonction des milieux de culture et des microorganismes cibles utilisés. Selon **Srivibool et Sukchotiratana, 2006**, ils expliquent que l'absence d'activité antibiotique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car les molécules d'antibiotiques pourraient ne pas être polaires ou bien constituées de composés non polaires.

Il est également probable que ces bactéries nécessitent, pour la production de certaines substances antibiotiques, des milieux de culture spécifiques (**cité par Djinni, 2009**).

Nous avons remarqué un virage du milieu de culture chez les souches : STECB3 sur (GEM), STA11 et STA19(4) sur (MEM) cultivées à 28°C/ 10 jours. Ce virage de couleur suite à une production de pigments, pourrait être synonyme de production d'antibiotiques. A cet effet, Badji en 2006 a remarqué une production de tels pigments sur ISP2 et GYEA pour la souche *Actinomadura* AC170. Ces dernières sont avérés être des antibiotiques (**Cité par Souagui, 2009**).

2. Effet du pH du milieu sur la production d'antimicrobiens

Afin d'étudier l'effet du pH sur la production d'antimicrobiens, les 5 souches sélectionnées ont fait objet d'un test de cylindres d'agar sur le milieu MEM ajusté à différents pH 3, 5, 7, 9 et 11. Les résultats positifs du test sont représentés en histogramme (figure 8).

La souche STA10 présente une activité antifongique contre *C. albicans* sur le MEM à différents pH correspondants à 3, 5 et 9 avec des zones d'inhibition de : 23, 21 et 25 mm

Résultats et discussion

respectivement. Tandis que le diamètre de celle-ci est de : 22mm à pH 7. Sachant qu'une culture des germes cibles est réalisée sur le milieu MEM aux pH testés (Témoin négatif).

Une zone d'inhibition de 21mm est marquée par STA19(4) vis-à-vis de *SARM* sur le milieu MEM à pH 11. Alors qu'aucune activité antibactérienne n'a été notée pour cet isolat ensemencé sur le même milieu à pH 7.

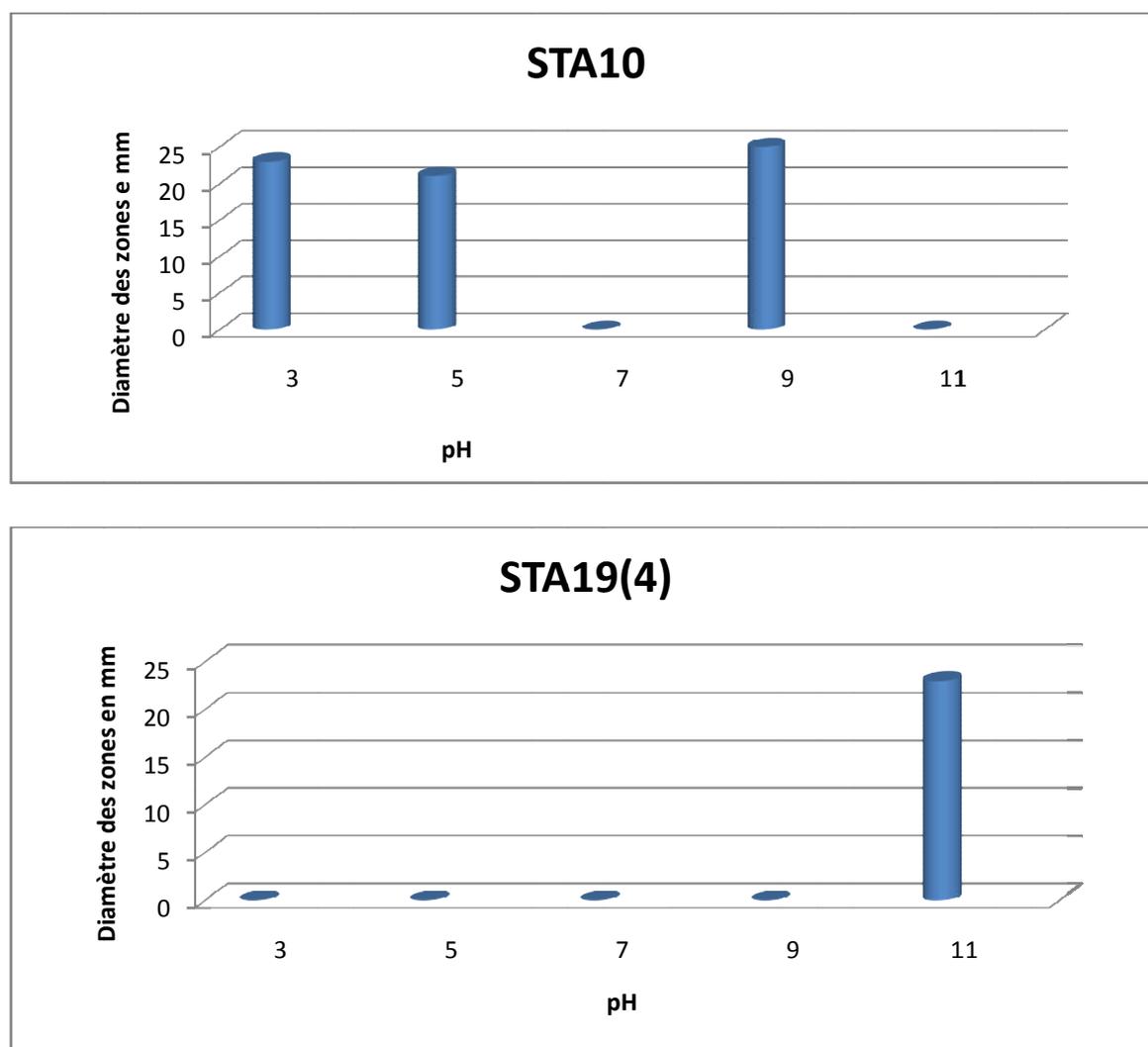


Figure 8: Effet de pH sur l'activité antimicrobienne de l'isolat STA10 contre *C. albicans* et de l'isolat STA19(4) contre *SARM* sur MEM par la méthode des cylindres d'agar.

D'après, **Tanaka, (1992)** ; **Higgs et al. (2001)**, la production d'antibiotiques varie quantitativement et qualitativement suite à une modification des conditions de culture de l'organisme producteur tel que : le pH. Ce dernier affecte énormément la production des métabolites secondaires. Cette observation a été constatée lors de la production de plusieurs métabolites secondaires à savoir la production d'un antifongique par la souche *Streptomyces*

Résultats et discussion

rochei AK39, la production de cet antifongique peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH (**Augustinen et al., 2005**). De même, chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline (CTC) et de la tétracycline (TC) dans le milieu de culture. Un pH acide favorise la production du CTC et un pH basique favorise la sécrétion de TC (**Asanza-Teruel et al., 1997**).

Il faut noter que ces conditions sont fonction en des bactéries actinomycétales, des bactéries-tests, et des milieux de culture. Il a été rapporté par **Dumenil et Sanglier. (1989)**, que les zones d'inhibition optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites pour la croissance et sont en fonction de la souche étudiée.

Les résultats négatifs obtenus par le test des cylindres d'agar sur les quatre milieux à l'égard des germes cibles utilisés pourraient être dus à l'inadaptation de ces milieux, aux germes cibles utilisés et/ ou aux conditions de cultures (pH, T°, aération) qui pourraient empêcher la production d'antimicrobiens. D'après, **Demenit et sanglier (1989)**, les principaux facteurs influençant la production d'antibiotiques sont les besoins nutritionnels (milieu de culture) et les conditions de cultures (pH, T°, aération). Ces facteurs diffèrent d'un germe à un autre.

3. Etude taxonomique

3.1. Détermination du genre

La détermination des genres d'actinomycètes est basée sur les critères morphologiques et chimiques.

3.1.1. Etude des caractères morphologiques

Celle-ci est portée sur des critères macromorphologiques et micromorphologiques.

➤ Macromorphologie

Des observations des cultures des 5 isolats cultivés sur divers milieux (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7, GYEA et M₂ à 5% de NaCl) à 28°C sont réalisées après 7, 14 et 21 jours d'incubation. D'après les résultats présentés sur le tableau VII, nous pouvons déduire que :

L'isolat STECB3 présente une croissance importante sur ISP1, ISP2, ISP3, GYEA et ISP7. La production de MA est observée sur tous ces milieux, il est de couleur beige

Résultats et discussion

verdâtre sur ISP2, ISP3 et ISP4, cependant il est de couleur blanche sur ISP1 et marron-claire sur GYEA. Le mycélium du substrat (MS) est d'une couleur blanche sur ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et beige sur le milieu GYEA.

La souche STA11 marque une croissance abondante sur les milieux : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, GYEA et ISP7. Le MA est d'une couleur blanche-beige sur ISP2, ISP4, ISP7 et GYEA et blanc sur ISP1 et ISP3, alors que ce lui de substrat est blanc sur tous ces milieux.

STA10 pousse très bien sur tous les milieux : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, GYEA et ISP7. Le MA est blanc sur ISP2 et ISP3, de beige verdâtre sur ISP4 et GYEA, il apparaît en blanc-verdâtre sur ISP1. Le MS est blanc sur tous ces milieux.

S23 se développe bien sur ISP1, ISP2, ISP7, ISP3 et GYEA, moyennement sur ISP4 la couleur de MA est blanche sur ISP4 et ISP7, il est de couleur blanche-beige sur ISP2, il est de couleur beige-verdâtre sur ISP1, ISP3, GYEA et M2 à 5% de NaCl. Le MS est blanc sur tous ces milieux.

L'isolat STA19(4) présente une croissance importante sur : ISP2, ISP3, ISP4, GYEA et ISP7, moyenne sur ISP1. Le mycélium végétatif est blanc sur ISP1, ISP7, et de couleur blanche-beige sur ISP4, gris-vert sur ISP2, blanc sur ISP3 et blanc-gris sur GYEA.

Les pigments mélanoides ne sont pas produits par les 5 isolats étudiés sur ISP7 conçu spécialement pour la production de ces pigments, Cependant, une confirmation de ce résultat sur ISP6 reste indispensable.

