

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département de Microbiologie.
Spécialité : Biotechnologie Microbienne.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Caractérisation culturelle, biochimique et
physiologique d'une souche *Streptomyces* sp.
productrice d'antibiotiques.**

Présenté par :

ARROUL Younes & BELABED Walid

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{elle} **DJINNI Ibtissem**

M^r **KECHA Mouloud**

M^{me} **SOUAGUI Samiha**

MCA

Professeur

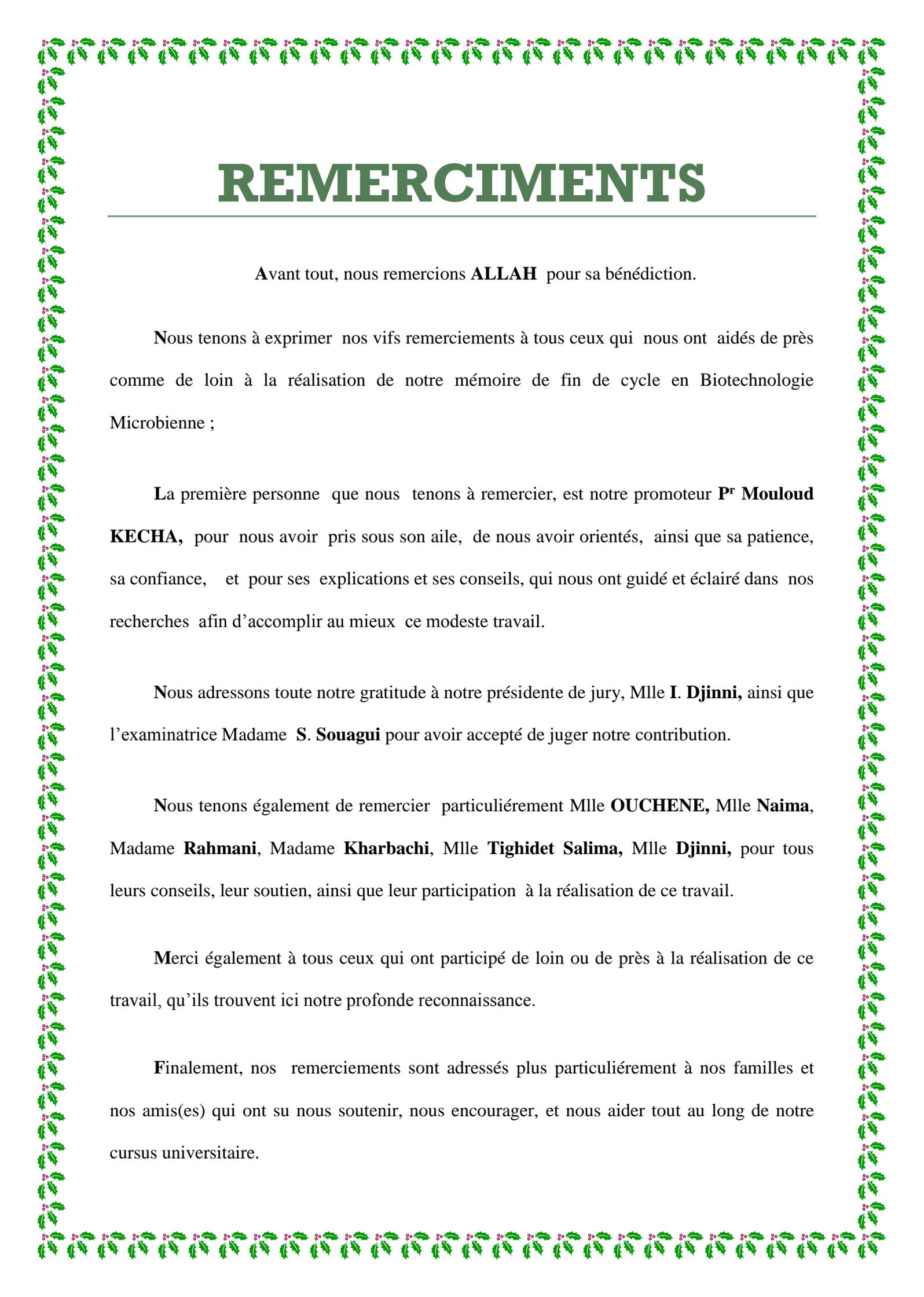
MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017/2018



REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions **ALLAH** pour sa bénédiction.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près comme de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle en Biotechnologie Microbienne ;

La première personne que nous tenons à remercier, est notre promoteur **P^r Mouloud KECHA**, pour nous avoir pris sous son aile, de nous avoir orientés, ainsi que sa patience, sa confiance, et pour ses explications et ses conseils, qui nous ont guidé et éclairé dans nos recherches afin d'accomplir au mieux ce modeste travail.

Nous adressons toute notre gratitude à notre présidente de jury, Mlle **I. Djinni**, ainsi que l'examinatrice Madame **S. Souagui** pour avoir accepté de juger notre contribution.

Nous tenons également de remercier particulièrement Mlle **OUCHENE**, Mlle **Naima**, Madame **Rahmani**, Madame **Kharbachi**, Mlle **Tighidet Salima**, Mlle **Djinni**, pour tous leurs conseils, leur soutien, ainsi que leur participation à la réalisation de ce travail.

Merci également à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde reconnaissance.

Finalement, nos remerciements sont adressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, et nous aider tout au long de notre cursus universitaire.

Je remercie Dieu **ALLAH** le tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail, que je dédie :

A ma **chère MAMAN**, unique dans son genre, et je tiens à la remercier, à l'occasion, pour ses longs sacrifices, sa belle compréhension et ses incessants soutiens et conseils répétitifs. Sachant que, ce présent témoignage de ma reconnaissance ne se résumeront **JAMAIS** : ni à ces quelques lignes, ni à ces quelques mots, vue qu'ils ne seront **JAMAIS** assez suffisants pour définir la gratitude que je lui dois et l'immense reconnaissance que je lui porte.

Je dédie aussi à ma seule et unique **sœur Sara et mon seul frère Benyamine**, à lesquels je souhaite la réussite éternelle et le bonheur et l'épanouissement perpétuels dans l'avenir.

A mon binôme **M^R BELABED Walid**, sans oublier mes amis surtout **Hanane ADOUANE** pour son aide mais aussi d'autres amis qui m'ont aidé (**Yacine, Housseem, Abed al-moumén, Oualid, Nassim, Samir, Salima, Fdoua, Amir, Fayçal, Mohammed, Sofiane**).

Encore une autre fois, je vous remercie tous infiniment, sachant que je n'oublierai jamais votre immense service que vous m'avait rendu au long du cursus universitaire.

Sans oublier bien sûr, je dédie ce présent modeste travail de recherche, à l'ensemble de la communauté scientifique : chercheurs, enseignants, étudiants. Comme je le dédie à tous les honorables **MARTYRS** de notre cher pays, d'avoir tant sacrifié à l'indépendance de notre pays, en veillant à notre sérénité et sécurité et vie paisible.

Mes gratitudes vont bien droit à vous

ET à notre promotion 2017/2018 de Biotechnologie microbienne.

Younes ARROUL

Je remercie Dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents, en témoignage de ma reconnaissance, pour leurs compréhensions et leurs soutiens, pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué avec tous les moyens et aux prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour leur patience, leur conseils et leur encouragement.

Que ce travail apporte joie et fierté à :

A mes chers frères **Imad, Nassim** et notre benjamin **Lyes**, à lequel je souhaite la réussite pour son BEM et pour son avenir, et ma chère sœur **Souad**, ainsi que toute ma famille.

A tous mes professeurs, particulièrement notre encadreur M^r **M.KECHA** que je ne remercierai jamais assez. Permettez moi de vous dire, monsieur, que ce travail est le votre, vous serez toujours en ma mémoire, un symbole de sagesse et de bravoure ;

A mon binôme M^r **Y.ARROUL** ;

A mes très chers amis pour leurs aide et soutiens, que ce soit de près ou de loin (**DrYacine, Rima, Mr Housseem, Oualid , Mohamed, Fayçal, Nassim, Nesrine, Hanane, Samir, Aissa, Samira, Abdelmoumene**), et bien d'autres que j'estime énormément. Merci à eux, à leurs soutiens et leur compréhension.

Je dédie aussi avec tous mes respects à l'ensemble des ingénieurs de différents laboratoires.

Et à notre promotion 2017/2018 de Biotechnologie Microbienne.

Walid BELABED

Liste des figures

Figure	Titres	Pages
Figure 1	Schéma générale de purification d'antibiotiques	10
Figure 2	Protocole expérimental des dilutions décimales réalisées pour les cultures de 18h pour les germes cibles.	15
Figure 3	Protocole expérimental de l'extraction des antibiotiques à partir des surnageants de culture, de la souche d'actinobactérie <i>Streptomyces</i> sp.	23
Figure 4	Photographie d'activité antibactérienne des souches d'actinobactérie vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> par le test des cylindres d'agar.	25
Figure 5	Photographie d'activité antibactérienne de la souche d'actinobactérie vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> par le test de stries croisées.	26
Figure 6	Observation sous microscope optique grossissement (GX40) des hyphes aériens de la souche d'actinobactérie retenue, après 14 d'incubation à 28 C° sur milieu GYEA.	32
Figure 7	Dégradation des caséines du lait par la souche <i>Streptomyces</i> sp.	33
Figure 8	Dégradation du tween 80 par <i>Streptomyces</i> sp.	33
Figure 9	Dégradation d'amidon par la souche <i>Streptomyces</i> sp.	34
Figure 10	Décomposition de la gélatine par <i>Streptomyces</i> sp.	34
Figure 11	Dégradation de Citrate de sodium par <i>Streptomyces</i> sp.	34
Figure 12	Test d'antagonisme du surnageant brut vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .	37
Figure 13	Photographie de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques par la souche <i>Streptomyces</i> sp.	37

Liste des Tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I	Types de paroi chez les actinobactéries	4
Tableau II	Répartition écologique des actinobactéries	5
Tableau III	Classes d'antibiotiques / antibactériens utilisés dans le traitement des infections dues aux bactéries pathogènes.	8
Tableau IV	Les germes cibles.	13
Tableau V	Les antibiotiques testés vis-à-vis la souche d'actinobactérie(S8) <i>Streptomyces</i> sp .	20
Tableau VI	Résultats du test des cylindres d'agar des souches d'actinobactéries <i>in vitro</i> vis-à-vis des germes cibles par mesure des zones d'inhibition (en mm) autour des colonies .	24
Tableau VII	Résultats du test des stris croisées des souches d'actinobactéries <i>in vitro</i> vis-à-vis des germe cibles.	25
Tableau VIII	Caractérisation morphologique et culturale de la souche <i>Streptomyces</i> sp.(S8) sur différents milieux de culture après 7 jours d'incubation.	27
Tableau IX	Caractérisation morphologique et culturale de la souche <i>Streptomyces</i> sp. sur différents milieux 14 et 21 après jours d'incubation.	28
Tableau X	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp. à différents pH.	29
Tableau XI	Croissance de la souche d'actinomycète retenue après 7,14 et 21 jours d'incubation à différentes températures.	30
Tableau XII	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp. à différentes concentrations en NaCl après 7 jours d'incubation.	31
Tableau XIII	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp. après 21 jours d'incubation.	31
Tableau XIV	Dégradation des acides aminés par la souche <i>Streptomyces</i> sp. après 21 jours d'incubation.	32
Tableau XV	Caractéristiques biochimiques de la souche <i>Streptomyces</i> sp.	33
Tableau XVI	Dégradation des sucres par la souche <i>Streptomyces</i> sp. après 21 jours d'incubation.	35

Liste des Tableaux

Tableau XVII	Résistance ou sensibilité de la souche <i>Streptomyces</i> sp. aux différents antibiotiques après 7 jours d'incubation.	37
Tableau XVIII	Caractéristiques physiologiques de la souche <i>Streptomyces</i> sp.	38
Tableau XIX	Ensemble des caractéristiques de la souche <i>Streptomyces</i> sp.	39

