

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



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

Département de Microbiologie

# Mémoire

Présenté par

M<sup>elle</sup> AMIR Akila

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Microbiologie

# Thème

**Activité antagoniste de deux souches de  
Streptomyces à l'égard d'une nouvelle collection de**

*Soutenue le : 02/07/2015*

*Devant le jury composé de*

**Noms et prénoms**

**Grade**

M <sup>me</sup> BEDJOU Fatiha	Professeur	UAMB	Président
M <sup>r</sup> . KECHA Mouloud	Professeur	UAMB	Rapporteur
M <sup>r</sup> . TOUATI Abdelaziz	Professeur	UAMB	Examineur
M <sup>r</sup> . NABTI El-Hafid	Maître de conférences « A »	UAMB	Examineur

**Année universitaire : 2014 - 2015**

# Remerciements

*Je commence par remercier Dieu, le tout puissant, le miséricordieux de m'avoir donné la force et la patience pour pouvoir mener ce travail à terme.*

*J'exprime ma profonde gratitude à mon promoteur le professeur M<sup>r</sup> KECHA M. de m'avoir facilité la réalisation de ce mémoire, en mettant à ma disposition tout ce dont j'ai besoin et pour les conseils qu'il m'a prodigué tout au long du travail.*

*Je remercie le professeur M<sup>me</sup> BEDJOU F. pour l'honneur qu'elle m'a fait de présider ce jury. Le professeur TOUATI A. et M<sup>r</sup> NABTI E.H. pour avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Je remercie le docteur M<sup>r</sup> HANED, chef du Laboratoire de Microbiologie au Centre Hospitalo-Universitaire de Bejaia (Targa Ouzemmour), pour son accueil, son aide et sa confiance ce qui m'a permis de réaliser la moitié de la partie pratique de mon mémoire. Ainsi que tous les membres de l'équipe du laboratoire pour leur soutien et leur politesse.*

*Je remercie tout le personnel de la polyclinique Tizoul en particulier le personnel du laboratoire pour leur compréhension et leur soutien.*

*Un immense merci également à l'équipe du laboratoire de microbiologie appliquée particulièrement Kamilia, Ouardia, Ibtesam, Yasmine, lamia, Siham et Hamza. Aux techniciens du laboratoire Mounia, Nassima et Nabila; et à tous ceux, qui à un moment ou un autre, m'ont prodigué des conseils scientifiques, fourni une aide matérielle ou technique, ou soutien moral.*

*Je remercie vivement mon frère Nadir et son épouse Hassiba.*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères.*

*À ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne  
de confiance.*

*À ceux qui m'ont soutenu nuit et jours, et durant tout mon parcours*

*À vous très chers parents, je vous dis **merci**.*

*À mon grand frère Abdelghanie et son épouse Lynda.*

*À mon frère Nadir et son épouse Hassiba.*

*À mon frère Farouk et son épouse Meriem*

*À mes petits anges adorables mes nièces ASMA et NELIA et mes neveux*

*ELIAS, ANIS ET AMINE*

*À mes grands-parents*

*À mes oncles et tantes*

*À mes cousins et cousines*

*À toutes mes amies Warda, Samira, Siham, Lamia, Hafida, Linda, ..... .*

*À ma promotion. En souvenir de notre apprentissage ensemble, je vous souhaite  
plein succès à tous.*

*Qu'ils trouvent ici l'expression de profonde gratitude.*

*AKILA*

# Glossaire

**Cystite**, Inflammation aiguë ou chronique de la muqueuse vésicale. Une cystite témoigne le plus souvent d'une infestation par des germes pathogènes, des bacilles (*Escherichia coli* [colibacillose], *Proteus mirabilis*) ou, plus rarement, par un champignon (*Candida albicans*). © Larousse 2006

**Urétrite**, Inflammation de l'urètre, essentiellement d'origine infectieuse. L'urétrite atteint surtout l'homme jeune. Selon le germe en cause, on distingue plusieurs formes d'urétrite, dont les symptômes communs sont un écoulement urétral, des brûlures locales, accentuées à la miction, et parfois une fièvre. © Larousse 2006

**Prostatite**, Infection aiguë ou chronique de la prostate. Une prostatite est une infection génito-urinaire fréquente affectant les hommes de tous âges, avec une fréquence particulière chez les jeunes adultes. © Larousse 2006

**Épididymite** Inflammation aiguë ou chronique de l'épididyme, le plus souvent d'origine infectieuse. Isolée, l'épididymite est exceptionnelle ; elle est presque toujours associée à une orchite (inflammation du testicule). © Larousse 2006

**Pyélonéphrite** Infection aiguë, subaiguë ou chronique du bassinet et du tissu interstitiel d'un rein, beaucoup plus rarement des deux. La plus fréquente des pyélonéphrites est la pyélonéphrite aiguë. © Larousse 2006

**Pyélite** Inflammation aiguë, subaiguë ou chronique des parois du bassinet du rein, le plus souvent d'origine infectieuse. © Larousse 2006

**Idiophase** : Période de la culture microbienne durant laquelle des métabolites secondaires sont produits (**Larpent, 1989**)

**Sclérotés** : Ils se présentent sous la forme de masses mycéliennes compactes, souvent très dures, globuleuses, ellipsoïdales ou allongées. Ils sont considérés comme des organes de conservation (**Theileux, 1993**).

**Synnemata** : Appelées également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Les synnema ou coremie définissent aussi des colonnes d'hyphes stériles. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema* (**Theileux, 1993**).

**Trophophase** : Période de la culture microbienne caractérisée par une croissance cellulaire active et la production de métabolites primaires (**Larpent, 1989**)

## *Liste des abréviations*

**µl:** Microlitre

**ATCC:** American type collection culture

**CA-SFM:** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CHU:** Centre Hospitalo-universitaire

**cm:** Centimètre

**DO:** Densité optique

**g:** Gramme

**h:** Heure

**L3, L4 et L5:** Vertèbres

**M2:** Milieu Williams

**min:** Minute

**ml:** Millilitre

**mm:** Millimètre

**NCCLS:** National committee for Clinical Laboratory Standards

**nm:** Nanometer

**NRRL:** Northern Regional Research Center, USA

**OMS:** Organisation Mondiale de Santé

**RM:** Rouge de Méthyle

**UFC:** Unité Formant Colonie

**VP:** Vosges-Proskauer

**ENS:** Ecole Normal Supérieur

**SNV:** Science de Nature et de Vie

**Rf:** Rapport frontal

**UV:** Ultra-violet

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes.	15
<b>Figure 2:</b> Pourcentage de genres trouvés dans le pus.....	42
<b>Figure 3:</b> Photographie montrant l'aspect de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	47
<b>Figure 4:</b> Cultures sur milieu chromogène d'orientation.....	50
<b>Figure 5 :</b> Proportion des bactéries responsables des infections urinaires.....	51
<b>Figure 6:</b> la résistance des bactéries à gram négatif aux différents antibiotiques utilisés.....	59
<b>Figure 7:</b> la résistance des bactéries à gram positif aux différents antibiotiques utilisés.....	59
<b>Figure 8 :</b> Activité antagoniste de la souche de la BS30 par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis <i>S. aureus</i> 7932 (a), <i>E. faecalis</i> ATCC (b), <i>P. mirabilis</i> 8491 (c), <i>Candida albicans</i> 521 (d), <i>Aspergillus carbonarius</i> A731 (e) et <i>Mucor rammanianus</i> NRRL 1829 (f).....	65
<b>Figure 9:</b> Taux de germes cible sensibles et résistants aux molécules bioactives synthétisées par la BS30.....	66
<b>Figure 10:</b> Activité de la BS30 sur les bactéries.....	67
<b>Figure 11:</b> Activité de la BS30 vis-à-vis de bactéries Gram négatives.....	68
<b>Figure 12 :</b> Activité de <i>Streptomyces</i> sp. BS30 vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> .....	69
<b>Figure 13:</b> Activité de la BS30 vis-à-vis <i>K. pneumoniae</i> par la méthode des cylindre d'agar.....	71
<b>Figure 14:</b> Illustre les activités antibiotiques de la souche étudiée vis-à-vis <i>Proteus mirabilis</i> par la méthode des cylindres d'agar.....	72
<b>Figure 15:</b> Activité de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 vis-à-vis les bactéries Gram positives.....	73
<b>Figure 16 :</b> Activité de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> 7932 et <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	74
<b>Figure 17:</b> Activité de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 vis-à-vis <i>Candida albicans</i> 521.....	75
<b>Figure 18:</b> Activité de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 vis-à-vis les moisissures.....	76
<b>Figure 19:</b> Cinétique de la croissance de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 sur milieu liquide.....	79
<b>Figure 20:</b> Cinétique du pH de la souche BS30.....	80

---

<b>Figure 21:</b> Mise en évidence de l'activité de la <i>Streptomyces</i> sp.SY-BS30 sur milieu liquide testée par la méthode des disques. (A) sur <i>Listeria innocua</i> Clip 74915, (B) sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> 2750.....	80
<b>Figure 22 :</b> Cinétique de la production de la BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram positives.....	81
<b>Figure 23 :</b> Cinétique de la production de la BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram négatives.....	81
<b>Figure 24:</b> Milieux de culture utilisés dans l'optimisation.....	84
<b>Figure 25:</b> Effet de solvants d'extraction sur les germes cibles.....	89
<b>Figure 26:</b> Effet des extraits bruts butanoliques sur les germes cible.....	90
<b>Figure 27 :</b> Effet de l'extrait butanolique sur les bactéries à Gram positives.....	92
<b>Figure 28:</b> Effet de l'extrait butanolique sur les bactéries à Gram négatives.....	93
<b>Figure 29:</b> Aspect des substances actives sous la lumière UV.....	95
<b>Figure 30:</b> Chromatogramme des substances de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30.....	96

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I:</b> Germes responsables de la méningite bactérienne .....	05
<b>Tableau II:</b> Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.....	14
<b>Tableau IV:</b> Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes.....	16
<b>Tableau X:</b> Microorganismes cibles utilisés.....	35
<b>Tableau XI:</b> Profil de résistances des <i>S. aureus</i> isolées des prélèvements de pus.....	44
<b>Tableau XII:</b> Profil de résistances des <i>Escherichia coli</i> isolées des prélèvements de pus....	45
<b>Tableau XIII:</b> Profil de résistances des <i>P. mirabilis</i> isolées des prélèvements de pus.....	45
<b>Tableau XIV:</b> Profil de résistance des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
<b>Tableau XV :</b> Le profil de résistances des bactéries et levures isolées des prélèvements de leucorrhée.....	47
<b>Tableau XVI:</b> le profil de résistance des <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées des urines.....	52
<b>Tableau XVII:</b> Le profil de résistance des <i>Escherichia coli</i> isolées des urines.....	52
<b>Tableau XVIII:</b> Le profil de résistances des <i>Proteus mirabilis</i> isolées des urines.....	53
<b>Tableau XIX:</b> Le profil de résistances des coques Gram positives ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>saprophyticus</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> ).....	54
<b>Tableau XX :</b> Le profil de résistances des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
<b>Tableau XXI:</b> Le profil de résistances les bacilles Gram négatifs ( <i>Serratia marscencens</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Shigella sonnei</i> ).....	55
<b>Tableau XXII:</b> Caractéristiques culturelles des colonies de la <i>Streptomces</i> sp. BS30 et de la <i>Streptomces</i> sp. SY-BS5 sur M2 à différents pH.....	59
<b>Tableau XXIII:</b> Caractéristiques culturelles des colonies de la <i>Streptomces</i> sp. BS30 et <i>Streptomces</i> sp. SY-BS5 à différentes concentration de NaCl.....	61
<b>Tableau XXIV:</b> Activité antimicrobienne contre les <i>E.coli</i> .....	67
<b>Tableau XXV :</b> Activité antimicrobienne contre les <i>K. pneumoniae</i> .....	69
<b>Tableau XXIV:</b> Activité antimicrobienne contre les <i>P. mirabilis</i> .....	71
<b>Tableau XXV:</b> Activité de la <i>Streptomycetes</i> BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram positif.....	73
<b>Tableau XXVI:</b> Germes retenues pour l'activité antagoniste de la BS30.....	75

**Tableau XXVII:** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) par souche cible en fonction des concentrations en amidon et caséine.....84

## *ANNEXE*

**Tableau III:** Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes..... *annexe 2*

**Tableau VI :** Classification des antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne... .. *annexe 2*

**Tableau VII :** Classification des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes..... *annexe 2*

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

GLOSSAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

**Introduction** .....01

## **PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE I: RETROSPECTIVE SUR LES ACTINOMYCETES : ECOLOGIE, TAXONOMIE ET IMPORTANCE**

<b>1. Généralités</b> .....	03
<b>2. Ecologie des actinomycètes</b> .....	03
<b>3. Taxonomie et critères de classification</b> .....	04
3.1. Systématique des actinomycètes .....	04
3.2. Critères d'identification .....	04
3.2.1. Critères morphologiques .....	04
3.2.2. Critères chimiques .....	05
3.2.3. Critères physiologiques .....	06
3.2.4. Critères moléculaires .....	06
<b>4. Importance des actinomycètes</b> .....	06
4.1. Importance dans le domaine industriel .....	09
4.2. Importance dans le domaine agronomique .....	09
4.3. Autres rôles .....	09
<b>5. Le genre Streptomyces</b> .....	09

### **CHAPITRE II: LES METABOLITES SECONDAIRES ET FACTEURS INFLUENÇANT**

<b>1. Les antibiotiques</b> .....	11
<b>1.1. Définition des antibiotiques</b> .....	11
<b>1.2. Résistances aux antibiotiques</b> .....	12
<b>2. Facteurs influençant la biosynthèse des antibiotiques</b> .....	12
<b>2.1. Paramètres physico-chimiques</b> .....	12
2.1.1 Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation .....	12
2.1.2. Effet du taux de croissance .....	13
<b>2.2. Paramètres nutritionnels influençant la production des antibiotiques</b> .....	13

# **PARTIE I: EXPERIMENTALE**

## **MATERIELS ET METHODES**

<b>1. Collection de germes pathogènes</b> .....	15
<b>1.1. Prélèvement biologique</b> .....	15
1.1.1. Prélèvement du pus.....	15
1.1.2. Prélèvement des Leucorrhée (pertes vaginales) .....	16
1.1.3. Prélèvement du liquide céphalo-rachidien.....	16
1.1.4. Prélèvement des urines.....	18
<b>1.2. Identification des germes pathogènes isolés</b> .....	18
1.2.1. Coloration de Gram .....	18
1.2.2. Test de la Catalase.....	19
1.2.3. Test d'Oxydase.....	19
1.2.4. Galerie biochimique classique.....	19
1.2.6. Antibiogramme.....	20
<b>2. Etude des souches productrices de substances bioactives</b> .....	21
<b>2.1. Origine des souches</b> .....	21
<b>2.2. Revivification des actinomycètes</b> .....	21
<b>2.3. Préparation de l'inoculum des <i>Streptomyces</i></b> .....	21
<b>2.4. Etude de deux paramètres physiologiques de croissances</b> .....	22
2.4.1. Le pH.....	22
2.4.2. Effet de chlorure de sodium (NaCl).....	22
<b>2.5. Mise en évidence des activités antimicrobiennes des Streptomycètes testés</b> .....	22
2.5.1. Microorganismes cibles.....	22
2.5.2. Standardisation des inocula des germes cibles .....	23
<b>2.6. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide</b> .....	23
2.6.1. Technique des cylindres d'Agar .....	23
<b>2.7. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide</b> .....	24
2.7.1. La technique des puits .....	24
2.7.2. Technique des disques.....	24
<b>2.8. Cinétique de la production et de la biomasse</b> .....	25
2.8.1. Cinétique de croissance par mesure du poids sec.....	25
2.8.2. Cinétique de production par mesure du diamètre de la zone d'inhibition.....	25
<b>2.9. Optimisation de la production des molécules bioactives par la BS30</b> .....	25
2.9.1. Choix du milieu de production .....	25
2.9.2. Détermination des teneurs optimales des sources d'azote et de carbone.....	26
<b>2.10. Analyse statistique</b> .....	26
<b>2.11. Extraction et purification partielle des molécules bioactives synthétisés</b> .....	26
2.11.1. Extraction à partir d'une culture sur milieu liquide.....	26
2.11.2. Extraction à partir d'une culture sur milieu solide .....	27
<b>2.12. Purification partielle des substances bioactives sur chromatographie couche mince</b> .....	27

## *Résultats et discussion*

<b>1. Collection de germes pathogènes</b> .....	30
<b>1.1. Prélèvement, isolement, identification des germes pathogènes</b> .....	30
1.1.1. Examen bactériologique de pus.....	30
1.1.2. Examen cyto bactériologique de leucorrhée .....	35
1.1.3. Examen cyto bactériologique de liquide céphalorachidien (LCR).....	37
1.1.4. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU).....	37
<b>1.2. Antibiogrammes des bactéries identifiées</b> .....	44
<b>2. Etude des souches productrices de substances bioactives</b> .....	46
<b>2.1. Etude de deux paramètres physiologiques de croissances</b> .....	47
2.1.1. Croissance à différents pH .....	47
2.1.2. Teneur en chlorure de sodium (NaCl) .....	49
<b>2.2. Mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches <i>Streptomyces</i> sp. BS30 et de la <i>Streptomyces</i> sp. SY-BS5</b> .....	51
2.2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar .....	51
2.2.2. Mise en évidence de l'activité antibiotique de la <i>Streptomyces</i> sp. BS30 sur milieu liquide .....	64
<b>2.3. Optimisation de la production des molécules bioactives par la souche <i>Streptomyces</i> sp. BS30</b> .....	70
<b>2.4. Extraction des substances bioactives de <i>Streptomyces</i> sp. BS30</b> .....	75
<b>2.5. Détection et semi-purification des antibiotiques</b> .....	81
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	84
<b>Référence bibliographiques</b> .....	86
<b>Annexes</b>	

## Introduction

La résistance aux antibiotiques, bien que n'étant pas un phénomène nouveau, est actuellement un problème majeur de santé publique dans le monde. Depuis plusieurs dizaines d'années, les bactéries communément impliquées en pathologie humaine ont développé des mécanismes de résistance vis-à-vis de tout nouvel antibiotique (**Rolain et Berrazeg, 2014**). Parmi ces bactéries, plusieurs souches sont recensées: *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM), *Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine (VRE) ainsi que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (**Livermore, 2004**). L'exemple le plus marquant de ces dernières années est l'émergence des carbapénémases chez les bactéries à Gram négatif, des enzymes qui confèrent une résistance à quasiment toutes les bêta-lactamines, dont les carbapénèmes (**Rolain et Berrazeg, 2014**).

Il est à noter que près d'un quart des décès dans le monde résulte de maladies infectieuses et un nombre grandissant d'infections est provoqué par des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques (**Mukhopadhyay et al., 2008**). La surconsommation directe de ces molécules ou indirecte via l'élevage agricole en est la principale cause. Bien que ce phénomène illustre l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, il est devenu une préoccupation majeure de l'humanité. Ainsi, la production de nouvelles molécules «bioactives» sur les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles fait l'objet de plus en plus de projets de recherche interdisciplinaires.

Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques reste absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules. La solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (**Madigan et Martinko, 2007; Saisivam et al., 2008**).

Vue la complexité de la structure chimique des molécules bioactives, le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives consiste à chercher ces molécules notamment celles produites par des microorganismes. Les actinomycètes du genre *Streptomyces*, sont les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques (**Wael Hozzein et al., 2011**).

Les actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* sont connus comme étant de grands producteurs d'antibiotiques.

Un des objectifs de notre étude est de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques produites par deux souche de *Streptomyces* isolée localement et appartenant à la collection du laboratoire LMA. Les stratégies de recherche de nouveaux antibiotiques passent, en premier lieu, par la mise en évidence des différentes activités sur milieu solide, et l'utilisation de bactéries résistantes aux antibiotiques comme germes tests, ce qui peut aboutir à la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles.

La présente étude vise également à mettre en place une collection de germes pathogènes isolés au niveau du CHU (Bejaia) dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne de deux souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS05 vis-à-vis de ceux-ci.

Ce document comprend trois parties: La première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinomycètes en général (écologie, taxonomie et importance) et sur les *Streptomyces* et aux antibiotiques synthétisés par ce genre en particulier. La seconde partie consiste à présenter les méthodes utilisées pour les prélèvements et la collecte des germes, le suivi et la mise en évidence des activités antimicrobiennes, l'extraction des substances actives produites et enfin la caractérisation partielle de ces dernières. La troisième partie porte sur la discussion des résultats obtenus.

## 1. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées à coloration de Gram positive (Nanjwad *et al.*, 2010), formant des colonies à morphologie complexe, avec un coefficient de Chargaff (G+C%) supérieur à 55%, à plus de 70% chez les *Streptomyces* et *Frankia*. Ils se développent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison de leur rôle dans la synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stéroïdes,....etc.

Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression « ray fungi » ou « champignons rayonnants » (Lamari, 2006). Ils sont souvent confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Gazengo *et al.*, 1998) ainsi que leur morphologie fongoïde: filament ramifiés, organe de sporulation (Reponen *et al.*, 1998).

Les actinomycètes sont généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif. Ces bactéries sont hétérotrophes ou chimiotrophes mais la plupart sont des chimio-hétérotrophes capables d'utiliser une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes (Zimmerman, 1990). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990). Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés (Crawford, 1993), et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine et les résidus des plantes dans le sol (Lacey, 1997).

## 2. Écologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires rencontrés sur tous les substrats naturels courants (Lacey, 1973; Mangamuri *et al.*, 2011). Ils représentent le groupe de microorganismes le plus largement distribué dans la nature (Oskay *et al.*, 2004; Narayana *et al.*, 2008).

La grande majorité des actinomycètes est d'origine tellurique, environ 80 genres vivent principalement comme des saprophytes (Singh *et al.*, 2012). C'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers,

grains, canne à sucre,...etc) et dans des zones géographiques variées : l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (**Badji, 2006 ; Pataraya et al., 2008**). Leur nombre, est variable selon les biotopes, atteint souvent  $10^6$  UFC/g de terre (**Harvey, 1999, Pizzul, 2006**). Le genre *Streptomyces* représente plus de 95% des souches d'actinomycétales isolées dans la plupart des sols (**Williams et Vickers, 1988 ; Isik et al., 2014**).

Dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60% et parfois jusqu'à 85% de la microflore totale. Ce pourcentage augmente jusqu'à 91% dans les horizons situés entre 1 et 2m de profondeur avec une prédominance des *Streptomyces* et parfois des *Actinomadura*, des *Micromonosporan* et des *Nocardioides* (**Sabaou et al., 1992, 1998**). D'autres genres peu fréquents à rares dans le monde, tels que *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora* sont retrouvés parfois en quantités appréciables dans les sols des palmeraies (**Sabaou et al., 1998; Boudjella, 2007**).

### 3. Taxonomie et critères de classification

#### 3.1. Systématique des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries rattachées au phylum *Actinobacteria*, lequel réunit des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage élevé en « guanine-cytosine » (supérieur à 55%). Leurs cellules tendent à se ramifier en formant un mycélium plus ou moins différencié (**Manual Bergey's, 2012**).

La taxonomie des actinomycètes repose actuellement sur l'étude des critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires.

#### 3.2. Critères d'identification

##### 3.2.1. Critères morphologiques

Ils permettent de distinguer les principaux genres entre eux et englobent les caractéristiques culturelles et micromorphologiques, à savoir, le type du mycélium aérien (MA) (fragmenté ou pas) et/ou le substrat (MS), la présence ou non de sporophores sur le mycélium, la présence ou non de sporanges, de sclérotés ou de synnemata, la présence de spores, leur taille, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes, leur nombre et l'ornementation de leur surface (spores lisses, rugueuses, épineuses, chevelues), et enfin, la production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS). Parfois, il est possible de classer une souche dans un genre donné en se basant sur des critères micromorphologiques

tout à fait évidents et particuliers comme par exemple pour les genres: *Micromonospora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*,... etc (**Manual Bergey's, 2012**).

### 3.2.2. Critères chimiques

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

Les études effectuées par Cummins et Harris (1956), Roman et Nickerson (1956) et Hoare et al. (1957) citée par **Becker et al.** (1965) ont établi que les actinomycètes avaient une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif et ont également indiqué que la composition chimique de la paroi cellulaire pourrait fournir des méthodes pratiques afin de différencier les genres d'actinomycètes.

**Becker et al.**(1965), **Yamaguchi** (1965) et **Lechevalier et Lechevalier** (1970) divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires. Le tableau II définit les chimiotypes selon lesquels a été établie cette classification.

Les acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont l'acide diamino-pimélique (forme isomérique LL ou méso DL), qui peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diamino-butérique; la glycine peut être présente ou absente (**Holt et al, 1994**).

Les couples arabinose-galactose, xylose-arabinose, rhamnose-galactose, ou encore le madurose (3-O-méthylgalactose), ont une importance taxonomique certaine (**Lechevalier et Lechevalier, 1970; Holt et al., 1994**).

Les lipides cellulaires tels que les acides mycoliques pariétaux (présence ou absence), ainsi que les phospholipides et les ménaquinones membranaires (détermination du type) sont aussi importants pour l'identification des actinomycètes (**Mordarska et al., 1972; Lechevalier et al., 1977; Collins et al., 1980**).

**Tableau II:** Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes

Chimiotype	D.A.P.		Gly.	Lys.	Orn.	D.A.B.	Sucres			
	LL	DL					Ara.+Gal.	Xyl.+Ara.	Rha.+Gal.	Mad.
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
III C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	+	v	-	+	-	-	-	-
VIII	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

I, II, III, ..., VIII: définis par Becker *et al.* (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diamino pimélique (DAP), la présence ou non de glycine (Gly.), de lysine (Lys.), de l'ornithine (Orn.) ou de l'acide diamino butyrique (DAB).

A, B, C, D et E: définis par Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants: l'arabinose (Ara.), le galactose (Gal.), le xylose (Xyl.), le madurose (Mad.) et le rhamnose (Rha.).

(+): présent. (-): absent. v: variable suivant les espèces d'un même genre.

### 3.2.3. Critères physiologiques

Ils sont basés sur la dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, etc.), de résistance aux agents antimicrobiens et à divers agents physico-chimiques (pH, température, salinité, etc.), et de plusieurs tests enzymatiques.

Les caractères physiologiques discriminants permettent de différencier les espèces appartenant à un même genre. Ces critères ne sont cependant pas suffisants, pour l'identification des espèces, car ils doivent être complétés par des études moléculaires. (Athalye *et al.*, 1985; Meyer, 1989).

### 3.2.4. Critères moléculaires

L'hybridation ADN/ADN a été réalisée pour la détermination des espèces (Wayne *et al.*, 1987, Euzéby, 2002), et le séquençage de l'ADN ribosomique 16S (pour l'identification des genres et des espèces) par la méthode de Stackebrandt *et al.* (1983) et le pourcentage GC% (Stackebrandt et Woese, 1981). Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes.

## 4. Importance des actinomycètes

La différenciation morphologique des *Streptomyces* est accompagnée d'une différenciation métabolique. En effet, à la fin du cycle biologique, les *Streptomyces*

produisent un grand nombre de métabolites secondaires tels que les antibiotiques, herbicides, pesticides, antiparasites et enzymes (**Hozzein et al., 2011**), possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien. Les *Streptomyces* sont d'une grande importance dans l'industrie pharmaceutique, du fait de la diversité considérable des composés biologiques actifs qu'ils produisent (**Thomson et al., 2004**).

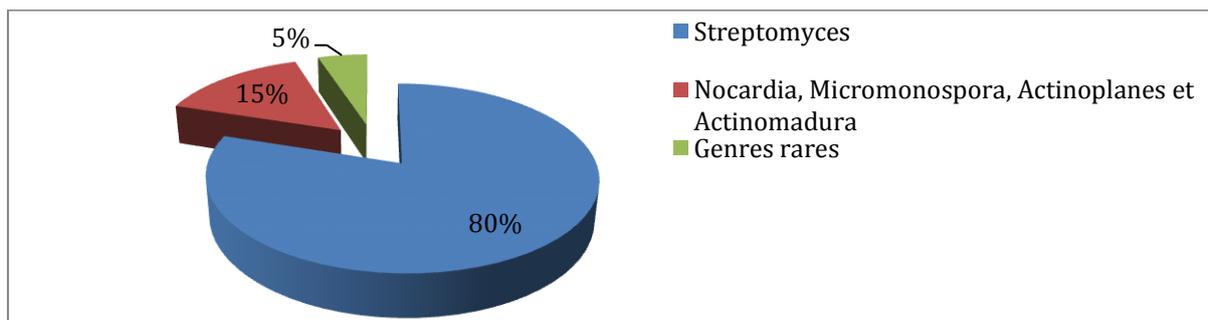
#### 4.1. Importance dans le domaine industriel

##### 4.1.1. Production d'antibiotiques

Les actinomycètes ont la particularité, pour un très grand nombre d'entre eux, de produire des antibiotiques. Depuis la découverte de la streptomycine par Waksman en 1943, des centaines d'antibiotiques ont été isolés des actinomycètes et particulièrement de *Streptomyces*. En effet, ce genre est, de loin, le plus grand producteur (Figure 1).

Près de 20% des antibiotiques sécrétés par les streptomycètes ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ont des propriétés assez diverses: antibactériennes, antibactériennes et antifongiques à la fois, antihelminthes,...etc. (**Buckingham, 1997**). Le tableau III (annexe 2) regroupe quelques antibiotiques produits par les actinomycètes (**Loucif, 2011**).

De nombreuses autres molécules sont également élaborées par ces microorganismes; certaines sont à activité antitumorale (carcinostatine, adriamycine, anthramycine, daunomycine, anthracycline, etc.), herbicide, antiparasite comme l'antimalaria (distamycine), anticoccidienne, insecticide (avermectine, polyoxines, mylébémicine, etc.), antivirale (mutactimycines) (**Perry et al., 1990; Raty et al., 2002**) et acaricide (altemicidines) (**Vandamme, 1985; Bycroft, 1988**).



**Figure 1** : Pourcentages d'antibiotiques produits par les principaux genres d'actinomycètes (**Okami et Hotta, 1988**).

(Les pourcentages sont donnés par rapport au total des antibiotiques d'origine actinomycétales).

#### 4.1.2. Production d'autres substances

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits d'intérêt industriels synthétisés par les actinomycètes. Certaines sont utilisées en industrie agro-alimentaire (ex : glucose isomérases) et dans les détergents (protéases) (Moreira, 2002). Les glycosidases jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases et xylanases), animales et fongiques (chitinases). D'autres enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, cholestérol oxydase), ou vétérinaires comme additif nutritionnel pour le bétail (Oestergaard *et al.*, 2001). Des molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques sont également produites par les actinomycètes (tableau IV). Umezawa (1988) rapporte qu'une molécule produite par *S. tsukubaensis* possède une activité immunosuppressive semblable à celle de la cyclosporine, utilisée dans la chirurgie de la transplantation des organes. Des antihistaminiques (Kase *et al.*, 1986; Ohmori *et al.*, 1988), des antiviraux (Kim *et al.*, 1998), des substances utilisées en neurothérapie (trouble du système nerveux central et dégénérescence des neurones) (Murakata *et al.*, 1998; Eder *et al.*, 2002), sont également produits.

**Tableau IV:** Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes (Loucif, 2011).

Actinomycète producteur	Molécules bioactives	Références
1/ Les agents antiparasitaires		
<i>Streptomyces</i> sp.	Trioxacarcine	Maskeyet <i>al.</i> , 2004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Prodiginine	Williamson <i>et al.</i> , 2006
2/ Les agents antiviraux		
<i>Streptomyces antibioticus</i>	9- $\beta$ -D-arabino-furanosyladénine	Madigan <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptomyces</i> sp.	Panosialine	Aoyagi <i>et al.</i> , 2006
3/ L'agent hypocholestérolémique		
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Rapamycine	Chen <i>et al.</i> , 1999
4/ Les agents antitumoraux		
<i>Nocardia asteroides</i>	Asterobactine	Nemotoet <i>al.</i> , 2002
<i>Salinispora tropica</i>	Salinosporamide A	Fenicalet <i>al.</i> , 2006
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Mechercharmucine	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
<i>Marinospora</i> sp.	Marinomycine	Kwon <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces</i> sp.	Borrelidine	Vino et Lokesh, 2008
<i>Actinomadura</i> sp.	IB-00208	Malet-Cascon, <i>et al.</i> , 2009
5/ Les agents immunostimulateurs		
<i>Nocardia rubra</i>	Rubratin	De boer <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Bestatine	Ichinose <i>et al.</i> , 2003
<i>Kitasatosporia kifunense</i>	FR-900494	Iwamiet <i>al.</i> , 2006
6/ Les agents immunosupprimeurs		
<i>Streptomyces filipinensis</i>	Pentalenolactone	Uyedaet <i>al.</i> , 2001
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Brasiliocardine A	Komatsu <i>et al.</i> , 2005
7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale)		
<i>Streptomyces</i> sp.	L- asparaginase	Saleem Basha <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	L- glutaminase	Balagurunatha <i>et al.</i> , 2010

## 4.2. Importance dans le domaine agronomique

Les actinomycètes ont un rôle important dans la biodégradation et le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité à dégrader des substances complexes et incapables d'être décomposées par les bactéries non mycéliennes et les champignons: les polymères complexes, les polysaccharides, les lignines, les celluloses, la chitine, la kératine...etc (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Ils participent donc activement à la fertilisation des sols (**Goodfellow et Williams, 1983**).