Les colonies des 5 isolats sélectionnés sont toutes dures et incrustées dans la gélose. La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique sont apportées dans le tableau (VII).

Tableau VII : Résultats de caractéristiques culturelles des isolats d'actinomycètes sur les milieux ISP et GYEA.

Milieu de culture	L'isolat	Les caractéristiques culturelles		
		7 ^{eme} jours	14 ^{eme} jours	21 ^{eme} jours
STECB3	• croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	S23			

Résultats et discussion

ISP1	• Croissance	++	+++	+++	
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre	
	• MS	blanc	blanc	Blanc	
	• Spores	Blanc	Blanc	Blanc	
		+	+	+	
	STA10				
	• Croissance	++	+++	+++	
	• MA	Blanc verdâtre	Blanc verdâtre	Blanc verdâtre	
	• MS	Blanc	blanc	blanc	
	• Spores	+	+	+	
	STA11				
	• Croissance	++	+++	+++	
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
	STA19(4)				
	• Croissance	++	++	++	
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
STECB3					
• Croissance	++	+++	+++		
• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre		
• MS	Blanc	Blanc	Blanc		
• Spores	+	+	+		
S23					
• Croissance	++	+++	+++		
• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige		
• MS	Blanc	Blanc	Blanc		
• Spores	+	+	+		
ISP2	STA10				
	• Croissance	+++	+++	+++	
	• MA	Débuté blanc	Blanc	Blanc	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
	STA11				
	• Croissance	+++	+++	+++	
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
	STA19(4)				
	• Croissance	++	++	+++	
	• MA	Gris vert	Gris vert	Gris vert	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spore	+	+	+	
ISP3	STECB3				
	• croissance	++	+++	+++	
		Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre	

Résultats et discussion

ISP3	• MA	Blanc	Blanc	Blanc	
	• MS	+	+	+	
	• Spores				
	S23				
	• croissance	++	+++	+++	
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	Blanc	+Blanc	Blanc	
		+	+	+	
	STA10				
	• Croissance	++	++	+++	
	• MA				
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores				
		Blanc	Blanc	Blanc	
	+	+	+		
STA11					
• Croissance	++	+++	+++		
• MA	Gris vert	Gris vert	Gris vert		
• MS	Blanc	Blanc	Blanc		
• Spores	+	+	+		
STA19(4)					
• Croissance	++	++	+++		
• MA	Blanc	Blanc	Blanc		
• MS	Blanc	Blanc	Blanc		
• Spore	+	+	+		
ISP4	STECB3				
	• croissance	+++	+++	+++	
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
	S23				
	• Croissance	++	++	++	
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
	STA10				
	• Croissance	++	+++	+++	
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre	
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc	
	• Spores	+	+	+	
STA11					
• Croissance	+++	+++	+++		
• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige		
• MS	Blanc	Blanc	Blanc		
• Spores	+	+	+		

Résultats et discussion

	STA19(4)			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige
	• MS	Beige	Beige	Beige
	• Spores	+	+	+
GYEA	STECB3			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Marron claire	Marron claire	Marron claire
	• MS	Beige	Beige	Beige
	• Spores	+	+	+
	S23			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	STA10			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	STA11			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige
	• MS			
	• Spores	Blanc	Blanc	Blanc
-		+	+	+
	STA19(4)			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc gris	Blanc gris	Blanc gris
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	STECB3			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre
	• MS			
	• Spores	Blanc	Blanc	Blanc
	• PM			
		+	+	+
		-	-	-
	S23			
	• Croissance	+++	+++	+++
ISP7	• MA	Blanc	Blanc	Blanc
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	• PM	-	-	-

Résultats et discussion

	STA10			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Blanc verdâtre	Blanc verdâtre	Blanc verdâtre
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	• PM	-	-	-
	STA11			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	• PM	-	-	-
	STA19(4)			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	• PM	-	-	-
	STECB3			
	• Croissance	++	++	+++
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
M2 à 5% de NaCl	S23			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc	Blanc	Blanc
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	STA10			
	• Croissance	++	+++	+++
	• MA	Beige verdâtre	Beige verdâtre	Beige verdâtre
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	STA11			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+
	• STA19(4)			
	• Croissance	+++	+++	+++
	• MA	Blanc beige	Blanc beige	Blanc beige
	• MS	Blanc	Blanc	Blanc
	• Spores	+	+	+

On note : +++ : bon développement ; ++ : développement moyen ; + présence ; - absence ; MS : mycélium du substrat ; MA : mycélium aérien ; PM : pigment mélanoïde



➤ **Micromorphologie**

Cette étude a pour but la détermination de la morphologie, la fragmentation ou nom des mycélia ainsi que le type de spores caractéristique des genres. Les colonies des 5 isolats cultivés sur les milieux utilisés pour l'étude de la macromorphologie (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7, GYEA et M₂ à 5% de NaCl), sont directement observées sur boîte de Pétri sous microscope optique (à l'objectif 40) après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. Des colorations de Gram ont été réalisées pour les 5 isolats après 21 jours d'incubation à la même température sur le milieu M₂ à 5% de NaCl. Les résultats obtenus indiquent que tous les isolats possèdent des filaments fins longs, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type *RF (Rectus-Flexibilis)*. Ce type de mycélium est caractéristique des genres *Streptomyces*, *Agromyces* et *Actinomyces*. Les spores sont immobiles. Les observations microscopiques de coloration de Gram sont indiquées dans la figure (9). Les observations microscopiques, effectuées directement sur boîte de Pétri, des colonies des 5 isolats sont représentées dans la figure 10.

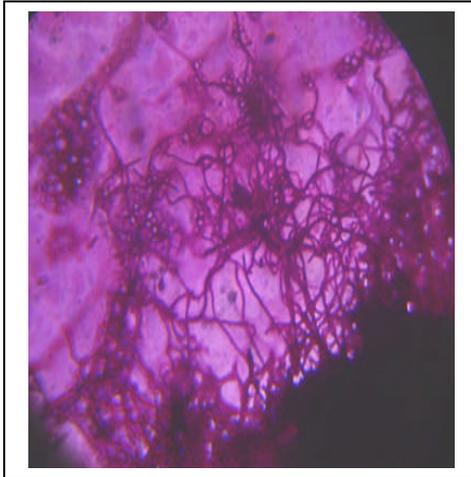


Figure 9a: L'isolat STECB3.



Figure 9b : L'isolat STA19(4).

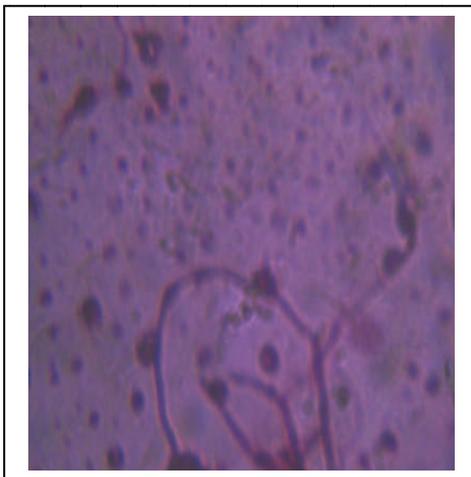


Figure 9c: L'isolat S23.

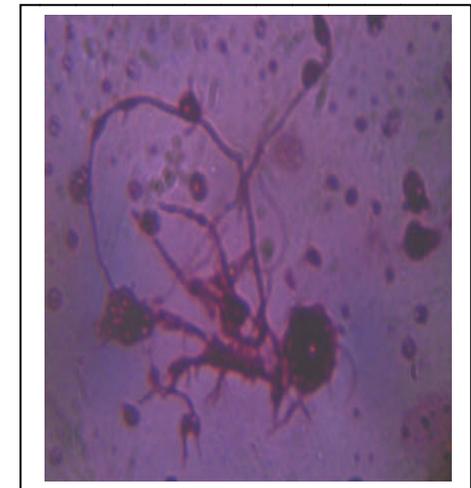


Figure 9d: L'isolat STA10.

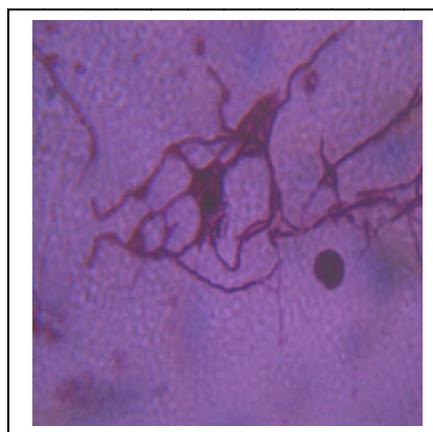


Figure 9e: L'isolat STA11.

Figure 9: Coloration de Gram des isolats d'actinomycètes sélectionnés.

Résultats et discussion

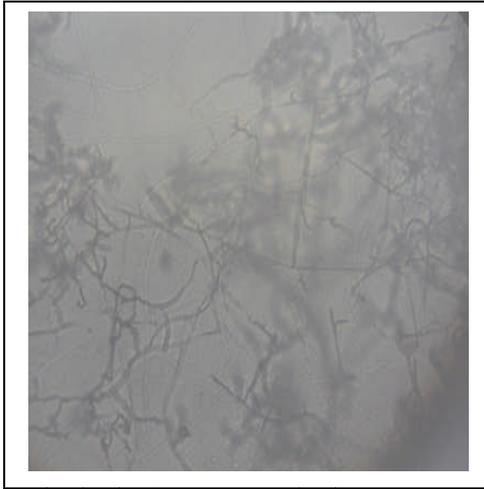


Figure10a : L'isolat S23.

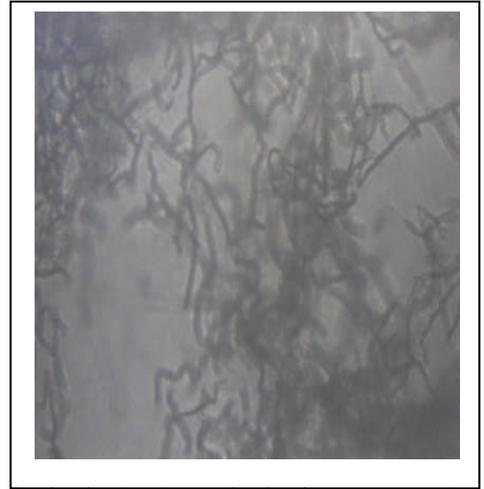


Figure 10b: L'isolat STA11.