Liste des abréviations

- **AMC** : Amoxiciline + Acide Clavulanique.
- **AN** : Acide Nalidixique.
- **ATCC** : American Type Culture Collection.
- **CAZ** : Ceftazidime.
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.
- **CIP** : Ciprofloxacine.
- **CTX** : Cefotaxime.
- **DAB** : Acide Diaminobutyrique.
- **DAP** : Acide Diaminopémilique.
- **DL** : Dextrogyre/ Lévoogyre.
- **FOX** : Cefoxitime.
- **GN** : Gélose Nutritive (milieu de culture).
- **GYEA** : Yeast Extract Glucose Agar (Gélose d'extrait de levures et de Glucose).
- **HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance.
- **IR** : Infra Rouge.
- **ISP** : International *Streptomyces* Project (milieu de culture).
- **LL** : Lévoogyre/ Lévoogyre.
- **LMA** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
- **NR1** : Nitrate Réductase 1.
- **NR2** : Nitrate Réductase 2.
- **OX** : Oxacilline.
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.
- **rpm** : rate per minute.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Généralité et définition des actinobactéries.....3

I.2 Taxonomie et chimiotaxonomie des actinobactéries.....4

I.2.1 Taxonomie et classification des actinobactéries.....5

I.2.2 Chimiotaxonomie des actinobactéries.....5

I.3 Ecologie des actinobactéries.....5

I.4 Domaines d'application des actinobactéries.....6

I.4.1 Domaine agricole.....6

I.4.2 Domaine médicale.....6

I.4.3 Domaine agro-alimentaire.....7

I.5. Antibiotiques.....7

I.5.1 Définition générale des antibiotiques.....7

I.5.2 Classification des antibiotiques (antibactériens).....8

I.5.3 Extraction et purification des antibiotiques.....9

I.6 Substances bioactives produite par des actinomycètes marins.....10

I.7 Enzymes industrielles produite par les actinobactéries.....11

I.8 Production de vitamines par les actinobactéries.....12

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II. Matériel

II.1. Matériel analytique (voir annexe A)

II.2. Matériel biologique

II.2.1. Provenance des souches d'actinobactéries.....13

II.2.2. Les Germes cibles..... 13

II.2. Méthodes

II.2.1 Revivification des souches d'actinobactéries.....14

II.2.2 Ensemencement sur milieu SCA.....14

II.2.3 Tests d'antagonisme sur milieu solide.....14

II.2.4. Méthode des cylindres d'Agar..... 14

II.2.5. Méthode des stries croisées.....16

II.3.1. Caractérisation macromorphologique de la souche *Streptomyces* sp.....17

II.3.2. Caractérisation micromorphologique.....17

II-4 Caractérisation biochimique.....17

II.4.1. Utilisation des différents sucres par la souche sélectionnée.....17

II.4.2. Utilisation des différents acides aminés par la souche retenue.....18

II.4.3. Hydrolyse de la gélatine..... 18

II.4.4. Mise en évidence de l'activité amylolytique.....18

II.4.5. Décomposition des caséines du lait.....18

II.4.6. Dégradation des sels de sodium..... 19

II.4.7. Etude l'activité lipolytique.....19

II.5. Caractérisation physiologique19

II.5.1. Croissance à des différentes concentrations en NaCl.....19

II.5.2 Croissance à différentes valeurs de pH.....19

II.5.3 Croissance à différentes températures.....19

II.5.4	Sensibilité aux antibiotiques.....	19
II.5.5	Sensibilité au Cristal violet.....	20
II.5.6	Test de la catalase.....	20
II.5.7	Production de nitrate réductase.....	20
II.6	Production d'antibiotiques sur milieu liquide.....	21
II.6.1	Pré-culture.....	21
II.6.2	Culture.....	21
II.6.3	Extraction d'antibiotique.....	22
II.6.4.	Extraction a partir du surnageant de culture.....	23

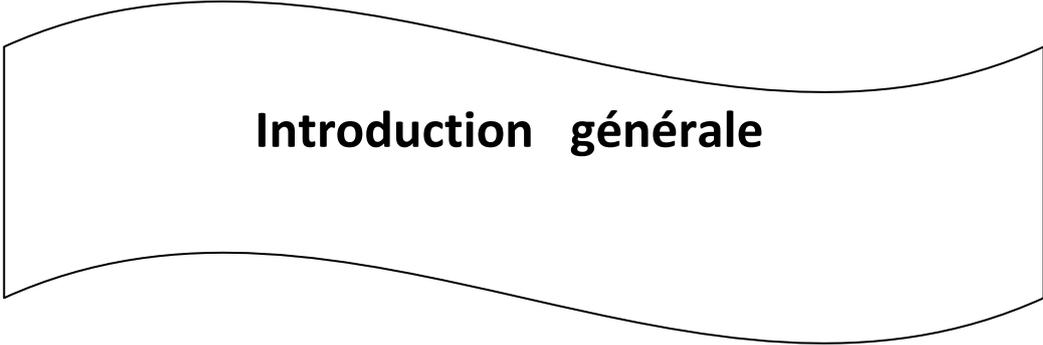
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1.	Revivification de souches d'actinobactéries sur milieu SCA.....	24
III.2.	Tests d'antagonisme sur milieu solide.....	24
III.2.1.	Test des cylindres d'Agar.....	25
III.2.2.	Test des stries croisées.....	26
III.3.	Caractérisation morphologique et culturale de la souche <i>Streptomyces</i> sp	27
III.3.1	Caractérisation morphologique et culturale de la souche <i>Streptomyces</i> sp.....	28
III.4.	Caractérisation physiologique.....	29
III.4.1	Croissance à différentes valeurs de pH.....	29
III.4.2	Croissance à des différentes températures.....	30
III.4.3	Croissance à des concentrations différentes en NaCl	31
III.5	Caractérisation micromorphologique	32
III.6	Caractérisation biochimique.....	32
III.6.1	Utilisation des différents acides aminés la souche <i>Streptomyces</i> sp.....	32
III.6.2	Utilisation des sucres par la souche <i>Streptomyces</i> sp.....	33
III.7.	Mise en évidence de la production d'antibiotiques sur milieu liquide.....	36
-	Méthode des puits.....	36
III.8	Sensibilité aux antibiotiques.....	37

III.9	Sensibilité au cristal violet, production de catalase et de Nitrate réductase.....	38
III.10	Description générale de la souche <i>Streptomyces</i> sp.....	39
	Conclusion	40

Références bibliographiques.

Annexes



Introduction générale

Les antibiotiques ont fait reculer la mortalité causée par les maladies infectieuses, qui sont dues aux bactéries pathogènes. Cependant, leur utilisation intensive chez l'être humain, comme chez les espèces animales, a conduit à l'émergence d'un phénomène de résistance parfois multiple et plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, qu'est une bactérie dangereuse responsable d'infections nosocomiales. L'augmentation croissante de microorganismes résistants aux antibiotiques rend la recherche de nouvelles substances bioactives indispensable (Poonam et al., 2013).

Les actinobactéries regroupent des microorganismes mycéliens à Gram positif riches en G+C appelés communément les actinomycètes qui hydrolysent une large gamme de matières organiques, et qui colonisent presque tous les écosystèmes, même les milieux extrêmes. Ces bactéries sont considérées comme une origine importante pour la plus grande partie de métabolites secondaires, notamment les antibiotiques antibactériens ou antifongiques (Boussaber et al., 2012). Ces bactéries jouent un grand rôle dans la minéralisation du sol, où ces dernières participent à la décomposition de la matière organique (Naikaptil et Rathod., 2011).

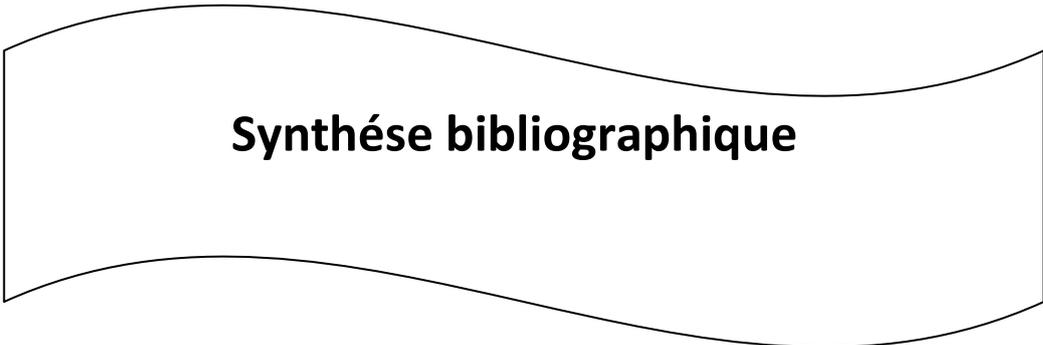
Les actinobactéries constituent une des sources les plus exploitées à l'échelle industrielle, pour l'obtention de nouvelles molécules bioactives. C'est pour cela que, les scientifiques cherchent à isoler de nouvelles souches d'actinomycètes à partir des milieux particuliers, et plus précisément les habitats marins. Sachant que cela pourrait aboutir à l'isolement et à l'identification des actinobactéries, parfois halophiles, productrices de nouvelles substances antimicrobiennes. Parmi ces dernières, on peut citer le genre le plus abondant et qui synthétise plus de la moitié de ces molécules antimicrobiennes c'est le genre *Streptomyces* en raison de sa répartition importante dans les différentes niches écologiques (Brodasky et al., 1983).

En Algérie, les milieux aquatiques, qui constituent un écosystème particulier, contiennent un potentiel assez riche en actinobactéries exploitables au niveau des industries pharmaceutiques et plus précisément les espèces du genre *Streptomyces* tels que : *Streptomyces yatensis* isolée à partir de la région El- Mellah Lake Wilaya d'El-Kala, celle-ci est connue comme producteur d'antifongique actif à l'égard de *Candida albicans* et vis-à-vis d'*Aspergillus niger* (Benouagueni et al., 2015).

L'objectif de notre étude est la mise en évidence de la production de substances actives par des souches d'actinobactéries isolées à partir de l'eau de mer et appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA : équipe du Pr KECHA Mouloud (Métabolites secondaires)) vis-à-vis de bactéries à Gram positif et Gram négatif et une levure pathogène *Candida albicans* ainsi que la caractérisation morphologique, biochimique et physiologique de la souche la plus performante.

Le plan de ce travail est articulé autour de trois axes principaux :

- La mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de 11 souches d'actinobactéries d'origine marine sur milieu solide et liquide ;
- Identification morphologique, culturale, biochimique et physiologique de l'isolat le plus actif ;
- Extraction de (s) antibiotique (s) produits sur milieu liquide.



Synthèse bibliographique

I.1 Généralités et définition des actinobactéries

Les actinobactéries sont considérées comme étant des bactéries à Gram positif avec un coefficient de Chargaff élevé ($G+C \geq 55\%$). A l'origine, ces microorganismes ont été définis comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les mycètes (Kuster., 1968). Leurs caractéristiques chimiques, physiologiques, et génétiques les situent parmi les procaryotes (Williams et *al.*, 1973). La paroi de ces germes ne possède ni chitine ni cellulose, par contre elle renferme le peptidoglycane qui est le constituant principal de la paroi des bactéries avec des acides tel que l'acide diaminopénilique avec ses différentes formes : LL, DL ou bien la forme dite méso LL/DL, l'acide diaminobutyrique, la lysine...etc. En plus, la cytologie de ces microorganismes est celle des bactéries. Ce qui démontre qu'il s'agit vraiment de bactéries, c'est l'absence de stérols au niveau de la membrane cytoplasmique et le matériel génétique est dépourvu de la membrane nucléaire (Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990).