## 4.3. Autres rôles

Les actinomycètes sont impliqués dans la dégradation des hydrocarbures (**Dixit et al., 2000**) et du phénol dans les déchets des industries textiles et des teintures (**Bhathena et al., 2002**). Certaines espèces d'actinomycètes se sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et de réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaires (**Holzappel et al., 2002**).

## 5. Le genre *Streptomyces*

Les actinomycètes sont divisés en plusieurs genres en fonction d'un ensemble de caractères morphologiques (du mycélium, des conidies, des sporanges et d'autres structures) et biochimiques (la composition en acides aminés de la paroi cellulaire, en glucides, en lipides et en acides nucléiques (G+C%)). A partir de ces critères, la classification de Bergey's, 2012 répartit les actinomycètes en plusieurs groupes parmi lesquels on distingue le groupe 29 des Streptomycètes et genres apparentés.

Selon le **manuel Bergey's, (2012)**, les *Streptomyces* appartiennent au phylum des Actinobacteria (phyl. Nov) à la classe des Actinobacteria, à l'ordre des Streptomycetales (ord.nov), à la famille des Streptomycetaceae, où il représente le genre majoritaire (95,34 %). Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses trouvées dans différents environnements, principalement dans les sols. Etant des microorganismes immobiles, ils doivent faire face à des conditions environnementales changeantes. Pour se développer, ils doivent rivaliser avec d'autres micro-organismes pour les éléments nutritifs présents dans le milieu (**Sánchez et al., 2010**). Leurs spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables. Dans certains cas il n'y a pas de production de spores, le mycélium alors se fragmente et donne naissance à de nouveaux hyphes.

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies strictes, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria* (**Stackebrandt et al., 1997**). Ils possèdent un métabolisme oxydatif (**Hodgson, 2000**). La présence de l'acide LL diaminopimelique et de glycine et l'absence de sucres caractéristiques est typique pour ce type de paroi cellulaire (**Stackebrandt et Schumann, 2006**).

Les *Streptomyces* possèdent un ADN chromosomique linéaire de grande taille (>8 Méga base (Mb) en moyenne) ayant une composition en bases G et C élevée (% GC de 66 à 78%) (**Madigan et Martinko, 2005**), et génétiquement très instables (nombreuses mutations) (**Dary et al., 1992**).

## 1. Les antibiotiques

### Historique

La plupart des molécules employées pour le traitement des maladies infectieuses bactériennes sont des antibiotiques (du grec anti : contre et bios : vie). Le mot "antibiotique" fut utilisé pour la première fois en 1889 par Paul Vuillemin, qui proposa également le terme "antibioté" pour les micro-organismes qui provoquent l'antibiose. La découverte de la Pénicilline par Fleming, 1929 a ouvert la voie à d'autres recherches.

La période allant de 1944 à 1960 appelée "âge d'or des antibiotiques", fut marquée par la mise en évidence des principaux antibiotiques, tels que la streptomycine (1944), la chlorotétracycline (1945), le chloramphénicol (1947), la néomycine (1949), l'oxytétracycline (1950), etc. Cette période est caractérisée par le développement des premières méthodes de screening (**Singh et Barrett, 2006**).

La période entre 1960 et 1970 fut celle de la fabrication des antibiotiques semi-synthétiques, obtenus par modifications chimiques ou enzymatiques des molécules naturelles. L'antibiothérapie se trouva par la suite confrontée aux problèmes des effets secondaires des traitements et aux phénomènes de résistance de plus en plus importants de souches pathogènes (**Singh et Barrett, 2006**).

Durant les années 70, l'amélioration des méthodes de criblage et des techniques de purification des antibiotiques et la diversification des genres de microorganismes producteurs, a conduit à l'augmentation du nombre d'antibiotiques nouveaux: 180 à 300 par année selon **Perlman (1977)**. Actuellement le nombre d'antibiotiques naturels d'origine microbienne avoisine les 7500 molécules.

#### 1.1. Définition des antibiotiques

Ce sont des produits du métabolisme secondaire à faible masse moléculaire (**Sánchez et al., 2010**), généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (**Bu'lock, 1965**), non essentiel à la croissance des organismes producteurs, mais très important pour la santé humaine. Ils ont des structures atypiques. Leur production résulte d'intermédiaires intracellulaires. Ils sont condensés en plusieurs structures complexes par des voies biochimiques définies. Leur synthèse peut être influencée par la concentration de substances nutritives et la composition de milieu de culture (**Sánchez et al., 2010**).

Selon leur mode d'action sur les cellules, les antibiotiques sont bactéricides ou bactériostatiques (**Canu et Peter, 2001**). Pour qu'il soit utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte. Selon **Yala et al., 2001** les antibiotiques sont définis par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

## 1.2. Résistances aux antibiotiques

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à sa cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques par plusieurs mécanismes. La même souche bactérienne peut cumuler plusieurs mécanismes:

- En se rendant imperméable à leur pénétration;
- En produisant des enzymes capables de les inactiver (Les  $\beta$ -lactamases, Les céphalosporinases);
- En modifiant la structure de leurs cibles (modification des protéines liant les pénicillines (PLP) ; modification du précurseur du peptidoglycane ; modification du ribosome), diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne, la mise en place ou la multiplication de systèmes d'efflux.

Ces résistances peuvent être naturelles ou acquises consécutivement à des modifications chromosomique ou plasmidique (mutations spontanées (20% des résistances) ou échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon (80 % des résistances)).

## 2. Facteurs influençant la biosynthèse des antibiotiques

### 2.1. Paramètres physico-chimiques

#### 2.1.1 Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation affectent énormément la production des métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**). Selon **Asanza-Ternuel et al., 1997**, Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre

la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline et un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline. L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolite secondaire. La concentration en oxygène dissous est un paramètre important dans la production de métabolites secondaires.

### 2.1.2. Effet du taux de croissance

Beaucoup d'antibiotiques semblent être produits à faible taux de croissance le cas pour *Saccharopolyspora erythraea*, *S.hygroscopicus*, *S.clavuligerus*. C'est difficile de déterminer le rôle du taux de croissance dans l'initiation de la synthèse de métabolites secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle. Autrement dit, une limitation nutritionnelle provoque systématiquement une diminution du taux de croissance, alors il n'est pas possible de faire la différence entre l'effet de limitation nutritionnelle et l'effet du ralentissement du métabolisme primaire (**Strub, 2008**).

## 2.2. Paramètres nutritionnels influençant la production des antibiotiques

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 (**Strub, 2008**) particulièrement chez les actinomycètes. Les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement la production d'antibiotique. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotiques en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (**Martin et Demain, 1980**).

### 2.2.1. Influence des sources carbonées

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou (effet glucose)) (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990**). La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (**Lebrihi et al., 1988 ; Lounès et al., 1995**) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (tableau VIII Annexe 2)

### 2.2.2. Influence des sources azotées

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les

actinomycètes, cela se traduit par un effet de la concentration d'un substrat naturel approprié ou sous forme d'acides aminés lentement métabolisés (tableau IX annexe 2) (Loucif, 2011).

### 2.2.3. Influence des sources de phosphate

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate variant 0,3 à 300 Mole, la synthèse de très nombreux métabolites secondaires est inhibée par des concentrations trop élevées (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990). Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les actinomycètes. Non seulement il affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (Gersh *et al.*, 1979 ; Dekleva *et al.*, 1985).

### 2.2.4. Influence des sources de sels minéraux et d'oligoéléments

Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est souvent ajouté pour maintenir le pH aux environs de la neutralité. Plusieurs chercheurs utilisent le  $\text{CaCO}_3$  pour favoriser la croissance bactérienne et augmenter la biomasse cellulaire, et par la même, la production d'antibiotiques.

Le NaCl, augmente la perméabilité membranaire ce qui renforce l'approvisionnement de la cellule en précurseurs d'antibiotiques. Par exemple, la production de streptomycine et de la tétracycline est améliorée par l'addition de 0,5% et de 1% de NaCl respectivement, alors que des concentrations plus élevées répriment la biosynthèse.

La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles environ ( $10^{-7}\text{M}$ ), parmi lesquels certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques (Strub, 2008)

Le présent travail a été réalisé en deux parties, la première a été effectuée au laboratoire d'analyses médicales de la maternité de Targa Ouzemmour (Centre Hospitalo-universitaire Bejaia) pour collecter des souches pathogènes. La deuxième au Laboratoire de Microbiologie Appliqué (LMA) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia qui a consisté à tester l'activité de deux souches d'actinomycètes productrices de substances bioactives appartenant à la collection de LMA vis-à-vis des souches collectées.

## **1. Collection de germes pathogènes**

### **1.1. Prélèvements biologiques**

Divers prélèvements biologiques ont été effectués à savoir:

#### **1.1.1. Prélèvements du pus**

Ils ont été réalisés par écouvillonnage sur des abcès ouverts. Ils consistent, d'abord, à nettoyer la périphérie de la plaie par de l'eau physiologique, puis, l'échantillon est prélevé sur les traces purulentes. En leur absence, le prélèvement a été effectué au fond de la plaie qui est peu accessible aux contaminants. Deux écouvillons ont été réalisés pour chaque prélèvement, un pour l'examen direct après coloration et l'autre pour la culture. Dans le cas où l'abcès est fermé le pus est recueilli par une seringue, après désinfection superficielle à l'alcool (**Raoult, 2013**).

Les prélèvements sont acheminés, immédiatement, au laboratoire d'analyse médical de la maternité. Ils sont analysés dès l'arrivée ou conservé à +4°C.

##### **1.1.1.1. Examen bactériologique de pus**

L'écouvillon a été incubé dans 0,5ml de bouillon nutritif pendant 15min afin de revivifier les germes prélevés. Ces derniers ont été ensemencés sur milieu de culture de base (gélose nutritive) et sur de milieu chromogène d'orientation [CHROMagar Orientation (BD)] pour la détermination des germes banaux. Alors que la gélose au sang frais et la gélose au sang cuit ont été utilisés pour les bactéries exigeantes en anaérobiose. Des milieux sélectifs ont été utilisés selon l'aspect des bactéries à la coloration de Gram, ou selon l'indication clinique.

- Milieu Chapman: Staphylocoques ;
- Milieu Hektoen: Entérobactéries.

Les milieux aérobies ont été incubés à 37°C pendant 18 à 36 h à 37°C, alors que les milieux anaérobies l'ont été de 2 à 5 jours à la même température.

### 1.1.2. Prélèvement des Leucorrhée (pertes vaginales)

L'examen cyto bactériologique des leucorrhées a consisté à prélever des cellules endocervicales par brossage. Puis les cultures ont été effectuées sur un milieu spécifique pour la recherche des Chlamydiae et de mycoplasme.

*N.B.: Ces prélèvements sont effectués par le patient lui-même en différents endroits de l'appareil génital. Après nettoyage soigneux de l'exocol, un écouvillon a été introduit jusqu'à la cavité fusiforme de l'endocol et, par un frottement léger et prolongé, l'écouvillon va collecter des sécrétions cervicales et des cellules endocervicales.*

Ces prélèvements ont été transportés rapidement pour être ensemencés car le gonocoque et les anaérobies ne supportent pas les transports prolongés. **(Raoult, 2013).**

#### 1.1.2.1. Examen cyto bactériologique de leucorrhée

##### a. Examen macroscopique

Cet examen consistait à révéler la couleur, l'odeur et le pH des sécrétions vaginales qui sont des éléments important du diagnostic.

##### b. Examen bactériologique

La culture a été faite sur gélose nutritive, gélose chromogène d'orientation [CHROMagar Orientation (BD)], sur gélose au sang cuit pour la recherche des *Neisseria gonorrhoeae* incubée en anaérobiose, sur gélose au sang frais pour la recherche de divers bactéries à Gram positif dont *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* et sur gélose Hektoen pour la recherche des Gram négatifs, en particulier les entérobactéries qui ne seront prises en considération que si elles sont abondantes, en l'absence d'autres germes.

Les cultures aérobies ont été incubées de 18 à 36 h à 37°C, alors que les milieux anaérobies l'ont été de 2 à 5 jours à la même température.

### 1.1.3. Prélèvement du liquide céphalo-rachidien

Dans le diagnostic d'une méningite aiguë l'examen cytochimique du liquide céphalo-rachidien (LCR) permet de reconnaître ou de suspecter une étiologie bactérienne justifiant un traitement antibiotique immédiat.

Les ponctions lombaires ont été réalisées avec une asepsie rigoureuse. Elles sont pratiquée par un médecin spécialiste entre les vertèbres L4 et L5 ou entre L3 et L4. 3ml de LCR ont été recueillis dans 3 tubes stériles en verre numérotés qui ont servi respectivement à

l'examen biochimique, microbiologique et cytologique. Pour la parasitologie-mycologie, en particulier pour la recherche de Cryptocoques, un prélèvement supplémentaire a été effectué. L'acheminement du LCR vers le laboratoire doit se faire sans délai et à l'abri de la lumière.

#### **a. Examen bactériologie**

##### **• Examen direct après coloration de Gram**

Un frottis a été préparé avec une goutte du culot de centrifugation du LCR, fixé puis coloré au Gram. Le frottis est ensuite examiné au microscope, à l'objectif X 100 à immersion. Cet examen est très important car il permet un diagnostic étiologique présomptif rapide. Il est généralement positif à partir de  $10^4$  à  $10^5$  UFC/ml. Il permet d'identifier:

- Des diplocoques en grain de café, Gram négatif intra ou extra leucocytaire évoquant *Neisseria meningitidis* ou le méningocoque; Diplocoques à Gram positif, lancéolés en flamme de bougie, capsulés, parfois en courtes chaînettes évoquant le *Streptococcus pneumoniae* ou pneumocoque ;

- *Haemophilus influenzae* se présente comme des petits bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif, polymorphes.

##### **• Culture du LCR**

Les cultures ont été réalisées sur milieux gélosés riches (Gélose au sang cuit et frais) incubées dans des jarres d'anaérobiose, puis incubées à 37°C pendant 24 h à 5 jours.

#### **1.1.4. Prélèvement des urines**

Les prélèvements des urines ont été effectués sur des nourrissons par les infirmiers du service, après désinfections en utilisant des collecteurs stériles, l'urine est en suite transvasée dans un flacon stérile. Alors que les prélèvements sur les patients adultes ont été effectués par autoprélèvement sur flacon stériles, après sensibilisation sur la méthodologie à suivre.

##### **1.1.4.1. Examen cytobactériologique des urines**

###### **1.1.4.1.1. Examen bactériologique**

###### **a. Isolement des germes pathogènes à partir de matériel biologique**

Un volume de 0,1ml d'urine bien mélangée a été dilué dans 9,9ml d'eau distillée stérile, puis 0,1ml de cette dilution a été étalée sur une gélose nutritive avec un râteau préalablement stérilisé. Parallèlement, 0,1ml de la même dilution a été ensemencé sur un milieu sélectif Hektoen, sur milieu d'enrichissement (Gélose au sang) et sur milieu Sabouraud.

Les milieux ont été incubés de à 37°C pendant 18 à 36 h en conditions aérobies, alors que les anaérobies l'ont été de 2 à 5 jours à la même température en conditions anaérobies (jarre d'anaérobiose).

La numération s'est faite selon la formule de KASS :

$$N \text{ (bactéries /ml)} = n \cdot 10^2 \cdot 10$$

Avec n: Nombre de colonies sur la boîte.

$10^2$ : Inverse de la dilution.

10: Inverse de l'inoculum.

Le nombre de colonie (n) sur la boîte a été estimé comme suit :

- 1-9 colonies représente environs  $10^3$  Bactérie/ml: Culture négative (pas d'infection);
- 10-99 colonies représente environs  $10^4$  Bactérie/ml: Culture douteuse (Présence éventuelle d'une infection);
- plus de 100 colonies représente environs  $10^5$  Bactérie/ml: Culture positive (présence d'une infection urinaire) (KASS, 1960).

### 1.5. Identification des germes pathogènes isolés

L'identification est l'étape commune aux quatre prélèvements cités plus haut qui précède toujours l'antibiogramme. La colonie est prélevée à partir des cultures pures présentant des colonies différenciables par leur aspect, forme, taille, bord, surface et chromogénèse.

Au terme de la période d'incubation, l'aspect des colonies ayant poussées sur le milieu de culture utilisé est examiné. Si la culture est polymicrobienne, des repiquages successifs sont réalisés afin de purifier les souches isolées. L'identification des souches purifiées est réalisée sur la base de la coloration de Gram, la catalase, l'oxydase et la galerie biochimique classique.

#### 1.5.1. Coloration de Gram

L'échantillon a été étalé sur une lame et fixé à la chaleur suivi d'une coloration de Gram.

### **1.5.2. Test de la Catalase**

Pour ce test une colonie bactérienne a été étalée sur une lame de verre propre, une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène est par la suite ajoutée. L'apparition d'effervescence après 10 secondes de contact est témoin d'une réaction positive.

### **1.5.3. Test d'Oxydase**

Avec un écouvillon stérile, une à deux colonies de bactéries bien isolées ont été prélevées, 1 à 2 gouttes d'oxydase ont été versée sur l'écouvillon. Une réaction positive se traduit par le développement d'une couleur violette dans un intervalle de 10 à 30 secondes, dans le cas contraire la réaction est négative. Les résultats ne doivent pas être lus avant 30s pour éviter les faux positifs qui peuvent se développer.

### **1.5.4. Galerie biochimique classique**

#### **1.5.4.1. La recherche de la nitrate réductase**

Le bouillon nitraté permet de mettre en évidence la nitrate réductase qui réduit le nitrate  $\text{NO}_3$  en nitrite  $\text{NO}_2$ . Ce milieu a étéensemencé avec la suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant 24 à 48 h. La révélation s'est faite en ajoutant deux réactifs : NRI (Acide sulfamilique) et NRII ( $\alpha$  naphtylamine) et la lecture des résultats a été faite par rapport au changement de couleur du milieu (annexe 3).

#### **1.5.4.2. Fermentation des sucres et production de gaz**

La suspension bactérienne a étéensemencée en stries serrées toute en long de la pente et par piqûre centrale dans le culot de la gélose TSI, la lecture se fait après 18 h d'incubation à 37°C (annexe 3).

#### **1.5.4.3. Utilisation de citrate**

La pente de la gélose Citrate de Simmons a étéensemencée par des stries longitudinales par une suspension bactérienne. L'incubation a été effectuée à 37°C, pendant 24 h jusqu'à 7 jours pour certaines bactéries. L'utilisation du citrate se traduit par une croissance sur la pente et un virage de la couleur du milieu au bleu suite à son alcalinisation.

#### **1.5.4.4. Etude de la voie fermentaire (test RM et VP)**

Afin de mettre en évidence la voie de fermentation, le milieu Clark et Lubs a étéensemencé à partir de la suspension bactérienne et incubé à 37°C pendant 24 h. A l'issue de la période d'incubation, le contenu du tube est partagé dans deux tubes et la lecture s'est faite

après l'ajout des deux réactifs VPI (solution d'alcool :  $\alpha$  naphтол) et VPII (solution d'hydroxide de potassium) qui induisent le changement de couleur du milieu (Annexe 3).

#### **1.5.4.5. Etude de la mobilité et de la fermentation du mannitol**

Le milieu Mannitol-mobilité a été ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur puis incubé à 37°C pendant 24 h.

- La fermentation du mannitol se traduit par une coloration jaune du milieu.
- La mobilité est confirmée par la formation d'un voile qui diffuse de part et d'autre de la strie d'ensemencement.

#### **1.5.4.6. Recherche de l'uréase et de la production d'indole**

Ces deux paramètres ont été recherchés simultanément sur le milieu Urée-Indole. A partir d'une suspension bactérienne, le milieu Urée-Indole a été ensemencé puis incubé à 37°C pendant 24 h.

- La présence d'une uréase se traduit par le virage de la couleur du milieu au rose.
- La production d'indole se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface après ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs.

#### **1.5.4.7. Test de la Coagulase**

Plusieurs colonies bactériennes ont été mises en suspension dans 0,5ml de plasma, la réaction se produira plus rapidement si la suspension bactérienne est dense. L'incubation a été réalisée à 37°C et l'examen effectué après 2, 4, et 24 h. Si la réaction est positive au bout de 2 ou de 4 h, il n'est plus nécessaire d'incuber plus longtemps.

- Réaction positive : Gélification partielle ou totale du plasma.
- Réaction négative : Pas de prise en masse du plasma au bout de 24 h.

### **1.6. Antibiogramme**

Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en disque selon « la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale » (médecine humaine et vétérinaire, 2011), 6<sup>ème</sup> Edition du document édité en collaboration avec l'OMS. Les antibiotiques utilisés pour évaluer la sensibilité et la résistance des bactéries collectées sont énumérés dans l'annexe 3.

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, 3 à 5 colonies isolées et identiques ont été ensemencées dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne d'une

DO de 0,5 lue à 625 nm a été ensemencée sur milieu Mueller Hinton (annexe 3). Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont mesurés avec un pied à coulisse.

## **2. Etude de l'antagonisme des souches de *Streptomyces* productrices de substances bioactives vis-à-vis des germes collectés**

### **2.1. Origine des souches**

Afin de réaliser ce travail, deux souches d'actinomycètes du genre *Streptomyces* : *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS05 ont été utilisées. Les deux souches appartenant à la collection du LMA de l'université de Bejaia ont été isolées par M<sup>elle</sup> SOUAGUI Y. dans le cadre de sa thèse de doctorat, à partir d'un sol aride du sud Algérien [wilaya de Ghardaïa (BS5) et Boussaâda (BS30)].

Les souches montrent des caractéristiques typiques du genre *Streptomyces*. En effet, cela a été confirmé par une identification moléculaire sur la base du séquençage du gène ARNr 16S, une des séquences a été déposée dans la base de donnée GenBank sous le nom « *Streptomyces* sp. BS30 » et le numéro d'accèsion (JX845561).

Elles ont été conservées dans des tubes de gélose inclinée contenant le milieu Williams (M2), à 4°C et en plusieurs exemplaires.

### **2.2. Revivification des actinomycètes**

Les deux souches étudiées ont été mises dans un milieu liquide M2 afin de les revivifier, puis les ensemencements ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'un tapis bactérien bien chargé. La composition de ce milieu M2 modifié est donnée en annexe 4.

### **2.3. Préparation de l'inoculum des *Streptomyces***

Les deux souches de *Streptomyces* ont été cultivées sur milieu M2 dans des boites de Pétri puis incubées pendant 14 jours à 30°C. La suspension de cellule de *Streptomyces* a été préparée en ajoutant 15ml d'eau distillée stérile à chaque boite de Pétri et les colonies de *Streptomyces* ont été raclées avec une anse en platine. La suspension obtenue a été filtrée stérilement sur coton cardé qui retiendra le mycélium et laissera passer les spores. La suspension de spores a été ajustée avec de l'eau stérile pour avoir une DO égale à 0,3 à 540nm (Soares et al., 2007). L'inoculum a été préparé avant chaque utilisation (extemporanément).

## 2.4. Etude de l'influence deux paramètres physiologiques de croissance

### 2.4.1. Le pH

Les souches de *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp.SY-BS5 ont été ensemencées sur milieu M2 ajusté à différents pH 5, 6, 7, 8, 9, 10,11 et 12, en utilisant des solutions d'HCl et de NaOH. Après incubation à 30°C, la croissance de la souche a été évaluée chaque jour pendant 14 jours, en utilisant trois niveaux d'appréciation usuelle:

- 1/ Croissance faible ou absente (+/-).
- 2/ Croissance moyenne (colonies éparses) (++)
- 3/ Bonne croissance (tapis chargé) (+++).

### 2.4.2. Effet de chlorure de sodium (NaCl)

Afin de déterminer la concentration optimale de croissantes, les souches ont été cultivées sur milieu M2 contenant des concentrations croissantes en NaCl : 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7% (m/v). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 14 jours.

La croissance des souches a été évaluée visuellement chaque jour, en suivant les mêmes niveaux d'appréciation utilisés pour le test précédent.

## 2.5. Mise en évidence des activités antimicrobiennes des Streptomycètes testés

Pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des souches étudiées et essayer de cerner leur spectre d'activité, notre collection de 86 bactéries et 2 *Candida albicans* pathogènes isolées du CHU Targa Ozemmour, en plus 6 bactéries et 8 champignons filamenteux de référence ont été utilisés.

### 2.5.1. Microorganismes cibles

L'activité antibactérienne des souches de *Streptomyces* étudiées a été mise en évidence vis-à-vis des bactéries pathogènes collectées à partir de liquides biologiques des patients hospitalisés au niveau de CHU Targa Ozamour et de bactéries de références (ATCC) obtenues auprès de l'institut Pasteur d'Alger, L'activité antilevurienne a été testée sur *Candida albicans* isolées durant la première partie de notre travail expérimentale réalisée au CHU du Bejaia (voir chapitre I).

L'activité antimoississure des souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5 a été réalisée sur les champignons filamenteux de référence provenant de l'ENS Kouba ainsi que sur *Botrytis cinerea* provenant du laboratoire de mycologie de la faculté des

Sciences de la nature et de la vie de l'université de Bejaia. Les germes utilisés sont rapportés dans le tableau X ci-dessous.

**Tableau X:** Microorganismes cibles utilisés

Germes collectés	Bactéries de références	Moisissures de références
<p><b>Bactéries :</b>  <i>Serratia marcescens</i>  <i>Acinetobacter baumannii</i>  <i>Escherichia coli</i>  <i>Shigella sonnei</i>  <i>Proteus mirabilis</i>  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  <i>Klebsiella pneumoniae</i>  <i>Citrobacter diversus</i>  <i>Enterococcus faecalis</i>  <i>Staphylococcus aureus</i>  <i>Staphylococcus saprophyticus</i></p> <p><b>Levure :</b>  <i>Candida albicans</i></p> <p><b>Moisissure :</b>  <i>Botrytis cinerea</i></p>	<p><b>Bactéries Gram négatives :</b>  <i>Escherichia coli</i> ATCC 259322  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> <p><b>Bactéries Gram positives :</b>  <i>Listeria innocua</i> Clip 74915  <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633  <i>Staphylococcus aureus</i> (SARM) ATCC 43300  <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p><i>Aspergillus parasiticus</i> CB5  <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251  <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174  <i>Aspergillus carbonarius</i> A731  <i>Aspergillus niger</i> 939N  <i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829</p>

### 2.5.2. Standardisation des inocula des germes cibles

Après revivification des souches, un repiquage de chaque souche sur un milieu spécifique est effectué.

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions, accompagnée d'une mesure de la densité optique à 625 nm jusqu'à obtenir une DO allant de 0,08 à 0,1 (CA-SFM/EUCAST, 2014) de la solution mère suivie par un dénombrement sur boîte pour les bactéries et sur cellule de Malassez pour les moisissures (suspensions de spores). La charge de l'inoculum utilisé est de  $10^6$  UFC/ml pour les bactéries (Isu et Onyeagba, 2006) et *C. albicans* et de  $10^5$  spores/ml pour les champignons filamenteux (Matan et Matan, 2008).

## 2.6. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide

### 2.6.1. Technique des cylindres d'Agar (Tortorano *et al.*, 1979 ; Lee et Hwang, 2002)

Les souches de *Streptomyces* ont été ensemencées en stries serrées à la surface du milieu M2 à 2% de NaCl et à pH8. Après 10 jours d'incubation à 30°C, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte pièces à partir de ce milieu et déposés à la surface du milieu Muller Hinton (4 mm d'épaisseur) semi solide (8g

d'agar) préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries-tests, selon la technique de la **NCCLS, (2003)**. Les champignons à 5 jours d'incubation sont ensemencés à la surface de l'extrait de malt.

Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'agar sont placées deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles, les zones d'inhibition sont mesurées après 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 h à 28°C pour les champignons filamenteux.

## **2.7. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide**

Des pré-cultures sont préparées à partir des inocula d'une DO de 0.3 à 540nm de chacune des deux souches dans des tubes à essai contenant 5ml du milieu liquide M2, Après 3 jours d'incubation à 30°C, 5ml de la pré-cultures (à raison de 10%) ont été utilisés pour ensemencer 50ml du même milieu liquide contenant dans un erlenmeyer de 250ml. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 14 jours sous agitation à 250 rpm/min.

### **2.7.1. La technique des puits (cité par Nouasri, 1996)**

L'activité antimicrobienne est vérifiée par la méthode de diffusion des puits d'agar sur gélose nutritive molle (8g d'agar) pour les bactéries et sur gélose à l'extrait de malt pour les champignons filamenteux.

Deux cent microlitres de surnageant de culture sont déposés dans des puits de 6mm de diamètre. Ces derniers sont réalisés dans des boîtes de Pétri préalablement ensemencées avec le germe test à raison de  $10^6$  UFC/ml (bactéries) et à raison de  $10^5$  spores/ml (champignons). Les boîtes sont mises 2 h à 4°C afin de permettre la diffusion des substances bioactives tout en inhibant momentanément la croissance du germe-cible. Par la suite, les boîtes sont incubées 24 h à 37°C pour les bactéries et 48 à 72 h à 28°C pour les champignons filamenteux, le diamètre des zones d'inhibition des germes est ensuite mesuré. Toutes les zones d'inhibition autour des puits, même de faible diamètre, sont considérées comme résultats positifs.

### **2.7.2. Technique des disques (Barry *et al.*, 1970)**

Des disques de papier Whatman n°4 stériles de 6mm de diamètre imbibés avec deux cent microlitres de surnageant de culture par fractions, ont été prélevés dans des conditions stériles et séchés sous un courant d'air stérile. Les disques sont, ensuite, déposés sur gélose nutritive molle préalablement ensemencée par un microorganisme-test. Les boîtes sont incubées à 37°C après une pré-diffusion de deux heures à 4°C. La mesure des diamètres

d'inhibition est effectuée après 24 à 48 h d'incubation pour les bactéries et après 48 à 72 h à 28°C pour les champignons filamenteux.

La lecture des résultats est réalisée après 24 h. Toute zone d'inhibition de la croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

## **2.8. Cinétique de la production et de la biomasse**

L'étude de la cinétique de production des substances bioactives et de biomasse a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale.

Afin d'évaluer quotidiennement la cinétique en évitant la contamination des cultures, 14 cultures liquides ont été préparées.

### **2.8.1. Cinétique de croissance par mesure du poids sec**

Elle consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. Pour mesurer le poids sec de chaque échantillon, 10 ml de culture ont été prélevés et mis dans des godets préalablement séchés et tarés. Ensuite les tubes ont été centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min, le culot a été récupéré et lavé. Les godets ont été ensuite placés dans une étuve à 40°C pendant 24 h, puis pesés après refroidissement et déshumidification dans un dessiccateur.

Le poids sec ainsi déterminé est rapporté à un millilitre de volume de fermentation (exprimé en milligramme de matière sèche par millilitre de milieu de culture).

### **2.8.2. Cinétique de production par mesure du diamètre de la zone d'inhibition**

L'évolution de la production de molécules bioactives a été réalisée suivant la méthode précédente, le surnageant obtenu a servi pour la réalisation des tests d'activité antimicrobienne par la méthode des puits vis-à-vis des germes les plus sensibles (bactéries, champignons) révélés par la méthode des puits effectuée précédemment.

Le diamètre des zones d'inhibition autour des puits a été mesuré après 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48 h à 5 jours d'incubation à 28°C pour les champignons filamenteux.

## **2.9. Optimisation de la production des molécules bioactives par la BS30**

### **2.9.1. Choix du milieu de production**

Les cinq milieux de culture M2, ISP2, Bennett, GLM et AF avec divers sources d'azote et de carbone (voir annexe 2 pour la composition) ont été utilisés pour déterminer

celui qui permet d'obtenir une production optimale en substances bioactives. Les milieux solides ont été ensemencés par l'inoculum de la souche BS30 puis incubé à 30°C pendant 10 jours.

### 2.9.2. Détermination des teneurs optimales des sources d'azote et de carbone

Ce test a pour but de déterminer les teneurs optimales des deux éléments qui permettent une meilleure production des substances bioactives de la souche étudiée.

La production des substances antimicrobiennes par la souche de *Streptomyces* sp.SY-BS30 sur le milieu solide M2 à différentes concentrations en source de carbone (concentration d'amidon 8, 9, 10, 11 et 12g) et d'azote (concentration de caséine 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5g) a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar.

### 2.10. Analyse statistique

Les résultats de la présente étude ont été analysés avec le logiciel STATISTICA 5.5. L'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée avec un risque d'erreur de 5%.

### 2.11. Extraction et purification partielle des molécules bioactives synthétisés

#### 2.11.1. Extraction à partir d'une culture sur milieu liquide

Après avoir réalisé des cultures liquides sur Erlenmeyers pour la souche BS30 et l'obtention du filtrat de culture, une extraction par des solvants à différentes polarités a été effectuée sur le filtrat et le culot de culture liquide.