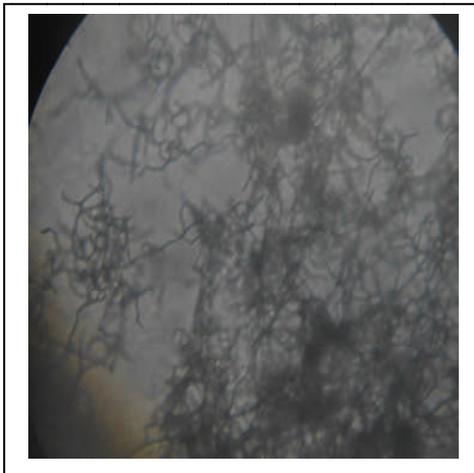


Figure10c : L'isolat STA19(4).

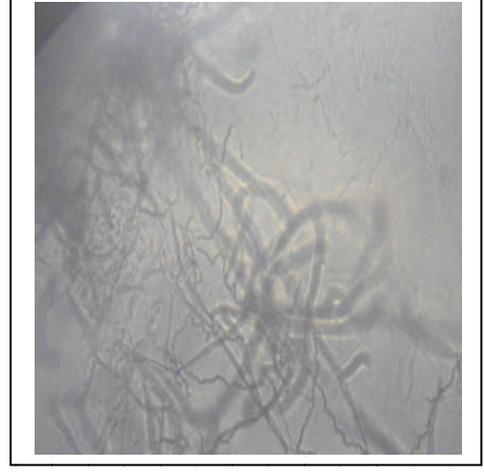


Figure10d : L'isolat STA10.



Figure10e : L'isolat STECB3

Figure10 : Observation microscopiques des isolats d'actinomycètes après 21 jours d'incubation à 28°C, grossissent (10×40).

Résultats et discussion

3.1.2. Chimiotaxonomie

Cette étude a été effectuée pour confirmer les résultats des tests de caractérisation morphologique afin de pouvoir affilier ces isolats aux genres correspondants. Les résultats ainsi obtenus de la détermination de la présence ainsi que la forme de l'isomère de l'acide daiminopimélique (DAP), de la lysine (qui le remplace chez certains genres d'actinomycètes), et de glycine ainsi que le type de sucres présent dans les hydrolysats cellulaires des isolats sont résumés dans le tableau VIII. Selon ces résultats, l'acide daiminopimélique DAP n'a pas été mis en évidence pour tous les isolats sélectionnés. La lysine est présente chez STA19(4), STA10, STA11 et STECB3 et absente chez l'isolat S23 alors que la glycine est présente uniquement chez cet isolat.

Tableau VIII : Résultat de la recherche des acides aminés pariétaux et les sucres cellulaires des souches d'actinomycètes retenues.

Composés cellulaires	Isolats				
	STA19(4)	STA11	STA10	S23	STECB3
Présence de DAP	-	-	-	-	-
Présence de la Glycine	-	-	-	+	-
Présence de Lysine	+	+	+	-	+
Sucres cellulaires	Arabinose NC	Arabinose NC	Arabinose NC	Arabinose NC	Ribose NC
Chimiotype	V	V	V	VII	VI

+: présence; -: absence, NC: non caractéristique.

Les résultats du tableau VIII permettent de rattacher les isolats STA19(4), STECB3 et STA10 au chimiotype V selon **Becher *et al.*, (1965)**, **Yamgushi, (1965)** et **Lechevalier et Lechevalier, (1970)** et l'isolat STA11 au chimiotype VII et S23 au chimiotype cVI selon les mêmes auteurs.

Résultats et discussion

En se basant sur les les résultats de la morphologie couplés à ceux chimiotaxonomiques, les isolats STA19(4), STECB3, STA10 et S23 peuvent être rattachés (avec beaucoup de précaution) au genre *Actinomyces* et STA11 au genre *Agromyces*. Cependant la confirmation de ces résultats par une chromatographie sur papier descendante serait envisageable ainsi qu' une analyse moléculaire (séquençage de l'ARN 16S) qui reste indispensable.

3.2. Etude physiologique

La détermination des espèces est basée sur des critères physiologiques et les critères moléculaires. Les tableaux (IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV) illustrent les résultats des testes physiologiques réalisés sur les 5 souches sélectionnées.

➤ La tolérance au NaCl

Ce test est réalisé afin d'étudier la capacité de chaque isolat à croître à différentes concentrations en NaCl. Selon les résultats obtenus (tableau IX), nous remarquons que la souche S23 a la capacité de croître aux différentes concentrations de NaCl qui sont testées inférieures à 4M notant comme limite supérieure de cette croissance la concentration 3,5M parmi celles testées. Cette limite est de 2,5M pour la souche STA10, de 2M pour STA 19(4) et STEACB3 alors qu'elle est de 1,5M pour STA11. Les résultats obtenus indiquent, toutefois, que les isolats sont modérément halotolérants.

Tableau IX : Croissance à différentes concentrations en NaCl.

Souches	Concentrations en NaCl.							
	1M	1,5M	2M	2,5M	3M	3,5M	4M	5M
STA10	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
STA11	+++	+++	-	-	-	-	-	-
STA19(4)	+++	++	++	-	-	-	-	-
STECB3	+++	++	+	-	-	-	-	-
S23	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

+++ : Très bon développement ; ++ : développement moyen ; + : faible développement ; - : pas de développement.

Résultats et discussion

➤ Croissance à différents pH

Les résultats mentionnés dans le tableau X montrent une bonne croissance des isolats : STA10, STECB3, STA11 et STA19(4) aux pH 3, 5, 7 et 11 mais leur optimum de croissance est estimé à pH 9. Alors qu'une meilleure croissance de la souche S23 est notée à pH 11, cependant, elle se développe également à pH 3, 5, 7 et 9.

Tableau X: Croissance des 5 isolats à différents pH.

pH de milieu	Croissance à différents pH.				
	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
3	+++	+	++	+	+
5	+++	+	+++	++	+
7	+++	+	+++	+	++
9	+++	+++	+++	++	+
11	++	+++	+++	++	++

+++ : Très bon développement ; ++ : développement moyen ; + : faible développement

➤ Croissance à différentes températures

L'optimum de croissance des 5 isolats testé est estimé à 28°C. Cependant ces isolats ont la capacité de croître à 2 autres températures testées (37°C et 44°C) sauf pour la souche STECB3 dont la croissance est inhibée à 44°C. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI: Croissance des 5 isolats à différentes températures.

Température	Croissance à différentes températures.				
	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
28°C	+++	+++	+++	+++	+++
37°C	+++	++	++	+++	++
44°C	++	+++	+	-	++

+++ : Très bon développement ; ++ : développement moyen ; + : faible développement ; - : pas de développement.

Résultats et discussion

➤ Autres tests physiologiques

✓ Dégradation des sucres

Les résultats de ce test tel que les montrent le tableau XII ci-dessous indiquent que les 5 souches sélectionnées utilisent les 16 sucres testés comme seule source de carbone. Notons aussi que ces isolats ont la capacité de croître sur le milieu ISP9 composé seulement de minéraux (Voir annexe I) indiquant la non-exigence de ces isolats vis-à-vis des sources de carbone.

Tableau XII : Dégradation des sucres par les 5 isolats.

Les sucres	Les souches testées.				
	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Lévérose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+

+ : positif

Résultats et discussion

✓ Dégradation de quelque Sels de sodium

Les résultats mentionnés dans le tableau XIII révèlent que 4 isolats ont une capacité à dégrader les 3 sels testés sauf la souche STA19(4) qui ne dégrade pas oxalate.

Tableau XIII : Dégradation des sels de sodium.

Sels de sodium	Les souches testées.				
	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
Acétate	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Oxalate	+	+	-	+	+

+ : positif ; - : négatif.

✓ La résistance à quelques agents chimiques

Les résultats du tableau XIV indiquent une tolérance des 5 isolats à 0,01% de tellurite de potassium et de STA19(4), STECB3 et S23 à 0,01% de phénol. Alors qu'une sensibilité de cette dernière et de STA10 est notée à cette concentration. Les tests restent incomplets car d'autres concentrations de ces agents doivent être testées notamment celle de 0,05% afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux du Bergey's Manuel.

Tableau XIV: Résistance à quelques agents chimiques.

La résistance aux agents chimiques	Les souches testées.				
	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
Phénol à 0,01%	-	-	+	+	+
Tellurite à 0,01% de potassium.	+	+	+	+	+

+ : positif; - : négatif.

✓ Dégradation d'autres composés organiques

D'après les résultats illustrés dans le tableau XIV, toutes les souches sélectionnées sont capables d'utiliser les 2 protéines testées: (Caséine de lait et la gélatine) ainsi que la L-tyrosine et la glycine comme source d'azote. Ces isolats ont la capacité de dégrader le tween 80.

Résultats et discussion

Tableau XV : Dégradation d'autres composés organiques.

	Les souches testées.				
Protéines	STA10	STA11	STA19(4)	STECB3	S23
Caséine de lait	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	+

+ : positif.

Les résultats de quelques tests physiologiques de la souche STECB3 sont illustrés dans la figure 11.