La morphologie de certaines de ces dernières rappelle celle des moisissures car elles se développent sous forme de filaments appelés mycélium qui porte le plus souvent des spores ou des conidies (Nanjwade et *al.*, 2010). Le mycélium peut se présenter sous deux aspects : un mycélium végétatif et un mycélium aérien (Sulaiman et *al.*, 2012). Les actinobactéries sont surtout connues pour la production de métabolites primaires tels que les enzymes et d'autres dits secondaires tels que les antibiotiques (Hanan et *al.*, 2015).

Les actinobactéries sont réparties en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de microorganismes possédant un métabolisme oxydatif et ayant comme écosystème le sol tels que les saprophytes notamment le genre *Streptomyces* mais aussi les symbiotes des plantes c'est le cas du genre le plus connu *Frankia* ; par contre le deuxième groupe rassemble des bactéries à métabolisme fermentatif, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux, à l'exemple du genre *Bifidobacterium* (Essaid et *al.*, 2016).

I.2 Taxonomie et chimiotaxonomie des actinobactéries

I.2.1 Taxonomie et classification des actinobactéries

Les actinobactéries regroupent des espèces de morphologies différentes, on trouve des formes dites en bâtonnets tel que le genre *Arthrobacter*, en bâtonnets irréguliers c'est le cas du bacille de Koch ou *Mycobacterium tuberculosis*, genre *Corynebacterium*, et *Bifidobacterium* ..., des formes en cocci tel que les genres *Micrococcus* et *Blastococcus* des

bactéries dites mycéliennes , on a l'exemple du genre le plus connu *Streptomyces* mais aussi d'autres dits rares ,c'est le cas des genres : *Actinomyces*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium...etc.* (Adzzie et al.,1997).

Selon le Bergey's manuelle 2012 volume 5 «The Actinobacteria », le Phylum *Actinobacteria* appartient au domaine des *Eubacteria* .Il est divisé actuellement en six Classes qui sont-elles même subdivisées en plus de 22 ordres qui renferment plus de 44 familles. Parmi les ordres les plus importants, on distingue les *Actinomycetales* et les *Streptomycetales* (voir Annexe C).

I-2-B Chimiotaxonomie des actinobactéries

La caractérisation chimio taxonomique des *Actinobactéries* est fondée sur l'étude chimique des sucres pariétaux, la composition de la paroi en acides aminés, en acide diamminopémilique, acide diaminobutyrique et aussi la composition de la membrane plasmique en phospholipides. Cela constitue une clé d'identification chimique des différents genres d'*Actinobactéries* (Tableau I) (Mc Kerrow et al., 2000).

Tableau I : Types de parois chez les *Actinobactéries* (Lechevalier., 1970).

Types de la paroi	Les sucres pariétaux + acides aminés	Genres représentants
Type I C	DAP/LL+ Glycine	<i>Streptomyces, Nocardioides</i>
Type II D	DAP/DL+Glycine+Arabinose+Xylo	<i>Micromonospora, Actinoplanes</i>
Type III B	DAP/DL+Madurose	<i>Actinomadura, Streptosporangium</i>
Type III C	DAP/DL	<i>Thermomonospora, Actinosynnema</i>
Type III E	DAP/DL+Rhamnose+Galactose	<i>Saccharothrix</i>
Type IV A	DAP/DL +Arabinose+Galactose	<i>Nocardia, Rhodococcus</i>
Type V	Ornithine+Lysine	<i>Cellulomonas</i>
Type VI	Lysine	<i>Actinomyces, Arthrobacter</i>
Type VII	DAB+ Glycine	<i>Clavibacter, Agromyces</i>
Type VIII	Ornithine	<i>Ornithinimicrobium</i>

En ce qui concerne les phospholipides, qui constituent la membrane plasmique cellulaire, on peut distinguer cinq types différents allant de PI à PV. Sachant que toutes les Actinobacteries présentent le phosphatidyl inositol, il existe également d'autres phospholipides tels que : le phosphatidyl glucosamine, le phosphatidyl ethanolamine, le phosphatidyl choline, ainsi que le phosphatidyl glycérol qui forment les doubles couches phospholipidiques caractérisant les différents genres d'actinobactéries (Jones et Krieg, 1989).

On cite à titre d'exemple les phospholipides caractérisant certaines espèces du genre *Streptomyces*, à savoir : phosphatidylinositol, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl glycérol et phosphatidylinositol mannoside trouvés chez *Streptomyces hygroscopicus* (Parthasarathy et al., 2007). Mais, il existe également des lipides autres que les phospholipides utilisés comme un critère d'identification chimique des différents genres d'actinomycètes, appelées les ménaquinones, qui se définissent comme étant des lipides membranaires avec un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique contenant des unités isoprène, ces dernières sont classées selon le nombre de ces unités et leur degré de saturation telles que les MK₉(H₈) spécifique au genre *Streptomyces* et les MK₉(H₁₀) spécifique au genre *Micromonospora* (Collins et al, 1985).

I.3 Ecologie des Actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires, c'est-à-dire qu'ils sont répartis dans les différents écosystèmes. On peut les rencontrer dans le sol, notamment le genre *Streptomyces*, qui est le genre le plus abondant. D'autres sont des genres dits rares, se trouvant dans les sédiments marins pour les souches halophiles, les sources thermales pour les bactéries thermophiles, les eaux usées ; le tube digestif humain et animal, les déserts, les mangroves (Groth et al., 1999). Le tableau II résume la répartition écologique des actinobactéries selon Khana et al., (2011).

Tableau N°02 : La répartition écologique des Actinobacteries (Khana et al., 2011).

N°	Actinobacteries	Ecosystèmes
1	<i>Actinomadura, Actinosynnema, Amycolatopsis, Arthrobacter, Frankia, Geodermatophilus, Gordonia Kitasatospora, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardioïdes, Nocardiosis, Pseudonocardia Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salinispora Streptomyces, Streptosporangium, Williamsia Tsukamurella, Verrucosipora, Marinispora</i>	Sédiments marins
2	<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Bogoriella, Microbispora, Micromonospora, Nocardia,</i>	Sol acide et sol basique
3	<i>Bifidobacterium, Rhodococcus, Nocardia, Gordonia</i>	Eaux usées
4	<i>Actinomadura, Micromonospora, Microtetraspora Saccharomonospora , Streptomyces, Thermomonospora</i>	Sources thermales
5	<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Microbispora, Microtetraspora, Nocardia, Nocardiosis, Saccharothrix</i>	Sols désertiques
6	<i>Arthrobacter, Friedmanniella, Modestobacterium, Nocardia, Nocardiosis, Pseudonocardia, Streptomyces</i>	Echantillons glaciaires
7	<i>Amycolatopsis , Arsenicococcus, Catellatospora, Fodinicola.</i>	Rhizosphère
8	<i>Actinoplanes, Couchioplanes, Catenuloplanes, Microbispora, Saccharopolyspora.</i>	Sol agricole

I-4 Domaines d'application des actinobactéries

I.4.1 Domaine agricole

Les actinobactéries ont un rôle écologique très important notamment les saprophytes dans le sol et plus particulièrement les *Streptomycètes* qui dégradent une grande variété de composés organiques. Ces microorganismes sont extrêmement importants pour la minéralisation de celle-ci , c'est pour cela que ces bactéries sont très utilisées pour la production d'enzymes (cellulases) , des herbicides (phinothricine), des insecticides (mykomycine) et des fongicides (Nystatine) ... etc. (Prescott.,2003).

I.4.2 Domaine médical

Ces bactéries sont très utiles à l'échelle industrielle en raison de leurs capacités à produire une large gamme de substances bioactives. En effet 70% des antibiotiques (antibactériens ou antifongiques) sont synthétisés par les actinobactéries et plus particulièrement le genre *Streptomyces* qui élabore plus de moitié de ces molécules antimicrobiennes, et d'autres genres dits rares sont également reconnus comme des

producteurs de substances antibiotiques tels que *Streptosporangium* qui produit la Sibiromycine, *Micromonospora* qui synthétise la gentamycine , la rifamycine et *Amycolatopsis* qui élabore la vancomycine, la rifamycine (Ameriga et *al.*, 2000). Ces bactéries mycéliennes sont aussi connues pour la synthèse des antiparasitaires, des anticancéreux, des antiviraux et des anti-inflammatoires... etc. (Hanan et *al.*, 2015).

I.4.3 Domaine agro-alimentaire

Dans la division *Actinobacteria* il existe un groupe très exploité au niveau des industries agro-alimentaires c'est celui des *Propionibacteriaceae* qui rassemble un grand nombre de bactéries fermentatives notamment le genre *Propionibacterium* qui produit de l'acide propionique très utilisé par les industries fromagères et de l'acide acétique utilisé dans la production du vinaigre, ce genre contribue également à la production de fromage type Gruyère et lui confère son goût typique (Prescott., 2003).

I.5 Antibiotiques

I.5.1 Définition générale des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances bioactives essentiellement de nature protéique, produites le plus souvent par des microorganismes mais aussi peuvent être synthétisés par voie chimique. Ces molécules peuvent avoir un effet bactériostatique ou un effet bactéricide concernant les antibactériens (à large spectre ou à spectre étroit) , un effet fongistatique ou fongicide concernant les antifongiques (anti -levures et anti- moisissures), ces antimicrobiens sont classés en fonction de leur structure chimique, leur mode d'action mais aussi leur masses moléculaires (Willey et Sons. ; 2007).

I.5.2 Classification des antibiotiques (antibactériens)

Dans cette classification on s'intéresse aux antibiotiques antibactériens selon le tableau de classification réalisée par des spécialistes de santé humaine , les détails sont établis comme présenté dans le tableau III.

Tableau III : Classes d'antibiotiques / antibactériens utilisés dans le traitement des infections dues à des bactéries pathogènes (Bbosa et *al.*, 2014).

Mécanismes d'action	Classes	Exemples d'antibiotiques les plus utilisés
Inhibition de la biosynthèse de la paroi des bactéries	B- Lactamines	Pénicilline G, Pénicilline V ; Ampicilline ; Amoxicilline, Bacampicilline.
	Céphalosporines	Cefixine, Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefotetan.
	Glycolipides	Fosfomycine, Vancomycine, Oritavancine, Ramoplanine
	Polypeptides	Bacitracine
	Pyridine-4-carbohydrazide	Isoniazide
Inhibition de la synthèse des protéines (inhibition de la sous unité 30S).	Tetracyclines	Democycline et Methacycline
	Glycylcyclines	Tigecycline, Gentamycine
	Aminoglycosides	Streptomycine ; Néomycine, Kanamycine, Spiromycine, Spectinomycine
	Furanes	Nitrofurantoine, Erythromycine
	Macrolides	Carithromycine, Dirithromycine
Inhibition de l'ARN _r 23S (sous unité 50S).	Kétolides	Telithromycine, Daflopristine et quinupristine
	Streptogramines	Clindamycine,
Inhibition de la synthèse des protéines (ARNt).	Lincosamides	Lincomycine
	Phenocols	Chloramphénicol
	Oxazoladinones	Linezolid
	Sulfanamides	Mupirocine et puromycine
Elongation d'ARN	Quinolones	Actinomycine
Inhibition du métabolisme d'acide folique.		Sulfacytine, Sulfisoxazole, Sulfadoxine.
		Acide nalidixique, acide oxolinique et cinoxacine.
		Levoflaxacine, Sparfloxacine.
Inhibition d'ADN	Anasamycines	Rifampicine, Rifabutine.
Inhibition d'ARN	Lipopeptides	Polymyxine A ; B ; C ; D ; E. Colistine (E).
		Pyrazinamide
Rupture des membranes cellulaires		

I.5.3 Extraction et purification des antibiotiques

L'étude des antibiotiques ou d'autres substances bioactives nécessite plusieurs méthodes d'extraction par le choix d'une gamme de solvants organiques de polarités différentes et de protocoles de purification qui dépendent des caractéristiques physicochimiques du complexe actif et de sa concentration dans le milieu de production. D'après Brodasky, (1983) l'extraction à l'aide de solvants non miscibles avec de l'eau est une opération unitaire qui permet une purification partielle.

La figure 2 présente un des protocoles utilisés pour la purification d'antibiotiques, décrit par Yingjian lu et *al.*, (2009).