- **A partir du filtrat de culture (Badji *et al.*, 2006)**

Afin d'obtenir le meilleur taux d'extraction, quatre solvants de polarité croissante sont utilisés ; le n-hexane, le benzène, *n*-butanol et l'acétate d'éthyle. L'extraction des molécules bioactives a été réalisée en mélangeant le filtrat dans une ampoule à décanter avec un volume égal de solvant. La phase organique a été récupérée et concentrée à sec au rotavapeur à 40°C, puis reprise dans 3ml de méthanol. Le résidu a été stérilisé par filtration (filtre millipore 0,45µm).

- **A partir du mycélium**

La méthode utilisée est celle de **Mechlinski (1978)**. Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation à 3000 rpm pour se débarrasser des impuretés et autres résidus du milieu. Le culot mycélien est égoutté, et

immergé dans du méthanol (50 mg dans 1 ml de méthanol). Le mélange est homogénéisé par agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante.

L'extrait méthanolique est ensuite récupéré par filtration sous vide puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un Rotavapor. Le résidu sec a été repris dans 3ml de méthanol, stérilisé par filtration (filtre millipore 0,45µm).

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par antibiographie (méthode des puits). Le 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 24 à 48h d'incubation.

### **2.11.2. Extraction à partir d'une culture sur milieu solide (Pimentel-Elardo, 2010)**

La souche *Streptomyces* sp.BS30 a été cultivée sur milieu M2 et incubée à 30°C pendant 10 jours. La masse mycélienne avec le milieu ont été découpés en petits morceaux et macérés pendant une nuit dans 200 ml de n-butanol, la solution résultante a été filtrée en utilisant du papier filtre Whatman N°4 sous vide, le culot obtenu a été soumis à une deuxième extraction avec le n-butanol dans les mêmes conditions. Les deux filtrats obtenus ont été combinés et séchés par évaporation rotative. L'extrait sec du mycélium a été récupéré dans 3ml de méthanol.

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par antibiographie (méthode des puits). Le méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif.

## **2.12. Purification partielle des substances bioactives sur chromatographie couche mince**

### **2.12.1. Préparation des plaques de gel de silice**

Pour préparer la phase stationnaire (plaques de silices), 40 g de silice sont ajoutés à 100 ml d'eau distillée, le gel obtenu est instantanément étalé, de manière uniforme, sur des plaques en verre (20 x 20 cm) en utilisant l'étaleur de Desaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques ont été séchées durant une nuit à 37°C. Elles sont activées à 100°C pendant 1 h avant l'utilisation.

### **2.12.2. Développement des plaques et sélection du système d'élution**

Les cuves rectangulaires utilisées contiennent 100ml de solvants. L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures avec les vapeurs des solvants cités ci-dessous, avant l'introduction des plaques de silice.

Les systèmes de solvants utilisés sont :

- **B.A.E.** : *n*-Butanol - Acide acétique - Eau (60: 20: 20 ; (v: v: v)).
- **HDM** : *n*-Hexane - Dichlorométhane - Méthanol (70: 30: 4 ; (v: v: v)).
- **A.M.**: Acétate d'Ethyle - Méthanol (100: 15; (v: v)).
- **Ac.**: Acetone (100 (v))

100 µl des extraits butanoliques mycéliens ont été déposés sous forme de spots à 3 cm du bord inférieur des plaques (**Boudjella, 2007**). Ces derniers sont séchés sous un courant d'air entre chaque application pour donner la plus petite surface possible au dépôt. La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance avoisinant les 15 cm à partir du dépôt. Les plaques sont séchées avant de passer à la révélation des chromatogrammes. Les méthodes de révélation utilisées sont les suivantes:

- **Révélation sous lumière UV**

En exposant la plaque à une source de radiation UV de 365 nm (fluorescence) et de 254nm (absorption), certains composés apparaissent sous forme de tâches brillantes. Les tâches sont alors délimitées, ce qui permettra de situer les substances actives entre elles et par rapport aux composés non actifs. Ceci facilitera ultérieurement le processus de purification.

- **Révélation microbiologiques ou bioautographie**

La méthode utilisée pour la réalisation de la bioautographie est celle de **Betina (1973)**. Elle consiste, d'une part, à détecter les tâches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur rapport frontal R<sub>f</sub>, et d'autre part, à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de mieux séparer les antibiotiques entre eux ou des autres composés non actifs.

Les plaques de gel de silice sont placées à l'étuve (37°C) pour évaporer les solvants qui empêcheraient les microorganismes de croître. Chaque plaque est ensuite placée horizontalement sur des supports en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm) contenant à sa base un papier filtre imbibé d'eau stérile qui maintiendra une atmosphère humide et retardera ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est ensuite stérilisé sous UV à 254 nm durant 45 min. Parallèlement, 50 ml d'une gélose nutritive molle en surfusion (45°C), sontensemencés avec 1 ml d'une suspension de germe-test *Staphylococcus aureus*. Le milieuensemencé est réparti avec une pipette stérile sur les plaques de gel de silice sous forme de film fin et uniforme. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C.

La lecture se fait après 24 à 48 h. Les zones d'inhibition des tâches actives sont alors observées et le Rf (rapport frontal) substances actives est calculé selon la formule suivant :

$$Rf = \frac{\text{distance de migration entre dépôt et tâche active}}{\text{distance de migration entre dépôt et front du solvant}}$$

- **Révélation chimiques des molécules bioactives (Merck, 1975)**

Après avoir choisi le meilleur solvant de migration et déterminé les Rf des antibiotiques par bioautographie, d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations par des solutions chimiques cité ci dessous et ce, dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des molécules bioactives.

- **Le diphénylamine-aniline:** révélateur des glucides.

- **La ninhydrine:** révélateur des amines, des acides aminés et des oses amines.

- La vanilline-acide sulfurique:** révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles éthérées.

- **Le formaldéhyde-acide sulfurique:** révélateur des substances aromatiques polycycliques.

La surface des plaques est alors pulvérisée par les différents révélateurs chimiques. Les tâches apparaissent soit à froid, soit après un chauffage de 5 à 10 min à 100°C. Les différentes méthodes et la composition des révélateurs sont détaillées en annexe 5.

## 1. Collection de germes pathogènes

### 1.1. Prélèvement, isolement, identification des germes pathogènes

Cette partie est consacrée à l'isolement, l'identification et l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de germes pathogènes après leurs prélèvements et isolement.

Quatre-vingts seize prélèvements pathologiques humains ont été réalisés à partir des liquides biologiques (urine, pus, liquide céphalorachidien, leucorrhée), durant le mois de février de l'année 2014, au niveau de la maternité Targa Ouzemmour du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Bejaia. Le prélèvement est choisi en tenant compte du type de pathologie infectieuse, des espèces bactériennes les plus fréquemment mises en cause dans cette pathologie et des taux de résistance vis-à-vis des antibiotiques habituellement utilisés ou recommandés pour cette pathologie (Noussaira et Nicolas-Chanoinea, 2007).

Ces prélèvements biologiques ont permis d'avoir quatre-vingts et onze isolats. Soixante-quatre bactéries ont été trouvées dans les urines, vingt et une dans les pus et cinq dans les leucorrhées.

#### 1.1.1. Examen bactériologique de pus

Vingt et un prélèvements de pus ont été réalisés à partir de plaies chirurgicales (césariennes, fibromes), suppuration secondaire dues à des actes chirurgicaux (surinfections à bactéries opportunistes).

##### 1.1.1.1. Identification des germes isolés

Après avoir analysé les résultats obtenus lors des cultures sur différents milieux d'isolement, des colonies de petites formes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol ont été trouvées sur milieu Chapman. Elles sont sous forme de grosses colonies crémeuses sur gélose nutritive, correspondent aux staphylocoques. Des colonies lisses, brillantes, de structure homogène ont été constatées sur gélose nutritive révèlent la présence des Entérobactéries. Cependant, les *Proteus* ont envahi la gélose nutritive formant un tapis uniforme. Les *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ont la capacité de produire un pigment diffusible la pyocyanine (bleu-vert) et une odeur caractéristique aromatique de type seringa qui est souvent présente (Clave, 2011).

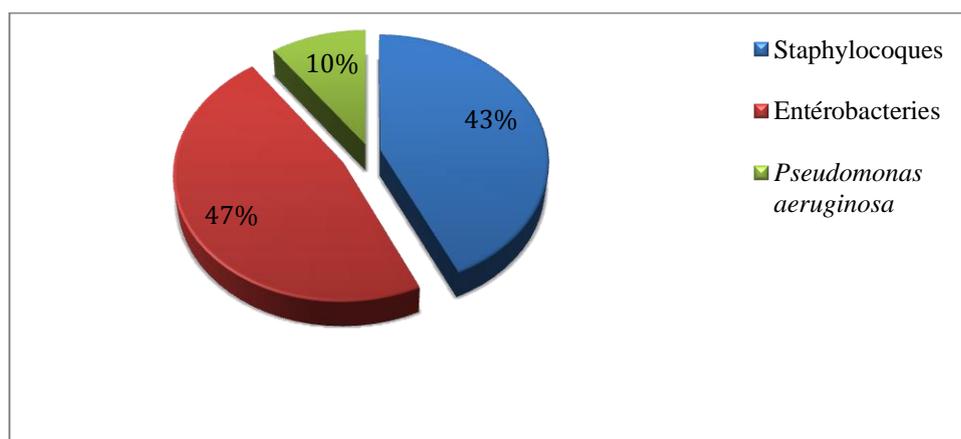
Les entérobactéries qui ont été mis en évidence sur milieu Hektoen sont *Escherichia coli* (*E.coli*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*). Les colonies d'*E.coli* sont de couleur jaune

saumon, celles de *P. mirabilis* sont vertes au centre noir, alors que celles de *Pseudomonas* sont petites de couleur bleues ou brunâtres.

Sur milieu chromogène d'orientation, *E.coli* a formé des colonies de couleur rose, *Proteus* des colonies de couleur blanche. Cependant, les cultures sur gélose au sang frais et cuit ont été négatives dues à l'absence des germes exigeants anaérobies.

Un ensemble de tests biochimiques et un certain nombre d'antibiotiques ont été utilisés pour la confirmation des espèces mis en évidence sur les milieux sélectifs cités précédemment. Le test de la coagulase a permis de séparer les *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) de tous les autres *Staphylococcus*. L'utilisation de l'antibiotique colistine, a permis de mettre en évidence l'espèce *P. mirabilis* car cette dernière est douée d'une résistance naturelle à cet antibiotique (Archambaud et Clave, 2004 ; CA-SFM, 2015)

L'étude bactériologique des prélèvements de pus a permis d'obtenir les genres suivant Staphylocoques, Pseudomonas et certain genre de la famille des Entérobactéries (Figure 2). Selon Denis *et al.* (2007), les bactéries les plus fréquemment isolées des infections des sites opératoires sont les coques Gram positif (Staphylocoques et Entérocoques), les bacilles à Gram négatif (Enterobactéries) et les bacilles à Gram négatif non fermentaire (*P. aeruginosa*). Ce qui est en accord avec ceux de la présente étude.



**Figure 2:** Pourcentage de genres trouvés dans le pus.

L'analyse des résultats a montré la prédominance de l'espèce *S. aureus* (43%) par rapport aux autres espèces ce qui corrobore les résultats trouvés par Schaechter *et al.* (1999). *S. aureus* est le germe le plus susceptible de produire du pus dans les blessures, c'est le représentant classique d'un groupe appelé « pyogènes », il peut être à l'origine d'infections sévères des tissus profondes (Schaechter *et al.*, 1999).

La présence d'*E.coli* dans les prélèvements de pus s'explique par sa capacité à provoquer 40% à 50% d'infections nosocomiales (Verhaegen, 2004), alors que la présence de *P. aeruginosa* est justifiée par son implication fréquente dans les infections opportunistes en médecine humaine (Minchella et al., 2010).

L'examen bactériologique a révélé la présence de culture mixte dans certains prélèvements de pus. Les cultures mixtes contenant plus de trois espèces bactériennes reflètent généralement une contamination, une colonisation ou un transport différé. Les prélèvements de morsure sont polymicrobiens. Si les plaies superficielles ou les prélèvements de la sphère abdominale contiennent plus de trois bactéries et qu'aucune ne soit prédominante, les cultures sont considérées mixtes en attendant la confrontation avec la clinique (Flandrois et al., 1988).

### 1.1.1.2. Antibiogrammes des germes isolés et identifiés

Après l'isolement et l'identification des bactéries, un antibiogramme a été réalisé afin d'évaluer leur résistance et leur sensibilité aux antibiotiques. Les résultats des antibiogrammes sont rapportés dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau XI:** Profil de résistances des *S. aureus* isolées des prélèvements de pus

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>S. aureus</i>	4735	OX1, TE, E15.	FA, P, FF, VA, TP, C.
<i>S. aureus</i>	SA-R	SP, E, FC, CN, RP, OX1, CIP, CD, GEN.	OX5, VA.
<i>S. aureus</i>	7932	P, OX1, E.	VA, Gm, DO, L, PT.
<i>S. aureus</i>	982	/ /	SP, E, FC, CN, RP, OFX1, OFX5, OX1, CIP, CD, VA, GEN.
<i>S. aureus</i>	4460	P,	C, FF, SXT, RA, PT, FA, TE, E15, VA, OX1, OX5.
<i>S. aureus</i>	4401	OX1, OX5, P, E.	VA, SXT.
<i>S. aureus</i>	193	COT.	SP, COT, E15, FC, CN, PP, OFX, OX1, CIP, CD.
<i>S. aureus</i>	1651	/ /	SP, COT, E15, FC, CN, PP, OFX, OX1, CIP, CD.
<i>S. aureus</i>	5481	Fa, P, TE.	OX <sub>1</sub> , OX <sub>5</sub> , PT, E, VA, C, RA, FF

Dans les prélèvements de pus, des *E.coli* sont révélées résistantes à un certain nombre d'antibiotiques. Le tableau ci-dessous montre les profils de résistances de ces isolats.

**Tableau XII:** Profil de résistances des *Escherichia coli* isolées des prélèvements de pus

Bactéries	Code	Résistantes à	sensibles à
<i>E. coli</i>	8424	/ /	CS, CN, AK, Cm, OTX, P, E, CTX, Cs, NA.
<i>E. coli</i>	9097	OTX, ORO, NA, Cip, Cs.	CTX, PFT, AK, SXT, C, TX, CN, CZ, Amc, CN.
<i>E. coli</i>	9624	/ /	Cip, C, Cs, AK, Na, FT, CTX, ORO, PEF, Cm, NA, SXT, CZ, Amc.
<i>E. coli</i>	9268	Amc.	Cip, Cs, AK, FT, CTX, ORO, C, PEF, Cm, NA, SXT, CZ.
<i>E. coli</i>	9590	Amc.	Cip, C, Cs, AK, Na, FT, CTX, ORO, PEF, Cm, NA, SXT, CZ, CN.

Les bactéries les plus fréquemment isolées des infections des sites opératoires sont les bacilles à Gram négatif (Enterobactéries) dont *P. mirabilis*. Les isolats de la présente étude montre des profils de résistances regroupés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII:** Profil de résistances des *P. mirabilis* isolées des prélèvements de pus

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>P. mirabilis</i>	6741	Amc, Cs.	Gm, AK, C, ORO, CN, FT, OTX, CZ, Na, CTX, PEF, SXT, Cip.
<i>P. mirabilis</i>	2460	FT, Cs.	C, SXT, CZ, CN, Amc, ORO, Cip, AK, Na.
<i>P. mirabilis</i>	8617	ORO, Cs, FT.	C, Cm, AK, Amc.
<i>P. mirabilis</i>	5482	Cs, CZ, CN, Amc.	Gm, AK, PEF, Na, ORO, C, Cip, CTX, OTX.
<i>P. mirabilis</i>	5419	FT, C, Cs, SXT, CZ.	CN, Amc, ORO, Cip, AK, Na.

**Tableau XIV:** Profil de résistance des *Pseudomonas aeruginosa*

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>P. aeruginosa</i>	8665	NI, ORO, FT.	CTX, Amc, C, Cm, AK.
<i>P. aeruginosa</i>	PA	NI, ORO, FT, CTX, Amc, C.	Cm, AK.

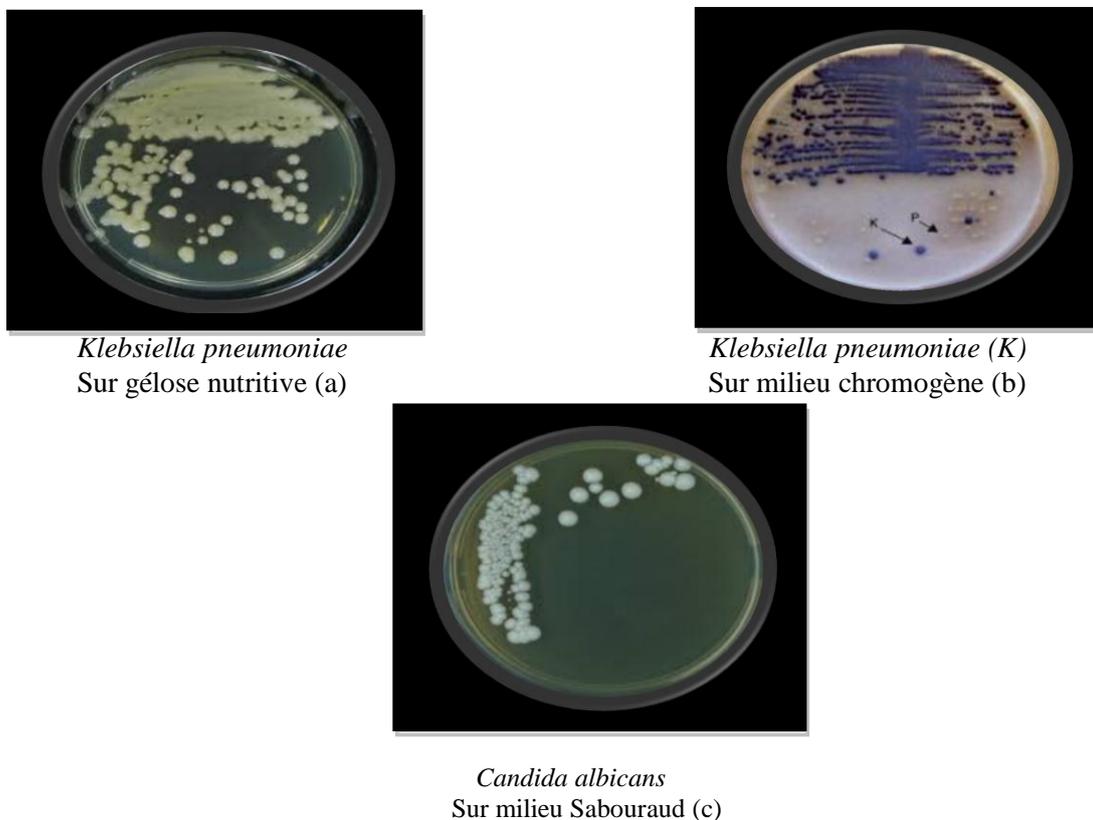
### 1.1.2. Examen cyto bactériologique de leucorrhée

L'examen bactériologique de routine des sécrétions vaginales a pour but d'effectuer le diagnostic de quatre pathologies: mycoses, infections à *Trichomonas vaginalis*, vaginoses bactériennes et vaginites bactériennes (Denis et al., 2007).

#### 1.1.2.1. Identification des germes isolés

Cinq prélèvements ont été réalisés auprès de femmes enceintes. Les cultures bactériennes de ces prélèvements ont montré la prédominance de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), dont les colonies sont grosses bombées et visqueuses sur gélose nutritive, de couleur jaune saumon sur milieu Hektoen et de couleur bleue sur milieu chromogène (Figure 3 (a et b)).

La recherche des levures a été réalisée sur milieu Sabouraud, qui a permis de mettre en évidence deux isolats de *Candida albicans* (Figure 3c).



**Figure 3:** Photographie montrant l'aspect de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose nutritive, sur milieu chromogène et de *Candida albicans* sur milieu Sabouraud.

Selon le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF, 2011) les infections génitales basses sont dues essentiellement aux champignons de la famille des *Candida*; *Candida albicans* dans 85 - 90% des cas, plus rarement *Candida tropicalis*,

*Candida krusei* ou *Candida glabrata*. Elles peuvent être également dues à un parasite: *Trichomonas vaginalis* ou à une bactérie Gram négative: *Gardnerella vaginalis* (en association avec d'autres germes anaérobies type *Bacteroides* ou *Peptostreptococcus*), ce qui est en accord avec les résultats de la présente étude. Cependant, la présence de *K. pneumoniae* qui est une entérobactérie peut être dû à une contamination lors du prélèvement (mauvaise hygiène), car ces derniers ont été effectués pas le patient lui-même (autoprélèvement), aussi, sa dissémination entre les patients pourrait être due à l'utilisation d'équipements non stérilisés.

La flore bactérienne dominante de la cavité vaginale est composée d'une diversité de Lactobacilles. Les espèces les plus souvent retrouvées sont *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* et *Lactobacillus iners* mais de très nombreuses espèces différentes continuent à être décrites. La concentration usuelle des lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre  $10^5$  et  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétions vaginales, soit entre 1 et 1000 bactéries par champ microscopique à l'examen d'un frottis des sécrétions vaginales grossièrement étalées sur une lame colorée par la coloration de Gram (Denis et al., 2007). Un bon marqueur de l'infection vaginale est la présence de nombreux polynucléaires altérés et l'absence de lactobacille de Doderlein (Bactérie spécifiques de la cavité vaginale) (CNGOF, 2011).

### 1.1.2.2. Antibiogrammes des germes isolés et identifiés

Des isolats identifiés à partir de prélèvement de leucorrhée, ont été soumis à un antibiogramme à fin d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XV.

**Tableau XV :** Le profil de résistances des bactéries et levures isolées des prélèvements de leucorrhée.

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>K. pneumoniae</i>	2962	/	CN, OTX, FT, CZ, CTX, Cs, CN, AK, Cm, Cip, ORO, NA, Amc, SXT, C.
<i>K. pneumoniae</i>	2750	Cip, CZ, SXT, CN, NA, ORO, FT.	PEF, Cs, Cm, CTX, AK, Amc, OTX.
<i>K. pneumoniae</i>	5481	ORO, FT, PEF, Cs, Cm.	Cip, CZ, SXT, CN, NA.
<i>Candida albicans</i>	521	/	/
<i>Candida albicans</i>	CA	/	/

### 1.1.3. Examen cyto bactériologique de liquide céphalorachidien (LCR)

Cinq prélèvements de LCR ont été effectués à partir des nouveau-nés pour éliminer toute atteinte méningée secondaire en cas d'infection materno-fœtale, syndrome méningé ou pour contrôle en cas de méningite néonatales.

L'examen bactériologie du liquide céphalorachidien n'a révélé aucune infection bactérienne ce qui exclu la méningite dans tous les prélèvements effectués. Ces résultats sont le fruit des vaccins qui ont un rôle important dans la lutte contre les méningites bactériennes.

Il existe des vaccins commercialisés contre *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) et *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), mais la protection offerte par chacun est spécifique de la bactérie et limitée à certains sérogroupes ou sérotypes. Tous ces vaccins se sont révélés inoffensifs et efficaces, leurs effets secondaires étant peu fréquents et bénins (**Guide de la lutte contre les méningites bactériennes communautaires, 2010**).

En pédiatrie, il a été observé en 2007 à la fois une décroissance majeure des cas de méningite à *H. influenzae* sérotype B du fait de l'instauration de la vaccination anti *H. influenzae* sérotype B, et une augmentation des méningites à *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée au  $\beta$ -lactamines. Dans le cas des méningites iatrogènes, les germes en cause sont le plus souvent des *S.aureus* à coagulase négative, et des bacilles à Gram négatif (entérobactéries ou bacilles non fermentant) (**Denis et al., 2007**).

### 1.1.4. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

Dans cette étude, soixante quatre prélèvements d'urine ont été réalisés sur des femmes hospitalisées et sur les nouveaux nés au niveau de la maternité Targa Ouzemmour.

Tous les prélèvements d'urines réalisés pendant la période de stage révèlent un examen bactériologique positif. Après examen direct, plusieurs prélèvements ont été refaits pour cause de présence de cellules uro-épithéliales en grande quantité, qui signifie un prélèvement de mauvaise qualité et s'accompagnent généralement d'une contamination par la flore péri-urétrale (**AFSSAPS, 2008**). L'examen direct des urines au microscope permet un dépistage et un diagnostic rapide.

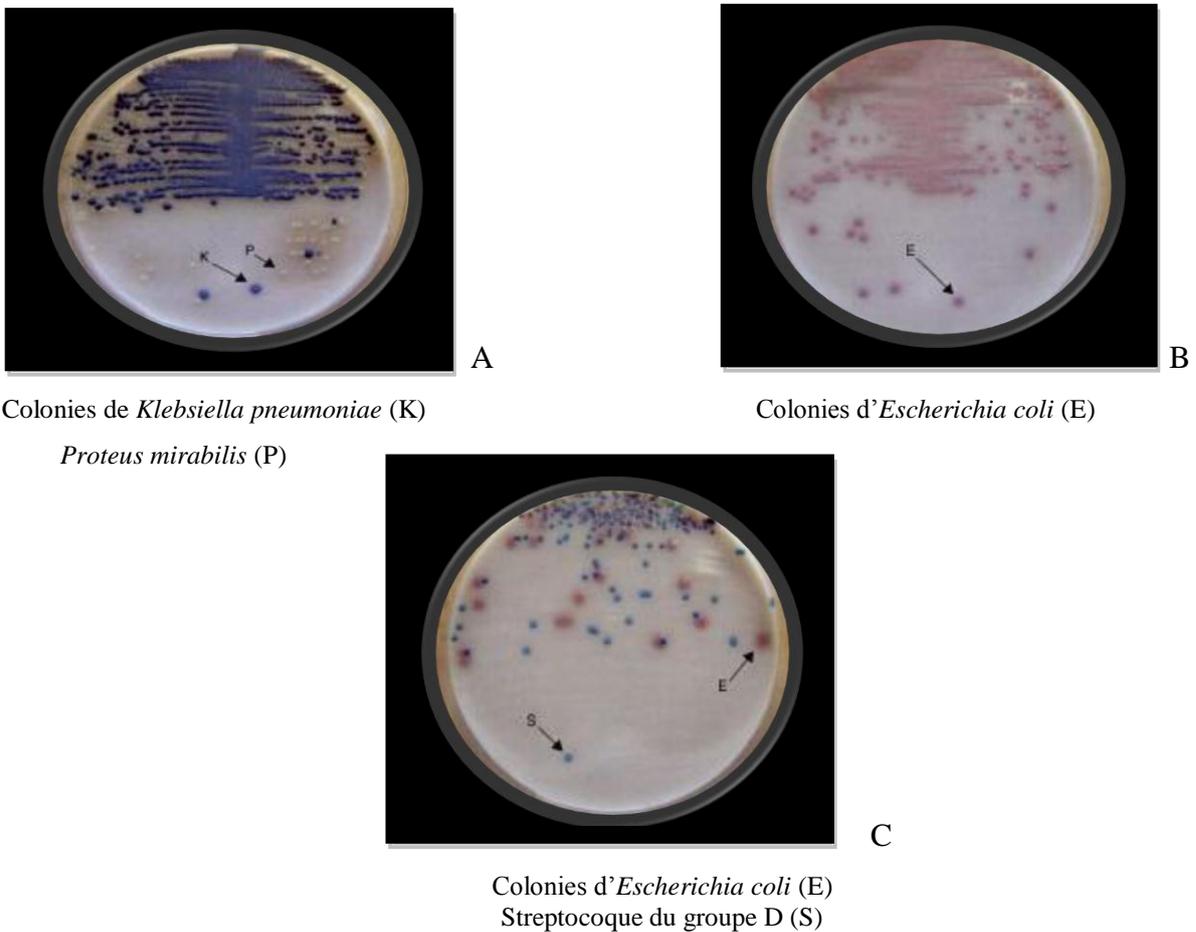
L'ECBU permet d'apprécier de façon quantitative et qualitative la présence d'éléments figurés (leucocytes, hématies, cellules épithéliales) et de micro-organismes (bactéries, *Candida*). La majorité des infections urinaires est caractérisée par la présence d'une bactériurie et d'une leucocyturie significatives (**AFSSAPS, 2008**).

#### 1.1.4.1. Identification des germes isolés

Les résultats obtenus lors de l'examen direct des prélèvements effectués ont révélé la présence des bactéries correspondant à une bactériurie  $\geq 10^5$  UFC/ml, qui nécessite un examen bactériologique complémentaire (**Surveiller et prévenir les infections associées aux soins, 2010**).

L'utilisation de milieux de cultures chromogènes facilite la détermination des genres et le choix des tests biochimiques. Les résultats des différents tests biochimiques sont présentés dans le tableau XVI (annexe 6). La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine.

Les milieux chromogènes permettent une discrimination directe plus fine des colonies et donc une meilleure sensibilité de détecter des urines polymicrobienne (**Denis et al., 2007**). Ils permettent une identification directe d'*E.coli*, *Enterococcus sp.* et *P.mirabilis*. A l'aide des tests complémentaires simple (indole, état frais) permettant une identification plus rapide et une éventuelle adaptation de l'antibiothérapie (Figure 3).

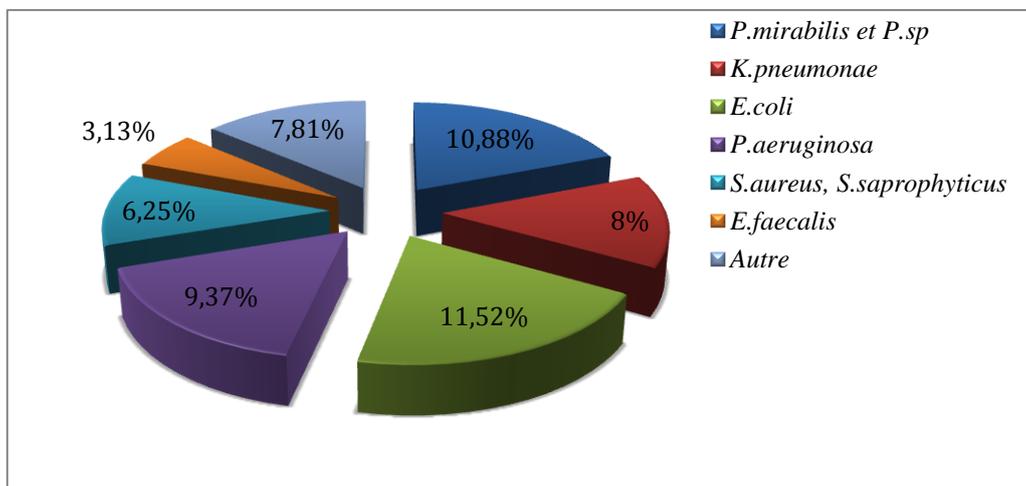


**Figure 4:** Cultures sur milieu chromogène d'orientation (**Denis et al., 2007**)

Les Colonies d'entérobactéries apparaissent sur gélose nutritive généralement bombées, de 1 à 3 mm de diamètre, lisses et brillantes, opaques et blanchâtre. Par contre *P. vulgaris* et *P. mirabilis* ont un aspect particulier, ils envahissent la gélose en voile montrant des vagues successives. Des colonies naines s'observaient rarement, de même que des colonies rugueuses ou des colonies muqueuses ressemblant à des colonies de *Klebsiella*. *Salmonella* donne des colonies petites et transparentes, à centre noir sur milieu Hektoen. Ces colonies peuvent se confondre à d'autres comme les *Proteus* (**Le Minor, 1992**).

Sur 64 prélèvements d'ECBU, 18 *E. coli* (11.52%), 17 bactéries du genre *Proteus* (10.88%) (16 *P. mirabilis* et 1 *Proteus sp.*), 13(8%) *K. pneumoniae*, 6 (9.37%) *P. aeruginosa*, 4 (6.25%) *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. saprophyticus*), 2 (3.13%) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) et autres tel que *Citrobacter diversus* (*C. diversus*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Shigella sonnei* (*S. sonnei*) ont été isolés (Figure 4).

L'analyse de ces résultats, révèle que les bactéries isolées de ces prélèvements ECBU appartiennent majoritairement à la famille des Enterobactériaceae. Cette dernière présente la famille responsable à 80% d'infections urinaires nosocomiales, particulièrement *E. coli* et *P. mirabilis* et les plus rarement *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par **Vincent et al. (1995)**, **Richards et al. (1999)** et **Hauer et al. (1996)** cité par **Mimoz, (2001)**, qui ont reporté que ces espèces sont souvent responsables des infections urinaires.



**Figure 5** : Proportion des bactéries responsables des infections urinaires.

*E. coli* est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. La plupart sont commensales, mais certaines souches possèdent des facteurs de

virulence qui leur permettent de déclencher des diarrhées. A côté des infections intestinales, elle est responsable d'infections extra-intestinales diverses: urinaires, abdominale, méningées et bactériémies (Avril et Fauchère, 2002).