Résultats et discussion

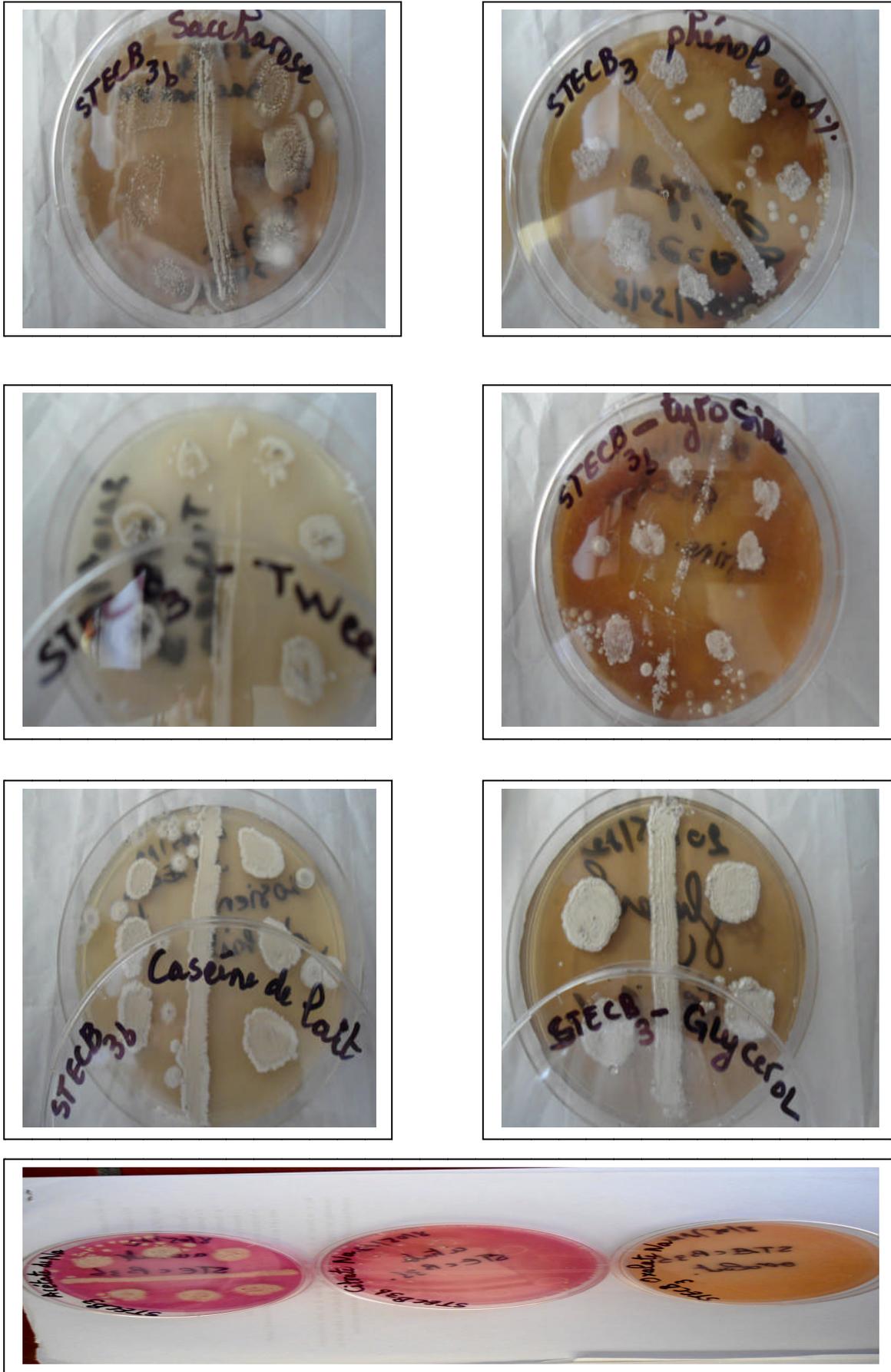


Figure11 : Quelques tests physiologiques de la souche STECB3.

Résultats et discussion

L'ensemble des tests physiologiques nécessite d'être complété par d'autres tests tel que la croissance sur d'autres milieux utilisés pour les actinomycètes, en absence et à d'autres concentrations en sels, d'autres températures, pH, humidité, en présence d'autres agents chimiques tel que les antibiotiques, la dégradation d'autres composés tel que la xanthine,...etc.

Actuellement, l'identification des 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 essentiels et indispensables. Ainsi, nos 5 isolats ayant subis une étude morphologique, chimiotaxonomique et physiologique (qui restent limitées) ne peuvent ; à ce stade de l'étude ; être rattacher avec certitude à leur genres correspondants.

4. Extraction des antibiotiques par le butanol

De nombreux travaux ont confirmé l'efficacité du butanol, pour l'extraction des antibiotiques par rapport aux autres solvants utilisés, entre autres, celle réalisée par **Boudjella et al. (2006)** sur le genre *Streptosporangium* qui indique, clairement, que le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances actives était le n-butanol.

Zitouni et al. (2005), ont obtenu des taux d'extraction importants avec le *n*-butanol et le dichlorométhane sur le genre *Saccharothrix*. Par contre, pour le genre *Nocardopsis*, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle étaient les plus efficaces.

4.1. Antibiographie: test des puits

Dans le but de déterminer la capacité des souches à produire des antibiotiques en milieu liquide, la méthode de diffusion dans des puits a été adoptée. Les résultats du test des puits montre une activité exclusivement antibactérienne de l'isolats S23 à l'égard de SARM (16mm) et de *S. typhi* (13mm), et de l'isolat STA19(4) vis-à-vis de SARM (16mm). Alors qu'une activité exclusivement antifongique à l'égard de *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 15mm de diamètre est notée pour l'extrait butanolique de la souche STA10. Ces résultats concordent avec ceux de la production sur milieux solides confirmant ainsi la capacité de ces souches à produire des antibiotiques sur le milieu solide et liquide. Les résultats négatifs notés pour les l'extait butanoliques de STA11 peuvent être due au solvant d'extraction utilisé ou l'incapacité de la souche STA11 à produire des antibiotiques sur le MEM liquide alors qu'une activité antifongique à l'égard de *C. albicans* de cet isolat (15mm) été noté sur le même milieu solide.

Résultats et discussion

Nedialkova et Naidenova, (2005) et Singh *et al.* (2006) ont observé une réduction voir une absence d'activité en milieu liquide en comparaison avec celle observée par la méthode des cylindres d'agar (en milieu solide). D'après Moncheva *et al.* (2002), cela peut probablement être dû à l'inadaptation des souches au milieu de culture liquide utilisé pour la production d'antibiotiques. Shomura *et al.* (1979) et Iwai et Omura, (1982) ont également remarqué que la production apparente ne se faisait que sur milieux solides et le passage aux milieux liquides pose quelque fois des problèmes quant à la production d'antibiotiques.

Les résultats du teste des puits sont illustrés dans la figur 12.

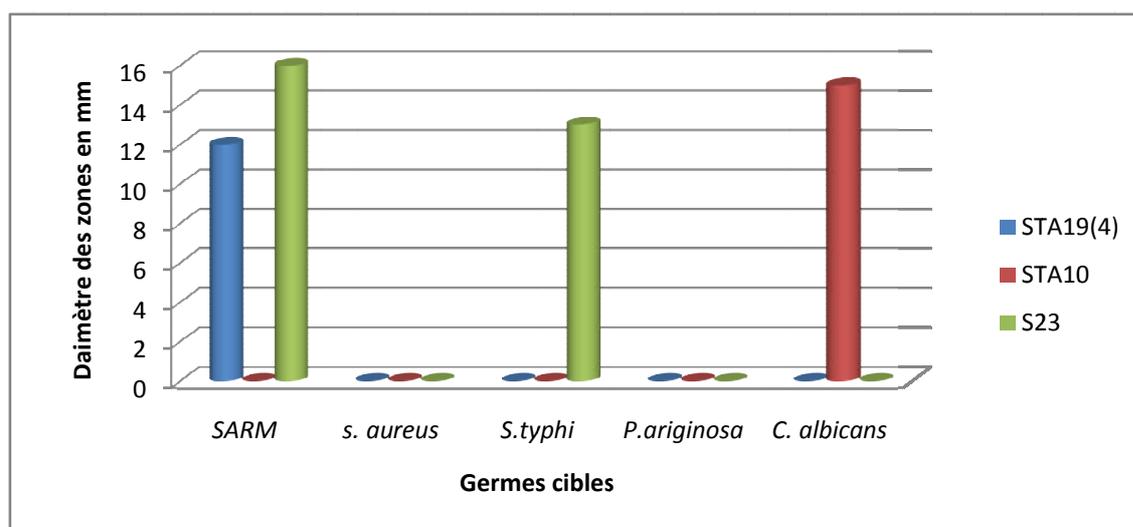


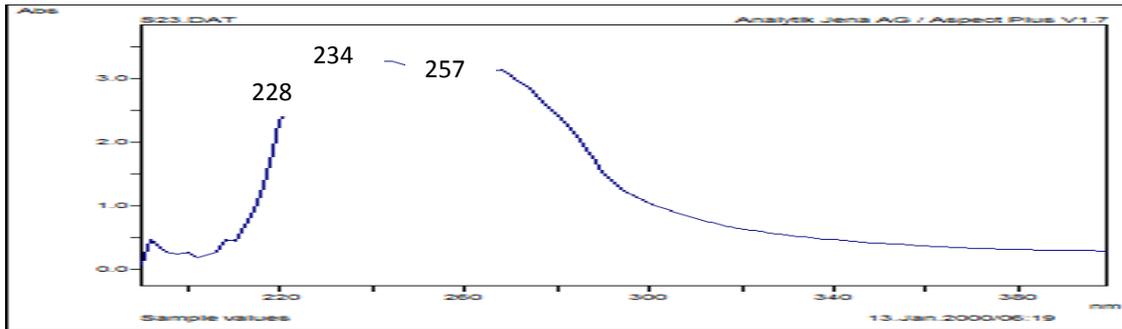
Figure 12: Les résultats de l'antibiogramme des extraits obtenus en milieu liquide.