I.6 Substances bioactives produites par des actinobactéries marines

Les écosystèmes marins constituent une source d'isolement et de criblage des souches d'actinobactéries aquatiques, afin de produire de nouvelles molécules biologiques à effet inhibiteur vis-à-vis de bactéries à Gram positif et vis-à-vis de bactéries à Gram négatif pathogènes, mais aussi à l'égard d'espèces fongiques (levures et moisissures) connus comme des parasites de l'homme ou d'animaux provoquant des mycoses invasives, c'est pour cela il est très intéressant d'exploiter des milieux salins tels que les mers, les océans et les mangroves à partir desquelles les chercheurs ont un espoir d'isoler et de sélectionner de nouvelles espèces d'actinobactéries bien adaptées à ces conditions physiologiques ce qui fait que le métabolisme de ces dernières est aussi important en vue de l'obtention de nouveaux antibiotiques actifs à l'égard des germes résistants aux agents antimicrobiens, on cite à titre d'exemple des genres rares renfermant des espèces productrices de nouveaux antibactériens ou de nouveaux antifongiques et qui appartiennent le plus souvent au genre *Marinispora* et au genre *Salinispora* mais aussi au genre *Streptomyces*. Parmi les antibiotiques connus on cite l'exemple de Marinisporolide A et Marinisporolide B synthétisés par *Marinispora pacifica*, Cyclomarine D produit par *Salinispora arnecola* (Fenical et Jensen., 2007). Sisomycine produite par *Streptomyces sp* (Yingjian et *al.*, 2009).

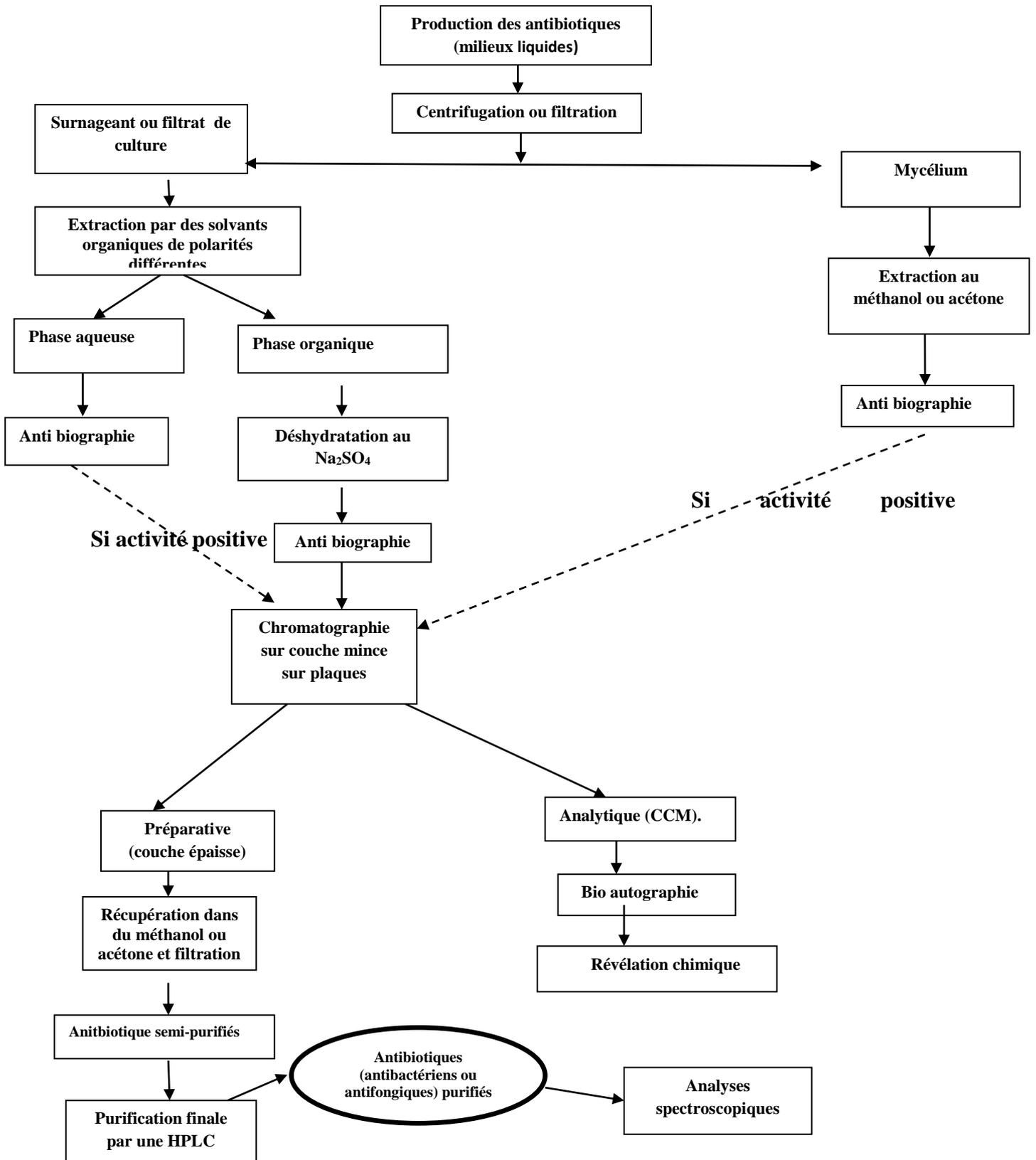


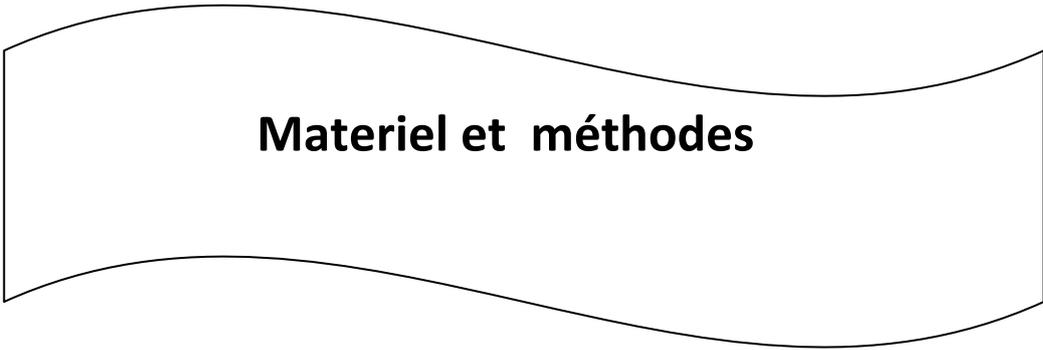
Figure 2 : Schéma général de purification d'antibiotiques (Yingjian lu et al., 2009).

I-7 Enzymes industrielles produite par des actinobactéries

L'usage des enzymes au sein des processus industriels est un bon moyen qui a permis d'une part de réduire la pollution par la valorisation et l'utilisation des sous-produits, il apporte un bénéfice à ces industries du côté économique en réduisant l'énergie nécessaire à leurs fonctionnements d'autre part (Pedrolli et Carmona, 2009). La plus grande partie des enzymes sont produites par des microorganismes notamment les actinobactéries et plus particulièrement les espèces du genre *Streptomyces* qui vivent comme des saprophytes du sol. Parmi ces protéines qui peuvent être synthétisées par des souches de *Streptomyces* sp. On distingue les endoxygénases, les endoglucanases, les peroxydases, les amylases et les cellulases (Tuncer et al., 2004).

I-8 Production de vitamines par les actinobactéries

Les vitamines sont des facteurs de croissance indispensables au bon fonctionnement de l'organisme, elles ne peuvent pas être synthétisées par le corps humain c'est pour cela qu'il faut un apport alimentaire. Ces vitamines sont également produites par des microorganismes, surtout les actinobactéries, on trouve des espèces du genre *Streptomyces* telle que *S. olivaceus* exploitée en biotechnologie pour la production de la vitamine B12 (Harlow et al., 1953). On distingue également une espèce de *Propionibacterium* connue pour la production de la thiamine, qu'on appelle *Propionibacterium freudenreichii* (Piao et al., 2004).



Materiel et méthodes

II. Matériel

II.1. Matériel analytique (voir Annexe A)

II. 2. Matériel biologique

II.2.1. Provenance des souches d'actinobactéries

Onze souches ont été isolées à partir de l'eau de mer de la région Beniksilla et sélectionnées par Mlle OUCHENE Rima, doctorante au niveau de Laboratoire de Microbiologie Appliqué (LMA).

II.2.2. Les germes cibles

Les germes cibles à tester appartiennent à des groupes distincts.

Les détails sont donnés ci-bas :

Tableau IV : Les germes cibles testés.

Bacteries à Gram positif	Bacteries à Gram négatif	Levure
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213).	<i>Salmonella Typhi</i> (LMA)	<i>Candida albicans</i> (ATCC10231)
	<i>Vibrio cholerae</i> (ATCC14035)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853).	
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC13182).	
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC10541).	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Multi-résistante LMA).	
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	

II.2 Méthodes

II.2.1 Revivification des souches d'actinobactéries

La revivification des souches est effectuée par un repiquage qui consiste à ensemençer la souche bactérienne en stries serrées sur un milieu gélosé tel que le milieu SCA (voir annexe B) dans le but d'avoir des culture jeunes.

II.2.2 Ensemencement sur milieu SCA

A partir des milieux SCA déjà inoculés par des souches d'actinomycètes, les 11 souches d'actinobactéries ont été ensemencées par la méthode des stries serrées sur des boîtes contenant le même milieu suivi d'une incubation à 28°C pendant 7 jours afin d'avoir une croissance importante.

II.2.3 Test d'antagonisme sur milieu solide

II.2.4 Méthode des cylindres d'Agar

Description de la méthode

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité antimicrobienne de 11 souches d'actinobactéries. Pour cela, les souches sont ensemencées sur milieu SCA et incubées pendant 7 jours à 28°C. Des cylindres d'agar sont découpés à l'aide d'un emporte pièce et placés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencées avec les germes cibles cités précédemment. Les boîtes sont mises à diffuser à 4°C pendant 2 heures afin de favoriser la diffusion de(s) substance(s) en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48h. Les zones d'inhibition autour des colonies sont mesurées à l'aide d'un pied-à-coulisse et exprimées en millimètre.

Standardisation des inocula de germes cibles

Après la revivification de ces germes, une culture de 18 heures dans des tubes contenant 5ml de bouillon nutritif incubés à 37°C a été réalisée pour chacun des microorganismes cibles. Ces cultures sont considérées comme des suspensions mères. Une série de dilutions décimales est effectuée puis un dénombrement de ces germes dans trois boîtes contenant un milieu GN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 heures. A l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini .1240), les valeurs d'absorbances correspondantes aux dilutions présentant un nombre de 10^7 UFC/ml ont été sélectionnées pour préparer des cultures de 18 heures pour les tests d'activité antimicrobienne (Billerbeck et *al.*, 2002).

- **Test des cylindres d'agar :**

Préparation de la culture de 18 heures de germes cibles :

Dans des tubes à essai contenant un bouillon nutritif, on ensemence neuf germes cibles (08 bactéries et une levure) ; suivi d'une agitation sur un vortex puis une incubation à 37°C, pendant 18 heures, à l'étape suivante ; on prépare des dilutions décimales pour lancer les tests d'antagonisme sur milieu solide . La dilution est réalisée dans des tubes coniques contenant du tryptone sel (voir Annexe B) de manière à avoir une charge de 10^7 UFC/ml.