*P. mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. (Lamnaouer, 2002), après *E. coli*, c'est la bactérie la plus souvent isolée des urines. *P. mirabilis* est à l'origine d'infections nosocomiales grâce à son uréase puissante qui alcalinise les urines (Mahrouki *et al.*, 2009).

Les cultures d'ECBU révèlent la présence de *K. pneumoniae*. Selon Savita *et al.* (2012), *K. pneumoniae* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine. Aussi l'étude révèle la présence de *Serratia marcescens* qui provoque habituellement des infections nosocomiales (Basilio et Anía, 2009).

L'étude réalisée par Tiouit *et al.* (2001) sur des patients externes a montrée que les Entérobactéries représentent plus de 80% des étiologies avec *E.coli* qui prédomine largement avec un pourcentage de 60,99%. François *et al.* (2013) ont rapporté que les germes les plus souvent responsables des infections urinaires sont *E. coli* (75-85%) selon les études et les pays, et d'autres entérobactéries (*Klebsiella* sp. et *Proteus* sp.) qui comptent pour environ 4% chacune, et jusqu'à 25% dans des séries françaises. Ces résultats corroborent avec ceux trouvés dans ce travail. Le Staphylocoque coagulase négatif (*S. epidermidis* et *S. saprophyticus*) est retrouvé dans moins de 4% des infections urinaires simples (jusqu'à 15% dans les séries américaines) (François *et al.*, 2013).

#### 1.1.4.2. Antibiogrammes des germes isolés et identifiés

Des bactéries identifiées à partir de prélèvement des urines, ont été soumises l'action des antibiotiques à fin d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques. Les résultats de l'antibiogramme sont représentés dans le tableau XV.

**Tableau XVI:** le profil de résistance des *Klebsiella pneumoniae* isolées des urines.

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>K. pneumoniae</i>	4742	Amc.	PEF, Gm, Na, AZ, CN, C, CTX, ORO, OTX.
<i>K. pneumoniae</i>	3003	CN, CZ.	C, Na, CZ, CTX, Cip, Cs, ORO, OTX, PFS, Ni, XT, FT, AK, OFX, Cm, Amc.
<i>K. pneumoniae</i>	8156	SXT, CN, Amc, CZ.	Cip, FT, Cm, OTX, C, AK, Na, ORO, CTX, Cs, PEF.
<i>K. pneumoniae</i>	5792	Amc.	C, Na, CZ, CTX, Cip, Cs, ORO, OTX, PFS, CN, Cm.
<i>K. pneumoniae</i>	8109	/	C, Na, CZ, CTX, Cip, Cs, ORO, OTX, PFS, CN, Cm, Amc.
<i>K. pneumoniae</i>	2962	/ /	CN, OTX, FT, CZ, CTX, Cs, CN, AK, Cm, Cip, ORO, NA, Amc, SXT, C.
<i>K. pneumoniae</i>	2750	Cip, CZ, SXT, CN, NA, ORO, FT.	PEF, Cs, Cm, CTX, AK, Amc, OTX.
<i>K. pneumoniae</i>	5481	/	Cip, CZ, SXT, CN, NA, ORO, FT, PEF, Cs, Cm, CTX, AK, Amc, OTX.
<i>K. pneumoniae</i>	8653	ORO, NI, FT, CM.	CTX, Amc, C, AK.
<i>K. pneumoniae</i>	8654	/ /	C, N, ORO, FT, Cm, AK, CTX, Amc.
<i>K. pneumoniae</i>	7621	N, AIC, Amc, C.	FT, ORO, Cm, CTX, PFT.
<i>K. pneumoniae</i>	9078	FT.	CTX, Amc, C, NI, ORO, Gm, AK, OFX, Cip, PEF.
<i>K. pneumoniae</i>	7668	C, CN, CZ, Amc.	CTX, Cs, Na, RO, Cm, AK, SXT, Cip, PEF, FX, FT.
<i>K. pneumoniae</i>	6395	/ /	C, NI, ORO, FT, CM, Amc, CTX.
<i>K. pneumoniae</i>	8266	C, CN, CZ, ORO.	CTX, Amc, Cs, Na, Cm, AK, SXT, Cip, PEF, FX, FT.

**Tableau XVII:** Le profil de résistance des *Escherichia coli* isolées des urines.

Bactéries	Code	Résistantes à	sensibles à
<i>E. coli</i>	9441	Amc, SXT, CZ, CN.	C, NA, FT, AK, OTX, CTX, Cs, ORO, PFE, Cip.
<i>E. coli</i>	8824	Amc, SXT.	AK, OTX, C, ORO, Cs, CTX, FT, CN, PFT, CZ.
<i>E. coli</i>	10020	Amc	AK, OTX, C, ORO, Cs, CTX, FT, PFT, CZ, Na, Cm, SXT, Cip.
<i>E. coli</i>			AK, OTX, C, Cs, CTX, FT, CN, PFT, CZ,

	9884	ORO, Cip.	Na, Cm, Amc, SXT.
<i>E. coli</i>			Cm, CTX, FT, CIP, C, NI, ORO, CZ, NA, OFX, AK, SXT, PEF.
	1998	Amc	
<i>E. coli</i>	5799	/ /	Cip, C, Cs, AK, Na, FT, CTX, ORO, PEF, Cm, NA, SXT, CZ, CN.
<i>E. coli</i>	9152	/	Cip, Cs, AK, FT, CTX, ORO, C, PEF, Cm, NA, SXT, CZ, Amc, CN, OTX.
<i>E. coli</i>	318	Amc	Cip, Cs, AK, FT, CTX, OXT, ORO, C, PEF, Cm, NA, Cn, Cs, SXT, CZ.
<i>E. coli</i>	6219	Amc	FT, CTX, CN, PEF, AK, OTX, Gm, C, Cip.
<i>E. coli</i>	9237	Amc	Cs, AK, C, OTX, CTX, Cip, TX, Cm, CN, NA, ORO, SXT, CZ, PEF.
<i>E. coli</i>	2245	SXT, Amc.	ORO, NI, C, CIP, Cs, Cm, CT.
<i>E. coli</i>	5799	/ /	FT, CTX, CN, PEF, AK, OTX, Gm, C, Cip, Amc.
<i>E. coli</i>	6175	Amc.	Cm, CTX, FT, CIP, C, NI, ORO, CZ, NA, OFX, AK, PEF.
<i>E. coli</i>	6833	CN, SXT, CZ, Amc.	OTX, CIP, CTX, C, NA, PEF, Cs, ORO, AK, FT
<i>E. coli</i>	793	NI, C, Amc, SXT, PEF, FT.	ORO, Gm, CTX, FX, Cs, NA, OTX, AK.
<i>E. coli</i>	4673	NI, C, Amc, SXT.	ORO, Gm, CTX, FX, Cs, PEF, FT, NA, OTX, AK.
<i>E. coli</i>	9939	SXT, Amc.	AK, Cm, CTX, Na, PEF, CIP, ORO, C, Cm, Cs, CZ, FT, CN.

Tableau XVIII: Le profil de résistances des *Proteus mirabilis* isolées des urines

Bactéries	Code	Résistantes à	sensibles à
<i>Proteus sp</i>	/	Cs, Amc, FT, C.	OFX, CZ, C, AK, Na, ORO, Cip, CTX, SXT.
<i>P. mirabilis</i>	2093	FT, SXT, CZ, Cs.	ORO, NI, C, Amc, Cm, CTX, AK, PET, Na, OTX.
<i>P. mirabilis</i>	4115	Cs, AM.	OFX, CAZ, NA, C, CTX, NET, Cl, OP, L.
<i>P. mirabilis</i>	4401	Cs, AM, Cl, OP, L.	OFX, CAZ, NA, C, CTX, NET.
<i>P. mirabilis</i>	6755	Amc, Cs.	Gm, AK, C, ORO, CN, FT, OTX, CZ, Na, CTX, PEF, SXT, Cip.
<i>P. mirabilis</i>	5913	Amc, Cs, Na, CZ, ORO, FT, CN.	OTX, PEF, C, Cip, CTX, Cm, AK.
<i>P. mirabilis</i>	S	Cs, Amc, SXT, CL.	CTX, FT, CAZ, C, CIP.

<i>P. mirabilis</i>	8491	Cs, SXT, Amc, C.	Na, ORO, Cip, CZ, PEF, FT, OTX, Cm, CTX, AK, CN.
<i>P. mirabilis</i>	PM		
<i>P. mirabilis</i>	8578	Amc, C, NI, FT.	ORO, Gm , AK, CTX.
<i>P. mirabilis</i>	3539	Cs, SXT, Amc.	FT, ORO, OFX, AK, CZ, NA, C.
<i>P. mirabilis</i>	7651	C, Cs, Amc, SXT, CN, CZ.	Cm, ORO, FT, OTX, CTX, AK, Na, Cip, PEF.
<i>P. mirabilis</i>	8364	Na, Cs, Amc, CZ, STX, C, CN.	CTX, PEF, Cm, AK, OTX, Cip, ORO, AK, FT.
<i>P. mirabilis</i>	9483	Cs, Amc.	FT, NA, PFE, CN, FI, SXT, OTX, Cip, CZ, ORO, CTX, C, Cm.
<i>P. mirabilis</i>	694	FT, Cs, T.	OFX, CZ, C, AK, Na, ORO, Cip, CTX, SXT

Le tableau XIX montre que les *S.aureus* isolés des urines sont résistantes à la pénicilline du fait de la production d'une pénicillinase. Cependant une sensibilité remarquable à d'autres antibiotiques.

Les infections à *E. faecalis* sont de plus en plus observées avec l'utilisation large des lincomycine (L) qui entraînent la sélection de ces germes auxquels ils sont naturellement résistants. Aucune résistance à la vancomycine n'a été notée bien que cette résistance soit rapportée dans de nombreux pays à des fréquences variables.

**Tableau XIX:** Le profil de résistances des coques Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *saprophyticus* et *Enterococcus faecalis*)

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>S. aureus</i>	6923		
<i>S. aureus</i>	4671	RA, P, OX5.	FF, VA, TE, FA, C, TP, E15.
<i>S. saprophyticus</i>	2517	Amc, SXT.	DO, Cm, VA, L, PT, E.
<i>S. saprophyticus</i>	9968	P, OX.	DO, Cm, VA, L, PT, E.
<i>Enterococcus faecalis</i>	5400	P, TP, OX <sub>5</sub> , OX <sub>1</sub> , E <sub>15</sub> , L.	VA.
<i>E. faecalis</i>	AA	L, Cs.	AM, VA.

**Tableau XX** : Le profil de résistances des *Pseudomonas aeruginosa*

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>P. aeruginosa</i>	/	SXT, PT, RA, CL, AM, CAZ.	CIP, TOB, Cs, PI.
<i>P. aeruginosa</i>	6092	Cip, Amc, Cm, OTX, PEF.	C, Na, Cs, CZ, ORO, FT, CTX, AK, CN.
<i>P. aeruginosa</i>	8056	C, Amc, CN, FT, CZ, Na, ORO.	Cip, OTX, Cm, AK, PEF, Cs, CTX.
<i>P. aeruginosa</i>	8260	C, Amc, CN, FT.	Cip, OTX, Cm, AK, PEF, Cs, CTX, CZ, Na, ORO.
<i>P. aeruginosa</i>	8266	C, Amc, CN, FT, CZ, Na, ORO, AK, PEF, Cs, CTX.	Cip, OTX, Cm.
<i>P. aeruginosa</i>	9178	Cip, Amc, Cm, OTX, PEF, FT, CTX, AK, CN.	C, Na, Cs, CZ, ORO.

**Tableau XXI**: Le profil de résistances les bacilles Gram négatifs (*Serratia marscencens*, *Citrobacter diversus*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella sonnei*)

Bactéries	Code	Résistantes à	Sensibles à
<i>Serratia marscencens</i>	NINA	CL.	AM, CTX, C, Cs, FF, SXT, Cip, NA, CAZ.
<i>Citrobacter diversus</i>	16mm 11982	CTX, COT25.	Cl, OFX, AMP, IMI, NA, AUG, AMC, CIP, NIT, CN.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	WAHIB A	FA, PT, VA, TE.	C, Cs, E
<i>Shigella sonnei</i>	AKILA	/ /	AM, CL, C, Cs, FF, SXT, Cip, NA, CAZ, Va.

## 1.2. Antibiogrammes des bactéries identifiées

Toutes les souches ont été testées vis-à-vis de 27 molécules d'antibiotiques commerciales appartenant à 7 familles différentes dont 18  $\beta$ -lactamines, 5 aminosides, 3 quinolones, 3 macrolides, un phénicol, la colistine et le triméthoprime/sulfaméthoxazole.

Au sein des prélèvements, l'analyse globale des résultats d'antibiogramme a montré une différence de taux de résistance. En effet pour la majorité des antibiotiques, les taux de résistance sont plus importants aux prélèvements d'urine par rapport aux autres prélèvements

pus et leucorrhée. Cependant, on note que les taux de résistance pour l'ampicilline/acide clavulanique 20/10ug et la colistine sont plus élevés, cela est en rapport avec le nombre de souches *P. mirabilis* isolés à partir de ce prélèvement.

Les résultats illustrés dans les tableaux, ont fait ressortir l'émergence des souches résistantes. Un pourcentage qui dépasse 52% d'entérobactéries (32/61) résistantes vis-à-vis l'ampicilline/acide clavulanique 20/10ug (AMC) appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines (16 *E. coli*, 11 *P. mirabilis* et 5 *K. pneumoniae*) et une résistance de 30% d'Entérobactéries (18/61) vis-à-vis triméthopryme/sulfaméthoxazole (7 *E. coli*, 7 *P. mirabilis* et 4 *K.pneumoniae*), contrairement à la colistine qui reste inactive avec une résistance totale (100%) due à une résistance naturelle des souches *Proteus* (spécificité de l'espèce *mirabilis*) à cet antibiotique (Cattoir, 2006) (Figure5).

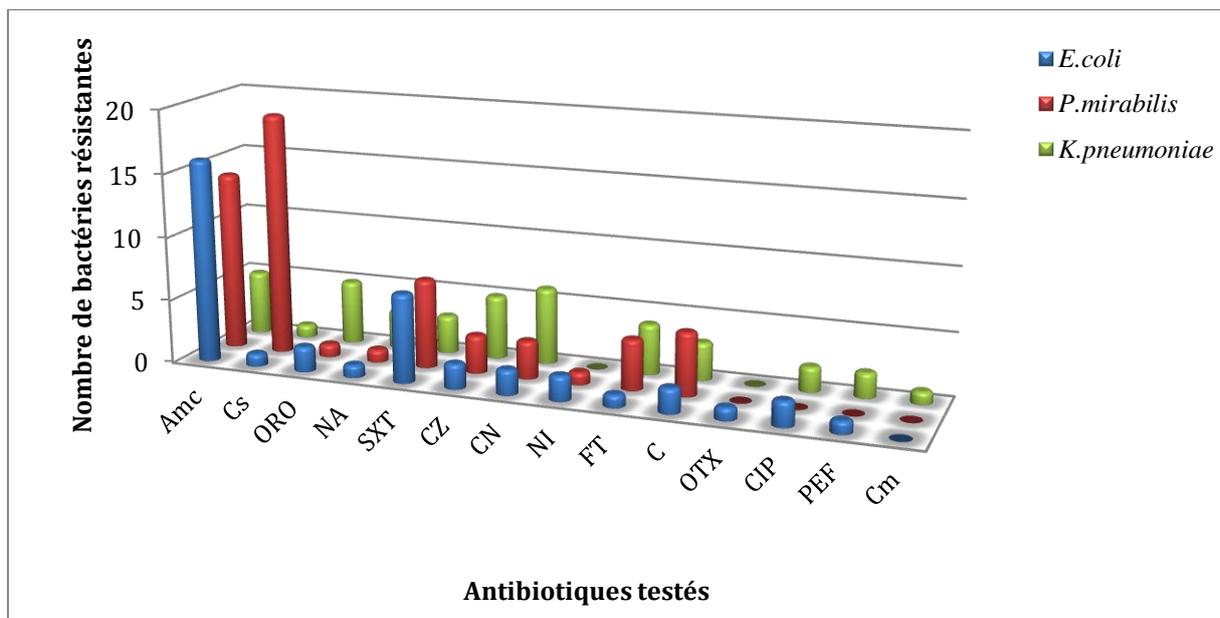
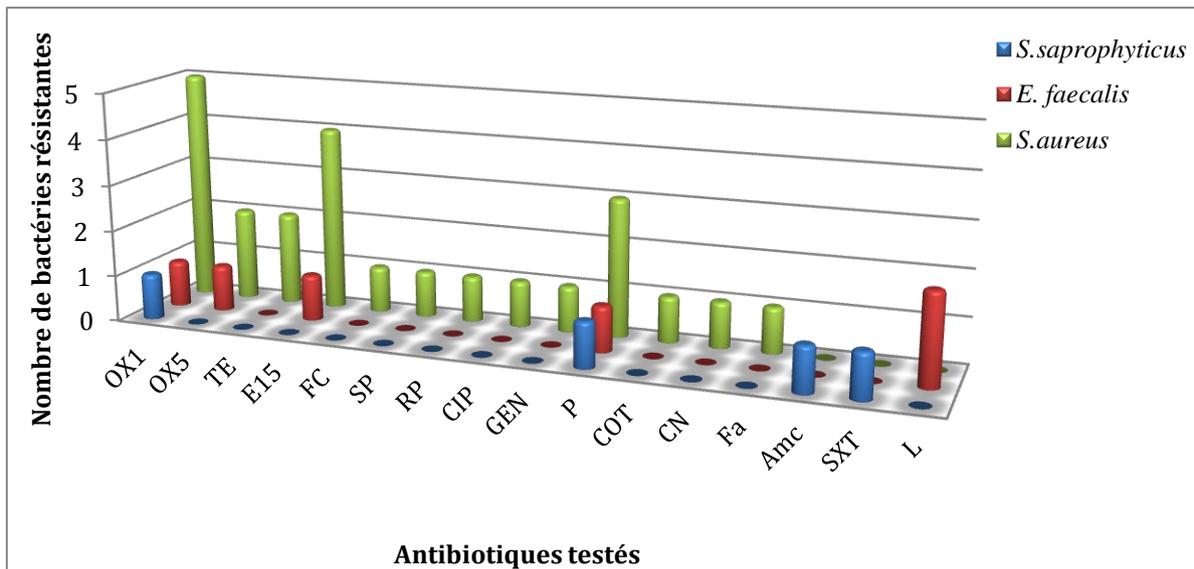


Figure 6: Résistance des bactéries à Gram négatif aux différents antibiotiques utilisés.

Les résultats des profils de résistances des souches à Gram positif (Figure 5) montrent que *E. faecalis* isolées présentent une résistance à une batterie d'antibiotiques telque Lincomycine (L), Oxacilline (OX1 et OX5), Erythromycine(E) et Pénicilline (P).

La résistance de ces souches peut être expliquée par sa résistance naturelle à l'oxacilline, seul l'amoxicilline et la piperacilline appartenant aux groupes des pénicillines sont les plus actives.

Les *E. faecalis* présentent une résistance naturelle aux lincosamides (Lincomycine) et aux streptogramines (Archambaud, Clave, 2007 ; CA-SFM / EUCAST, 2015).



**Figure 7:** Résistance des bactéries à Gram positif aux différents antibiotiques utilisés.

Les *S. aureus* présentent une résistance à une gamme d'antibiotiques de différentes familles essentiellement vis-à-vis les  $\beta$  lactamines tels qu'oxacilline (OX1), et pénicilline (P) et vis-à-vis les Macrolides tel qu'erythromycine (E). Cette résistance est acquise fréquente car *S. aureus* ne présente pas de résistance naturelle particulière : c'est une espèce sensible aux  $\beta$ -lactamines, aminosides, macrolides, synergistines, lincosamides, fluoroquinolones, glycopeptides, rifampicine, acide fusidique, fosfomycine, cotrimoxazole. Cependant, La majorité des souches secrètent une pénicillinase qui hydrolyse la pénicilline G ce qui explique la résistance aux pénicillines (Clave, 2013).

Pour les aminosides (la gentamicine et l'amikacine), on remarque une sensibilité de la majorité des bactéries isolées. En ce qui concerne les fluoroquinolones (quinolone de 2<sup>ème</sup> génération), les taux de résistance étaient de 0% pour la ciprofloxacine ainsi que l'acide nalidixique (quinolone de 1<sup>ere</sup> génération).

## 2. Etude des souches productrices de substances bioactives

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et discussion concernant la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches actinomycetales utilisées, la production, la cinétique, l'optimisation du milieu de production, l'extraction et la caractérisation partielle des substances bioactives synthétisées.

## 2.1. Etude de deux paramètres physiologiques de croissances

### 2.1.1. Croissance à différents pH

Les résultats de la croissance des deux souches de *Streptomyces* étudiées présentés dans le tableau XXII, révèlent une aptitude de croissance pour les deux souches sur le milieu M2 à différentes valeurs de pH allant de 5 à 12. L'analyse des résultats montre que la meilleure croissance (exprimée par un tapis chargé) de *Streptomyces* sp. BS30 a été constatée à pH 8, tandis que pour *Streptomyces* sp. SY-BS5 elle a été constatée à pH 10. Ces résultats indiquent que les souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5 sont à caractère alcalophile. Des résultats similaires ont été rapportés par **Singh et al. (2009)** dans leurs étude de la souche *Streptomyces tanashiensis* A2D isolé du sol du lac Loktak de Manipur (Inde), cette dernière pouvait croître sur une gamme de pH comprise entre 6,5 et 9,5, avec un optimum à pH 8.

Selon **Zhang et al. (2013)**, une souche de *Streptomyces* EGI 80050T alcalophile isolée du sol aride de Xinjiang, du nord-ouest de la Chine est capable de se développer à un pH de 7 à 11, avec un optimum de croissance entre PH 9 et 10, ce qui concorde sensiblement avec nos résultats pour la souche BS5.

*Streptomyces* sp. BS30 et la *Streptomyces* sp. SY-BS5 ont montré une aptitude à produire des pigments diffusibles de différentes couleurs en fonction du pH du milieu de culture. Sur milieu solide, la BS5 a produit des pigments de couleur verte dans un intervalle de pH compris entre 5 et 8 et des pigments de couleur marron foncé à pH 9, 10, 11 et 12.

La *Streptomyces* sp. BS30 a produit un pigment de couleur marron à des pH de 5 et 6, de couleur vert foncé à pH 7 et 8 et de couleur marron foncé à des pH allant de 9 à 12.

**Tableau XXII:** Caractéristiques culturales des colonies de la *Streptomces* sp. BS30 et de la *Streptomces* sp. SY-BS5 sur M2 à différents pH.

pH du milieu	Croissance		Mycélium aérien		Mycélium substrat		Pigment		Photo	
	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30
5	++	+	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Vert	marron		
6	++	+	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Vert	marron		
7	++	++	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Vert	Vert foncé		
8	+++	+++	Rose	Blanc	Beige	Blanc	Vert	Vert foncé		
9	+++	+++	Beige	Blanc	Blanc	Blanc	Marron foncé	Marron foncé		
10	++	+	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Marron foncé	Marron foncé		
11	+	-	Vert	Beige	Beige	Beige	Marron foncé	Marron foncé		
12	+/-	-	Vert	Beige	Beige	Beige	Marron foncé	Marron foncé	/	

1/ Croissance faible ou absente (+/-).

2/ Croissance moyenne (colonies éparses) (++)

3/ Bonne croissance (tapis chargé) (+++).

### 2.1.2. Teneur en chlorure de sodium (NaCl)

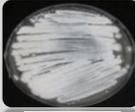
Ce test est réalisé pour déterminer la concentration en NaCl de croissance tolérée par les deux souches étudiées sur milieu M2 solide. Les résultats de ce test sont rapportés dans le tableau XXIII.

Ces *Streptomyces* ont présenté une tolérance à des concentrations en NaCl comprises entre 0,5% et 5%, et aucune pour des concentrations de 6% à 7%. Ces données montrent que les souches testées sont halotolérantes. La meilleure croissance (tapis chargé) de *Streptomyces* sp. BS30 a été constatée à 2% de NaCl, tandis que la meilleure croissance de *Streptomyces* sp. SY-BS05 l'a été à une concentration de 3%.

Selon **Singh et al. (2009)**, *Streptomyces tanashiensis* A2D peut tolérer des concentrations de NaCl allant de 0 à 7% avec un optimum de croissance à 2 % de NaCl, ce qui est en accord avec nos résultats pour la BS30. La souche *Streptomyces* EGI 80050T (**Zhang et al., 2013**), est capable de se développer à une concentration de NaCl comprise entre 0 à 7,5%, et un optimum de croissance à une concentration allant de 2,5 à 5%.

Les souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5 n'ont pas l'aptitude de produire des pigments diffusibles quelque soit la concentration en NaCl testée.

**Tableau XXIII:** Caractéristiques culturales des colonies de la *Streptomces* sp. BS30 et *Streptomces* sp. SY-BS5 à différentes concentration de NaCl.

Concentration NaCl (%)	Croissance		Mycélium aérien		Mycélium substrat		Pigment		Photo	
	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30	BS5	BS30
0,5	+	+	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	/	/	/	/
1%	++	+	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	/	/		
									BS5	BS30
2%	+++	+++	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	/	/		
									BS5	BS30
3%	++	++	Rose	Blanc	Beige	Blanc	/	/		
									BS5	BS30
4%	+	+/-	Beige	Blanc	Blanc	Blanc	/	/	/	/
5%	+/-	+/-	Blanc	Blanc	marron	Blanc	/	/	/	/
6%	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
7%	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/

1/ Croissance faible ou absente (+/-).

2/ Croissance moyenne (colonies éparées) (++)

3/ Bonne croissance (tapis chargé) (+++).

## 2.2. Mise en évidence des activités antimicrobiennes de *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5

Pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des deux souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5 identifiées et essayer de cerner leur spectre d'activité, il était nécessaire de les cultiver sur un milieu de culture pour Streptomycètes puis de les mettre en présence de divers microorganismes-tests en faisant appel, en cas de besoin, à plus d'une technique. Ainsi, l'activité antibactérienne et antifongique des souches *Streptomyces* sp. BS30 et *Streptomyces* sp. SY-BS5 a été mise en évidence par deux méthodes de diffusion en milieu gélosé ; la technique des cylindres d'Agar et la technique des puits.

### 2.2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar

Les souches étudiées ont été testées contre plusieurs microorganismes saprophytes et/ou pathogènes pour l'homme (bactéries pathogène et champignons filamenteux) et pour les plantes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium polyferatum*). L'utilisation de souches bactériennes sensibles aux antibiotiques comme germes cibles, vise la détection de toutes substances antibactériennes, alors que l'utilisation de germes résistants aux  $\beta$ -lactamines, aux sulfamides, à la tétracycline, à la vancomycine et au cotrimoxazole, vise la recherche d'antibiotiques à structures particulières pouvant contourner le mécanisme de résistance. En effet, la recherche d'antibiotiques actifs contre des germes multirésistants constitue une des meilleures stratégies dans la découverte de nouveaux antibiotiques (Ceylan *et al.*, 2008 ; Rajan et Kannabiran, 2010).

Les souches de levure et de champignons inférieurs utilisées pour la détection rapide d'une activité antifongique ont été choisies pour les raisons suivantes:

- Candida albicans*, très souvent impliquée dans les infections fongiques.
- Mucor rammanianus*, champignon sensible aux substances antifongiques (Bastide *et al.*, 1986).
- *Aspergillus niger*, champignon responsable des mycoses invasives (Badji, 2006).

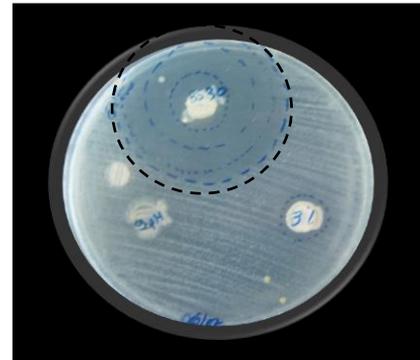
Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose (Gélose nutritive molle 8g d'agar pour les bactéries et extrait de malt pour les champignons), permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide

au niveau de la zone de diffusion de la molécule bioactive, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

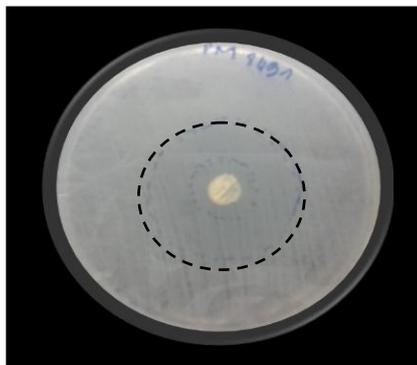
Il a été constaté que c'est la souche *Streptomyces BS30* qui présentait une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes (Gram positif et Gram négatif) testées sensibles ou résistantes aux antibiotiques et des bactéries de références, une activité antimoisissures sur les champignons filamenteux, et une activité antilevurienne contre la levure *candida albicans* (Figure 8).



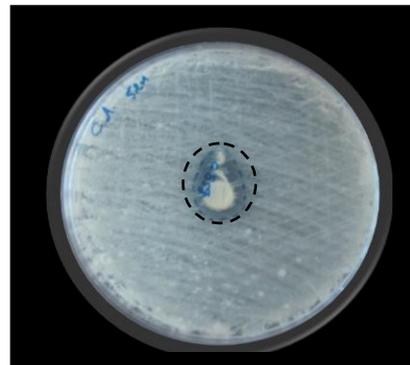
*Staphylococcus aureus* 7932 (a)



*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (b)



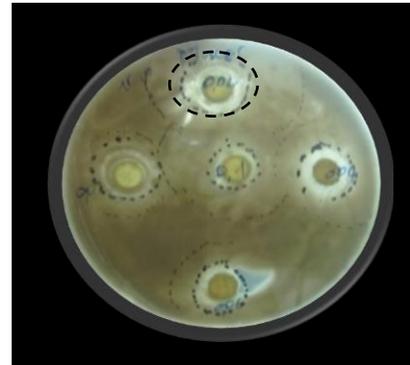
*Proteus mirabilis* 8491 (c)



*Candida albicans* 521 (d)



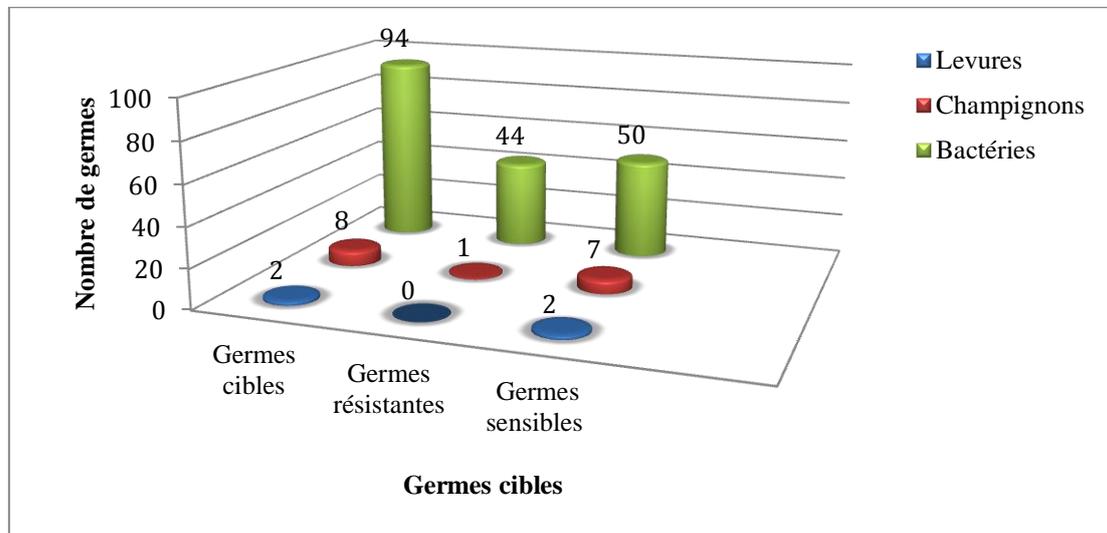
*Aspergillus carbonarius* A731 (e)



*Mucor rammanianus* NRRL 1829 (f)

**Figure 8 :** Illustration des activités antagonistes de la souche *BS30* révélées par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis de *S. aureus* 7932 (a), *E. faecalis* ATCC (b), *P. mirabilis* 8491 (c), *Candida albicans* 521 (d), *Aspergillus carbonarius* A731 (e) et *Mucor rammanianus* NRRL 1829 (f).

Selon les diamètres des zones d'inhibitions obtenus, il en ressort que sur les 94 bactéries testées, 50 se sont révélés sensibles avec des diamètres importants des zones d'inhibitions. Sept des huit-champignons utilisés ont présenté une sensibilité à la BS30 avec des zones d'inhibitions intéressantes, de même pour les deux levures testées (Figure 9). En effet, une forte concentration de molécules bioactives libérées diffuse plus rapidement que la croissance de la souche-test ce qui conduit à une zone d'inhibition importante (Koch, 1999).



**Figure 9:** Taux de germes cible sensibles et résistants aux molécules bioactives synthétisées par la *Streptomyces* sp. BS30.