4.2. Recherche des polyéniques

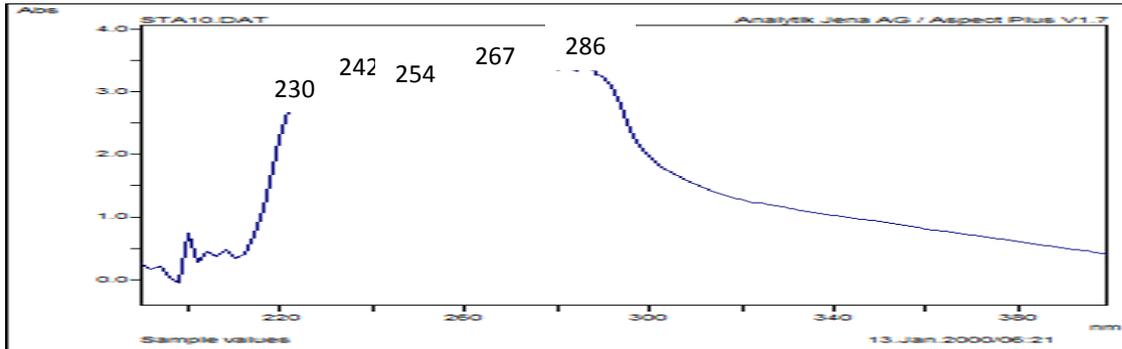
La recherche de composés polyéniques dans les extraits butanoliques brut actifs des isolats étudiés est réalisé par spectrophotométrie UV-visible entre 190 –500nm. Les spectres UV-visible de ces extraits , sont représentés dans la figure 13.

Les données relatives aux spectres UV-visible suggèrent que les substances antibiotiques produites par les 4 souches n'appartiennent pas à la famille des d'antifongiques polyéniques lesquels sont caractérisées par la présence de trois maxima très caractéristiques entre 260 et 405nm (Bastide, 1986).

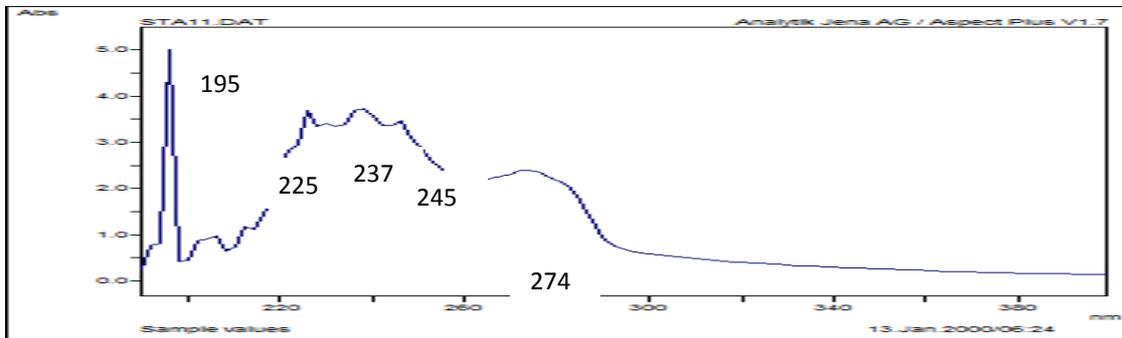
Résultats et discussion



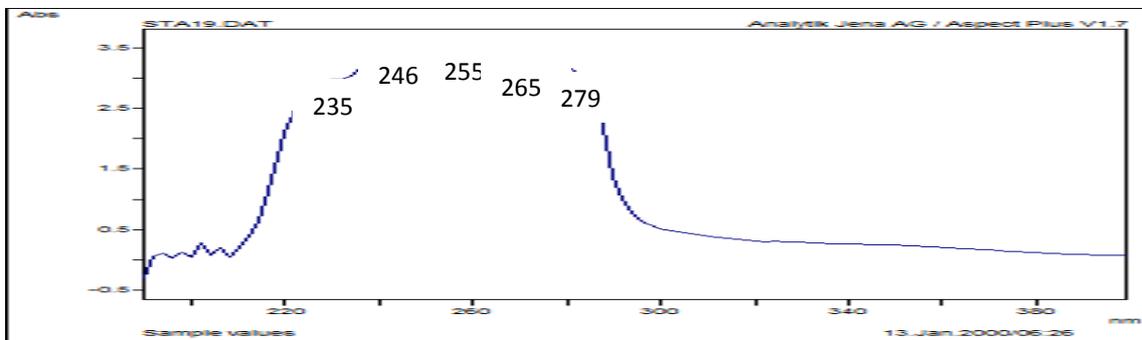
Spectre UV-visible de l'extrait butanolique actif de S23 entre 190 et 500nm.



Spectre UV-visible de l'extrait butanolique actif de STA10 entre 190 et 500nm.

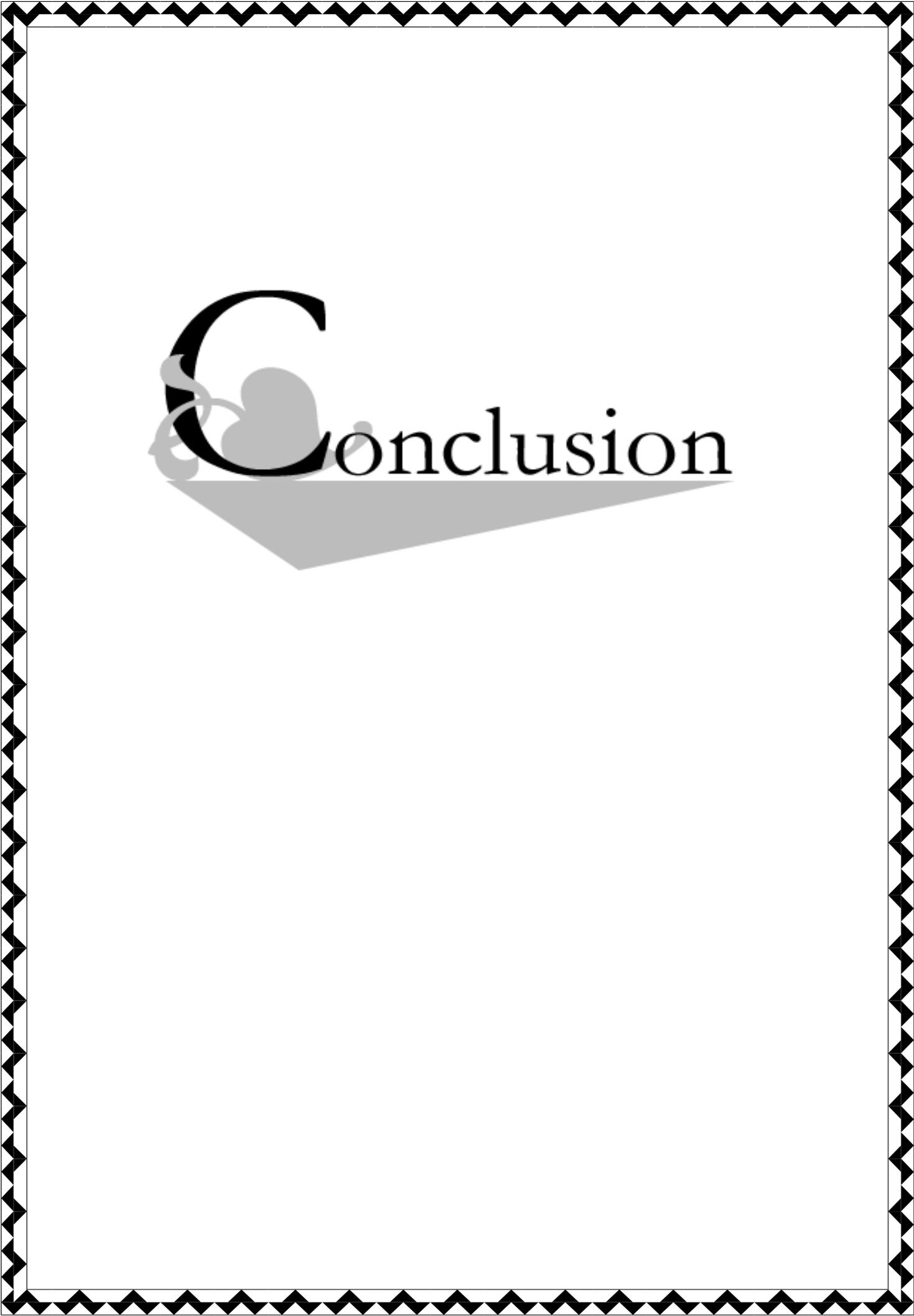


Spectre UV-visible de l'extrait butanolique actif de STA11 entre 190 et 500nm.



Spectre UV-visible de l'extrait butanolique actif de STA19 (4) entre 190 et 500nm.

Figure 13: Spectres UV-visibles des extraits butanoliques des isolats sélectionnés.

A decorative border with a repeating black and white zigzag pattern surrounds the entire page.

C Conclusion

A gray shadow is cast beneath the text, extending to the right and slightly downwards.

Conclusion

Dans le but de la sélection et de la recherche de souches productrices d'antibiotiques, 91 souches provenant de deux stations d'épuration de la région de Béjaïa (Béjaïa et Aoukas) ont fait l'objet d'un screening pour leur aptitude à la production d'antimicrobien, et ce, sur 4 milieux de culture à savoir (M₂, M₂ à 5% de NaCl, MEM et GEM) par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis de 4 bactéries à Gram positif, 4 bactéries à Gram négatif, *C. albicans* et *Aspergillus niger*. En se basant sur leur spectre d'action 13 souches sont actives dont seulement 5 sont sélectionnées pour la suite de l'étude. Selon les résultats les milieux M₂ à 5% en NaCl et GEM se sont révélés meilleurs pour la production d'antibiotiques notamment pour les isolats S23 et STA 11 et le milieu MEM est indiqué pour la synthèse des antifongiques alors qu'aucune activité antimicrobienne n'est décelée sur le milieu M₂.

Les isolats S23 et STA19 (4) sont dotés d'une activité exclusivement antibactérienne tandis que STA11, STA10, STECB3 montrent des activités à la fois antifongique et antibactérienne.

Afin d'étudier l'effet du pH sur la production des antibiotiques, les 5 isolats ont été re-testées, par la même technique que la précédente, pour leur aptitude de synthèse d'antibiotiques sur le milieu MEM à différente valeur de pH correspondants à : 3, 5, 7, 9 et 11. Les résultats montrent un effet nettement positif de pH9 sur la production d'antifongique de la souche STA10 à l'égard de *C. albicans* (une zone d'inhibition de 25mm de diamètre et qui est de 22 à pH7 sur le même milieu), et une induction de production d'un antibactérien à l'égard de SARM de l'isolat STA19(4) à pH11 alors que celle-ci n'est décelée à pH7 sur le même milieu.