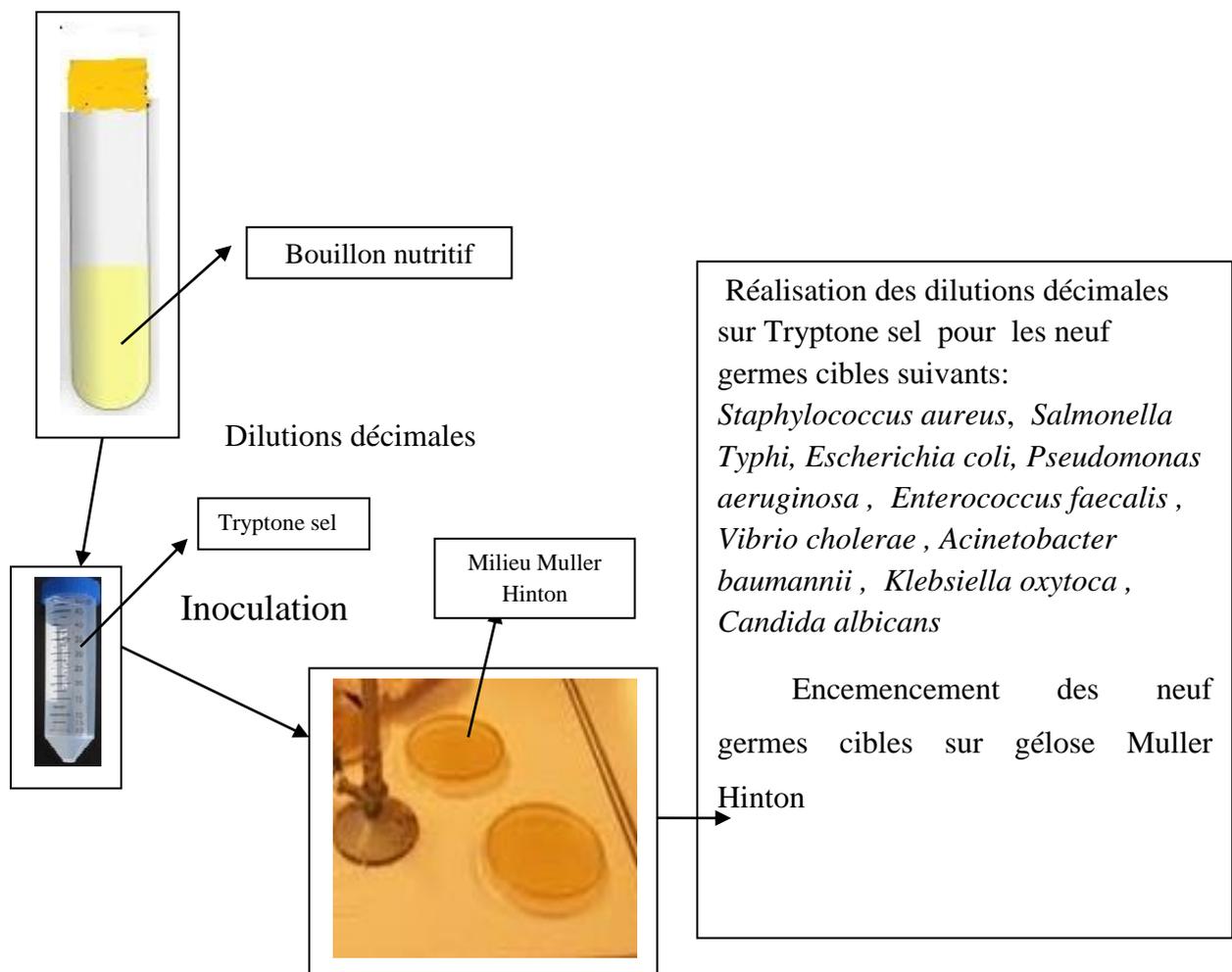


Figure 2 : Protocole expérimental des dilutions réalisées pour les cultures de 18 heures des germes cibles.

II.2.5 Méthode des stries croisées

Cette technique consiste à encemencer le germe producteur en stries sur le milieu Muller Hinton. Après une incubation de 7 jours à 28°C, on passe à l'inoculation des germes cibles perpendiculairement au germe producteur à l'aide d'une ose stérile. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h à 48h. L'activité antagoniste se manifeste par l'absence de croissance du germe cible au contact de la souche productrice (Egorov *et al.*, 1985).

II.3.1 Caractérisation macromorphologique de la souche *Streptomyces* sp.

La description morphologique des actinobactéries est basée généralement sur la détermination de la morphologie, la taille et la couleur des colonies, la couleur des hyphes aériens et des hyphes végétatifs, la production de pigments diffusibles... etc. C'est pour cela, que la souche (S8) pour ses aptitudes antibiotiques est ensemencée sur les milieux suivants : ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP7, milieu de Williams, milieu de Bennett, gélose nutritive, milieu GYEA (voir Annexe B), suivie d'une incubation à 28°C pendant 7, 14, et 21 jours.

La lecture des résultats s'effectue chaque semaine, c'est-à-dire après les 7^{ème}, le 14^{ème} et enfin le 21^{ème} jour.

II-3-2 Caractérisation micromorphologique

Les colonies d'actinobactéries sont observées sur les milieux ISP7 et GYEA à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (X 40 et X10) après 14 jours d'incubation. Cette étude permet de voir la forme, le cloisonnement ou non des hyphes végétatifs et des hyphes aériens, ainsi que la formation et la disposition des exospores.

II.4 Caractérisation biochimique

II.4.1 Utilisation des différents sucres par la souche *Streptomyces* sp.

Ce test consiste à encemencer la souche *Streptomyces* sp. sur milieu ISP9 (voir Annexe B) contenant 10 sources de carbone différentes D-mannose, D- Fructose, Tréhalose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Sorbitol, D-Cellobiose, Arabinose, D-Xylose et Lactose (0.1g/ml). En utilisant un témoin négatif afin d'avoir une comparaison entre l'usage des sources de carbone et la croissance de cette souche en absence de ces glucides. Après avoir inoculé cette bactérie, incubation à 28 °C pendant 21 jours (Pridham et Gottlieb., 1948).

II.4.2 Utilisation des différents acides aminés par la souche *Streptomyces sp.*

Ce test a pour but de mettre en évidence l'usage des acides aminés par la souche sélectionnée comme seule source d'azote, en ensemençant cette souche sur un milieu ISP9 (voir Annexe B) contenant les acides aminés suivants : L-Asparagine, Méthionine, L-lysine, L-leucine, L-Tryptophane, L-Glutamine, L-Histidine, DL-Alanine, Phénylalanine, DL-Valine, Arginine et (0.1g/ml) ; en utilisant un témoin négatif afin d'avoir une comparaison entre l'usage des acides aminés et la croissance de cette souche en absence de ces composés azotés. Après avoir inoculé cette bactérie, l'incubation des boîtes est effectuée à 28°C pendant 21 jours (Pridham et Gottlieb., 1948).

II.4.3 Hydrolyse de la gélatine

La mise en évidence de la production d'une gélatinase par la souche retenue est effectuée sur gélose nutritive (voir Annexe B) contenant 0.4%(w/v) de gélatine, après inoculation en spot de cette souche sur le milieu GN, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 14 jours. Les halos clairs entourant les colonies correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine .

II.4.4. Mise en évidence d'activité amylolytique

Cette activité est mise en évidence par l'ensemencement de la souche retenue *Streptomyces sp* sur gélose nutritive (voir Annexe B) contenant 10% (w/v) d'amidon soluble (TETAN BIOTECH LTD). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 14 jours, la révélation de l'activité amylolytique est effectuée avec du lugol. L'absence des zones claires autour des colonies est un témoin d'hydrolyse de l'amidon, par contre les zones contenant de l'amidon apparaissent brunes.

II.4.5. Mise en évidence de la décomposition des caséines du lait

Ce test consiste à mélanger 20% (w/v) de la poudre du lait écrémé avec 4g d'agar dans 300ml d'eau de mer en surfusion à 45°C après autoclavage à 120°C/20 min, la souche d'actinomycète sélectionnée estensemencée sur une gélose blanche contenant les caséines du lait comme seule source de carbone et seule source d'azote. Les boîtes sont

incubées à 28°C pendant 14 jours. L'activité protéolytique se manifeste par apparition des halos clairs autour des colonies .

II.4.6. Dégradation des sels de sodium

Il s'agit d'inoculer la souche retenue sur milieu solide à base des sels de sodium tels que le citrate de sodium, l'acétate de sodium (voir Annexe B), les boîtes sont alors incubées à 28°C pendant 14 jours .

II.4.7. Mise en évidence d'activité lipolytique

Sur milieu contenant du Tween 80 (voir Annexe B) comme seule source de carbone, la souche est ensemencée en spots sur milieu préconisé par Sierra et *al.*, 1957. La lecture est effectuée après 14 jours d'incubation à 28°C. La dégradation du Tween 80 se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies.

II.5 Caractérisation physiologique

II.5.1 Croissance à différentes concentrations en NaCl (w/v)

L'isolat sélectionné est inoculé sur milieu SCA à des concentrations différentes en NaCl à savoir : 0%, 1.5%, 3% , 5%, 7%, 10% , 13% et 15%. Les boîtes sont incubées à 28°C et La croissance de la bactérie est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation afin de déterminer la concentration du sel la plus favorable.

II.5.2 Croissance à différentes valeurs de pH

L'isolat sélectionné est ensemencée sur milieu SCA (voir Annexe B) ajusté à différentes valeurs de pH (4.5 ,5 ,6 ,7 ,8 ,9.2, 10 et 11) suivie d'une incubation à 28°C ,La croissance est observée après 7^{ème} jour, 14^{ème} jour et le 21^{ème} jour .

II.5.3 Croissance à différentes températures

L'isolat sélectionné est ensemencé sur le milieu SCA. Les boîtes sont incubées à différentes températures (4°C ,22°C ,28°C ,30°C ,37°C et 45°C). Le suivi de la croissance est effectué après 7^{ème}, 14^{ème}, et le 21^{ème} jour d'incubation .

II.5.4 Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est réalisée sur milieu SCA. Les disques d'antibiotiques sont déposés, à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu SCA, qui est préalablement inoculée avec la souche sélectionnée et ce par la méthode des stries serrées. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours. Les zones d'inhibition autour des disques sont mesurées après cette incubation. Les antibiotiques testés, leurs familles, et leurs charges sont donnés selon le Tableau V :

Tableau V : Les antibiotiques testés vis-à-vis la souche *Streptomyces* sp.

Les antibiotiques	Charges (ug)	Classes
Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	5	B-Lactamines
Oxacilline (OX)	1	B-Lactamines
Cefotaxime (CTX)	30	Céphalosporines
Ceftazidime (CAZ)	30	Céphalosporines
Ciprofloxacine (CIP)	30	Céphalosporines
Cefoxitime (FOX)	30	Céphalosporines
Acide Nalidixique (Na)	50	Quinolones

II.5.5. Sensibilité au Cristal violet

Ce test est effectué par l'inoculation en stries serrées de la souche *Streptomyces* sp. sur milieu SCA auquel est ajouté 0,002% du Cristal violet. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

II.5.6. Test de la catalase

La colonie caractéristique de la souche *Streptomyces* sp. est dissociée dans une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) 30% (v/v), sur une lame d'observation microscopique.

La production de la catalase se manifeste par l'apparition d'un phénomène d'effervescence, du à la formation de bulles d'oxygène.

II.5.7. Production de nitrate réductase

Ce test est réalisé sur un bouillon nitraté . La réduction des nitrates en nitrites est confirmée après l'ajout de deux réactifs NR1 et NR2. Après 7 à10 jours d'incubation. La formation des nitrites se manifeste par l'apparition de couleur rouge. En absence de cette couleur, une petite masse (quelques mg) de poudre de zinc sont alors additionnés, s'il y a :

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

II.6.Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu liquide

II.6.1 Pré culture

L'inoculum sporal a été raclé à partir du mycélium aérien obtenu sur des boites de Petri incubées pendant 14 jours.

Des pré-cultures de la souche retenue ont été préparées dans des tubes à essai contenant 3ml du milieu SCA stérile et incubées pendant 48heurs à 28°C, sous agitation permanente.

II.6.2 Culture

Les pré-cultures précédentes servent à inoculer 100ml du milieu SCA contenus dans des flacons de 250ml, L'incubation s'est faite à 28°C dans un Shaker sous agitation permanente (250 rpm), pendant 21 jours.