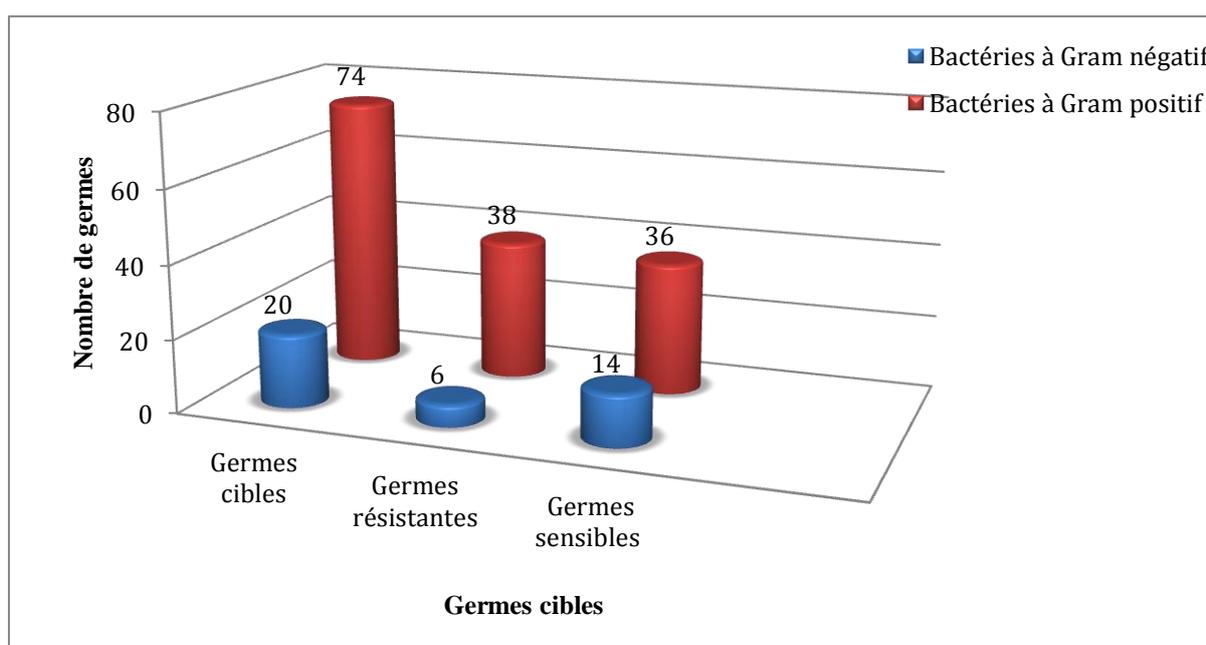
L'analyse des résultats obtenus démontre que la souche *Streptomyces BS30* est douée d'une++ activité antibactérienne et antifongique.

L'activité antagoniste de la *Streptomyces* sp. SY-BS30 vis-à-vis de 50 bactéries pathogènes (Gram positif et Gram négatif), 7 champignons filamenteux pathogènes et 2 levures sur milieu solide montre qu'elle est caractérisée par un large spectre d'action.

Les résultats de cette étude concordent avec ceux de plusieurs études; **Singh et al. (2009)** ont rapporté qu'un actinomycète alcalophile (*Streptomyces tanashiensis* A2D) présentait un large spectre antimicrobien contre des bactéries et des champignons, les études de **Devi et al. (2013)**, réalisées sur la souche *Streptomyces* AC 23 révèlent une activité antagoniste vis-à-vis des bactéries et des champignons pathogènes. Selon **Bouras, (2013)**, la souche *Streptomyces* PP14 isolée du sol canadien présente une activité contre divers micro-organismes (mycètes phytopathogène et mycotoxigène et bactéries multi-résistantes).

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus, montrent que les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives synthétisées par la souche étudiée

en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, (Figure 10), des résultats en accord avec ceux de **Hasavada et al. (2006)** ; **Atta et al. (2009)** et **Bouras et al. (2013)**, malgré les précautions prises pour augmenter la sensibilité de la méthode. La densité optique a été fixée à une absorbance d'environ 0,1 à 625 nm après avoir effectué des essais faisant intervenir différentes concentrations de cellules microbiennes (**CA-SFM, 2014**). En effet, la densité de l'inoculum des souches-tests est connue dans la littérature comme étant un facteur influençant la sensibilité de la technique (**Iwai et Omura, 1982**; **Brooks et al., 1995**; **Madigan et al., 1997**). Par ailleurs, la diffusion des molécules bioactives a été favorisée par l'utilisation d'un milieu faiblement gélosé et par la mise des boîtes à +4°C pendant 2 heures avant l'incubation comme le préconisaient **Tortorano et al. (1979)**.



**Figure 10:** Activité de la *BS30* sur les bactéries.

### 2.2.1.1. Activité antagoniste de la *BS30* vis-à-vis des bactéries Gram négatives

Sur les 74 bactéries gram négatif, 36 souches soit 49% sont sensibles à l'activité antibactérienne de la *BS30*, plus de la moitié présente une résistance à cette dernière bien qu'elle soit sensible aux différentes familles d'antibiotiques. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes aux composés antibactériens que les bactéries Gram positives. Selon **Gupta, (2011)**, plusieurs études ont prouvé que la membrane externe des bactéries Gram négatives (doubles membranes) contient beaucoup de mécanismes protecteurs contre des antibiotiques (Figure 11). L'activité des *Streptomyces* vis à vis des bactéries Gram positives ont été largement rapporté (**Park et al., 2009**) , mais il semble que l'activité contre

les bactéries Gram négatives, levures et champignons ne l'est que rarement (Nguyen *et al.*, 2010).

Yadav *et al.* (2009) ont montré que toutes les souches isolées du sol (Inde) ont présenté un effet antagonique vis à vis des bactéries Gram positive (*M. luteus*, *B. subtilis* et *S. aureus*). D'ailleurs, seule la souche A161 a montré une bonne activité antagonique contre quatre importantes bactéries gram négatives (*E. coli*, *K.pneumoniae*, *P. vulgaris* et *P. aeruginosa*).

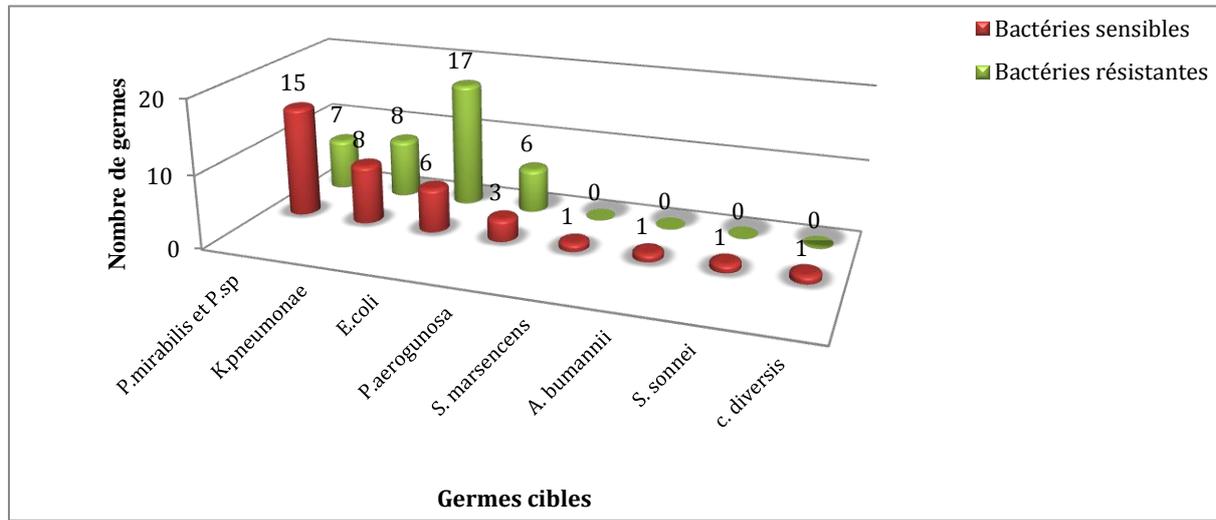


Figure 11: Activité de la BS30 vis-à-vis des bactéries Gram négatives.

La résistance des bactéries Gram négative aux molécules bioactives synthétisés par la BS30 est remarquable essentiellement dans le cas de l'activité contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

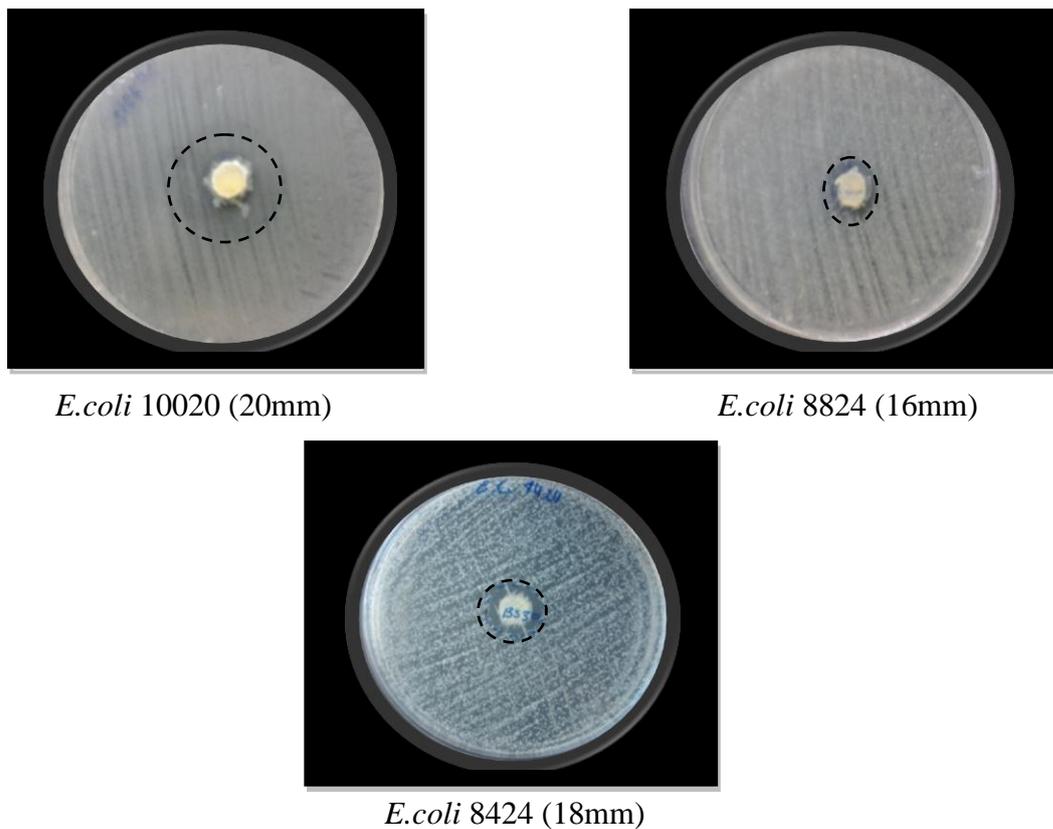
#### a. Activité antagoniste vis-à-vis de *E. coli*

L'activité antagoniste de la souche BS30 a été testée vis-à-vis de 24 isolats d'*E. coli*, cependant seules 6 (25%) se sont révélées sensibles et 18 (75%) résistances aux molécules bioactives synthétisées par la souche étudiée. Parmi les bactéries sensibles, 4 ont été isolées du prélèvement d'urines et dont les meilleurs diamètres d'inhibition ont été notés avec les souches *E. coli* 10020 (20mm) et *E. coli* 8824 (16mm), et 2 souches isolées de pus dont *E. coli* 8424 représente la bactérie pathogène la plus sensible avec un diamètre de zone d'inhibition égale à 18mm (Figure 12). Les diamètres des zones d'inhibition sont rapportés dans le tableau XXIV

La BS30 ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de *E. coli* pathogène n'a aucun effet antagoniste sur *E.coli* ATCC 25922. Cependant, la souche MITS 1005 isolée du sol (Gwalior)

par **Singh et al. (2012)**, présente une activité vis à vis de la même bactérie avec une zone d'inhibition de 14mm de diamètre et vis-à-vis des germes pathogènes tels que *S. aureus* Méthicilline Résistant (MRSA) et Enterococcus Vancomycine Résistante (VRE).

Une résistance remarquable a été notée pour la majorité des *E.coli* isolées malgré leurs sensibilités aux autres antibiotiques utilisés à l'exception de l'ampicilline/acide clavulanique 20/10ug (AMC). Cette résistance peut être expliquée par leur facteur de pathogénicité: les adhésines qui peuvent induire une adhésion à des globules rouges ou à des cellules épithéliales, et sa capacité à produire des toxines (**Nauciel, 2000**).



**Figure 12:** Activité de *Streptomyces* sp. SY-BS30 sur *Escherichia coli*

**Tableau XXIV:** Activité antimicrobienne contre les *E.coli*

Prélèvement	Bactérie	Diamètres des zones d'inhibition (mm)
Pus	<i>E. coli</i> 8424	16
	<i>E. coli</i> 9097	15
Urine	<i>E. coli</i> 10020	<b>20</b>
	<i>E. coli</i> 8824	16
	<i>E. coli</i> 9441	15

**b. Activité antagoniste vis-à-vis de *P. aeruginosa***

L'activité antibactérienne de la souche étudiée sur les bactéries Gram négatives non fermentaire, *P. aeruginosa* est très faible vu le nombre de souches résistantes, soit: 6 sur 9 (66%) et le diamètre des zones d'inhibition obtenu avec les souches sensibles. **Aouiche et al. (2012)**, ont constaté que l'isolat PAL111 a une forte activité antimicrobienne contre la plupart des champignons filamenteux toxigènes, des levures, des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui pourrait être expliqué selon **Normank et Normark, (2002)**, par la présence d'une résistance naturelle (intrinsèque) à de nombreuses  $\beta$ -lactamines, une mauvaise perméabilité membranaire, l'existence de mécanismes d'efflux actif et la production d'une céphalosporinase chromosomique inductible. Les  $\beta$ -lactamines actives sont les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), certaines céphalosporines (ceftazidime, cefépime), les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème) et les monobactams (aztréonam) (**Clave, 2011**).

On trouve que *P. aeruginosa* est également résistante aux aminopénicillines, céphalosporines de 1ère et 2ème génération, céfixime, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, ertapénème, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol, triméthoprim et les quinolones (**CA-SFM, 2015**). Les *Pseudomonas* sont donc des bactéries qui cumulent de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques tels que imperméabilité, hyperexpression efflux actif, modification de la cible (PLP), hydrolyse Enzymatique (pénicillinases, céphalosporinase et imipénémase) imposant une analyse régulière de leur activité (**Auajjar et al., 2006**).

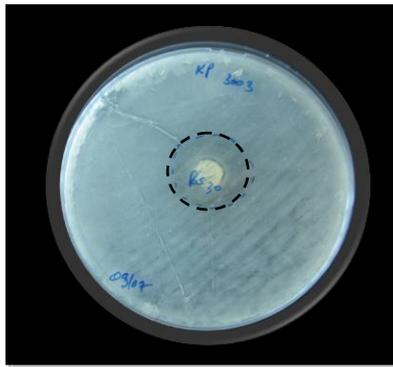
**c. Activité antagoniste vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae***

La majorité des souches testées de *Klebsiella pneumoniae* se sont révélées sensibles (7/8) avec des zones d'inhibitions plus ou moins importantes (tableau XXV).

Certaines souches isolées du prélèvement d'urine présentent une résistance plus ou moins importante par rapport aux autres souches isolées du même prélèvement. Des diamètres des zones d'inhibition de 26mm et de 24mm ont été observé avec *K. pneumoniae* 3003 et *K.pneumoniae* 8109 respectivement isolées d'urine. *K. pneumoniae* 2962 isolée de pus présente un diamètre de 20mm (Figure 13).

*Klebsiella* spp., produit naturellement des  $\beta$ -lactamases. Cette enzyme est présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme

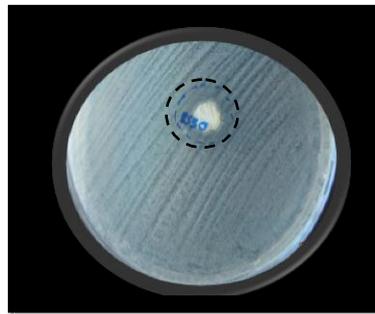
les pénicillines A, avant que ceux ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne (**Lozniewski et Rabaud , 2010**). La résistance naturelle est caractéristique d'une espèce bactérienne. Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification.



*K. pneumoniae* 3003 (26mm)



*K. pneumoniae* 8109 (24mm)



*K. pneumoniae* 2962 (20mm)

**Figure 13:** activité de la BS30 vis-à-vis de *K. pneumoniae*.

**Tableau XXV :** Activité antimicrobienne contre les *K. pneumoniae*

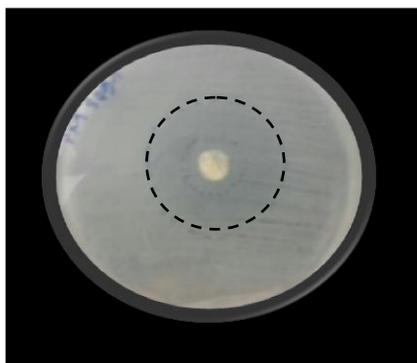
Prélèvement	Bactéries	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Leucorrhée	<i>K. pneumoniae</i> 2962	20
	<i>K. pneumoniae</i> 2750	18
Urine	<i>K. pneumoniae</i> 4742	19
	<i>K. pneumoniae</i> 3003	<b>26</b>
	<i>K. pneumoniae</i> 8156	18
	<i>K. pneumoniae</i> 5792	18
	<i>K. pneumoniae</i> 8109	<b>24</b>
	<i>K. pneumoniae</i> 2750	18

#### d. Activité antagoniste vis-à-vis de *P. mirabilis*

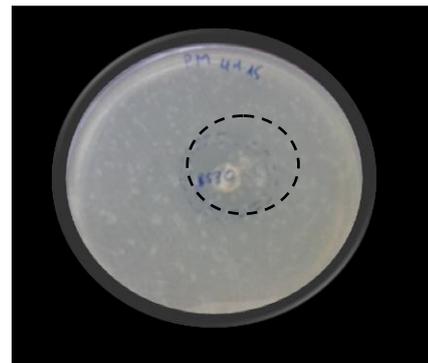
Sur les 22 bactéries appartenant à l'espèce *P. mirabilis* majoritairement isolées d'urine, 15 (68%) révèlent une sensibilité importante aux molécules bioactives synthétisées par la BS30. D'ailleurs, les meilleurs diamètres des zones d'inhibitions sont enregistré contre *P. mirabilis* 5913 et *P. mirabilis* 8491 atteignant 40 mm et un peu moins contre *P. mirabilis* 8578 (35mm), *P. mirabilis* 4115 et *P. mirabilis* 2460 avec 28mm chacune (Figure 14). Cette espèce est dotée d'une résistance naturelle à la tétracycline (TET), la colistine (Cs) et la nitrofurane (FT) et une très grande sensibilité aux antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines, aminosides, quinolones, cotrimoxazole, chloramphénicol (CA-SFM, 2015) ce qui justifie les grandes zones d'inhibition obtenues.

*P. mirabilis* a une résistance naturelle à la colistine, les cyclines (spécificité de l'espèce mirabilis) et les furanes. Les autres antibiotiques testés sur les bacilles à Gram négatif type Entérobactéries sont habituellement actifs ( $\beta$ -lactamines, aminosides, quinolones, cotrimoxazole, chloramphénicol) (Archambaud et Clave, 2004).

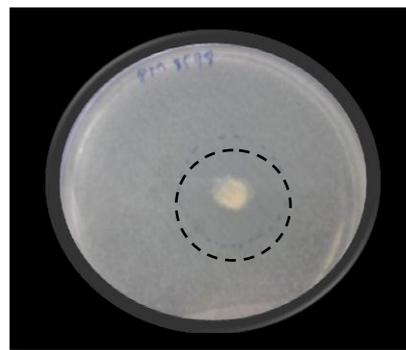
L'activité antibactérienne la plus importante de la souche BS30 vis-à-vis des bactéries Gram négatif a été enregistrée vis à vis *Proteus mirabilis*.



*Proteus mirabilis* 5913(40mm)



*Proteus mirabilis* 4115 (28 mm)



*Proteus mirabilis* 8578 (35mm)

**Figure 14:** Activités antibiotiques de la souche étudiée vis-à-vis de *Proteus mirabilis*

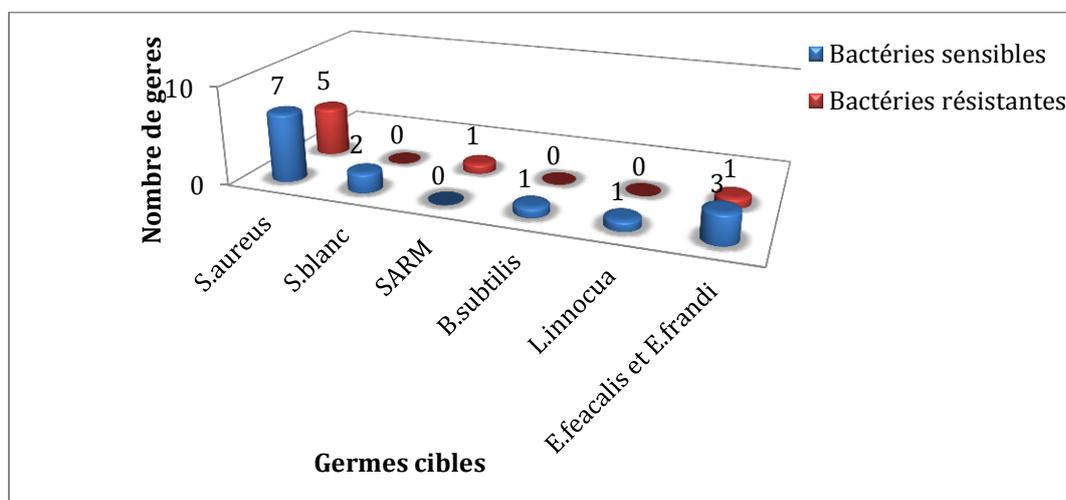
**Boughachiche et al. (2005) et Boudemagh et al. (2005)**, expliquent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture. Les diamètres des zones d'inhibition sont présentés sur le tableau suivant :

**Tableau XXIV:** Activité antimicrobienne contre les *P. mirabilis*

Prélèvement	Bactéries	Diamètres des zones d'inhibition (mm)
Pus	<i>P. mirabilis</i> 6741	18
	<i>P. mirabilis</i> 2460	28
	<i>P. mirabilis</i> 8617	20
Urine	<i>P. mirabilis</i> 2093	14
	<i>P. mirabilis</i> 4401	16
	<i>P. mirabilis</i> 4115	28
	<i>P. mirabilis</i> 6755	14
	<i>P. mirabilis</i> 5913	<b>40</b>
	<i>P. mirabilis</i> 8491	<b>40</b>
	<i>P. mirabilis</i> S	13
	<i>P. mirabilis</i> PM	18
	<i>P. mirabilis</i> 8578	35
	<i>P. mirabilis</i> 3539	18
	<i>P. mirabilis</i> 7651	09
	<i>P. mirabilis</i> 8364	16

### 2..2.1.2. Activité antagoniste de la BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram positif

De même, nos résultat montre que *S. aureus* est sensible aux molécules secrétées par la *Streptomyces* sp. BS30 avec un pourcentage de 58.33% (Figure 16).



**Figure 15:** Activité de la *Streptomyces* sp. BS30 vis-à-vis les bactéries Gram positives

La meilleure activité a été enregistrée vis-à-vis les *S. aureus* isolés des prélèvements de pus et le plus important diamètre est enregistré vis-à-vis *S.aureus* 7932 (58mm) (Figure 16). Les diamètres des zones d'inhibition sont rapportés dans le tableau XXI. Cependant aucune activité détectée vis à vis SARM contrairement aux résultats obtenu en utilisant la souche *Streptomyces* sp.MITS 1005 isolée du sol (Gwalior) par **Singh et al. (2012)** qui présente une activité vis à vis des germes pathogènes tel que le *S. aureus* Méthicilline Résistant (MRSA) et Enterococcus Vancomycine Résistante (VRE).



*Staphylococcus aureus* 7932



*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

**Figure 16** : Activité de la *Streptomyces* sp. BS30 vis-à-vis *Staphylococcus aureus* 7932 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Des zones d'inhibition importantes ont été enregistrées vis-à-vis des bactéries de références *B. subtilis* ATCC 6633 (39mm), *L. innocua* Clip 74915 (20mm), *E. faecalis* ATCC (48mm) (Tableau XXV).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Şahin et Uçur (2003)** qui ont isolé des souches de *Streptomyces* du sol de la Turquie avec une activité vis-à-vis de *S. aureus* de 11 à 30 mm. Des souches d'actinomycètes du même origine révèlent une inhibition entre 08 et 16mm pour les *S. aureus* et entre 3 et 10 pour *E. faecalis* (**Oskay et al., 2004**). Une activité plus importante de 22 mm a été obtenue avec une *Streptomyces* isolée du sol vis-à-vis *S. aureus* (**Samer et Al-Hulu, 2015**). **Devi et al. (2013)** a été constaté que la *Streptomyces* AC23 montre un large spectre d'action en particulier vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (38mm).

**Tableau XXV:** Activité de la *Streptomyces* BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram positif.

Nature de prélèvement	Bactérie	Diamètres des zones d'inhibition (mm)
Pus	<i>S.aureus</i> 7932	58
	<i>S.aureus</i> 5481	22
	<i>S.aureus</i> 982	18
	<i>S.aureus</i> 4735	16
	<i>S.aureus</i>	13
Urine	<i>S.aureus</i> 6923	22
	<i>S.saprophyticus</i> 2517	20
	<i>S. saprophyticus</i> 9968	13
	<i>E.faecalis</i>	16
	<i>E.faecalis</i> ATCC	48

### 2.2.1.3. Activité antifongique de la BS30

L'activité antilevurienne de la souche BS 30 vis-à-vis *Candida albicans* est intéressante et atteint 17 mm de diamètre (*Candida albicans* 521) et 22mm (*Candida albicans* AA) (figure 17).



**Figure 17 :** Activité de la *Streptomyces* sp. BS30 vis-à-vis *Candida albicans* 521

Il est intéressant de noter que les champignons toxigènes et phytopathogènes sont fortement inhibés (Figure 18), comme dans le cas d'*Aspergillus carbonarius* A731 dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 30mm, *Mucor rammanianus* NRRL 1829 (20mm), *Aspergillus parasiticus* CB5 (20mm) et *Aspergillus niger* 939N (20mm), à un degré moindre *Aspergillus flavus* NRRL 3251 (10mm) et *Fusarium polyferatum* (10mm). Une résistance de *Botrytis cinerea* et *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 a été enregistré.

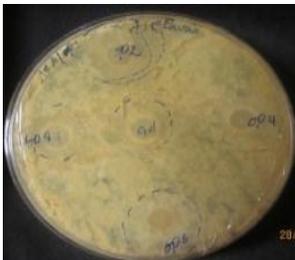
Les travaux de **Badji et al. (2005)**, montrent une importante activité antilevurienne de la souche *Actinomadura* sp. AC 170, contre *Candida albicans* (21 mm) et en particulier contre les champignons filamenteux. Ceci corrobore avec les résultats de la présente étude.



*Aspergillus niger* 939N



*Aspergillus carbonarius* A731



*Aspergillus flavus* NRRL 3251



*Aspergillus parasiticus* (CB5)



*Mucor rammanianus* NRRL 1829

*Fusarium polyferatum*

**Figure 18:** Activité de la *Streptomyces* sp. BS30 vis-à-vis les moisissures.

### 2.2.2. Mise en évidence de l'activité antibiotique de la *Streptomyces* sp. BS30 sur milieu liquide

Selon le diamètre des zones d'inhibitions ainsi que le spectre, la souche BS30 présente des activités antibactériennes et antifongiques importante sur milieu solide, d'où l'intérêt de réaliser des cultures liquides dans le but de déterminer sa capacité à produire des molécules actives dans ce milieu, d'étudier la cinétique de la production, d'extraire et d'essayer de semi purifier les molécules bioactives synthétisées.

L'analyse des résultats obtenus lors du premier criblage par la méthode des cylindres d'agar basée sur l'importance du diamètre de la zone d'inhibition en tenant compte des profils de résistance des germes cibles a permis de choisir des bactéries qui sont révélées sensibles aux molécules bioactives synthétisées par la *Streptomyces* sp. BS30 et résistantes à une batterie d'antibiotiques pour la suite de ce travail expérimental.

La souche étudiée a été testée vis-à-vis de 5 bactéries à Gram positif, 6 bactéries à Gram négatif et une levure. Les germes retenus sont reportés dans le tableau suivant :

**Tableau XXVI:** Germes retenues pour l'activité antagoniste de la BS30.

Bactéries Gram positif	Bactéries Gram négatif	Levure
<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 2517 ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Listeria innocua</i> clip 74915; <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633;	<i>Escherichia coli</i> 9097 ; <i>Proteus mirabilis</i> 5913 ; <i>Acinetobacter boumannii</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> 2750. <i>Pseudomonas aeruginosae</i> 8665 ; <i>Citrobacter diversis</i> 11952 ;	<i>Candida albicans</i> ;

Des cultures liquides ont été préparées afin d'évaluer l'activité antibactérienne, la cinétique de la production, de la croissance et de la variation du pH des substances actives de la BS30.

Pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne, deux techniques de diffusion ont été adoptées ; la méthode des puits et la méthode des disques.

### 2.2.2.1. Etude de la cinétique de la croissance, de la production et du pH

#### a. Cinétique de la croissance

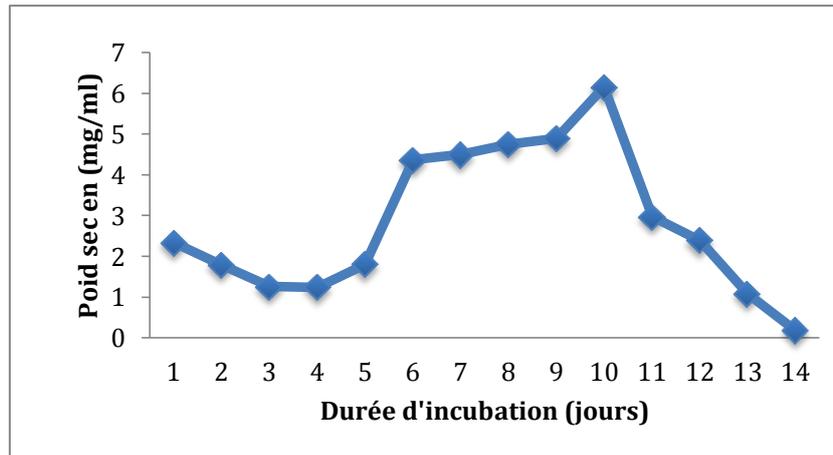
Les résultats de la cinétique de la croissance de la souche BS30, cultivée sur le milieu liquide M2, sont présentés sur la figure 19. La culture a duré 14 jours.

Durant la phase de croissance le poids sec augmente rapidement pendant les 24 premières heures jusqu'à 2.33mg/ml. Entre le premier et le cinquième jour, une diminution du poids sec a été observée à 1.8mg/ml qui peut être expliquée par la faible précision de la technique. Selon **Martin et McDaniel, (1975)**, le dosage des acides nucléiques représente l'une des techniques les plus favorables permettant de suivre la croissance avec plus de précision chez les microorganismes filamenteux.

L'allure du graphe de la figure 19 montre que la phase de latence est pratiquement inexistante, ce qui pourrait être expliquée d'une part, par le fait que la souche s'est adaptée aux constituants du milieu lors de la préculture et d'autre part à la présence du glucose dans le milieu M2 à raison de 1g/l, comme source de carbone, facilement assimilable, connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne (**Hermans et al., 1989**) .

Un optimum de croissance a été constaté au 10<sup>ème</sup> jour avec un poids sec de 6.16 mg/ml. La phase de déclin commence dès le 11<sup>ème</sup> jour avec une réduction considérable du poids sec qui a atteint 2.97mg/ml.

L'analyse des résultats obtenus a permis de constater que la souche BS30 est capable de croître dans ce milieu liquide. De nombreuses espèces de Streptomyces produisent un grand mycélium lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux liquides, ce qui est un inconvénient pour une application industrielle car il est associé à une croissance lente et à une mauvaise utilisation des nutriments (**Van Dissel, 2015**). Tandis que, **Badji et al. (2005)** rapportent que certains actinomycètes tels que la souche *Actinomadura* sp. AC 170 a la particularité de ne pas croître dans les milieux liquides, aussi bien complexes que synthétiques et dans différentes conditions (aération, température, pH, lumière,...etc.), Cependant ce phénomène n'a jamais été signalé chez les actinomycètes.