Les 5 actinomycètes sélectionnés ont fait objet de test d'identification (morphologiques, chimiotaxonomiques et physiologiques). Les résultats de ce dernier ont permis de rattacher (avec beaucoup de précautions) les isolats STA19(4), STECB3, STA10 et S23 au genre *Actinomyces* et STA11 à celui *Agromyces*. Cependant ces résultats restent à confirmer par d'autres analyses plus approfondies et plus précises (Séquençage de l'ARNr 16S). Les résultats des tests physiologiques montrent une halotolérance des souches étudiées avec des limites de croissance de 3,5M pour l'isolat S23, de 2,5M pour STA10, de 2M pour STA19(4) et STECB3 alors que STA11 ne peut croître au-delà de 1,5M en NaCl. Tous les isolats ont la capacité de croître à une large gamme de pH allant de 3, 5, 7, 9 jusqu'à 11. Il en est de même pour les températures de 28, 37 et 44°C testées à l'exception de STECB3 qui ne croît pas à cette dernière. Les isolats sont dotés d'une bonne aptitude de dégradation de toute la gamme des composés testés (16 sucres, 2 protéines, 2 acides aminés, 3 sels de sodium et le tween80)

Conclusion

ces souches restent intéressantes vue leurs capacités de croître dans différentes conditions permettant ainsi leur sélection.

La production des antibiotiques sur milieu liquide est testée par la méthode des puis pour les extraits butanoliques des surnageants de culture. Ce test montre une activité antibactérienne des S23 et STA19(4) vis-à-vis de SARM et de *S. typhi* et une activité antifongique des STA10 vis-à-vis de *C. albicans*.

L'analyse des spectres UV-visible des extraits butanoliques actifs des 4 souches testées (STA19 (4), STA10, STA11 et S23) ne montre aucun pic caractéristique des polyènes, ce qui incite à la purification et la caractérisation de ces molécules non polyéniques.

L'ensemble des résultats obtenus est intéressant et mérite la poursuite de ce travail dont il serait à envisager évidemment d'exploiter ces souches intéressantes concernant :

- ❖ un approfondissement de l'identification (détermination des espèces), par des techniques moléculaires telle que le séquençage de l'ARNr 16S, hybridation ADN/ADN;
- ❖ une réalisation des tests d'optimisation de productivité à savoir la détermination des meilleures conditions de production des antibiotiques;
- ❖ une étude de la cinétique de croissance et de la production des antibiotiques;
- ❖ un élargissement de la gamme de germe cibles;
- ❖ un élargissement de la gamme des solvants d'extraction afin d'en choisir le meilleur;
- ❖ une extraction à partir de la phase aqueuse et du mycélium;
- ❖ une purification, caractérisation et détermination de la structure chimique des antibiotiques synthétisés par les 5 souches sélectionnées.



Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abbas B-H (2006).**-A Biological and Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J App Sci Res.***2**:809-815.
- **Adinarayana K., Ellaiah P., Srinivasulu B., Bhavani D. and Adinarayana G. (2003).** Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin Production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem.* **38**: 1565-1572.
- **Aharonowitz Y., Demain A.L. (1978).** Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agen. Chemother.* **14**: 159-164.
- **Al-Tai A., Kim B., Kim S.B., Manfio G.P., et Goodfellow M., (1999).** *Streptomyces malaysiensis* sp .nov., a new streptomycete spicules with rugos ornamentation spores. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1395-1402.
- **Al-Zarban S-S, Al-Musallam A-A, Abbas I, Stakbrandt E, Kroppenstedt R-M (2002).** *Int J Syst Evo Microbiol* .**52**:555-558.
- **Asanza-Ternuel M. L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J.E., Barbotin J. N (1977).** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzy. Microbial. Technol.* **21**: 314-320.
- **Athalye M. Lacey J and Goodfellow M. (1981).** Selective isolation and enumeration of Actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.*, **51** : 289-297.
- **Augustine. S.K; Bhavsar. S.P; and Kapadnis. B.P. (2005).** A non-polyene antifungala ntibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* 30(2), 201–211.
- **Badji B, Riba A., Mathieu F., Lebrihi, et Sabaou N., (2005).** Antifungal activity of saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxigenic fungi. *J. Mycol Med.* **15**: 211-219.
- **Badji B., (2006).** Etude taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine sahariennes appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat.Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Références bibliographiques

- **Bakour L. (2006).** Caractérisation chimique de nouvelles mutatumycines synthétisées par *Saccharothrix* SA103 et influence des sources de carbone et d'azote sur la production. Mémoire de magistère, université A. Mira de Bejaia.
- **Baniasadi F., Shahidi G.H., Karimi Nik A. (2009).** In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *Amer-Euras. J. Agri. Environ Scienc.* **6**: 268-270.
- **Basilio. A; Gonzalez. I; Vicente. M.F; Gorrochategui. J; Cabello. A; Gonzalez. A; and Genilloud. O. (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.* **9**: 814–823.
- **Bastide. A; de Méo. M; Andriantsoa. M; Laget. M; and Duménil. G. (1986).** - Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. Journa.* **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-hydrolysates. *Applied Microbiol.* **12**: 421-423.
- **Becker. B; Lechevalier. M. P. and Lechevalier. H. A. (1965).** Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Appl. Environ Microbiol.* **13(2)**: 236-243.
- **Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *Journal of antibiotics.* **58**: 1-26.
- **Berdy J., Aazalos A. and Mc Nitt K.L., (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. *CRC Press, Boca Roton.*
- **Bergey's Manuel. (2007).** Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In*: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.
- **Billerbeck V.-G., Roques C., Vanière P. and Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle., *Hyg. Rev, n°3.* *Bioengineering.* **106 (2)**: 148-153.
- **Boudemagh. A; Kitouni. M; Boughachiche. F; Hamdiken. H; Oulmi. L; Reghioua. S; Zerizer. H; Couble. A; Mouniee. D; Boulahrouf. A; Boiron. P. (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some

Références bibliographiques

saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Mycologie Médicale*, **15**: 39–44.

- **Boudjella H., (2007).** Etude taxonomiques et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols Sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécréter par trois souches. Thèse de Doctorat d'Etat : Alger, Algérie.
- **Boudjella. H; Bouti. K; Zitouni. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; Sabaou. N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. *Microbiol Research*. **161**: 288-298.
- **Boudmagh A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie.
- **Boughachiche f., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A.,et Boulahrouf A.,(2005).** Isolement d'Actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia d'Ain Mlila .*Sci Technol.***23** : 5-10.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. et Vobi G. (1989).** Organisme producteurs biologie, taxonomie et écologie. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P. et Sanglier J .J (EdS). *Paris, Masson*. PP. 33 -70 .s .
- **Buckingham J. (1997).** Dictionary of natural product. Chapman and Hall/ CRC. *England CRC Press*.
- **Bugrigourt M. (1999).** Dictionnaire de microbiologie général. ISBN2-7298-6. Ses /éditons marketing SA. p 64-65.
- **Carle S.,(2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. **36** : 25-41.
- **Chen H. H., Qin S., Lee J. C., Kim C. J., Xu L. H., Li W.J. (2009).** Streptomyces mayteni sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Chinese medicinal plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **95 (1)**:47-53.
- **Cheng J. R., Fang A., Demain A. L. (1995).** Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **43**: 1096-1098.

Références bibliographiques

- **Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 492-498.
- **Dairi. T. (2005).** Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, **58 (4)**: 227-243.
- **Demain A.L., Dykhuizen L. (2006).** Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Cur. Opin. Microbiol.* **9**: 237-23.
- **Dinya Z.M. and Sztaricskai F.J. (1986).** Ultraviolet and light absorption spectrometry. In : « Modern analysis of antibiotics » Aszolas A. (Eds), Marcel Dekker, Inc. *New York*, pp.19-96.
- **Djinni I. (2009).** Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Mémoire de Magister. Université de Bejaia. pp 46- 47.
- **Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Massa P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A. M. (2002).** Microbiol technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* **99** : 187-198.
- **Données OMS "Principales causes de mortalité dans le monde en 1996"**, (1997).
- **Duhoux E, Nicol M (2004).** Les symbioses Rhizobium-Légumineuses. In biologie végétal : Associations et interaction chez les plantes. Ed Dunod, Paris, 2-18.
- **Dumenil D., Sanglier J. J (1989).** Physiologie de la production des antibiotiques dans «Biotechnologie des antibiotiques». *Masson (Ed)*. 195-217 pp.
- **Ensign J.C. (1979).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev. Microbiol.* **32**: 185-219.
- **Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**, 657-660.
- **Gesheva V., Ivanova R., Gesheva R. (2004).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolides antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol resear.* **160**: 243-248.
- **Gesheva. V; Ivanova. V; Gesheva. R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological Research*, **160**: 243-248
- **Goodfellow M et Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**: 189-216.