II.6.3 Extraction d'antibiotique(s)

Après une incubation de 21 jours, la culture liquide est centrifugée à 8000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant de culture est récupéré dans le but d'effectuer une extraction.

Méthode de diffusion dans des puits

Après incubation, l'existence d'activité antibactérienne est détectée par la technique de diffusion dans des puits. Un volume de 50µl de surnageant brut est prélevé stérilement puis introduit dans les puits, sur milieu Muller Hinton (d'une épaisseur de 6mm), préalablementensemencé par *Staphylococcus aureus* .

Les boites sont, d'abord, mises à 4°C pendant 2h dans le but de permettre la diffusion de(s) substance(s) bioactives tout en arrêtant momentanément le développement du germe

cible, après incubation pendant 24h à 48h à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés à l'aide d'un « pied à coulisse » .

II.6.4 Extraction à partir du surnageant de culture (choix du solvant d'extraction)

L'extraction des antibiotiques à partir du surnageant de culture exige le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Cinq solvants de polarité croissante ont été utilisés ; n-butanol, acétate d'éthyle, chloroforme, dichlorométhane et hexane (Hanan *et al.*, 2015).

Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction, le surnageant est mélangé dans une ampoule à décanter avec un volume égal de solvant (v/v). Les phases organiques sont récupérées, concentrées à sec à l'aide d'un rotavapor puis reprises dans un volume minimum de méthanol 80% , pour être testés par la technique de diffusion des puits, vis-à-vis des germes cibles, le méthanol est utilisé comme témoin négatif. La figure 3 résume le protocole expérimental de l'extraction d'antibiotique(s) à partir des surnageants de culture.

Matériel et méthodes

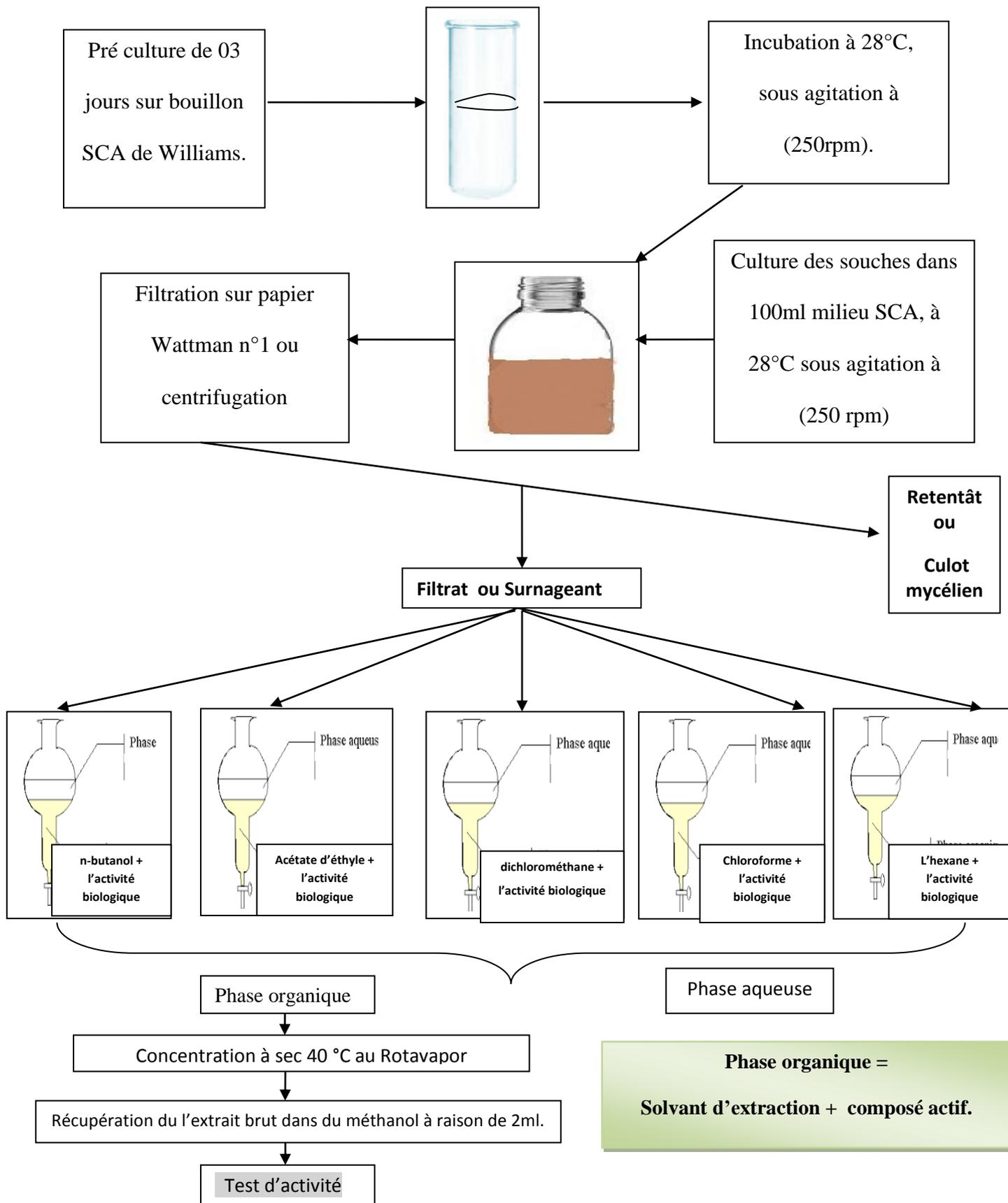


Figure 3 : Protocole expérimental de l'extraction des antibiotiques à partir des surnageants de culture, de la souche d'actinobactérie sélectionnée *Streptomyces* sp.

Résultats et discussion

L'étude est réalisée au sein de Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia allant de mois de Février au mois de Mai.

III.1. Revivification des souches d'actinobactéries sur milieu SCA

Après incubation à 28°C pendant 7 jours, un tapis d'hyphes denses de couleur blanchâtre est obtenu à la surface du milieu SCA qui correspond au mycélium aérien portant une chaîne de spores blanches (sporophore), avec des hyphes végétatifs de couleur jaune marron qui s'incrudent dans la gélose. Cela indique l'obtention d'une croissance importante et intéressante.

III.2. Tests d'antagonisme sur milieu solide

III.2.1 Test des cylindres d'agar

Les zones d'inhibition mesurées autour des colonies caractéristiques des germes cibles après l'incubation à 37°C pendant 24h sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VI : Résultats du test de cylindres d'agar des souches d'actinobactéries *in vitro* vis-à-vis des germes ciblés par mesure des diamètres des zones d'inhibition (en mm) autour des colonies.

Germes Cibles Souches Testées	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
S 1	0	0	<u>12</u>	0	0	0	0	0	0
S 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 3	0	0	<u>13</u>	0	0	0	0	0	0
S 4	0	<u>16</u>	0	0	0	0	0	0	0
S 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 8	0	<u>19</u>	0	0	0	0	0	0	0
S 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 11	0	<u>14</u>	0	0	0	0	0	0	0

Résultats et discussion

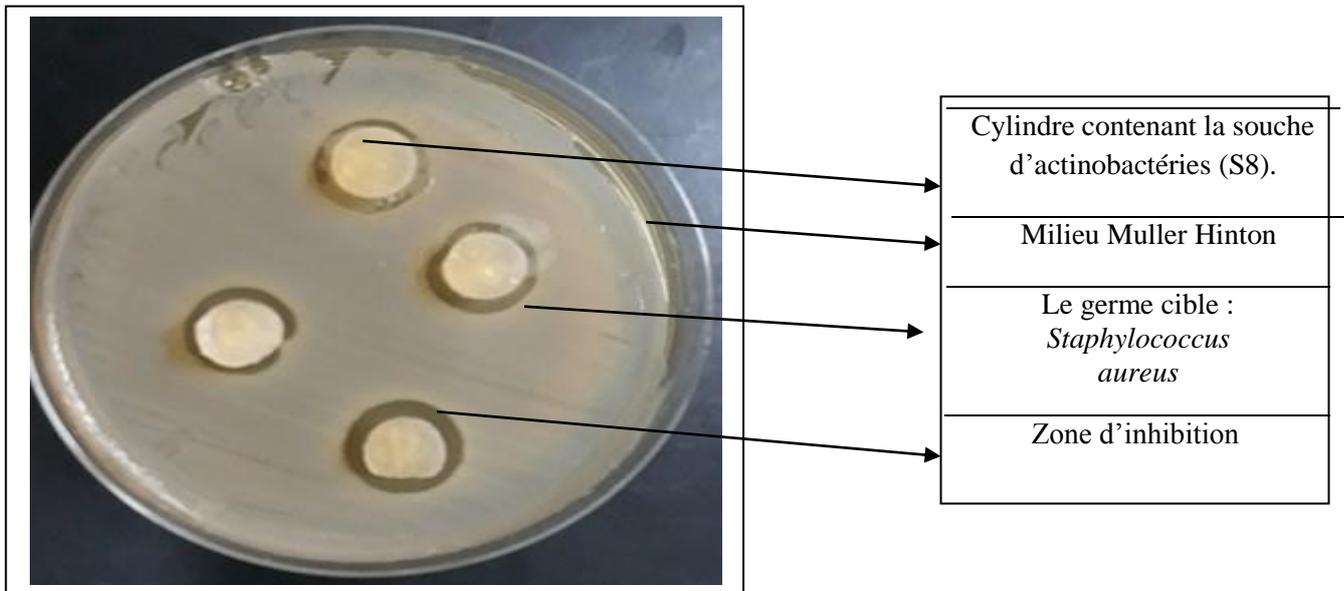


Figure 4 : Photographie de l'activité antibactérienne de la souche d'actinobactérie(S8) testée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par le test des cylindres d'agar.

III.2.2. Test des stris croisées

Les zones d'inhibition déterminées autour des colonies caractéristiques des germes cibles après l'incubation à 37C° pendant 24h sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VII : Résultats du test des stris croisées des souches d'actinobactéries *in vitro* vis-à-vis les germes cibles.

Germes Cibles Souches Testées	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Enterococcus feacalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	19mm	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Résultats et discussion

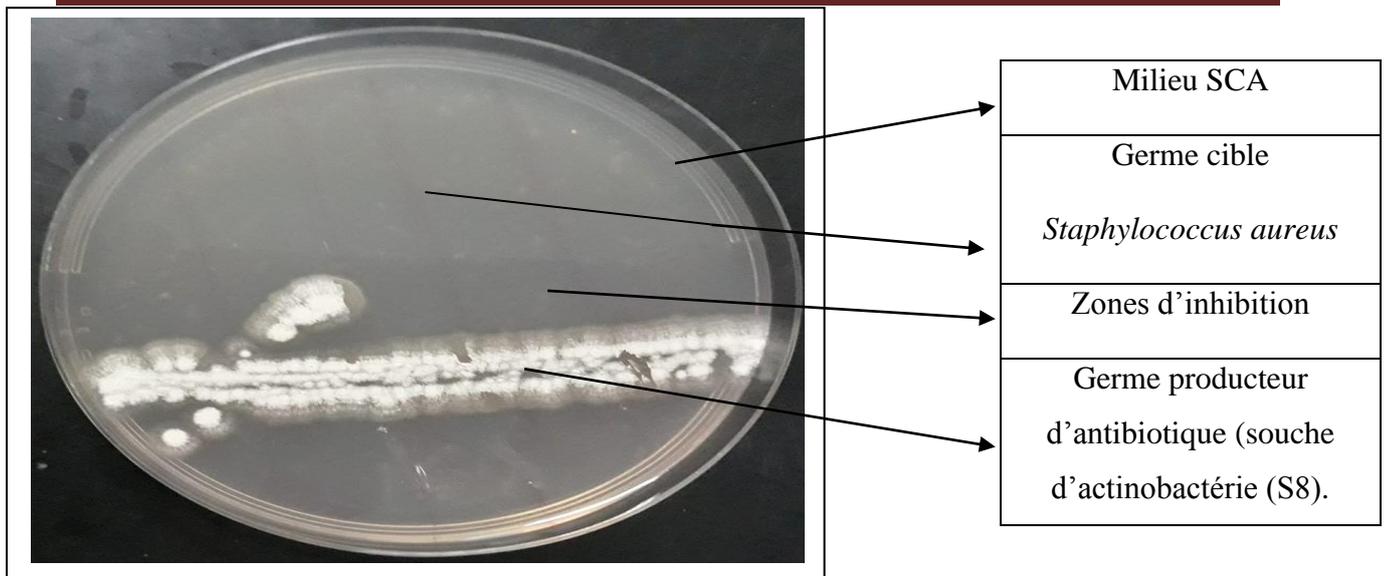


Figure 5 : Photographie de l'activité antibactérienne d'une souche d'actinobactérie (S8) testée vis-à-vis *Staphylococcus aureus* par test des stries croisées.