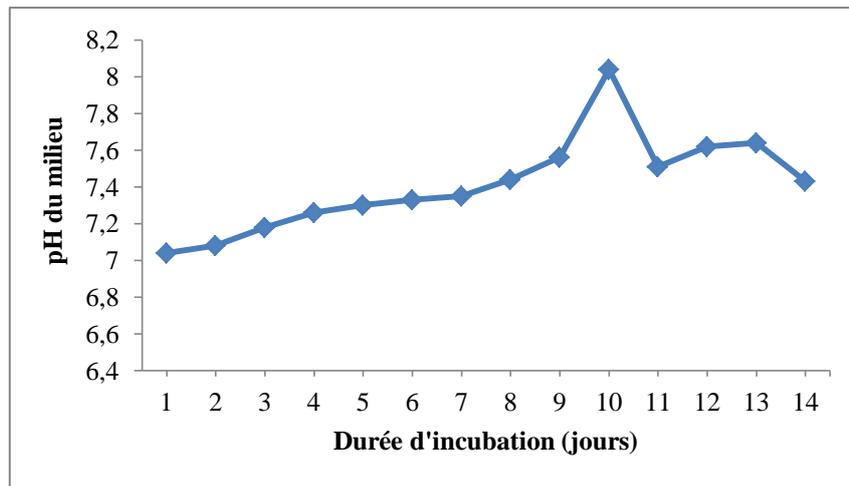


**Figure 19:** Cinétique de la croissance de la *Streptomyces* sp. BS30 sur milieu liquide.

### b. Cinétique du pH

La mesure des pH des milieux effectuée quotidiennement pendant les 14 jours d'incubation de la souche étudiée a permis de déduire que cette dernière tend vers une neutralisation du pH qui passe de 8 (pH initial) le 1<sup>er</sup> jour à 7.04 au 9 jour, suivie d'une alcalinisation du milieu qui remonte à pH 8 le 10<sup>ème</sup> jour (Figure 20). Cette diminution de pH du milieu de culture pourrait être due à la libération d'acides organiques (**Reghioua et al., 2008**). La phase stationnaire commence après 10 jours de fermentation ou le pH atteint son maximum 8. Elle est caractérisée par une faible augmentation du pH (Basique) qui est probablement due à la dégradation des sources azotées (**Reghioua et al., 2008**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Boughachiche et al. (2005)**, qui confirment l'abondance des actinomycètes dans les milieux faiblement acides.

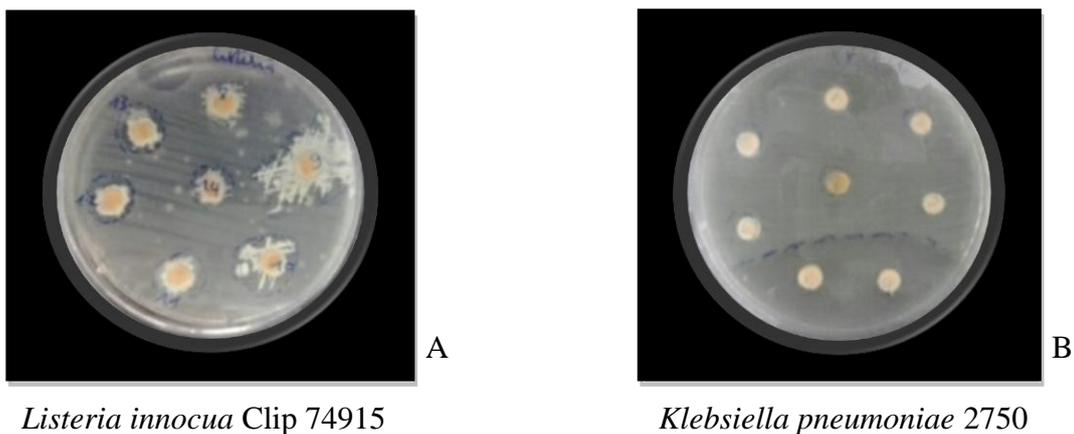
L'acidification du milieu de culture au cours de la fermentation affecte la stabilité des antibactériens mais pas celle des antifongiques, sachant que la plupart des antifongiques connus sont stables à pH acide ou faiblement acide (**Holmberc, 1978**). Alors que la production d'antibactériens est plutôt favorisée par un pH alcalin du milieu de culture (**Pandey et al., 2005**).



**Figure 20:** Cinétique du pH de la souche BS30.

### c. Cinétique de la production des molécules bioactives.

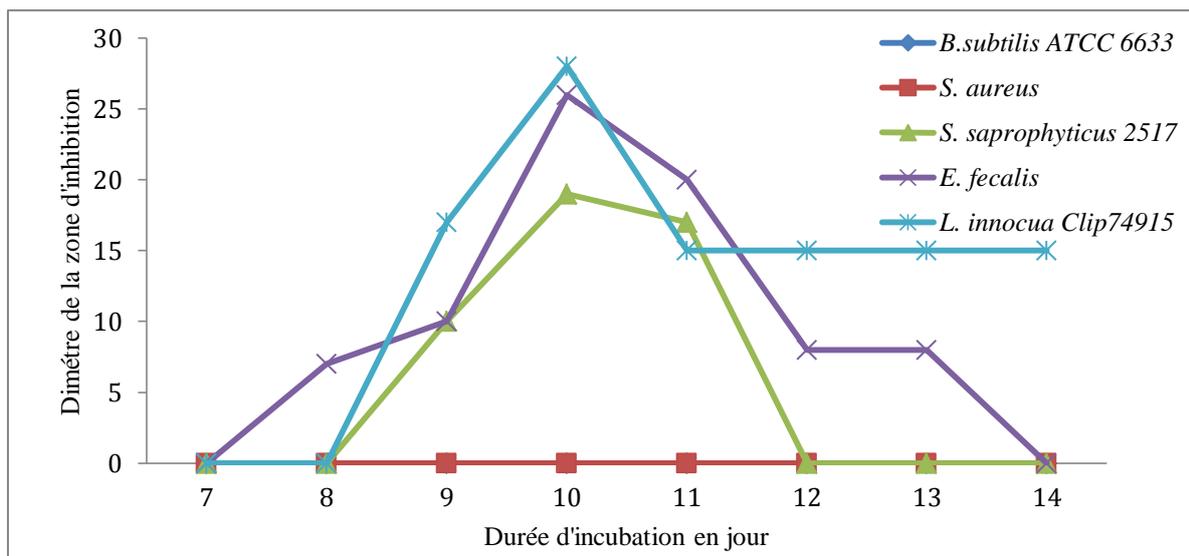
L'activité de la souche BS30 en fonction du temps est réalisée sur milieu M2. Cette activité est suivie par la méthode des puits et la méthode des disques, en utilisant le bouillon de culture brut, non concentré. Les résultats sont illustrés par les figures 21, 22 et 23.



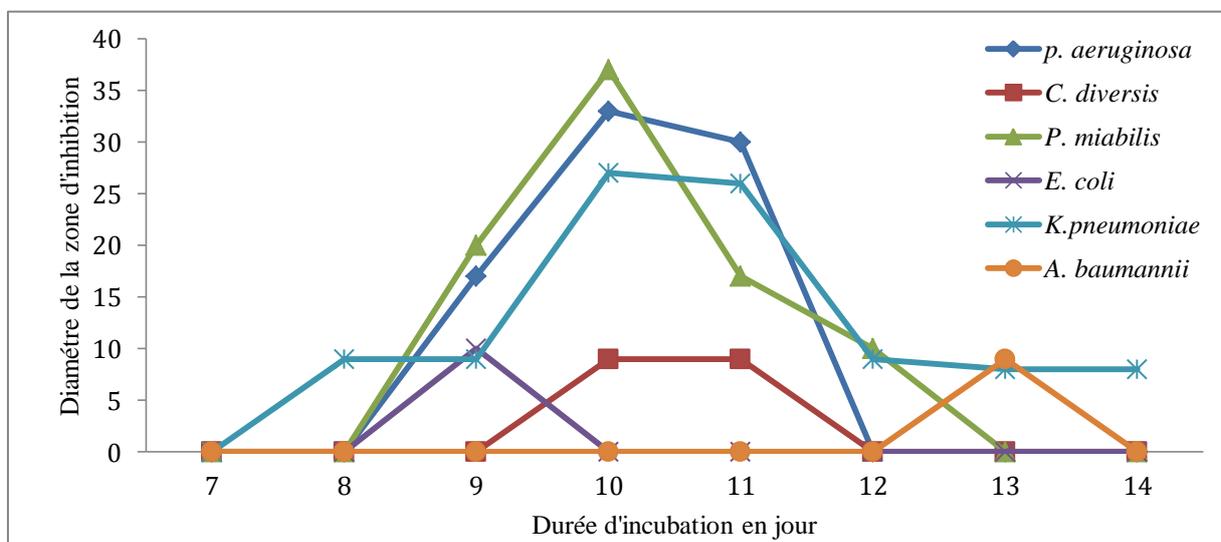
**Figure 21:** Mise en évidence de l'activité de la *Streptomyces* sp. SY-BS30 sur milieu liquide testée par la méthode des disques. (A) sur *Listeria innocua* Clip 74915, (B) sur *Klebsiella pneumoniae* 2750

L'activité antibactérienne de la souche BS30 sur milieu liquide apparaît dès le 8<sup>ème</sup> jour d'incubation vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* 2750 et *Enterococcus faecalis* avec des diamètres de zone d'inhibition de 9 et 7mm respectivement. Cette activité atteint son maximum au 10<sup>ème</sup> jour contre *Pseudomonas aeruginosae* 8665 (33mm), *Klebsiella pneumoniae* 2750 (27mm), *Enterococcus faecalis* (26mm), *Escherichia coli* 9097, *Listria*

*innocua* Clip 74915 (28mm), *Proteus mirabilis* 5913 (37mm) et *Staphylococcus saprophyticus* 2517 (19mm). Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de **Atta et al. (2012)** qui ont rapporté la biosynthèse maximale des substances antimicrobiennes produites par *Streptomyces crystallinus* AZ-A151 a été obtenue après 10 jours d'incubation, et avec ceux de **Sejiny, (1991)** qui a déterminé le coefficient de corrélation entre le temps d'incubation et le diamètre des zones d'inhibition. En effet, il a ainsi déduit qu'un temps d'incubation de 10 jours permettait d'avoir des zones d'inhibition importante. Et d'une manière générale, les premiers jours (4-7 jours) d'incubations sont caractérisés par la formation de biomasse alors que la production maximale d'antibiotiques est enregistrée durant la phase stationnaire de la croissance (**Sejiny, 1991**).



**Figure 22 :** La cinétique de la production de la BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram positives.



**Figure 23:** La cinétique de la production de la BS30 vis-à-vis des bactéries à Gram négatives.

Les activités débutent au 8<sup>ème</sup> jour, fin de la phase exponentielle pour atteindre des maximales au 10<sup>ème</sup> jour. Pour les deux souches *Listeria innocua* Clip 74915, *Klebsiella pneumoniae* 2750 l'activité persiste jusqu'à la fin de la culture. Cela indique que ces activités sont des métabolites secondaires. Aucune activité n'a été constaté du 1<sup>er</sup> au 8 jours d'incubation, alors que certains travaux rapportent que plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture (Seo et al., 2010).

Durant les tests d'activité, il a été remarqué que la souche étudiée avait perdu son potentiels antagonistes et inhibiteurs vis-à-vis de certains germes cibles (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) sur milieu liquide, ce qui pourrait être due à la faible concentration de l'agent antimicrobien dans le milieu. Ces souches se sont révélées sensibles sur milieu solide. Ces résultats concordent avec ceux de Maruyama et al. (1975) et Arasu et al. (2009), cependant lors de leur étude sur des souches d'actinomycètes, ils ont rapporté que l'activité antibiotique a été constatée uniquement sur milieux solides. D'après Moncheva et al. (2002) cela peut être dû à l'inadéquation du milieu de culture liquide utilisé pour la production d'antibiotiques.

D'autres études ont présentés des résultats comparables. En effet, Nediakova 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).

L'activité antibactérienne du surnageant de culture n'a pas pu être détectée par la technique des puits à cause de la faible concentration des substances antibactériennes dans ce dernier. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait qu'en milieu liquide lors de l'agitation, les filaments se fragmentent en petits fragments incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques (Bushell et al., 1997; Martin et Bushell, 1996 ; Reghioua et al., 2008).

Shomura et al. (1979) et Iwai et Omura, (1982) ont également remarqué que le passage des milieux solides aux milieux liquides pose quelque fois des problèmes. Ce qu'ils expliquent par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps alors que leur distribution autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie pas ou varie très peu.

Shomura et al. (1979) et Haj-Husein (2013) ont noté également une relation étroite entre la morphologie des filaments mycéliens et la productivité. En effet, le mycélium

végétatif prend une forme filamenteuse lorsque l'antibiotique est produit en milieu solide, il est cependant fragmenté en milieu liquide et aucune activité antimicrobienne n'est détectée.

L'analyse globale des données obtenues lors des activités antimicrobiennes des souches testées a permis de constater que ces résultats sont mieux exprimés par la méthode des cylindres d'agar. Cette méthode permet une meilleure visualisation et observation des zones d'inhibitions sur milieu solide.

### **II.3. Optimisation de la production des molécules bioactives par la souche *Streptomyces* sp. BS30**

#### **a. Choix du milieu de production**

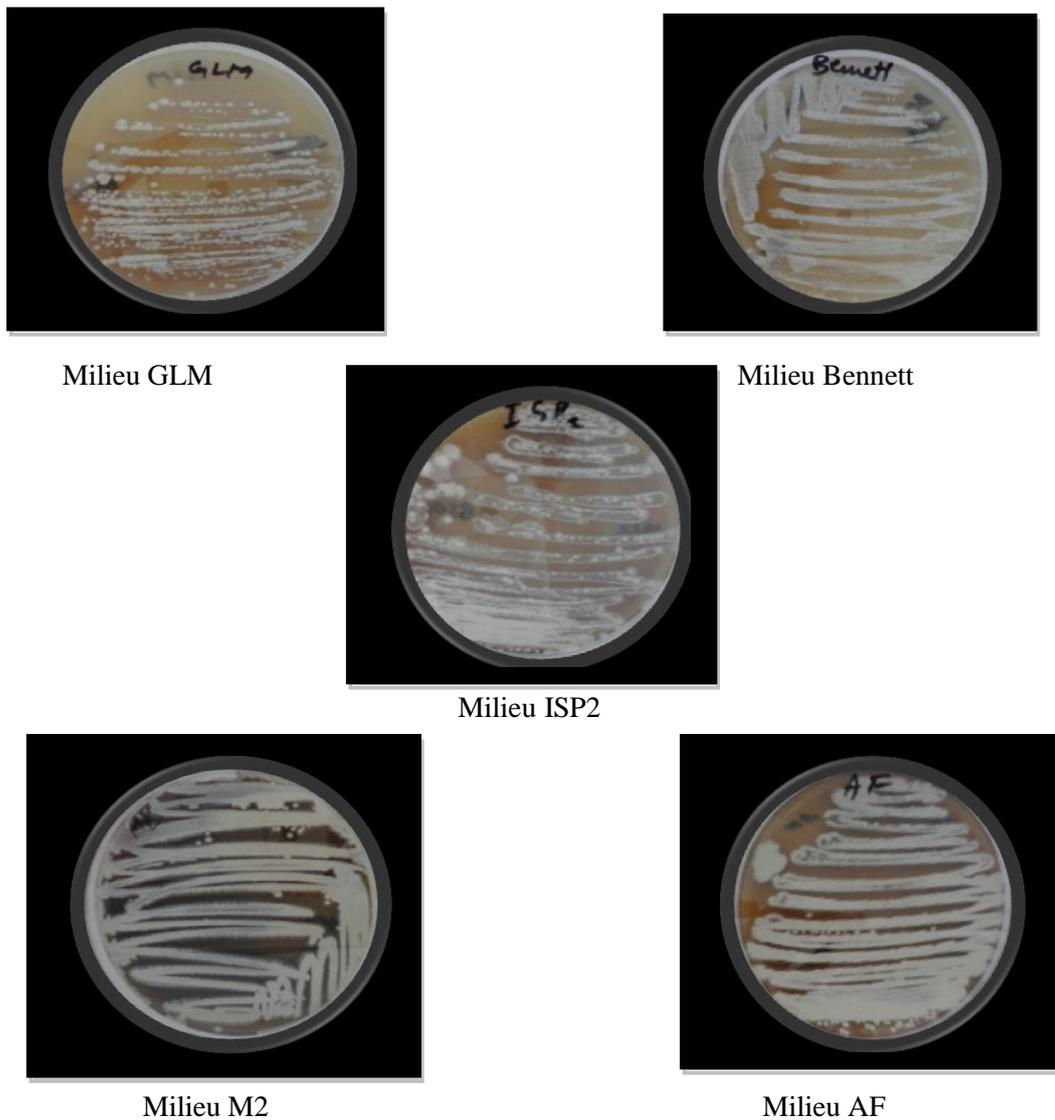
Cinq milieux de culture (M2, ISP2, GLM, AF et Bennett (composition donnée en annexe 2) ont été utilisés afin de déterminer le milieu nutritif optimal pour la production des substances bioactives par la souche *Streptomyces* sp.BS30.

Après 20 jours d'incubation, la souche BS30 s'est développée sur la plupart des milieux de culture utilisés (Figure 24), avec une très bonne croissance sur milieu M2 et AF, tandis que la croissance constatée sur les trois autres milieux ISP2, GLM et Bennett est plus modeste.

La croissance de la souche BS30 a été constatée durant 5 jours d'incubation sur milieu M2, ce qui correspond à la durée la plus courte, tandis que sur les milieux ISP2, Bennett, GLM, AF, la croissance a duré près de 20 jours d'incubation. Vu la courte durée d'incubation constatée sur milieu M2 et les résultats de la mise en évidence de l'activité de la souche BS30 (partie 1.1), sur ce même milieu M2; ce dernier a été retenu pour la suite du travail.

De nombreuses études d'optimisation ont été effectuées; l'étude de **Badji et al, (2006)**, menée sur 8 milieux de culture, parmi lesquels figure le milieu Williams (amidon-caseine-agar), ainsi le taux de production le plus important a été observé sur milieu ISP2. En 2005, la même équipe a également effectué une optimisation de la production en testant 5 milieux différents pour en conclure à l'efficacité du milieu GYEA.

Selon **Qmura et Tanaka (1986)**, la qualité et la quantité des composés du milieu influencent significativement la production d'antibiotique.



**Figure 24** : Croissance sur les 05 milieux de culture utilisés pour l'optimisation

### 2.3.1. Détermination des teneurs optimales des sources d'azote et de carbone nécessaires

La synthèse de métabolites secondaires biologiquement actifs (antibiotiques, antifongiques,...) est généralement liée et influencée par la composition de milieu de culture.

En utilisant comme milieu de base le milieu M2, cinq concentrations de la source de carbone (l'amidon) à 1% (m/v) et cinq concentrations de la source d'azote (la caséine) à 1% (m/v) ont été utilisées. Le milieu optimum de la production est choisi sur la base des diamètres des zones d'inhibition obtenues lors des tests d'activités vis-à-vis des germes révélés sensibles afin de déceler les moindres variations. Les résultats sont présentés dans le tableau XXVI.

Les résultats de cette étude corroborent ceux de :

a) **Atta et al. (2011)** qui montrent que le glycerol, l'amidon, et le maltose étaient d'excellentes sources de carbone pour la production de la néomycine par *Streptomyces fradiae*,

b) **Atta et al. (2012)** réalisée sur *Streptomyces crystallinus*. A151 AZ qui indiquent que l'amidon est l'excellente source de carbone pour la production d'antibiotiques.

**Mellouli et al. (2003)** ont rapporté que la production des antibiotiques n'a été observée lorsque l'amidon est utilisé comme source de carbone.

Une étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats obtenus a démontré que l'apparition des différentes activités antimicrobiennes chez la souche BS30 est fonction des milieux de culture et des microorganismes cibles utilisés, ce qui concorde avec les résultats de **Boughachiche et al. (2005)**. Elle a démontré que les facteurs : souche productrice, milieu, souche-test et les interactions « souche productrice/milieu », « souche productrice/souche-test », « milieu/souche-test » et « souche productrice/milieu/souche-test » sont significatifs sur l'apparition des activités antibactériennes. Les diamètres des zones d'inhibition les plus importants sont obtenus avec le milieu M2 avec des concentrations de 10g d'amidon et 0.1g de caséine pour tous les germes testés.

Pour la suite, le milieu utilisé a été le M2 à 10g d'amidon et 0.1g de caséine.

**Tableau XXVI:** Diamètre des zones d'inhibitions (mm) par souche cible en fonction des concentrations en amidon et caséine.

<b>Germe cible: <i>Staphylococcus aureus</i> 7932</b>					
<b>CASEINE</b>	<b>AMIDON</b>				
	<b>12g</b>	<b>11g</b>	<b>10g</b>	<b>9g</b>	<b>8g</b>
<b>0.1g</b>	11	13	17	13	13
<b>0.2g</b>	13	15	15	14	13
<b>0.3g</b>	13	16	15	13	13
<b>0.4g</b>	13	13	13	13	14
<b>0.5g</b>	17	16	15	15	16
<b>Germe cible: <i>Proteus mirabilis</i> 5913</b>					
<b>CASEINE</b>	<b>AMIDON</b>				
	<b>12g</b>	<b>11g</b>	<b>10g</b>	<b>9g</b>	<b>8g</b>
<b>0.1g</b>	14	15	17	17	17
<b>0.2g</b>	12	17	17	17	17
<b>0.3g</b>	15	16	17	17	17
<b>0.4g</b>	15	17	17	17	17
<b>0.5g</b>	16	17	17	17	17
<b>Germe cible : <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633</b>					
<b>CASEINE</b>	<b>AMIDON</b>				
	<b>12g</b>	<b>11g</b>	<b>10g</b>	<b>9g</b>	<b>8g</b>
<b>0.1g</b>	11	11	17	11	13
<b>0.2g</b>	14	13	17	13	13
<b>0.3g</b>	14	15	15	13	13
<b>0.4g</b>	14	15	11	13	13
<b>0.5</b>	15	13	14	14	15

La performance sur milieu GBA (expliciter ce milieu), très utilisé dans la mise en évidence de l'activité antimicrobienne (**Shomura et al., 1979** ; **Hilali et al., 2002**) s'expliquerait, d'une part, par la présence, dans ce milieu d'amidon et de glycérol, qui sont considérés par plusieurs chercheurs comme des composants à consommation lente augmentant la production de métabolites secondaires (**Aharonowitz, 1980; Volker et Altaba, 2001 ; Hasavada et al., 2006**), et d'autre part, par la présence du carbonate de calcium qui a le rôle d'agent tampon, neutralisant toute acidification du milieu ce qui conduit à une meilleure production d'antibiotique (**Tanaka, 1992**). Les résultats trouvés confirment que la composition des milieux de culture, en particulier la nature et la concentration des sources de carbone et de nitrogène, influent considérablement sur la quantité et la qualité des substances antimicrobiennes sécrétées par les actinomycètes (**Arasu et al., 2009; Song et al., 2012**). Une faible modification de la composition du milieu de culture peut favoriser ou inhiber la production. En effet **Kauffmann, (1962)** indique qu'une production intense d'un antibiotique par une souche d'actinomycète est observée sur un milieu renfermant de l'extrait de malt et 1% de farine de soja. Cette production n'a pas lieu sur le même milieu avec 0.5% de farine de soja, bien que la croissance de la souche soit identique sur les deux concentrations de farine de soja. **Ripa et al. (2009)**, ont indiqué que la production maximale des molécules antimicrobiennes par une souche de *Streptomyce* sp. RUPA-08PR, est observée quand le milieu est supplémenté avec 2% de glucose. En plus des facteurs nutritionnels, d'autres facteurs, influents sur la production des molécules antimicrobiennes, en particulier le pH, la température, et l'inoculum (**Goodfellow et Williams, 1983, Muiru et al., 2007 ; Atta et al., 2010**).

La production d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires exige souvent des cultures avec une substance nutritive limitante pour la croissance (**Bu'Lock, 1974 ; Bushell, 1983**). En général, le métabolisme secondaire débute lorsque le taux de croissance cellulaire diminue; ceci peut conduire, en culture discontinue, à un découplage entre croissance et production de l'antibiotique (**Liao et al., 1995**). Néanmoins, lors de cultures de *Saccharopolyspora erythrae*, la production d'érythromycine est associée à la croissance en limitation ou non d'oxygène.

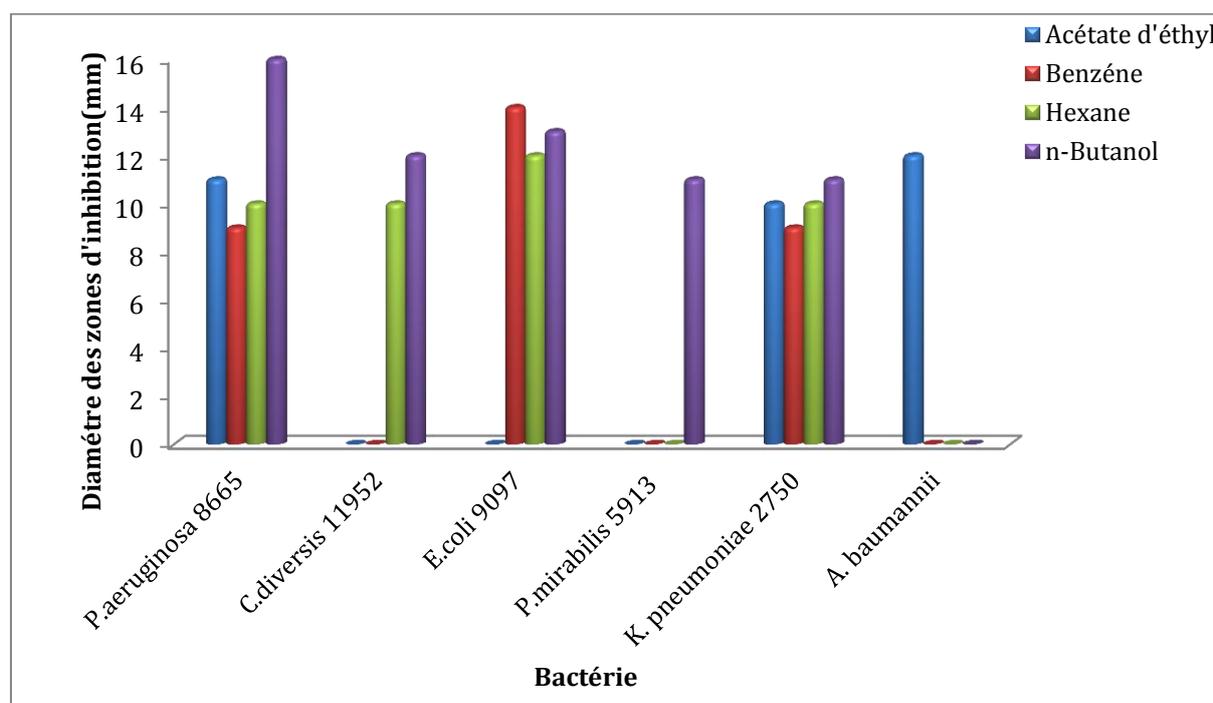
## 2.4. Extraction des substances bioactives de *Streptomyces* sp.BS30

### 2.4.1. Extraction à partir du milieu liquide

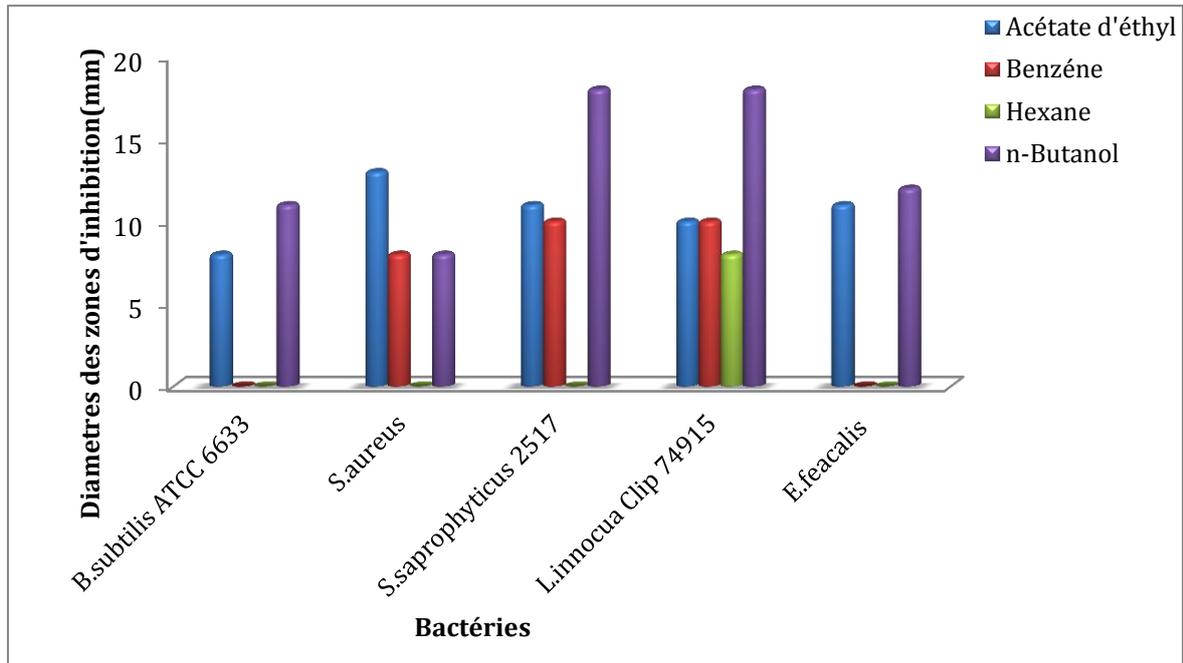
L'extraction des molécules bioactives à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Cinq solvant d'extraction de polarité différentes ont été utilisés; *n*-butanol, l'acétate d'éthyle, benzène et le *n*-hexane.

Les activités antibiotiques des extraits organiques de la souche *Streptomyces* sp.BS30 testée ont été décelées dans les phases organiques de quatre solvants : acétate d'éthyle, benzène, *n*-hexane, et *n*-butanol (Figure 25). Elles sont plus ou moins importantes en fonction du solvant organique utilisé.

L'apparition de l'activité antibactérienne dans un solvant polaire (le butanol) et un autre apolaire (l'hexane), suppose qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien une ou plusieurs molécules solubles dans des solvants variés. Cette dernière hypothèse est plus plausible puisque selon **Guernet et Hamon (1981)**, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers. Différent types de substances antimicrobiennes de *Streptomyces* sp. ont été décrites, incluant les aminoglycosides, les macrolides, les nucléosides, les polyenes, les polyester et des tetracyclines (**Mellouhi, 2003**).



**Figure 25(a):** Effet des extraits organiques sur la croissance des bactéries à Gram négatif



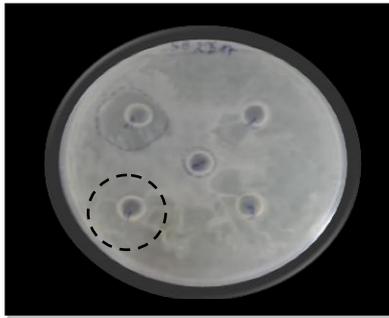
**Figure 25 (b):** Effet des extraits organiques sur les bactéries à Gram positive

**Figure 25 :** Effet de solvants d'extraction sur l'activité de la BS30 vis-à-vis des germes cibles

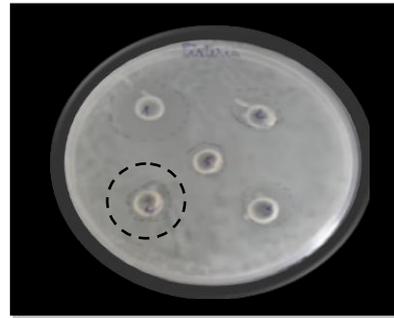
Les résultats obtenus avec l'extrait brut au n-butanol du surnageant de la culture de la souche BS30 montrent des activités inhibitrices vis-à-vis toutes les bactéries-tests Gram positives, Gram négatives utilisée et la levure *Candida albicans*.

La figure 26 montre une sensibilité importante des bactéries Gram positives à l'extrait brut au n-butanol avec des diamètres importants (18mm) enregistrés vis-à-vis de *L. innocua* Clip 74915 et de *S. saprophyticus* 2517, également vis-à-vis de *E. faecalis* (12mm). Cette sensibilité a été constatée pour les bactéries Gram négatives avec des diamètres d'inhibition important particulièrement *P. aeruginosa* 8665 (16mm) et *Escherichia coli* 9097 (13mm). Par contre *A. baumannii* était résistante.

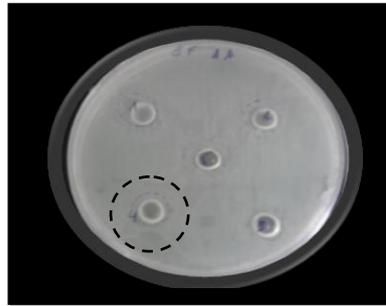
L'activité antilevurienne a été constatée sur *Candida albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 16mm.