Références bibliographiques

- **Goodfellow M. (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J of General Microbiol.* **69**: 33-90.
- **Hawang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. 2001.** Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**:3739-3745.
- **Higashide E. (1984).** "The macrolides: properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci.* **22**, pp. 452-508.
- **Higgs R. E., Zahn G. A., Gygi J. D., Hilton M. D. (2001).** Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Appl. Environ Microbiol.* **67**: 371-376.
- **Inoue O. O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R. 2007.** Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian journal of Microbiology.* **38**: 58-61.
- **Jensen PR, Dwight R, Fenical W (1991).** Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**:1102-1108
- **Kalakoutski L. V et Agre N.S. (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. *Bacteriol. Rew.* **40**: 469-525;
- **Kecha M. (1996).** Isolement et sélection de deux souches de streptomyces productrices d'antifongiques non polygéniques .Taxonomie, extraction, purification et caractérisation partielle des antibiotiques synthétisent .thèse de magistère .université Mouloud Mammeri (Tizi ouazou).
- **Kim T. K., Hewavitharana A. K., Shaw P. N. et Fuerst J. A. (2006).** Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol.*, **72**: 2118-2125.
- **Kim T. K., Hewavitharana A. K., Shaw P. N. et Fuerst J. A. (2006).** Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol.*, **72**: 2118-2125.
- **Kitouni M., Boumdemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hmdiken H., Couble a., Mouniee D., Boulehrouf A, et Boiron P. (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive subsances from water, soil and tree bark samples of north-east Algeria. *Journale de mycologie médicale.* **15** :45-51

Références bibliographiques

- **Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. App Bacteriol., Symp. Ser. 2*: 231-251.
- **Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, **4**: 113–121.
- **Lakshmiathy D.T., Krishnan K. (2009).** A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *Inter. J. Integrative Biol.* **6**: 132-136.
- **Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie).
- **Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481.
- **Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*.79: 399-405.
- **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970a).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales. *In: The procaryotes*, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. *Springer-Verlag. Berlin. 2*: 1915-1922.
- **Lechevalier M.P., De bievre C. and Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**: 249-260.
- **Lechevalier M-P and Lechevalier H-A (1970).** Composition of wal-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: The actinomycetales H.Prause , (Ed) G Fisher Verlage*, Jena. 331-316.
- **Leclerc H., Izard D., Husson M.O., Wattre P. et Jakubezak E. (1983).** Microbiologie générale. Doin, Paris., p. 40.
- **Lee D. G. (2006).** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence in combinatorial. *Genome Biology.* **7. R90**

Références bibliographiques

- **Lie W-J., Zhang Y-G., Zhang Y-Q., Tang S-K., Xu P., Xu L-H., et Jiang C-L., (2005).** *Streptomyces sodiophilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. *Int J. Evolu Microbiol.* **55** : 1329-1333.
- **Liu S., Liu S., Y., Lu Z. X. 2007.** Antibactérien activity and propriety of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese journal of Biotechnology.* **23**: 1077-1081.
- **Marchal N. and Bourdon J.L. (1973).** Milieu de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds.). Paris.
- **Marchal. N; Bourdon; J.L. and Richard. Cl. (1978).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Doin editor. Paris, pp. 67-122.*
- **Mariat F. et Sebald M. (1970).** Actinomycoses : actinomycoses à germes anaérobies, nocardiose, actinomycoses rares ou fausses actinomycoses. *Encyclopédie Méd. Chir., 8123 : A, 1-13*
- **Mariat F. et Sebald M. (1990).** Les actinomycètes. In: *Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.935-949*
- **Martin J.F. (1979).** Polyene macrolide antibiotics. *In: "Economic Microbiology" Rose A.F., (Eds). Academic Press, London, 3: 355-387.*
- **Maur N., (1990).** Vade-mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux. *5éme Ed: Maloine, Paris. P (245-276).*
- **Mc neil M .M., Nash S.L., Hajjeh R. A., et al., (2001).** Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in united states, 1980-1997. *Clin. Infect. Dis.* **33** : 641-7.
- **Minikin D. E., Patel P. V., Alshanaony L., Goodfellow M. (1977).** Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Inter. J. of Syst Bacteriol.* **27**: 104-7.
- **Mitali D., Royer T. V and Leff L. G. (2006).** Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Appl. Env. Microbiol,* **73** (3): 756–767.
- **Montravers P., Cargeac A, Rezzoug A., (2003).** Choix d'un antifongique conférence d'actualisation, *p. 673-692.*
- **Mordarska H., Mordarska M. and Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.,* **71**: 77-86.

Références bibliographiques

- **Mukai A., Fukai T., Matsumoto Y., Ishakawa J., Hoshino Y., Yazawa K et al., 2006.** Transvalcin Z, a new antimicrobail compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The journal of antibiotics.* **59:** 366-9.
- **Narayana. K.J.P; Prabhakar. P; Vijayalakshmi. M; Venkateswarlu. Y; and Krishna. P.S.J. (2008).** Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish J. Microbiol,* 57 (1): 35-39.
- **Ningthonjam D., Sanasam S., and Nimaichand S. (2009).** *Astreotomyces sindenis* stain 251-128 Exhibiting broad spectrum Antimicrobial Activity. *Resears. J. of. Boil. Scien.* **4(10):** 1085- 1091.
- **Odds F. C., (1995).** Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull. Soc Fr. Microbiol.* **10 (4):** 285-293.
- **Omura S., Tanaka J (1986).** Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. *In:* Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G (Eds), *Regulation of secondary metabolites. VCH Publishers Inc. Berlin.* 306-332pp.
- **Oskay M,Tamer A-U and Azeri C (2004).**Antibacterial activity of same actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric J Biothec.***3:** 441-446.
- **Ottow J. C.G. and Math H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **16:** 170-171
- **Perry J.J., Staley J.T. et Lory S. (2004).** *Microbiologie. Cours et questions de révision.*Dunod, (Paris). pp. 494-369.
- **Pizzul. L. (2006).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède).
- **Pridham, T.G. and Gottlieb, D.J. (1968).** The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.,* **56:** 107-114.
- **Pullen C., Schmitz P., Meuer K., Bamberg D. D., Lohman S., De Castro França S et al., 2002.** New and bioactive compound from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta.* **16:** 162-167.
- **Remya M, Vijayakumar R (2008).** Isolation and characterization of marine Antagonistic actinomycetes from weat coast of India. *Med and Biol.***15:**13-19.

Références bibliographiques

- **Ruan J.I.S., Lechevalier M.P., Jiang C.L. et Lechevalier H.A. (1985).** *Chainia kunmingensis*, a New Actinomycete Species Found in Soil. *Inter J. Syst Bacteriol.* p. 164-168.
- **Saadoun I., Rawashdeh R., Dayeh T., Abadneh Q. et Mahasneh A. (2007).** Isolation Characterization and Screening for Fiber Hydrolytic Enzyme-Producing Streptomycetes of Jordanian Forest Soils. *Biotechnology*, **6(1)**: 120-128.
- **Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9** : 147-153.
Saccharothrix algeriensis Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and*
- **Sanasam S., Ningthoujam D.S. (2010).** Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian J. Biotechnol.* **2**: 139-145.
- **Sanchez S., Demain A. L. (2002).** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy. Microbiol. Technol.* **31**: 895-906.
- **-Sanglier J .J (1990).** –Mycotoxines, mycoses et mycoallergies .in : Moisissure utiles et nuisibles : importance industrielle. Botton B. (Eds). *2nd édition, Paris,Masson. PP.* 437-453.
- **Sanglier J. J et Trujilo M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12.** (13).
- **Sanglier J.J, Haag T.A., Huck T.A. and Fehr T. (1993).** Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **5**: 207-223.
- **Shirling. E.B; and Gottlieb. D. (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **16 (3)**: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. *Antonie Van. Leeuwenhoek.* **23**: 15-22.
- **Singleton P. (1994).** Bactériologie.Masson. France.
- **Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.

Références bibliographiques

- **Souagui S. (2009).** Sélection de souches d'actinomycètes modérément halophiles productrices de substances antibiotiques. Mémoire de Magister Université Bejaia.
- **Srivibool R. and Sukchotiratana M. (2006).** Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **28**: 493-499.
- **Strub. C; Brandam. C; Meyer. X and Lebrihi. A. (2008).** Investigations of
- **Sturdikova M., Sturdik E. 2009.** Natural products of origin and their perspectives in the discovery of anticancer. *Acta Chgmica Slovaca.* **2** : 63-74.
- **Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y. (1994).** A screening system for antiviral compounds against Herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L929 cells. *Tohoku. J. Exp. Med.,* **176** : 163-171.
- **Takahashi A., Kurasawa S., Ikeda D., Okami Y. and Takeuchi T. (1989).** Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance I. Taxonomy, fermentation, isolation and physicalchemical and biological properties. *J. Antib.,* **42**, 1556–1561.
- **Takahashi Y., Omura S. 2003.** Isolation of new actinomycete stains the sceening bioactive compounds. *Journal of Genitic Appleid Microbiology.* **49**: 141-154.
- **Tanaka Y. (1992).** Fermentation processes in screening for new biozactive substances, dans «The search for bioactive compounds from microorganisms» 303-325 pp. Spring-Verlag, New York, (Ed).
- **Terrell C.L. Goa k.L. Barradell L.B (1999).** Antifungal agents. Part II. *The azoles. Mayo; Clin. Proc.* **74**: 78-100.
- **Ventura. M; Canchaya. C; Tauch. A; Chandra. G; Fitzgerald. G. F; Chater. K. F; and van Sinderen. D. (2007).** Genomics of *Actinobacteria*: Tracin g the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev,* **71 (3)**: 495–548.
- **Vincent JL, Bihari dj, suter PM, et al. (1998).** The prevalence of nosocomail infection in intensive care units in Europe. Results of European Prevalence of in Intensive care (EPIC) Study.EPIC International Advisory Committee. *Jama;* **274** : 639-44.
- **Von Dohren H. et Grafe U. (1997).** General aspect of secondary metabolism. In: Rehm H.J., Reed G (Eds.) *Biotechnology: products of secondary metabolism, Vol. 7, 2nd Eds. VCH/Wiley, Weinein, pp. 2-55.*

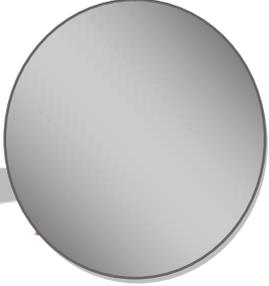
Références bibliographiques

- **Walsh C., (2000).** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406**: 775-81.
- **Wang L., Zhang Y., Huang Y., Maldonado L.A., Liu Z., et Goodfellow M., (2004)** *Nocardia pigrifrangens* sp. nov. A novel actinomycete isolated from a contaminated agar plate. *Inter. J. and Evol. Microbiol.* **54**: 1683-1686.
- **Watve. M.G ; Tickoo. R ; Jog . M.M ; Bhole. B.D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus streptomyces? *Arch. Microbiol.* **176**: 386-390.
- **Willams S.T. and Cross T. (1971).** Methods in microbiology. Academic press, Londre. **4**: 295-334.
- **Xue Q (2009).** Classification et la tolérance au sels des actinomycètes dans l'eau de lac dans Quinghai et le sol salin(lackde) . *Jof subst devl.2* :107-110.
- **Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb. N° 91*.
- **Yamagushi T. (1965).** Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **89**: 444-453.
- **Yilma S., Cannon-Sykora J., Samoylov A., Loc T., Liu N., Brinker C. J., Neely W. C. and Vodyanoy V. (2008).** Large-conductance cholesterol–amphotericin B channels in reconstituted lipid bilayers. *Biosensors Bioelectron.* **22**: 1359–1367.
- **Zaitlin B and Watson S-B (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odor in drinking water: Myths tenets and truths. *Water Research.* **40**:1741-1753.
- **Zerizer H, Oulma L, Boughachiche F, Righioua S, Boudemagh A, Kitouni M and Boulahrouf A (2006).** Identification d'une actinomycetale, productrice d'antibactériens, isolée de sols Arides de la région de Biskra. *Sien Tech.***24** : 17-22.
- **Zhitang L., Wang L., Zhang Y., Shi Y., Liu Z., Quintana E.T., et Goodfellow M., (2003).** *Actinomadura catellatispora* sp. nov., and *Actinomadura glauciflava* sp. nov., from a sewage ditch and soil in southern China. *J. Syst and Evol Microbiol.* **53**: 137-142.
- **Zitouni A. (2005).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat.
- **Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N., (2005).** *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in

Références bibliographiques

Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiol.* **156**: 984–993.