Nous constatons que la souche S8 d'actinobactérie testée présente une activité importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 19 mm . Seule la souche 1 présente une zone d'inhibition de 12mm à l'égard de *Salmonella Typhi* , la souche 3 présentait toujours une activité vis-à-vis de *Salmonella Typhi* mais avec un diamètre de 14mm. Concernant la souche 4 , elle présente une activité de 16mm vis-à-vis du *S.aureus* , cela démontre que la souche 8 est la plus performante vue l'activité intéressante qu'elle présente à l'égard de *S.aureus*. On remarque aussi qu'il ne y'a aucune souche d'actinobactéries parmi les 11 souches testées qui présente un effet antagoniste vis-à-vis de *Candida albicans*, concernant *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* et *Enterococcus faecalis*, y'a aucune souche qui présente un effet inhibiteur vis-à-vis de ces bactéries.

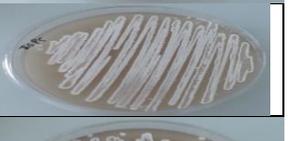
D'après ces résultats, on déduit que le test des cylindres d'agar est mieux adapté pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne par rapport au test des stries croisées.

Résultats et discussion

III.3 Caractérisation morphologique et culturelle de la souche d'actinomycète retenue

Après une incubation de 7 jours à 28°C (première semaine), les résultats obtenus sont présentés comme suivant :

Tableau VIII : Caractéristiques morphologiques et culturelles de la souche *Streptomyces* sp. sur différents milieux de culture après 7 jours d'incubation.

Souche retenue / Milieu de culture	Mycélium aérien	Mycélium végétatif	Croissance	Production de pigments diffusibles	Les Illustrations
ISP2	-	+	-	-	
ISP3	Blanc	+	++	-	
ISP4	Blanc	+	++	-	
ISP5	Blanc	+	++	-	
ISP7	Blanc	+	++	+	
Milieu de Bennett	-	+	+	-	
Milieu GYEA	Blanc	+	+++	-	
Milieu de Williams	Blanc	Jaune marron	+++	Rose	
Gélose Nutritive	-	+	---	-	

Note : +++ : Croissance abondante, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : croissance faible, --- : Croissance très faible.

Résultats et discussion

Tableau IX : Caractéristiques morphologiques et culturales de la souche *Streptomyces* sp. sur différents milieux de culture observés au 14^{ème} et au 21^{ème} jour.

La souche test milieux de culture	Mycélium aérien.	Mycélium du substrat	Croissance	Production de pigments diffusibles	Les Illustrations
ISP2	Beige	+	-	-	
ISP3	Beige	+	++	-	
ISP4	Blanc	+	++	-	
ISP5	Blanc	+	++	Orange foncée	
ISP7	Blanc	+	+	Mélanoïde de couleur marron	
Milieu de Bennett	-	+	+	-	
Milieu GYEA	Blanc	+	++++	-	
Milieu de Williams	Blanc	Jaune marron	+++	Rose	
Gélose Nutritive	-	-	--	-	

Note : +++ : Croissance abondante, + : Croissance bonne, - : Croissance moyenne, --- : Croissance nulle.

Résultats et discussion

une croissance abondante sur les milieux ISP5, ISP7, M2 et GYEA, bonne sur les milieux : Bennett, ISP4 mais elle est faible sur les milieux : ISP2, ISP3 par contre elle est nulle sur milieu GN . Cette souche développe un mycélium aérien blanc à la surface du milieu SCA avec un mycélium végétatif de couleur jaune marron qui s'incruste à l'intérieur de la gélose.

III.4 Caractérisation physiologique

III.4.1 Croissance à différentes valeurs de pH

Après l'incubation de la souche retenue à 28°C pendant 7 jours sur le milieu de Williams à des pH différents : « 4.5 », « 5 », « 6 », « 7 », « 8 », « 9.2 », « 10 » et « 11 ». Les résultats sont exprimés comme suit :

Tableau X : Croissance de la souche *Streptomyces* sp. à différents pH.

Les valeurs du pH	Croissance de la souche retenue
4.5	---
5	+ (pas de M.A)
6	---
7	++
8	---
9.2	+++
10	--
11	---

Note : Croissance abondante + + +, Bonne croissance + +, Croissance moyenne +, Croissance faible - -, Croissance nulle - - -, **MA** : Mycélium Aérien.

Concernant le pH. La souche se développe aux pH 7, 9.2 mais elle ne développe pas aux pH 4.5, 5, 6, 8, 10 et 11 d'après ces résultats on peut déduire que la souche d'actinobactérie sélectionnée est légèrement alcalophile mais beaucoup plus neutrophile

Résultats et discussion

III.4.2 Croissance à des températures différentes

Après une incubation de 7 jours à différentes températures : Les résultats sont présentés comme suit :

Tableau XI : Croissance de la souche *Streptomyces* sp. après 7,14 et 21 jours d'incubation à différentes températures.

Températures (C°)	Croissance de la souche retenue
04	---
22	+
28	++
30	+++
37	++
45	---

Note : +++ : Croissance abondante, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - - : Croissance faible, --- : Croissance nulle.

Concernant la température , la souche S8 semble croître facilement à des températures de 28°C, 30°C, 37°C mais elle se développe moyennement à 22 °C alors que à 4°C et à 45°C la souche ne présente aucune croissance donc il s'agit d'une bactérie mésophile.

III.4.3. Croissance à des concentrations en NaCl

Après une incubation à 28°C pendant 7 jours à différentes concentrations en NaCl : 0% , 1.5% , 3% , 5%, 7%, 10%, 13% et 15%. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant

Résultats et discussion

Tableau XII : Croissance de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée à différentes concentrations en NaCl après 7 jours d'incubation.

Concentrations en NaCl (%)	Croissance de la souche retenue
0	-
1.5	-
3	-
5	-
7	-
10	-
13	-
15	-

D'après les résultats obtenus le test est non concluant, ces derniers ne sont pas exploitables.

Tableau XIII : Croissance de la souche *Streptomyces* sp à différentes concentrations en NaCl après 21 jours d'incubation.

Concentrations en NaCl (%)	Croissance de la souche retenue
0	-
1.5	-
3	-
5	-
7	-
10	+
13	+
15	+++

Note : + : Croissance modérée, +++ : Croissance bonne, - : Absence de croissance.

D'après les résultats obtenus, la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. développe moyennement à 10% et 13% d'NaCl, mais la croissance est bonne à 15% d'NaCl, on déduit qu'il s'agit d'une bactérie halophile.

III.5. Caractérisation micromorphologique

La figure 6 présente les photographies d'observation de la souche retenue sur les milieu GYEA sous microscope optique grossissement (x 40) après 21 jours d'incubation à 28°C. Les filaments aériens sont droits, fragmentés dotés des ramifications portants des chaînes d'exospores non mobiles. Cette micromorphologie est typique au genre *Streptomyces* appartenant à la famille des *Streptomycetaceae* (Pridham et al., 1958).



Figure 6 : Observation sous microscope optique au grossissement (X 40) des hyphes aériens de la souche *Streptomyces* sp. après 14 jours d'incubation à 28°C sur milieu GYEA.

III.6 Caractérisation biochimique

III.6.1. Utilisation des différentes sources d'azote (acides aminés) par la souche *Streptomyces* sp

Tableau XIV : Dégradation des acides aminés par la souche *Streptomyces* sp. après 21 jours d'incubation.

Hydrolyse des acides aminés	Croissance de la souche retenue	Hydrolyse des acides aminés	Croissance de la souche retenue
Témoin négatif	-	L-Histidine	-
L-Valine	-	DL- Alanine	-
L-Asparagine	-	DL- Valine	-
L-Lysine	-	phénylalanine	+
L- Leucine	-	Arginine	+
L-Tryptophane	-	Glycine	-
L- Glutamine	-		

Résultats et discussion

Après 21 jours d'incubation de la souche retenue à 28°C, le tableau XIV montre que la souche sélectionnée n'est pas capable d'utiliser la plupart des acides aminés testés à l'exception de deux acides aminés : L-Arginine et Phénylalanine.

Après 21 jours d'incubation à 28°C, les caractéristiques biochimiques de la souche 8 sont résumées dans le tableau et les figures suivantes :

Tableau XV : Caractéristiques biochimiques de la souche *Streptomyces* sp.

Les caractères	Croissance de la souche retenue
Hydrolyse de : Gélatine	+
Amidon	+
Acétate de sodium	-
Citrate de sodium	+
Tween 80	+
Coagulation du lait	+

D'après les caractères biochimiques précédents, la souche 8 sécrète au moins une lipase, une gélatinase et une amylase. Elle se caractérise également par une capacité à produire des protéases .

Les figures suivantes illustrent les caractéristiques biochimiques de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée.

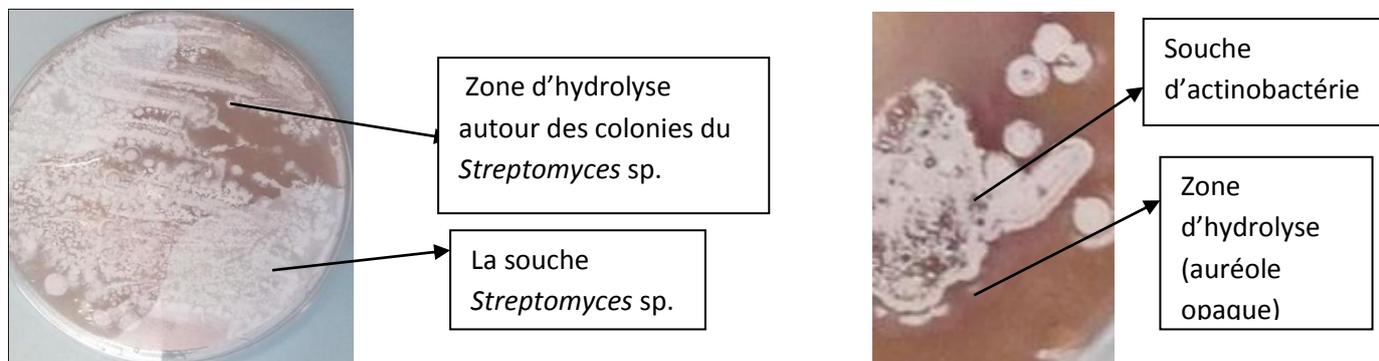


Figure 7:Dégradation des caséines du lait par *Streptomyces* sp. **Figure 8** : Dégradation du Tween 80 par *Streptomyces* sp.