*Staphylococcus saprophyticus* 2750

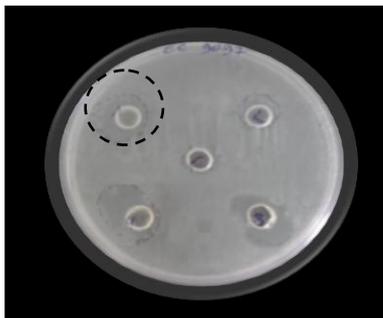


*Listeria innocua* Clip 74915

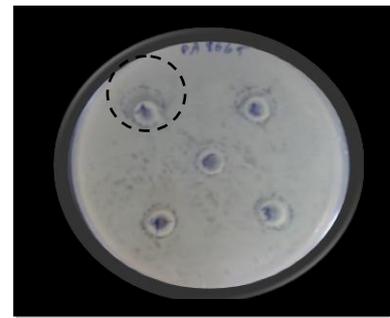


*Enterococcus faecalis*

(a) : Effet des extraits bruts butanoliques vis à vis les bactéries Gram positif

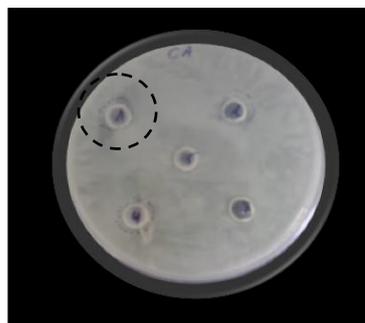


*Escherichia coli* 9097



*Pseudomonas aeruginosa* 8665

(b) : Effet des extraits bruts butanoliques vis à vis les bactéries Gram positif



(c) : Effet des extraits bruts butanoliques vis à vis *Candida albicans*

**Figure 26:** Effet des extraits bruts butanoliques sur les germes cibles.

Les résultats obtenus avec l'extrait à l'acétate d'éthyle du surnageant de la culture de la souche BS30 présente une activité antagoniste sur toutes les bactéries-tests Gram positifs utilisées et sur les bactéries Gram négatifs à l'exception d'*E. coli* 9097, *P. mirabilis* 5913 et *C. diversis* 11952. L'activité antibactérienne apparaît aussi avec les extraits bruts à l'hexane et au benzène. Dans ce dernier, l'activité antibactérienne a été enregistrée vis-à-vis des bactéries à Gram positif *S. aureus* (8mm), *S.saprophyticus* (10mm) et *L. innocua* Clip 74915 (10mm) et les bactéries à Gram négatif *E. coli* 9097 (14mm), *P. aeruginosa* 8665 (9mm) et *K. pneumoniae* 2750 (9mm).

A l'exception de l'extrait brut hexanique, les résultats obtenus montrent une absence d'activités antibactériennes vis-à-vis de la majorité des germes cibles Gram positif. Seul *L. innocua* Clip 74915 s'est avérée sensible avec un diamètre d'inhibition de 8mm. Alors que 4/6 bactéries à Gram négatif ont été sensibles à cet extrait avec des diamètres d'inhibition plus au moins importants obtenus avec *E. coli* 9097 (12mm), *P. aeruginosa* 8665 (10mm), *C.diversis* (10mm) et *K.a pneumoniae* 2750 (10mm).

L'analyse des résultats a permis de conclure que le meilleur solvant d'extraction est le n-butanol. Ce dernier a présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de tous les germes cibles avec des diamètres d'inhibition importants en comparaison avec d'autres extraits. De nombreux travaux ont confirmé l'efficacité du n-butanol par rapport aux autres solvants utilisés, entre autres, celle réalisée par **Boudjella et al. (2006)** sur le genre *Streptosporangium*, **Zitouni et al. (2005)**, sur le genre *Saccharothrix* et *Nocardiopsis*. **Bouras et al. (2013)** sur la *Streptomyces* sp. PP14. Alors que **Badji et al. (2006)**, ont rapporté que le Benzène était le meilleur solvant d'extraction des substances actives des souches actinomycétales du genre *Actinomadura*. L'acétate d'éthyle pour *Streptomyces* sp. GZ024 (**Kiran et al., 2015**, **Samer et Al-Hulu, 2015**).

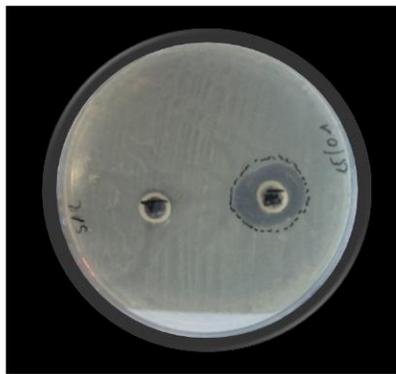
L'activité antilevurienne vis-à-vis de *Candida albicans* a été détectée dans tous les extraits à l'exception de l'extrait brut au benzène. Ces résultats corroborent ceux de **Franco et Countinho, (1991)** et **Augustine et al., (2005)**, où la plupart des antibiotiques antifongiques connus, sont surtout extraits par l'acétate d'éthyle. Alors que, **Augustine et al. (2005)**, ont obtenu les meilleures activités vis-à-vis des champignons filamenteux en utilisant l'hexane comme solvant d'extraction à partir de *Streptomyces albidoflavus*.

#### 2.4.2. Extraction à partir du mycélium

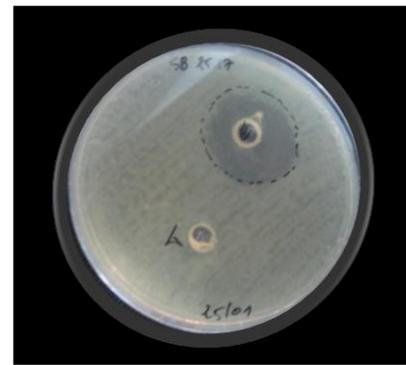
Dans l'extrait méthanolique du mycélium, les activités contre tous les germes cibles utilisés sont absentes.

### 2.4.3. Extraction à partir de milieu solide

Les résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait brut butanolique à partir du milieux solides sont illustrés par la figure 27 qui montre une activité inhibitrice sur tout les germes cibles (bactéries à Gram positif et à Gram négatif). Ces résultats confirment ceux trouvés dans la partie extraction sur milieu liquide. Le diamètre le plus important a été constaté vis-à-vis de *S. saprophyticus* 2517 (30mm) suivi de *S. aureus* (22mm), *B. subtilis* ATCC (20mm) et *L. innocua* Clip 74915 (19mm).



*Staphylococcus aureus*



*Staphylococcus saprophyticus* 2517



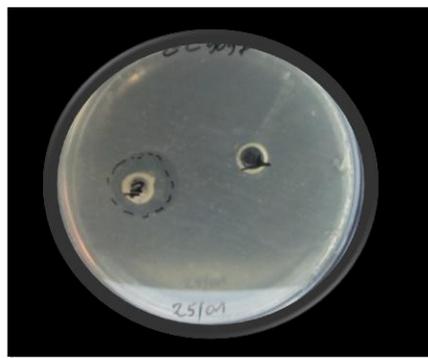
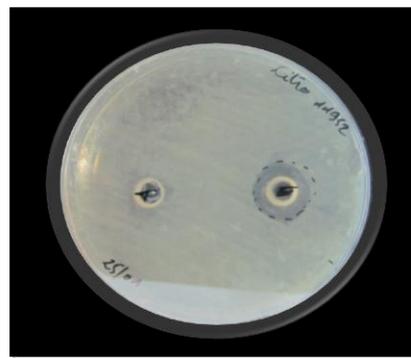
*Bacillus subtilis* ATCC



*Listeria innocua* Clip 74915.

**Figure 27** : Effet de l'extrait butanolique sur les bactéries à Gram positives.

Des diamètres importants ont été constatés aussi vis-à-vis des bactéries Gram négatives (Figure 28).; *K. pneumoniae* 2750 (23mm), *P. aeruginosa* (22mm), *P. mirabilis* 5913 (20mm), *E. coli* 9097 (18mm) suivi de *C. diversis* 11952 (16mm)

*Pseudomonas aeruginosa**Klebsiella pneumoniae* 2750*Escherichia coli* 9097*Citrobacter diversus* 11952**Figure 28:** Effet de l'extrait n-butanolique sur les bactéries à Gram négatives.

L'extrait organique brut au n-butanol de la souche BS30 présente des activités antibactériennes importantes, ce qui montre que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable qu'à partir d'un milieu liquide. Plusieurs auteurs ont remarqué que la production des antibiotiques sur milieux solides est nettement meilleure et le passage au milieu liquide pose quelques problèmes, soit par l'arrêt de la synthèse des antibiotiques (Shomura *et al.*, 1979), ou par une diminution de leur production (Radhika *et al.*, 2011 ; Sharma *et al.*, 2011 ; Singh *et al.*, 2006). Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux milieux (Bushell, 1993) ; en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* fragmentent ce qui diminue leur capacité à produire des antibiotiques (Stocks et Thomas, 2001; Reghioua *et al.*, 2008) car généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (Olson et Ratzkin, 1999), contrairement au milieu solide où le mycélium n'est pas fragmenté ce qui favorise une production importante

d'antibiotiques (**Gurung et al., 2009**). Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus.

## 2.5. Détection et semi-purification des antibiotiques

Les activités antibiotiques sont d'abord détectées sur une plaque de gel de silice. La phase organique active ayant montré les meilleures activités antibiotiques est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (0,25 mm d'épaisseur).

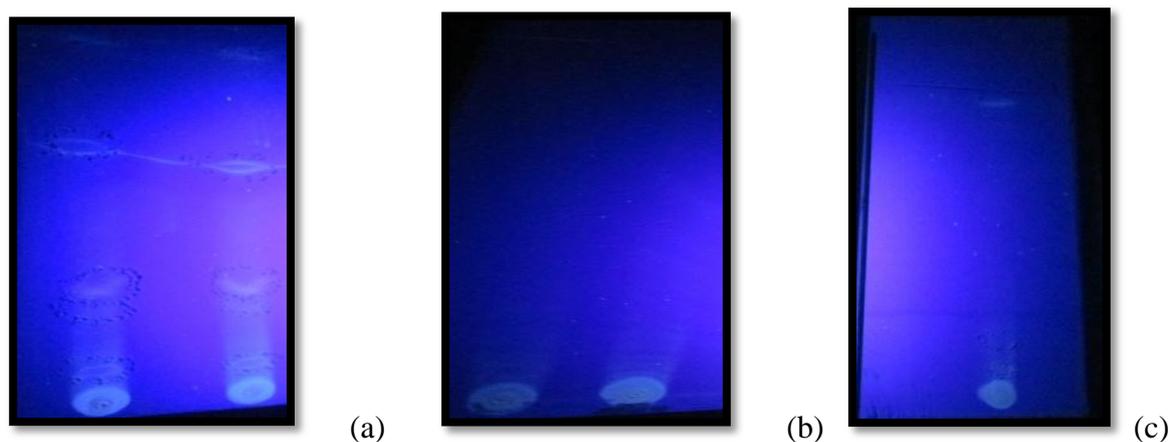
La caractérisation chimique des molécules bioactives sécrétées par la *Streptomyces* BS30 est réalisée par chromatographie sur couche mince, en utilisant quatre systèmes de solvant: *n*-Butanol /Acide acétique /Eau (B.A.E) (60: 20: 20 ; (v: v: v)), *n*-Hexane /Dichlorométhane / Méthanol (HDM) (70: 30: 4 ; (v: v: v)), Acétate d'Ethyle/ Méthanol (A.M.) (100: 15; (v: v)) et. Acétone (Ac) (100 (v)).

### 2.5.1. Révélation sous lumière UV

Les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm et une fluorescence à 366 nm. Le meilleur système d'élution sera sélectionné pour sa capacité à séparer les extraits bruts d'antibiotiques. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 29.

En exposant la plaque à une source de radiation UV de 254nm (absorption), certains composés apparaissent sous forme de tâches brillantes. Les tâches sont alors délimitées, ce qui permettra de situer les substances actives, entre elles et par rapport aux composés non actifs. Ceci facilitera ultérieurement le processus de purification.

D'après la figure 29, il est évident que le meilleur système d'élution ayant permis une bonne séparation, des constituants de l'extrait brut butanolique de la *Streptomyces* BS30 est *n*-Hexane /Dichlorométhane / Méthanol (HDM) avec un rapport de (70: 30: 4 ; (v: v: v)) (Figure 29a). Avec certains systèmes utilisés, les extraits sont : soit restés au point de spot (cas de *n*-Butanol /Acide acétique /Eau (B.A.E) (60: 20: 20 ; (v: v: v)), et Acétone (Ac) (100 (v)) (Figure 29b), soit ils ont migré jusqu'au front du chromatogramme (cas de l'acétate d'éthyle/Méthanol (100 : 15. v/v)) (Figure 29c).



**Figure 29:** Aspect des substances actives sous la lumière UV.

Quatre taches ont été obtenues pour le système de solvant *n*-Hexane /Dichlorométhane / Méthanol (HDM) (70: 30: 4 ; (v: v: v)) qui ont été révélées par la lumière UV à 254 nm (Figure 29a), l'une migre rapidement et se caractérise par un Rf de 0.73, une autre moins rapide avec un Rf de 0.33 et deux autres avec un Rf de 0.26 et 0.066, cette dernière a migré d'un centimètre à partir de l'emplacement du dépôt ou spot.

### II.5.2. Bioautographie

Après avoir sélectionné les solvants d'extraction ayant permis une meilleure récupération des activités antibiotiques par antibiographie, et après avoir procédé au choix du système d'élution qui permet une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts de *n*-butanol à savoir *n*-Hexane/Dichlorométhane/Méthanol (HDM) (70: 30: 4 ; (v: v: v)); les phases organiques sont analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les antibiotiques sont détectés par bioautographie vis-à-vis de *B. subtilis* ATCC 6633.

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été impossible de distinguer l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis du germe test utilisé, après plusieurs tentatives. Ce qui pourrait s'expliquer, par une faible quantité d'antibiotiques produits, une bonne partie des substances actives serait perdue durant les étapes successives d'extraction.

### II.5.3. Révélation par solution chimique

Après avoir choisi le meilleur solvant de migration et déterminé les Rf des substances bioactives, d'autres plaques ont été préparées dans les mêmes conditions, qui vont servir à des révélations par des solutions chimiques dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des molécules bioactives. La surface des plaques a été pulvérisée par les différents

révélateurs chimiques qui sont le diphénylamine-aniline, la ninhydrine, la vanilline-acide sulfurique et le formaldéhyde-acide sulfurique.

La révélation chimique a permis d'obtenir, pour la première et la deuxième tache, une réaction positive pour la ninhydrine et le formaldéhyde-acide sulfurique et pour la troisième et la quatrième, la révélation était positive uniquement pour le formaldéhyde-acide sulfurique, tandis que la révélation par La vanilline-acide sulfurique et par Le diphénylamine-aniline étaient négative pour toutes les autres taches (Figure 30).

La ninhydrine est un révélateur des amines, des acides aminés et des oses amines. La Couleur rose de la première tache suppose que ce produit est glycosylé (Figure 30a).

La révélation par le formaldéhyde-acide sulfurique a donné une tache de couleur brun, formant un smear, tout au long du trajet de la migration ce qui permet de conclure que la substance active produite par la BS30 est composée des aromatiques polycycliques (Figure 30b). Pareille pour la troisième et quatrième tache.



Révélation par la ninhydrine (a)



Révélation par formaldéhyde/ acide sulfurique (b)



**Figure 30:** Chromatogramme des substances de la *Streptomyces* sp. BS30.

## Conclusion

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure. La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressive pour l'hôte semble toujours indispensable.

Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (70% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

Dans le but de disposer d'une collection germes cibles 96 des isolats, 2 levures et 8 champignons ont été isolés au niveau de centre Hospitalo-Universitaire Targa Ouzemmour Bejaia, deux souches de *Streptomyces*: *Streptomyces* sp.BS30 et *Streptomyces* sp.SY-BS05 ont été utilisées. L'étude de leurs activités antibiotiques, l'extraction et la caractérisation partielle des molécules bioactives synthétisées ont été réalisées.

Les résultats de l'étude des paramètres physiologiques montrent que les deux souches étudiées sont alcalophiles (pH 8 pour la *Streptomyces* sp.BS30 et pH 10 pour et la *Streptomyces* sp.SY-BS5), et halotolérantes à des concentrations entre 0,5% et 5% de NaCl.

L'analyse des résultats obtenus montre que la souche *Streptomyces* sp.BS30 est douée de deux activités antimicrobiennes sur milieu solide. L'activité antagoniste de *Streptomyces* sp. BS30 vis-à-vis de 50 bactéries pathogènes (Gram positif et Gram négatif), 7 champignons filamenteux pathogènes et 2 levures sur milieu M2 solide démontre qu'elle est caractérisée par un large spectre d'action. Elle a montré une action antagoniste contre les bactéries à Gram positif et contre les bactéries à Gram négatif ce qui est rare chez les actinomycètes, avec une capacité à produire des substances bioactives sur les deux milieux.

L'optimisation des milieux de culture et les sources de carbones et d'azotes suivies d'une analyse statistique de la variance (ANOVA) ont révélé que la meilleure activité antimicrobienne est obtenue sur milieu M2 avec une concentration de 10g d'amidon et 0.1g de caséine.

La *Streptomyces* BS30 a la capacité de synthétiser deux substances bioactives extraite pas le solvant organique le n- butanol, ces molécules se sépare très bien dans un système

d'élution le *n*-Hexane /Dichlorométhane / Méthanol (HDM)). La structure chimique probable des ces substances actives produites est constituée de composés glycosylé et aminé et de composés aromatiques polycycliques révélés par des tests chromogéniques.

Afin de compléter ces travaux, il serait intéressant de pousser l'investigation dans cette direction, en réalisant des analyses et test complémentaires à savoir :

- La purification de substances après bioautographies et HPLC et une caractérisation plus poussée avec la RMN, l'IR, la spectroscopie de masse...etc, afin de déterminer éventuellement leurs structures chimiques et leur originalité..
- Enfin, la réalisation de tests de génotoxicité vis-à-vis des cellules animales, avant de prétendre à une application possible de ces antibiotiques.

## A

- Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. (2008).** Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l'adulte : cystite aiguë simple- cystite compliquée- cystite récidivante- pyélonéphrite aiguë simple - pyélonéphrite aiguë compliquée - prostatite aiguë - infections urinaires de la femme enceinte. 24.
- Aharonowitz Y. (1980).** Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann Rev Microbiol.* 34: 209-233.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. (2012).** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal de Mycologie Médicale.* 22, 42—51.
- Arasu M.V., Duraipandiyar V., Agastian P. et Ignacimuthu S. (2009).** In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale.* 19 (1): 22-28.
- Archambaud M. et Clave D. (2004).** Fiche technique : *Proteus mirabilis* BLSE. Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse Rangueil. Fiche technique Bactériologie (51) :1- 4.
- Archambaud M. et Clave D. (2007).** Fiche technique : *Enterococcus faecalis*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse Rangueil. Fiche technique Bactériologie (53/73): 1- 3.
- Archambaud M. et Clave D. (2008).** Diagnostic bactériologique direct d'une infection, les prélèvements, principales bactéries en cause, interprétation. DCEM 1 Laboratoire de Bactériologie-Hygiène Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil.
- Asanza-Ternuel M.L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J.E. et Barbotin J.N., (1977).** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production With K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* 21: 314-320.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. et White R.P. (1985).** Numerical Classification of *Actinomyces* and *Nocardia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 35 (1): 86-98.
- Atta H.M., Afifi M.M., Elshanawany A.A., Abdoul-raouf U.M. et El-Adly A.M. (2012).** Production of Hygromycin-B antibiotic from *Streptomyces crystallinus*, AZ-A151: II. Parameters Controlling of Antibiotic Production. *Academia Arena:* 4(3). 37-52.
- Atta H.M., El-Sehrawi M., Bayoumi R. et Gehan F. G. (2011).** Bioprocess Development for the Production of Bioactive Compounds from Actinomycetes Isolates from Al-Khurmah Governorate. *New York Science Journal.* 4(10).

- Atta H.M., Bayoumi R., El-Sehrawi M., Aboshady A. et Al-Humiany A. (2010).** Biotechnological Application for Producing Some Antimicrobial Agents by Actinomycetes Isolates from Al-khurmah Governorate. *European Journal of Applied Sciences*. 2 (3): 98-107.
- Atta H.M., Dabour S.M. et Desoukey S.G. (2009).** Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. *Journal of Agriculture et Environmental Science*. 5(3): 368-377.
- Auajjar N., Attarassi B., Elhaloui N., Badoc A. (2006).** Multirésistance aux antibiotiques de *pseudomonas aeruginosa*, *p. fluorescens* et *staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 145, 61-76
- Augustine S.K., Bhavsar S.P. et Kapadnis B.P. (2005).** A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *Journal of Biosciences*. 30(2): 201-211.
- Avril J.L. et Fauchère J.L. (2002).** Bacteriologie Generale et médicale. Ellipses. Paris. pp. 252-253.

## B

- Badji B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2005).** Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*. 15 : 211-219.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou S. (2006).** Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 373-382.
- Barry A.L., Garcia F. et Thrupp L.D. (1970).** An improves single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens . *Am J Clin Pathol*. 53: 149-158.
- Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M. et Duménil G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. Journal*. 2: 453-466.
- Becker B., Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1965).** Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Applied Environ Microbiology*. 13(2): 236-243.
- Bégué P. et Astrus J. (1999).** Infection des voies respiratoire basse. In: *Pathologie infectieuse de l'enfant*. Pris. Masson. 439-446.

- Ben Ameer Mehdi R., Sioud S., Fourati Ben Fguira L., Bejar S. et Mellouli L. (2006).** Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochemistry*. 41: 1506-1513.
- Betina V. (1973).** Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography*. 78: 41-51.
- Bhathena Z.P., Vora C. et Kadam K. (2002).** Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycal consortium. *Pollution Research*. 21(3): 265-275.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. et Boiron P. (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*. 15 : 39-44.
- Boudjella. H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger).177.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161, 288-298.
- 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 de Ain Mlila. *Sciences et Technologie C*. 23: 5-10.
- Bouras N., Meklat A., Toumatia O., Mokrane S., Holtz M. D., Strelkov S. E. et Sabaou N. (2013).** Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil. *African Journal of Microbiology Research*. 7(25). 3199- 3208. DOI: 10.5897/AJMR12.767 .
- Brooks G.F., Butel G.S. et Auruston L.N. (1995).** *Medical Microbiology*. Printice Hall International Inc USA: 137-149.
- Buckingham J. (1997).** -Dictionary of natural products. Chapman and Hall/CRC, England CRC Press.
- Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., et al. (2011).** Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 9 (12): 894-896.
- Bushell M.E. (1993).** A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 76. (2): 89-93.
- Bushell M.E., Dunstan G.L. et Wilson G.C. (1997).** Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora*

*erythraea*. Biotechnology Letters. 19: 49-52.

**Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008).** Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 35:49-58.

**Bu' lock J. D. (1965).** The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. Mc Graw-Hill, New-York.

**Bu'Lock, J.D. (1974).** *Secondary metabolism of microorganisms*. In Industrial aspects of microorganisms, 1, 335-345. Ed. B.Spencer, Amsterdam, Elsevier.

**Bushell, M. E. (1983).** *Microbiological aspects of the discovery of novel secondary metabolites*. Ed. A. Wiseman, Glasgow, Blackie, 6, 32-67.

**Bycroft B.W., Hington A.A. et Roberts A.D. (1988).** Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall Edition, London New York.

## C

**Canu A. et Peter F. (2001).** Microbiologie- Immunologie. In : Le préparateur en pharmacie. Ed Technique et Documentation. ISBN: 2-7430-0445-2. pp. 51-59.

**Cattoir V. (2006).** Chloramphenicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. Chapitre 28. In AntibioGramme. Paris. ESKA: 2<sup>ème</sup> édition. 359-363.

**Ceylan O., Okmen G. et Ugur A. (2008).** Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. EurAsian Journal of BioSciences. 2: 73-82.

**Challis. G.L et Hopwood. D.A. (2003).** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. The National Academy of Sciences of the USA, PNAS. 100(2):14555- 14561.

**Clave D. (2011).** Fiche technique: *Pseudomonas aeruginosa*. Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse Rangueil. Fiche technique Bactériologie (111): 1- 4.

**Clave D. (2013).** Fiche technique : *Staphylococcus aureus*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse. Fiche technique Bactériologie.1- 4.

**Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF). (2011).** Item 88 : Infections génitales de la femme: Leucorrhées Université Médicale Virtuelle Francophone.

**CA-SFM (2014).** Comité de l'AntibioGramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. Edition de Janvier 2014, p1-49.

**CA-SFM (2015).** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandation 2015. Edition de Janvier 2010, p1-49

**Collins M. and Minnikin D.E. (1980).** Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. Journal of general microbiology . 118 : 29-37.

**Cravello L. (2001).** Infections génitales de la femme. Leucorrhées. Service de gynécologieobstétrique B, hôpital de La Conception, 13385 Marseille Cedex 05. La revue du praticien. Gynécologie – Obstétrique. 51.

**Crawford D.L., Lynch J.M. et Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. Applied and Environmental Microbiology. 59(11): 3899-3905.

## D

**Datta N. et Hughes V.M. (1983).** Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. Nature. 306: 616-617.

**Dekleva M.L., Titus J.A. et Strohl W.R. (1985).** Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. Canadian Journal of Microbiology. 31: 287-294.

**Denis F., Poly M.C., Martin C. et Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. ISBN: 978-2-294-01172-6. 107-333.

**Devi S.C, Kumari A., Jain N., Naine J. S. et Mohanasrinivasan.V. (2013).** Screening of actinomycetes isolated from soil samples for antibacterial and antioxidant activity. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ISSN- 0975-1491 Vol 5, Issue 4.

**Dixit V.S. et Pant A. (2000).** Comparative characterization of two serine endopeptidases from *Nocardioopsis* sp. NCIM 5124. Biochimica et Biophysica Acta. 1523(2-3): 261-268.

**Dommergues Y. et Mangenot F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.

**Dumenil G. et Sanglier J.J. (1989).** Physiologie de la production des antibiotiques, dans : Larpent J.P. et Sanglier J.J. Biotechnologie des antibiotiques. Masson Edition Paris: Pp195-217.

## E

**Eder C., Kurz M. et Wink J. (2002).** Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. European Patent

Application .11.

**Euzéby J P (2002).** List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**. Pp : 590-592.

## F

**Fourati Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer Mehdi R., Mellouli L. et Laatsch H. (2005).** Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities from a newly isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology*. 156 (3): 341-347.

**Flandrois J.P. et Chmarat M. (1988).** L'examen bactériologique des suppuration- In : Bactériologie Médicale Pratique –Medsi/Mc Graw- Hill, Paris.

**Franco M.M.C. et Countinho L.E.L. (1991).** Detection of novel secondary metabolites; *Crit. Rev. Biotechnol.* 11, 193–276.

**François A., Brandstätter H., Bréchet A.C. et Huttner A. (2013).** Infections urinaires – Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG). Département de médecine communautaire, de premier recours et des urgences (DMCPRU). Service de médecine de premier recours.

## G

**Gazengo S. V., Reponen T. A., Grinshpun S. A. et Willeke K. (1998).** Analysis of airborne actinomycete spores with flurogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4410-4415.

**Gersch D., Roemer W., Bocker H. et Thrum H. (1978).** Variations in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygrosopicus*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters*. 3: 39-41.

**Goetz P. et Ghedira K. (2012).** Phytothérapie anti-infectieuse. Springer Paris Berlin Heidelberg New York.193-204. ISBN : 978-2-8178-0057-8.

**Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H-J., Trujillo M. E., Suzuki K., Ludwig W. et Whitman W. B. (2012).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Volume Five. The *Actinobacteria*, Part A and B.

**Goodfellow M. et Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology. 37: 189-216.

**Guernet M. et Hamon M. (1981).** Abrège de chimie analytique (tome 1). Masson Edition Paris: 8-12.

**Guide de la lutte contre les méningites bactériennes communautaires**

**communautaires, MS, Maroc. (2010).** Elaboré avec le soutien de l'OMS.

**Guinoiseau E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat. Université de Corse. Biochimie - Biologie moléculaire. 1-70.

**Guiraud J. et Galzy P. (1980).** Techniques générales de la microbiologie. In. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection génie alimentaire. Editions de l'Usine Nouvelle. Paris. ISBN: 2-7327-000-2 Br. 365. 236.

**Gupta R.S. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Leeuwenhoek*. 100:171-182.

**Gurung T.D., Sherpa C., Agrawal V.P. et Lekhak B. (2009).** Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*. 10: 173-182.

## *H*

**Haj-husein L. (2013).** Impact de l'agitation et de l'aération sur la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en bioréacteurs mécaniquement agité et gázosiphon. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine Spécialité: Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. 247

**Harvey I. (1999).** Sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. Thèse de Doctorat. Université Laval (Canada).127.

**Hasavada S.H., Thumar J.T. et Singh S.P. (2006).** Secretion of a potent antibiotic by salttolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science*. 91(10): 1393-1397.

**Hermans L., Gossele F. et Biot A. (1989).** Fermentations industrielles. In: Biotechnologie des antibiotiques. Larpent. J.P ; et sanglier. J.J. (Eds.). Masson, Paris. pp. 342-380.

**Hilali L., Khattabi A., Nssarllah N., Malki N. et Finance C. (2002)** Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir de milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech*. 2: 49-53.

**Hodgson D.A. (2000).** Primary metabolism and its control in Streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 42:47-238.

**Holmberg K. (1978).** Laboratory tests of antifungal drugs in treatment of systemic mycoses. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 16: 65-73.

**Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. et Williams S.T. (1994).** In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co.,

Baltimore.

**Holzapfel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D. et Addo P. (2002).** Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . PCT International Applied.19.

**Hozzein W. N., Rabie W. et Ali M.I.A. (2011).** Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. African Journal of Biotechnology. 10(12). 2295-2301. DOI: 10.5897/AJB10.1973 ISSN 1684–5315.

**Hulya A.K. et Tarhan L. (2006).** Vancomycin antibiotic production and TCA-glyoxalate pathways depending on the glucose concentration in *Amycolatopsis orientalis*. Enzyme and Microbial Technology. 38: 727-734.

## I

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

**Isik K., Gencbay T., Özdemir- Kocak F. et Cil E. (2014).** Molecular identification of different actinomycetes isolated from East Black Sea region plateau soil by 16S rDNA gene sequencing. African Journal of Microbiology Research. 8(9), 878-887.

**Isu N.R., Onyeagba R.A. (2006).** Basic practicals in Microbiology. 2<sup>nd</sup> edition. Fasmen Communication, Okigwe. 25-45.

**Iwai W. et Omura S. (1982).** Culture conditions for screening of new antibiotics. Journal of Antibiotics. 35: 123-141.

## K

**Kase H., Iwahashi K. et Matsuda Y. (1986).** K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. Journal of Antibiotics. 39: 1059-1065.

**Kass E.H. (1960).** Bacteriuria and pyelonephritis of pregnancy. Archives of Internal Medicine.105:1994-1998.

**Kauffmann (1962).** sur les antibiotiques d'origine microbienne. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 255: 599-601

**Kim Y.S. et Kawai A. (1998).** Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. Biological And Pharmaceutical Bulletin. 21(5): 498-505.

- Kiran T., Subhan S. A., Pirzada Z.A. et Wahab A. (2015).** Production, extraction and characterization of antimicrobial metabolites from *Streptomyces* sp. GZ024 isolated from Karachi soil. *Advances in Applied Science Research*. 6(1):38-44.
- Koch A. (1999).** Diffusion through agar blocks of finite dimensions: A theoretical analysis of three systems of practical significance in microbiology. *Microbiology*. 145: 643-654.
- Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R. et al. (2010).** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases*. 10 (9): 597-602.

## L

- Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. pp. 231-251.
- Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Annals of agricultural and environmental medicine*. 4: 113-121.
- Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 153.
- Lamnaouer D. (2002).** Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord: Phase III. Etat d'avancement. 3-7.
- Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M. (1990).** *Mémento Techniques de Microbiologie. Technique et Document-Lavoisier. France.*
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** *Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris.481.*
- Lavigne J P (2007).** Effets des antibiotiques et mecanismes de resistance. Faculte de Medecine Montpellier – Nimes. Pp :1-3.
- Lebrihi A., Lefebvre G. et Germain P. (1988).** Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 28: 44-45.
- Leclerc H., Izard D., Husson M.O., Wattre P. et Jakubczak E. (1983).** *Microbiologie générale. 2ème édition - Paris. 199-202.*
- Lee J.Y. et Hwang B.K. (2002).** Diversity of antifungal actinomycètes in various vegetative. *Soils Korea. Canadian Journal of Microbiology*. 48: 407-417.
- Le Minor L. (1992).** Les Salmonelles. In : LE MINOR L. *Bactériologie médicale Paris : Flammarion. 259-74.*

- Lechevalier M. P., De Bievre C. et Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. 5: 249-260.
- Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1970).** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: The actinomycetales*. Prauser H. (eds) Jemu F.V. pp. 311-316
- Lohr D., Buschulte T. et Gilles E.D. (1989).** Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 274-279.
- Loucif K. (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives, Mémoire de Magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine. 117.
- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1995).** Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45: 204-211.
- Lozniewski A. et Rabaud C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est.
- Liao, X., Vining, L.C. and Doull, J.D. (1995).** Physiological control of trophophase and iodophase separation on *Streptomyces* cultures producing secondary metabolites. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 309–315.
- Livermore D.M. (2004).** The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*. 10 (4): 1-9.