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

Annexe 

Annexe I.

I. Le matériel analytique

Ampoule a décanté; Microscope optique (*Optika*); Plaque agitatrice chauffante; evapeurateur rotatif BÜCHI ROTAVAPOR R-114; Spectrophotomètre Shimadzu UVmini. 1240; Spectrophotomètre UV-visible « *Analytik Jen Specord UV 260* »; Centrifugeuse « Sigma » ; Spatule; Vortex; Autoclave ; Bain marré ; Micro pipette ; Agitateur rotatif ; Four Pasteur ; Bec bunsen ; Plaques CCM ; Etuve ; balance; pipete Pasteur ; la loupe.

II. LES MILIEUX

1. Milieu de production d'antibiotiques :

➤ Milieu WILLIAMS modifié (Williams et Kuster, 1964)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl: (2 ou 50g); K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; glucose : 1g ; eau distillée : 1000 ml. pH: 7,2.

➤ Milieu GAUSS Eau de mère (GEM)

Amidon : 20g ; KNO₃ : 1g ; K₂HPO₄ : 0, 5g ; NaCl : 0,5g ; MgSO₄, 7 H₂O : 0,5g ; FeSO₄, 7 H₂O : 0,01g ; Agar: 20g; Glucose: 1g; eau de mère: 500ml. pH: 7,2.

➤ Mincer Eau de mère (MEM)

Amidon : 10g ; extrait de levure : 4g ; peptone : 2g ; Agar : 20g ; eau de mère : 500ml ; pH : 7, 2.

➤ Muller-Hinton (MH)

Extrait de viande : 3g ; Hydrolysat de caséine : 17,5g ; amidon : 1,5g ; agar : 16g ; pH : 7, 3.

➤ Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande : 1g ; extrait de levure : 2,5g ; peptone : 5g ; NaCl : 5g ; agar : 15g. pH: 7.

III. MILIEUX D'IDENTIFICATION

1. Etude morphologique

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

1.1. Milieu ISP1

Tryptone: 5g; extrait de levure: 3g ; agar: 15g; eau distillée:1000 ml. pH = 7,2

1.2. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g; au distillée 1000 ml; agar: 20g. pH : 7, 2.

1.3. Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 ml ; agar: 20 g ; eau distillée : 1000 ml. pH 7, 2.

* Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.1 g ; eau distillée 100 ml.

Annexe I.

1.4. Milieu ISP4

Amidon: 10 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄, 7H₂O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; CaCO₃: 2 g ;
Solution saline standard (voir ISP3): 1 ml; agar: 20 g; eau distillée 1000 ml. pH 7, 2.

1.5. Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (Athalye *et al.*, 1981)

Extrait de levure: 10g; glucose: 10g; agar: 18g; eau distillée: 1000 ml. pH = 6,8.

2. Etude physiologique

2. 2.1. Dégradation des glucides et dérivés

-Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂ S₀₄: 2,64g ; KH₂PO₄: 2,38g ; K₂HPO₄: 5,65g; MgSO₄, 7H₂O : 1g; Solution saline*: 1 ml; eau distillée: 1000 ml; agar: 20g; pH: 6,8-7.

Solution saline: CuSO₄, 5H₂O: 0,64g; FeSO₄, 7H₂O: 0,11g; MnCl₂, 4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0.15 g; eau distillée: 1000 ml.

2. 2.2. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80: 10 ml; NaNO₃: 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline: 50 ml; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g; eau distillée : 1000 ml; agar : 18 g. pH : 7,2.

*solution saline: K₂HPO₄: 0, 25g; MgSO₄, 7H₂O: 0,125 g; NaCl: 0,125 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,00 1 g; MnSO₄: 0,00 1 g; eau distillée :50 ml.

La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

2. 2.3. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon *et al.*, 1974)

0,4g 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.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

2. 2.4. 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. 2.5. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

4g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.

2. 2.6. Dégradation de la caséine du lait (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. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3, 6 g d'agar sont parallèlement autoclavés.

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

L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

2. 2.8. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

Annexe I.

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2 g, NaCl: 2 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g;

(NH₄)₂HPO₄: 1 g; KH₂PO₄: 0,5g; agar: 15 g; eau distillée q. s. p. 1000 ml; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04%: 20 ml, pH 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

2. 2.9. Production de pigments mélanoides.

Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K₂HPO₄: 0,5 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,5 g; NaCl: 0,5 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 ml; agar: 18 g; eau distillée q. s. p. 1000 ml. pH 7, 2.

2. 2.10. Production de nitrate réductase

La recherche du nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess.

Résumé

Dans ce travail, 91 souches d'actinomycètes isolées à partir de 2 stations d'épuration (Bejaia et Aoukas) qui ont fait l'objet d'un screening pour leur aptitude de production d'antibiotiques, et ce, sur 4 milieux de culture (GEM, MEM, M₂ et M₂ à 5% en NaCl) par le test des cylindres d'agar. 13 souches ont été sélectionnées dont seul 5 ont été choisies, pour leurs importantes activités antimicrobiennes vi-à-vis des germes cibles testés (4 bactéries à Gram positif, 4 à Gram négatif, *C. albicans* et *Aspergillus niger*). Ces isolats ont fait objet de tests d'identification se basant sur leur morphologie, chimiotaxonomie et leur physiologie, suivis de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide des isolats STA19(4), SAT10, STA11 et S23 par la méthode des puits et la recherche des antifongiques polyéniques dans les extraits organiques.

Les milieux M₂ à 5% de NaCl et GEM se sont révélés meilleurs pour la production d'antibiotiques tandis que celui MEM est favorable pour la synthèse des antifongiques par STA10, STA11 et STECB3 sur *C. albicans*. Les tests d'identifications révèlent que les isolats STA19(4), STECB3, STA10 et S23 peuvent être rattachés (avec beaucoup de précaution) au genre *Actinomyces* et STA11 au genre *Agromyces*.

Le test des puits indique une activité des extraits butanoliques des souches STA19(4), SAT10 et S23) à l'égard d'au moins un seul germe cible parmi ceux testés et le spectre UV-visible de ces extraits actifs ne montre aucun pic caractéristique des polyènes.

Mots clés : Actinomycètes, Screening, Production d'antibiotiques, Identification, non polyéniques

Abstract

In this study 91, strains of actinomycetes are isolated from two sewage station (Bejaia and Aoukas) have been screened for their ability to produce antibiotics, and, on four culture media (GEM, MEM, M2 and M2 to 5% NaCl) by the agar cylinders test. 13 strains which have been selected. Only 5 were selected for their significant antimicrobial activity against tested germs (4 Gram positive bacteria, 4 Gram negative one, *C. albicans* and *Aspergillus niger*). These isolates were identified according to the morphology, chemotaxonomy and physiology, followed by the detection of antimicrobial activity in liquid medium from STA19 (4), SAT10, STA11 and S23 isolates and the search for non-polyenes antifungal in the organic extracts.

The M2 medium with 5% of NaCl and GEM was best for the production of antibiotics while the MEM is favorable for the synthesis of antifungal by STA10, STA11 and STECB3 against *C. albicans*. The identifications of selected isolates revealed that STA19 (4), STECB3, STA10 and S23 can be attached (very carefully) to the genus *Actinomyces* and STA11 to *Agromyces* one.

The wells test indicates activity of butanolic extracts of STA19 (4), and SAT10 S23 strains against at least one microorganism among those tested and UV-visible spectrum of these active extracts d' not show peaks characteristics of polyenic antifungal.

Keywords: Actinomycetes, Screening, production of antibiotics, identification, no-polyenic.

Résumé

Dédicaces

Avec l'aide du bon DIEU, le tout puissant, ce travail est achevé ; Je dédie ce modeste travail à tous les personnes qui me sont chères :

A ma très chère grande mère que dieux la garde encor Longtemps.

Aux deux êtres les plus chères au monde qui ont donné sens à mon existence, et qui m'ont soutenu nuits et jours et durant tout mon parcours. Ma très chère mère quia consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman

À Celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands hommes : mon père soient toujours en bonne santé et à mes cotés

A mes très chers sœur pour leurs disponibilités, leurs soutien moral et leurs encouragement incessant que le dieu les protègent et leurs donnent une vie pleine de réussite et de bonheur

A ma tente et sa famille surtout Youcef et Farah

Résumé

A mes ancles et leurs famille surtout les petites Houda, Chaima et Iman

A mes chers cousins et cousines Samia, Zineb, Nabila Slimane Samir et Lhacene

Mes dédicaces ne seront pas complets sans cites mes copines Ferial, Souhila, Lila, Kahina, Bania, Safia, Saida Sabrina et Radia