## *M*

- Madigan M. T., Martinko J.M. et Parker J. (1997).** Biology of microorganisms. Printice Hall International Inc, New York. 146-147.
- Madigan M.T et Martinko J.M. (2007).** Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11<sup>ème</sup> édition: 331-423, 686-718.
- Mahrouki S., Ben-Achour N., Chouchani C., Ben-Moussa M. et Belhadj O. (2009).** Identification of plasmid-encoded extended spectrum  $\beta$ -lactamases produced by a clinical strain of *Proteus mirabilis*. *Pathologie Biologie*. 57: 55-59.
- Mangamuri UK, Muvva V, Poda S, Agasar D. (2014).** Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165T. *British Microbiology Research Journal*. 4(4): 428- 42.
- Mariat F. et Sebald M. (1990).** Actinomycétales..*In: Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale*.Medecine-Sciences. Flammarion. France. Deuxième partie: 933-999.

- Martin J.F. et Mcdaniel L.E. (1975).** Kinetics of biosynthesis of polyene macrolide antibiotics in batch cultures: Cell maturation time. *Biotechnology and Bioengineering*. 17: 925-938.
- Martin S.M. et Bushell M.F. (1996).** Effect of hyphal morphology on bioreactor performance on antibiotic producing *Saccharopolyspora erythraea* culture. *Microbiology*. 142: 8.
- Martin S.M. et Demain A.L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews*. 44: 230-261.
- Maruyama. H.B., Suhara. Y., Suzuki-Watanable, Maeshima. Y. et Shimizu M., (1975).** A new antibiotic, fumaramidmycin I- Production, biological properties and characterization of producer strain. *J. Antibiot*, 28: 636.
- Matan N. et Matan N. (2008).** Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration et Biodegradation*. 62 : 75-78.
- Mayer A., Deiana J. et Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générales avec problèmes et exercices corrigés. 2<sup>ème</sup> édition : biosciences et technologies. ISBN 2-7040-1170-2 ISSN 1629-7954.
- Mellouli L., Ben Ameur-Mehdi R., Sioud S., Salem M. et Bejar S. (2003).** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology*. 154: 345-352.
- Mellouli L., Karray-Rebai I., Sioud S., Ben Ameur-Mehdi R., Naili B. et Bejar S. (2004).** Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology*. 49(6): 400-406.
- Merck E. (1975).** Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. 149.
- Meyer, J. (1989).** Genus *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier 1970a, 400AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2511–2526. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Mimoz O. (2001).** Infections urinaires en réanimation. Département d'anesthésie et de réanimation Chirurgicale, Centre Hospitalo- Universitaire la Milétrie. 496-501.
- Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A. et Fenical W. (2002).** Widespread and persistent population of major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10): 5005-5011.
- Minchella A., Molinari L., Alonso S., Bouziges N., Sotto A. et Lavigne J.P. (2010).** Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie*. 58 :1–6.

- Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** Characteristics of actinomycetes from Antarctica *J. Cult. Collect.* 3:3-4.
- Mordarska H., Mordarski M. et Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology.* 71: 77-86.
- Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F. et Lima Filho J.L. (2002).** Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 18 (4): 307-312.
- Murakata C. et Matsuda Y. (1998).** Development of the bioprobe K-252a for treatment of neurodegenerative diseases. *Biotechnology Industry.* 15(7): 43-49.
- Muiru W.M., Mutitu E.W. et Mukunya D.M. (2007).** Characterization of antibiotic metabolites from actinomycete isolates. *African Crop Science Conference Proceedings.* 8: 2103-2107.
- Murray P.R. et al., 1995.** *Manuel of Clinical Microbiology.* 6th ed. ASM Press. Washington DC.

## N

- Nanjwad B., Chandrashehara S., Goudanavar P. S., Shamarez A. M. et Manvi F. (2010).** Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 9: 373-377.
- Narayana K.J.P., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Venkateswarlu Y. et Krishna P.S.J., (2008).** Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology.* 57(1): 35-39.
- Nedialkova. D., and Naidenova. M., (2005).** Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collections,* 4: 29-35.
- Nedal A. (2007).** Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Thèse de Doctorat. Norwegian University of Science and Technology, (Norvège). 81.
- Nguyen H.C., Karray F., Lautru S., Gagnat J., Lebrihi A., Huynh T.D. et Pernodet J.L. (2010).** Glycosylation steps during spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*: involvement of three glycosyltransferases and their interplay with two auxiliary proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 54: 2830-2839.
- Normark B.H. et Normark S. (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine.* 252:91-106. doi:10.1046/j.1365-2796.2002.01026.

**Nauciel C.** 2000. Bctériologie médicale. Ed Masson. P 55-64

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

**Noussaira L. et Nicolas-Chanoinea M.H. (2007).** Mesure de la sensibilité aux antibiotiques selon les conditions standards directement à partir de liquides biologiques infectés et d'hémocultures positives. Pathologie Biologie. 55: 143-148.

## O

**Oestergaard P.R et Sjoeholm C. (2001).** Use of acid-stable proteases in animal feed. PCT Internatiol Applied. pp.49.

**Ohmori K., Ishii H., Manabe H., Satoh H., Tamura T. et Kase H. (1988).** Antiinflammatory and antiallergic effects of a novel metabolite of *Nocardioopsis* sp. as a potent protein kinase C inhibitor from microbial origin. Arzneimittelforschung. 38: 809-814.

**Okami Y. et Hotta K. (1988).** Search and discovery of new antibiotic in: M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordanski . Ed: Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London. pp. 33- 67.

**Okazaki T. (2006).** Intrigued by actinomycete diversity. Actinimycetologica. 20 (1): 15-22.

**Omura S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc. 281-303.

**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. **306-332.**

**Olson E. et Rattzkin B. (1999).** Pharmaceutical biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 10: 525-527.

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

**Oiwa R. (1992)** Antibacterial agents, dans : Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. Spring-Verlag, New York: 1-29.

## P

- Pandey A., Shukla A. et Majumdar S.K. (2005).** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an antibacterial antibiotic. African Journal of Biotechnology. 4 (9): 909-910.
- Park J.S., Yang H.O. et Kwon H.C. (2009).** Aldgamycin I, an antibacterial 16-membered macrolide from the abandoned mine bacterium, *Streptomyces* sp. KMA-001. Journal of Antibiotics. 62: 171-175.
- Pataraya D., Gurielidze M., Berishvili T., Cholokava N., Zaalishvili G. et Nutsbidze N. (2008).** Halophylic Actinomycetes from Saline Soils of Eastern Georgia and their Biological Properties.
- Perlman D. (1977).** The role of the journal of antibiotics in determining the future of antibiotic research. Journal of Antibiotics. 30. 133-137.
- Perry D.A., Tone J. et Maeda H. (1990).** Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). Brit. UK Pat. Appl.28.
- Pimentel-Elardo S.M., Kozytska S., Bugni T.S., Ireland C.M., Moll H. et Hentschel U. (2010).** Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. Marine Drugs. 8: 373-380.
- Pizzul L. (2006).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). 39.

## R

- Raty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K. et Mantsala P. (2002).** Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. Gene. 293: 115-122.
- Raoult D. (2013).** Manuel de prélèvement. Laboratoire de biologie médicale du pôle infectiologie. 1-27.
- Radhika S., Bharathi S., Radhakrishnan M. et Balagurunathan R. (2011).** Bioprospecting of Fresh Water Actinobacteria : Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. Journal of Pharmacy Research. 4 (8): 2584-2586.
- Rajan B.M. et Kannabiran K. (2010).** Antimicrobial activity of *Streptomyces albofaciens* vitbrk1 spp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. Pharmacologyonline. 1: 124-132.
- Reghioua S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. et Boulahfrouf A. (2008).** Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. Sciences et Technologie. 28. 59-64.

- Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. et Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. Applied and Environmental Microbiology. 64: 3807-3812.
- Ripa F.A., Nikkon F., Zaman S. et Khondkar P. (2009).** Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New Streptomyces sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. Mycobiology. The Korean Society of Mycology. 37 (3): 211-214.
- Rolain J.M. et Berrazeg M. (2014).** Nouvelles stratégies de détection et de surveillance des bactéries multi-résistantes. Bactériologie Résistance aux antibiotiques. 317.

## S

- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. Canadian Journal of Microbiology. 38 : 1066-1073.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Levebvre G. et Germain P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara, algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse. 9 (2): 147-153.
- Sánchez S., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., A'valos M., Guzmán-Trampe S., Rodríguez-Sanoja R., Langley E. et Ruiz B. (2010).** Carbon source regulation of antibiotic production. The Journal of Antibiotics. 63: 442-459.
- Schaechter M., Medoff M.D, Eisenstein M.D. (1999).** Les agents infectieux. In. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2 Ed De Boeck. 179-251. ISBN 2-804-1592-5.
- Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) (2011).** Document édité avec la collaboration de l'OMS. 6<sup>ème</sup> Edition. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. pp. 15-159.
- Şahin N. et Uçur A. (2003).** Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates. Turkish Journal of Biology. 27(2): 79-84.
- Samer et Al-Hulu (2015).** Effects of Some Conditions on Antibacterial Activity of Actinomycetes Spp. Isolated from Soil Samples. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 9(1): 86-90.
- Sanglier J.J. et Trujill M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes, stratégie de sélection de souches. Bulletin de la Société Française de Microbiologie. 12(3) : 269-276.

- Savita J., Rabindranath M., Nageshawari G., Mahadev U., Purbasha G., Kalpana A., Chanda V. (2012).** Increasing incidence of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* infections in hospital and community settings. *International Journal of Microbiology Research*. 4 (6): 253-257.
- Sejiny M. (1991).** Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *Journal of King Abdulaziz University-Science*. 3: 21-29.
- Seo G., Kim J. et Choi D. (2010).** Antibiotic Production from *Streptomyces fradiae* SF-12 using Wasted Crude Vegetable Oil as an Energy Source. *Journal of Advanced Engineering Technology*. 3(3): 251-254.
- Sharma D., Kaur T., Chadha B.S. et Manhas R.K. (2011).** Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10 (6): 801-808.
- Shikha D., Rup L. et Manjit H. (2005).** Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology*. 96: 1415-1418.
- Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. et Nida T. (1979).** Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *Journal of Antibiotics*. 32: 427-435.
- Singh S.B. et Barrett J.F. (2006).** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015.
- Singh S., Baruah I. et Bora T.C. (2006).** Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*. 5: 217-221.
- Singh L.S., Mazumder S. et Bora T.C. (2009).** Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale*. 19: 225-233.
- Singh S., Kumar P., Gopalan N., Shrivastava B., Kuhad R.C. et Singh Chaudhary H. (2012).** Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1147-1150.
- Smaoui S. (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de Microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat d'Etat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). 207.
- Soares A.C.F., Sousa C.S., Garrido M.S. et Perez J.O. (2007).** Production of streptomycete inoculum in sterilized rice. *Scientia Agricola*. 64(6): 641-644.
- Song J., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Go S.J. et Suh J.W. (2012).** Phylogenetic

diversity of thermophilic Actinomycetes and *Thermoactinomycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 202: 97-102.

**Stackebrandt E. et Schumann P. (2006).** Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, dans: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. Prokaryotes. *Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA*: 297-321.

**Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M. et Fowler V.J. (1983).** A phylogenetic analysis of the family Dermatophilaceae. *Journal of General Microbiology*. 129 (6): 1831-1838.

**Stackebrandt E. et Woese C.R. (1981).** The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for general microbiology*. 32: 1-31.

**Stackebrandt E., Rainey F.A et Ward-Rainey N.L. (1997).** A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* clasis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 479-491.

**Stoks S.M. et Thomas C.R. (2001).** Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 75 (6): 702-709.

**Strub C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. 174.

**Surveiller et prévenir les infections associées aux soins. (2010).** Société française d'hygiène hospitalière. Volume XVIII - N° 4. ISSN 1249-0075.

## *T*

**Tabbassum K., Syed Abdus S., Zaid Ahmed P. et Abdul W. (2015).** Production, extraction and characterization of antimicrobial metabolites from *Streptomyces* sp. GZ024 isolated from Karachi soil. *Advances in Applied Science Research*. 6(1): 38-44.

**Tanaka Y. (1992).** Fermentation processes in screening for new bioactive substances, dans: Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. *Spring-Verlag, New York*: 303-326.

**Tiouit D., Naim M., Amhis W. (2001).** Traitement antibiotique des infections urinaires. *Service de microbiologie, HCA –Alger. Médecine du Maghreb*. 91.36-39.

**Thomson J.M., Parker J., Perou C.M., et Hammond S.M. (2004).** A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat. Methods* 1: 47–53.

**Tortorano A.M., Cabrini E. et Viviani M.A. (1979).** Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med*. 8: 69-74.

## U

**Umezawa H. (1988).** Low molecular-weight enzyme inhibitors and immunodifiers. *In:* Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M (Eds.). London: Academic Press. 285-325.

## V

**Vandamme E.J. (1985).** Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. New-York. Marcel Dekker. 808.

**Van Dissel D., Claessen D., Roth M. et Van Wezel G.P. (2015).** A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microbial Cell Factories*. DOI 10.1186/s12934-015-0224-6.

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

**Voelker F. et Altaba S. (2001)** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*. 147: 2447-2459.

**Von Daehne W., Jahnsen S., Kirk I. et al. (1984).** Fusidic acid : properties, biosynthesis and fermentation. *Drugs pharm Sci*. 22: 427-449.

## W

**Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murry R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. and Trüper H.G. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 463-464.

**Williams ST, Vickers JC (1988).** Detection of actinomycetes in the natural environment problems and perspectives. In Okami Y, Beppu T. and Ogawara H. (eds.). *Biology of actinomycetes '88*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 165-270.

## Y

**Yadav A.K., Kumar R., Saikia R., Bora T.C. et Arora D.K. (2009).** Novel copper resistant and antimicrobial *Streptomyces* isolated from Bay of Bengal, India. *Journal de Mycologie Médicale*. 19: 234-240.

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

**Yamaguchi T. (1965).** Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. Journal of Bacteriology. 89 (2): 444-453.

**Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., et al. (2009).** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53. 5046-54.

## Z

**Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T. et Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. Journal American Water Works Association. 95 (2): 113-118.

**Zermane F. (2008).** Etude des caractéristiques culturelles des Actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistère, Université Mentouri Constantine. 123.

**Zhang Y.G., Wang H.F., Liu Q., Wael Hozzein N., Wadaan M.A.M., Cheng J., Chen Y.J., Zhang Y.M. et Li W.J. (2013).** Streptomyces fukangensis sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from a saline-alkaline soil. Antonie van Leeuwenhoek. 104 :1227-1233. DOI 10.1007/s10482-013-0045-8.

**Zimmerman B.J. (1990).** Self- Regulated learning and academic achievement: An overview. Educational psychologist. 25(1),3-17

**Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou. N. (2005).** *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Res. Microbiol., 156 : 984-993.

## ANNEXE 1

**Tableau III** : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes (Loucif, 2011).

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
<b>1/ Les agents antibactériens</b>		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	Takahashi et al., 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidine	Jinenez et al., 2009
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigine	Liu et al., 2007
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	Inoue et al., 2007
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
<i>Verrucosispora sp.</i>	Abyssomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
<b>2/ Les agents antifongiques</b>		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	Fukunaga et al., 2008
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacétate	Hwanget al., 2001
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	Mukai et al., 2006
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine	Carle et al., 2003
<b>3/ Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosad. Insecticide neurotoxique	Williamson et al., 2006
<i>Actinomadura sp</i>	Herbicides. <b>Exemple 1.</b> 2,4-Dihydro-4-( $\beta$ -D- ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)- triazol-3-one	Schmitzer et al., 2000
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Herbicides. <b>Exemple 2.</b> Herbimycine	Omura et al., 2006

## ANNEXE 2

*Composition des milieux de culture***Composition de milieu Williams (M2):**

Amidon.....	10g
Caséine.....	0.3g
KNO <sub>3</sub> .....	02g
NaCl .....	50/75g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	02g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.05g
CaCO <sub>3</sub> .....	0.02g
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.01g
Glucose .....	1g
Eau distillée.....	1000mL
Agar.....	18g
pH .....	7.6

**Composition de milieu AF**

Extrait de malt .....	10g
Extrait de levure.....	04g
Glucose .....	0 2g
NaCl .....	2,5g
CaCO <sub>3</sub> .....	01g
Agar.....	15g
Eau distillée .....	1000mL
pH .....	7,2

**Composition de milieu ISP2**

Extrait de levure .....	04g
Extrait de malt .....	10g
Glucose .....	04g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000mL
pH .....	7,2

**Composition de milieu GLM**

Extrait de malt .....	3g
Extrait de levure.....	3g
Peptone .....	5g
Glucose .....	10g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000mL
pH .....	7,2

**Composition de milieu Bennett**

Extrait de viande .....	01g
Peptone .....	02g

Glucose .....	10g
Agar .....	16g
Eau distillée .....	1000mL
pH .....	7,2

**Composition de la gélose nutritive**

Extrait de viande.....	05g
Peptone.....	10g
Chloride de sodium.....	05g
Agar agar bactériologique.....	15g
Ph.....	7.5±0.2

Ou dissoudre 28g dans 1 litre d'eau distillée.

**Composition de la gélose de conservation**

Extrait de viande .....	03g
Peptone protéose.....	10g
Chloride de sodium.....	03g
Disodiumphosphate.....	0.8g
Agar.....	10g

**Composition du bouillon nutritif**

Peptone .....	15,0 g
Extrait de levure.....	3,0 g
Chloride de sodium.....	6,0 g
D glucose.....	1,0 g
Ph .....	7.5±0.2

Dissoudre 25g dans un litre d'eau distillée

**Composition de milieu extrait de malt**

Extrait de malt.....	30,0 g
Agar agar bactériologique.....	15,0 g

Mettre en suspension 45,0 g de milieu déshydraté (BK045) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Ajuster le pH à 4,5 par addition d'une solution stérile d'acide lactique à 10%.

Le pH du milieu est ajusté avant la stérilisation par l'autoclavage à 120°C pendant 20minutes. Le milieu est ensuite coulé dans les boîtes de pétri.

## ANNEXE 3

## Les antibiotiques utilisés

Sigle	Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
AM	Ampicilline	Aminopénicilline	10
AMC	Amoxicilline + acide clavulanique	Aminopénicilline	25/10
AMX	Amoxicilline	Aminopénicilline	25
AN	Amikacine	Aminosides	30
ATM	Aztréonam	Monobactame	30
AZM	Azithromycine	Macrolides	15
B	Bacitracine	Polypeptides	130
C	Chloramphénicol	Phénicolés	30
CAZ	Ceftazidime	Céphalosporine 3ème génération	30
CB	Carbénicilline	Carboxypénicilline	100
CEC	Céfaclor	Céphalosporine 1ère génération	10
CED	Céfradine	Céphalosporine 1ère génération	30
CEF	Céfépime	Céphalosporine 3ème génération	30
CF	Céfalotine	Céphalosporine 1ère génération	30
CFM	Céfixime	Céphalosporine 3ème génération	10
CFP	Céfopérazone	Céphalosporine 3ème génération	30
CFR	Céfadroxil	Céphalosporine 1ère génération	30
CFS	Cefsulodine	Céphalosporine 3ème génération	30
CFT	Céfatrizine	Céphalosporine 1ère génération	10
CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	5
CL/CS	Colistine	Polypeptide	50
CM/CC	Clindamycine	Lincosamides	2
CN	Céfalexine	Céphalosporine 1ère génération	30
CPD	Cefpodoxime-proxétil	Céphalosporine 3ème génération	10
CPO	Cefpirome	Céphalosporine 3ème génération	30
CRO	Ceftriaxone	Céphalosporine 3ème génération	30
CS	Colistine	Polypeptide	50

CRO	Ceftriaxone	Céphalosporine 3ème génération	30
CS	Colistine	Polypeptide	50
CTF	Céfotiam	Céphalosporine 3ème génération	30
CTT	Céfotétan	Céphalosporine 2ème génération	30
CTX	Céfotaxime	Céphalosporine 3ème génération	30
CXM	Céfuoxime	Céphalosporine 2ème génération	30
CZ	Céfazoline	Céphalosporine 1ère génération	30
D/DO	Doxycycline	Tétracyclines	30
E	Erythromycine	Macrolides	15
ENX	Enoxacine	Fluoroquinolone	5
ETP	Ertapénème	Carbapénème	10
FA	Acide fusidique	Divers	10
FAM	Ampicilline + sulbactam	Aminopénicilline	10/10
FEP	Céfépime	Céphalosporine 3ème génération	30
FOS	Fosfomycine	Divers	50
FOX	Céfoxitine	Céphalosporine 2ème génération	30
GEN	Gentamicine forte charge	Aminosides	500
GM	Gentamicine	Aminosides	10
IPM	Imipénème	Carbapénème	10
Sigle	Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
ISP	Isépamicine	Aminosides	30
K	Kanamycine	Aminosides	30
KAN	Kanamycine forte charge	Aminosides	1000
L	Lincomycine	Lincosamides	15
LOM	Loméfloxacine	Fluoroquinolone	5
LVX	Lévofloxacine	Fluoroquinolone	5
MA	Céfamandole	Céphalosporine 2ème génération	30
MEC	Mécillina	Amidinopénicilline	10
MEM	Méropénème	Carbapénème	10
MNO	Minocycline	Tétracyclines	30 UI

<b>MNO</b>	Minocycline	Tétracyclines	30 UI
<b>MOX</b>	Latamoxef	Céphalosporine 3ème génération	30
<b>MTR</b>	Métronidazole	Divers	16
<b>MZ</b>	Mezlocilline	Acyluréidopénicilline	75
<b>N</b>	Néomycine	Aminosides	30
<b>NA</b>	Acide nalidixique	Quinolones 1ère génération	30
<b>NET</b>	Nétilmicine	Aminosides	30
<b>NI</b>	Nitroxoline	Divers	20
<b>NOR</b>	Norfloxacine	Fluoroquinolone	5
<b>OA</b>	Acide oxolinique	Quinolones 1ère génération	10
<b>OFX</b>	Ofloxacine	Fluoroquinolone	5
<b>OT</b>	Oxytétracycline	Tétracyclines	30 UI
<b>OX</b>	Oxacilline	Pénicillines	1 ou 5
<b>P</b>	Pénicilline G	Pénicillines	6
<b>PB</b>	Polymyxine B	Polypeptides	50
<b>PEF</b>	Pefloxacine	Fluoroquinolone	5
<b>PI</b>	Acide pipémidique	Quinolones 1ère génération	20
<b>PIP</b>	Pipéracilline	Pénicillines	75
<b>PR/PT</b>	Pristinamycine	Streptogramines	15
<b>RA</b>	Rifampicine	Divers	30
<b>S</b>	Streptomycine	Aminosides	10
<b>SP</b>	Spiramycine	Macrolides	100
<b>SPT</b>	Spectinomycine ( <i>N. gonorrhoeae</i> )	Aminosides	100
<b>SPX</b>	Sparfloxacine	Fluoroquinolone	5
<b>SSS</b>	Sulfamides	Sulfamides-Triméthoprim	200
<b>STR</b>	Streptomycine <b>forte charge</b>	Aminosides	<b>500</b>
<b>SXT</b>	Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides-Triméthoprim	1,25/23,75
<b>TCC</b>	Ticarcilline + acide clavulanique	Carboxypénicillines	75/10

<b>SPX</b>	Sparfloxacine	Fluoroquinolone	5
<b>SSS</b>	Sulfamides	Sulfamides-Triméthoprim	200
<b>STR</b>	Streptomycine <b>forte charge</b>	Aminosides	<b>500</b>
<b>SXT</b>	Triméthoprim/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole)	Sulfamides-Triméthoprim	1,25/23,75
<b>TCC</b>	Ticarcilline + acide clavulanique	Carboxypénicillines	75/10
<b>TE</b>	Tétracycline	Tétracyclines	30
<b>TEC</b>	Teicoplanine	Glycopeptides	30
<b>TIC</b>	Ticarcilline	Carboxypénicillines	75
<b>TM</b>	Tobramycine	Aminosides	10
<b>TMP</b>	Triméthoprim	Sulfamides-Triméthoprim	5
<b>TZP</b>	Pipéracilline + tazobactam	Pénicillines	75/10
<b>UB</b>	Fluméquine	Quinolones 1ère génération	30
<b>VA</b>	Vancomycine	Glycopeptides	30

**ANNEXE 4****a. La recherche de la nitrate réductase**

Une nitrate réductase positive se traduit par une coloration rouge. Si la réaction est négative on ajoute une petite quantité de la poudre de zinc au milieu incolore. On agite puis on laisse le tube incliné pendant 5mn. Après ce temps, on observe s'il ya apparition d'une couleur rouge, cela confirme que la souche étudiée ne possède pas une nitrate réductase.

Si le milieu reste incolore, cela indique que la souche étudiée possède, en plus de la nitrate réductase, une nitrite réductase qui réduit le nitrate jusqu'au stade azote atmosphérique N<sub>2</sub>.

**b. Fermentation des sucres (glucose, saccharose et lactose), la production d'H<sub>2</sub>S et le gaz**

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu est révélée par le virage de l'indicateur de couleur, le rouge de phénol, du rouge au jaune. La lecture des résultats est faite comme suit :

- **Fermentation de glucose** : couleur jaune du culot
- **Fermentation de lactose** : couleur jaune de la pente
- **Fermentation du saccharose** : couleur jaune au centre du tube
- **Production d'H<sub>2</sub>S** : noircissement de tout le milieu ou apparition d'un anneau ou un précipité noir juste au-dessous de la pente.
- **Production de gaz (CO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>)**: se traduit par le soulèvement ou fracturation de la gélose, ou par l'apparition de bulles de gaz.

**d. Etude de la voie fermentaire (test RM et VP)**

À l'issu de la période d'incubation, le contenu du tube est divisé en 2 et la lecture se fait après l'ajout de deux réactif VPI et VPII qui se manifeste par le changement de couleur du milieu comme suit :

- **Tube 1** : on ajoute 5 gouttes de VPI et 5 gouttes de VPII. La suspension est chauffée et laissée 10 mn avant la lecture. L'apparition d'une couleur rouge cerise indique une réaction positive.
- **Tube 2** : on ajoute quelques gouttes du réactif RM. La lecture est immédiate, un virage au rouge indique une réaction RM positive.

**f. Antibiotique****• Ensemencement**

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne déjà préparée, l'essorer puis le frotter sur la totalité de la surface des boites contenant la gélose Mueller-Hinton, de haut en bas, en stries serrées, répétée l'opération deux fois, en tournant la boite à chaque fois sans oublier de pivoter l'écouvillon sur lui même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Puis, les disques d'antibiotiques à tester selon les germes isolés sont déposés à la surface de la gélose, à l'aide d'une pince stérile. Enfin, l'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

## ANNEXE 5

- **Révélation chimique des molécules bioactives des plaques CCM**

Après avoir choisi le meilleur solvant de migration et déterminé les Rf des antibiotiques par bioautographie, d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations par des solutions chimiques citées ci-dessous et ce, dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des molécules bioactives.

\* **Le diphénylamine-aniline**: révélateur des glucides.

\* Solution à vaporiser : dissoudre 4 g de diphénylamine, 4 ml d'aniline et 20 ml d'acide phosphorique dans 200 ml d'acétone

\* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 min à 100°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

\* **La ninhydrine**: révélateur des amines, des acides aminés et des oses aminés.

\* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'acétone.

\* Traitement complémentaire: chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (Couleur violette, rose).

\* **La vanilline-acide sulfurique**: révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.

\* Solution de vaporisation : dissoudre 1 g de vanilline dans 1000 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

\* Traitement complémentaire : chauffer à 120°C pendant 5 à 10 (couleurs violette, rose ou grise).

\* **Le formaldéhyde-acide sulfurique**: révélateur des aromatiques polycycliques.

\* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 ml d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

Les taches apparaissent de diverses couleurs (brunes, blanches...)

**Tableau VIII :** Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques

Famille chimique	Antibiotiques	Producteurs	Source de carbone ayant un effet négatif sur la production des antibiotiques	Références
Béta- lactamine	Céphamycine C	<i>Streptomyces lactamadurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>	Glucose Glycérol	<b>Cortes et al., 1986</b> <b>Lebrihi et al., 1988</b>
Aminoglycosides	Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>	Glucose, Xylose	<b>Escalante et al., 1992</b>
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Glycérol	<b>Lounès et al., 1995</b>
Anthracycline	Rétamycine	<i>Streptomyces lindensis</i>	Glucose	<b>Inoue et al., 2007</b>

**Tableau IX:** Production d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisée par les acides aminés

Famille chimique	Antibiotiques	Producteurs	Acides aminés	Références
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Proline	<b>Dulaney, 1948</b>
Béta-lactamines	Céphamycine	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Asparagine / Glutamine	<b>Brana et al., 1985</b>
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Proline	<b>Shapiro et Vining, 1985</b>
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Valine	<b>Untrau et al., 1994</b>

## Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques élaborés par des actinomycètes vis-à-vis de germes pathogènes, deux souches du genre *Streptomyces* (*Streptomyces* sp.BS30 et *Streptomyces* sp.SY-BS5) ont été utilisées. 96 souches bactériennes et 2 levures ont été recueillies à partir de différents prélèvements (pus, urines et leucorrhée) au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU Targa Ozemmour de Bejaia. L'étude physiologique des deux souches de *Streptomyces* a montré que ces souches étaient alcalophiles et halotolérantes. Leurs activités antibactériennes sur milieux solides et liquides ont été mise en évidence contre les germes pathogènes collectés, ce qui a révélé des activités antimicrobiennes et antifongiques de la souche *Streptomyces* sp. BS30 dont l'importance varie selon le milieu de culture et des souches tests employées. Les résultats obtenus ont montré que le milieu M2 contenant 10g d'amidon et 0.1g de caséine a permis d'obtenir la meilleure activité antimicrobienne. Ils montrent également que La *Streptomyces* sp.BS30 a la capacité de synthétiser des substances bioactives, qui ont été extraites par le *n*-butanol. Ces molécules qui séparent très bien dans un système d'éluion *n*-Hexane/Dichlorométhane/Méthanol (HDM)), seraient constituées de composés glycosylés, aminés et aromatiques polycycliques.

**Mots clés:** Collection de germes ; Germes pathogènes ; *Streptomyces* ; Activité antimicrobienne; Substances actives.

## Abstract

Reserching for a new antibiotics produced by Actinomycetes against pathogens, two *Streptomyces* strains, namely *Streptomyces* sp.BS30 and *Streptomyces* sp.SY-BS5 were used. 96 bacterial strains and 2 yeasts were collected from various samples (pus, urine and vaginal discharge) at the microbiology laboratory of the University Hospital center of Targa Ozemmour Bejaia. The physiological study of these two *Streptomyces* strains showed that they were alkalophilic and halotolerant. Their antibacterial activities on solid and liquid cultures has been demonstrated against the collected pathogens, which revealed antimicrobial and antifungal activities of *Streptomyces* sp. BS30, which importance varies by the culture medium used and the strains tested. The results showed that the M2 medium containing 10g of starch and 0.1g casein yielded the best antimicrobial activity. They also show that the *Streptomyces* sp.BS30 has the ability to synthesize two bioactive substances, which were extracted by *n*-butanol. These molecules that separate fine in an elution system *n*-hexane / dichloromethane / methanol (HDM)) would consist of glycosylated compounds, amines and polycyclic aromatic.

**Keywords:** Germ collection; Pathogens germ; *Streptomyces*; Antimicrobial activity; Active substances.

## ملخص

في إطار البحث عن المضادات الحيوية الجديدة التي تفرزها الأكتينوميستات استخدمت فصيلة ستربتومييس (ستربتومييس BS5-SY sp و ستربتومييس BS30 sp). تم جمع 96 سلالة بكتريا و2 الخمائر *Candida albicans* من عينات مختلفة القيح والبول لافرازات المهبلية في علم مخبر الأحياء الدقيقة الجامعي للمستشفى Targa Ozemmour بجاية . وأظهرت الدراسة الفسيولوجية أن هذه سلالتين alkalophilic و halotolerant. وقد تجلى من BS30sp أنشطتها المضادة للبكتيريا على وسائل الصلبة والسائلة ضد مسببات الأمراض التي تم جمعها والتي كشفت عن الأنشطة المضادة للجراثيم ومضاد للفطريات ستربتومييس أهميتها باختلاف مستنبت و المستخدمة الاختبار سلالات. وأظهرت النتائج أن وسط M2 تحتوي على 10g من النشا والكازي 0.1g حققت أفضل نشاط مضادات الميكروبات. وتبين أيضا نأ ستربتومييس sp.BS30 لمركبات لديه القدرة تركيب على اثنين من المواد النشطة ،بيولوجيا الذي انتزعت منه *n*-butanol هذه التي جيد تفصل في نظام شطف (HDM) *n*-Hexane/Dichlorométhane/Méthanol من ستألف الجزيئات ،لغليكوزيلات الأمينات العطرية متعددة الحلقات.

**كلمات البحث:** الجراثيم مجموعة . الأمراض مسببات . ستربتومييس . الميكروبات مضادات نشاط. المواد الفعالة .