Résultats et discussion

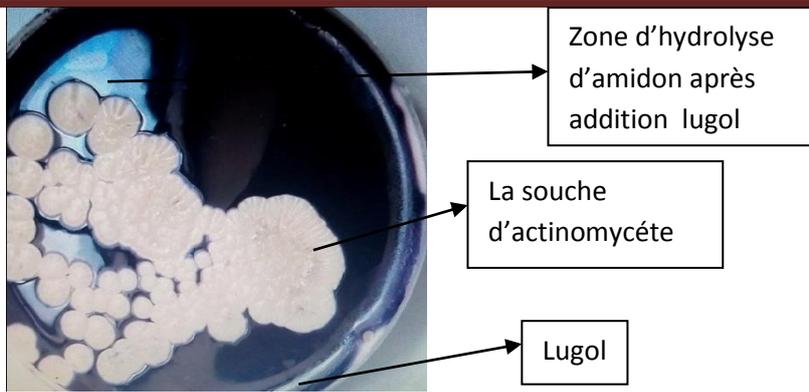


Figure 9 : Dégradation d'amidon par la souche *Streptomyces* sp .

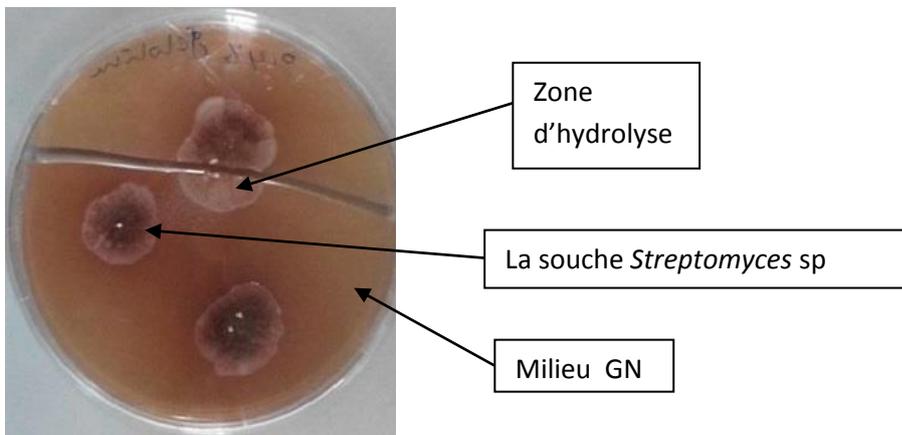


Figure 10 : Décomposition de gélatine par la souche *Streptomyces* sp.

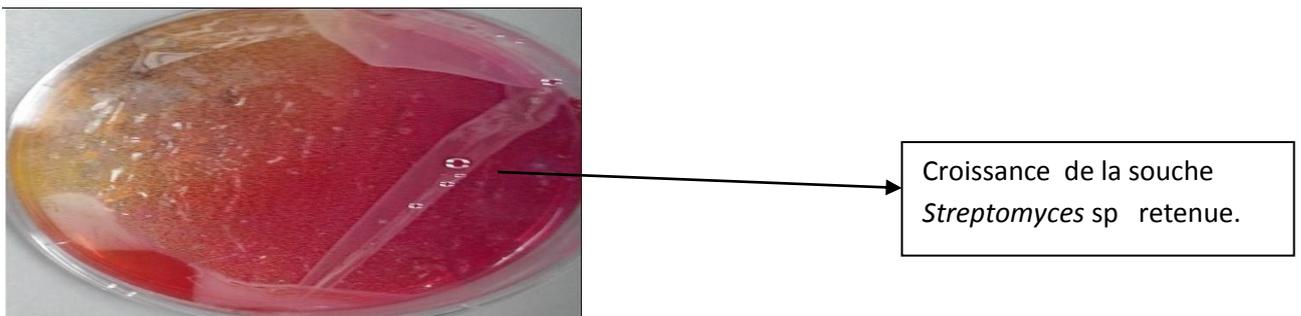


Figure 11 : Dégradation de citrate de sodium par la souche *Streptomyces* sp.

Résultats et discussion

III.6.2. Utilisation des différentes sources de carbone (sucres) par la souche retenue

Après incubation à 28°C pendant 21 jours, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XVI

Tableau XVI : Dégradation des sucres par la souche *Streptomyces* sp. après 21 jours d'incubation.

Les sources de carbone	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp retenue.
D-Mannose	-
D-Fructose	-
D-Saccharose	+
D-Sorbitol	-
Tréhalose	-
D-Cellobiose	-
D-Glucose	+
D-Xylose	+
Arabinose	+
Lactose	-
Témoin négatif	-

D'après le tableau précédent, la souche *Streptomyces* sp. sélectionné semble dégrader préférentiellement l'amidon en plus du Glucose, Xylose , Arabinose et Saccharose.

Résultats et discussion

III.7 Mise en évidence de la production d'antibiotique sur milieu liquide

- Méthode des puits

Sur la base des deux tests d'antagonisme précédents, obtenus sur milieu solide (cylindre d'Agar et stries croisés), nous avons retenu une souche d'actinomycète qui a montré une bonne croissance (croissance rapide par rapport aux autres souches testées) et une activité importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Dans le but de déterminer la capacité de cette dernière à sécréter des antibiotiques sur milieu liquide, une pré-culture et une culture de la souche sélectionnée ont été réalisées sur bouillon de Williams.

Au bout de 21 jours d'incubation la culture a été arrêtée, puis, après une centrifugation à 8000rpm pendant 20min, le surnageant brut non concentré de la souche *Streptomyces* sp obtenue a été testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

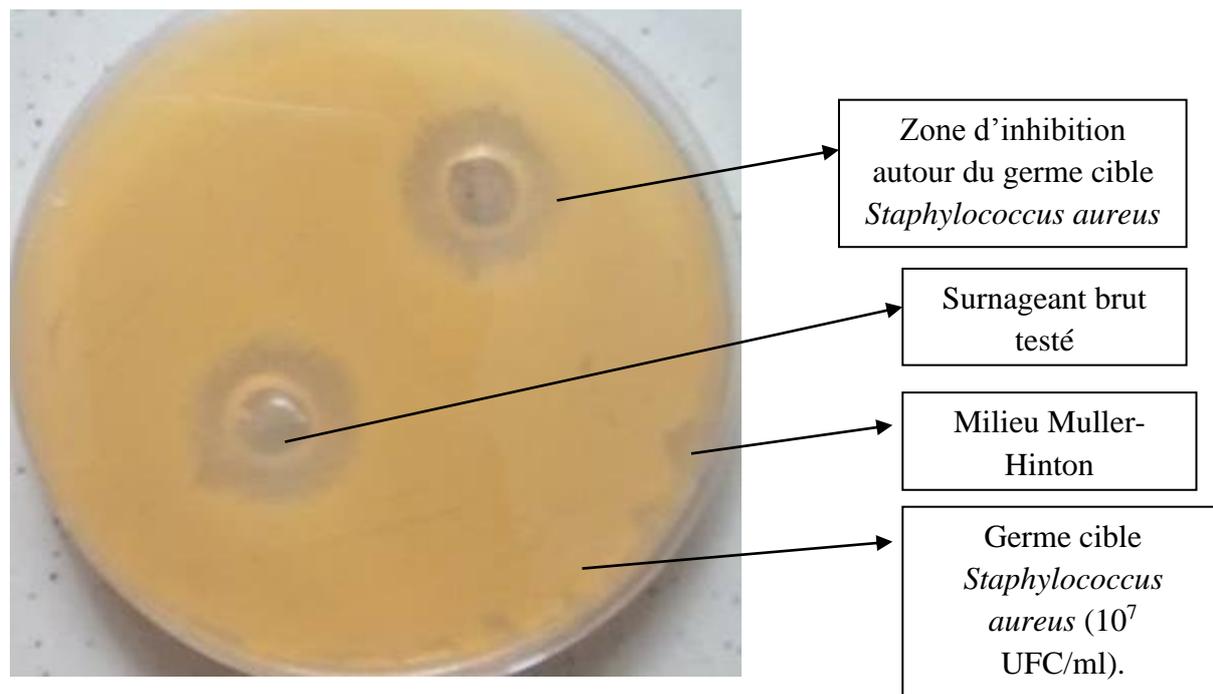


Figure N° 12 : Test d'antagonisme du surnageant brut testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Concernant le choix de meilleur solvant organique sa n'a pas été fait à cause de la contrainte de Rotavapor.

Résultats et discussion

III.8 Sensibilité aux antibiotiques

Le tableau XVII présente les antibiotiques vis-à-vis lesquelles la souche *Streptomyces* sp. est sensible et d'autres vis-à-vis lesquels est résistante.

Tableau XVII : Résistance ou sensibilité de la souche d'actinobactérie (S8) aux différents antibiotiques après 7 jours d'incubation.

Antibiotiques	Résistance ou Sensibilité de la souche d'actinobactérie	Zone d'inhibition (en mm).
Amoxicilline+ Acide clavulanique (AMC)	R	0
Oxacilline (OX)	R	0
Cefotaxime (CTX)	S	28
Ceftazidime (CAZ)	S	16
Ciprofloxacine (CIP)	R	0
Cefoxitime (FOX)	R	0
Acide nalidixique	R	0

La figure qui suit illustre les résultats du test de sensibilité ou résistance aux antibiotiques.

Résistant (R) ≤ 12 ; Sensible (S) ≥ 18

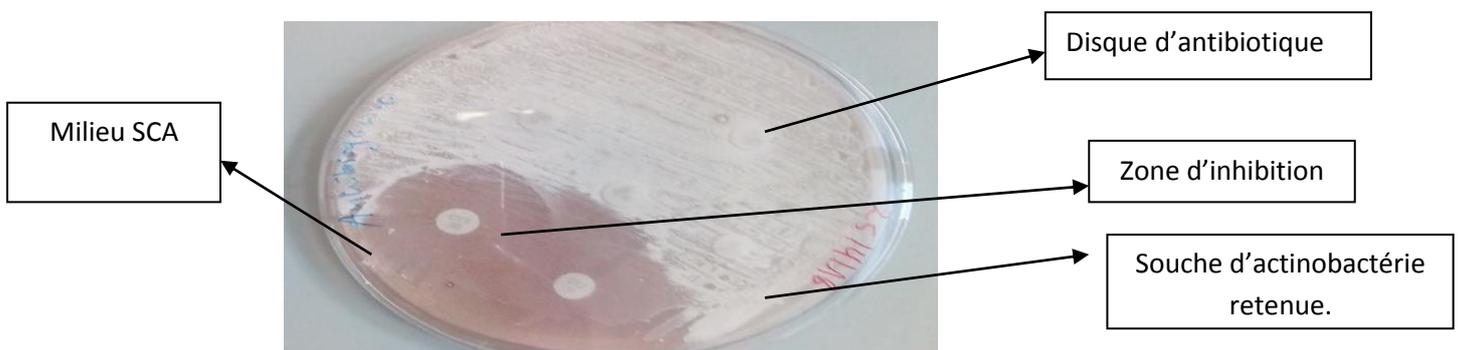


Figure N°13 : Photographie de sensibilité ou résistance aux antibiotiques de la souche *Streptomyces* sp.

Résultats et discussion

D'après ces résultats, la souche retenue est résistante à la majorité des antibiotiques testés toutefois, elle est sensible vis-à-vis deux antibiotiques uniquement et qui appartiennent à la classe des Céphalosporines, à savoir : le Cefotaxime et le Ceftazidime .

Lorsqu'une souche d'actinobactérie est résistante vis-à-vis d'un antibiotique, il est probable qu'elle est capable de le synthétiser.

III.9 Sensibilité au Cristal violet, production de catalase et de Nitrate réductase

Après une incubation de 7 jours à 28°C, les propriétés physiologiques de la souche *Streptomyces* sp sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XVIII : Caractéristiques physiologiques de la souche *Streptomyces* sp.

Propriétés	La souche <i>Streptomyces</i> sp.	Illustrations
Cristal violet (0.002%)	sensible	
Production de la catalase	+	
Nitrate réductase (après ajout de quelques mg de poudre de zinc).	-	

La souche *Streptomyces* sp retenue est sensible au Cristal violet à raison de 0.002%, catalase positive, Nitrate réductase négatif.

III.10 Description générale de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée.

Tableau XVIII : Ensemble des caractéristiques de la souche *Streptomyces* sp

Caractères et Propriétés	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp sélectionnée
Macromorphologique	Tapis d'hyphes de couleur blanchâtre à la surface de milieu SCA. avec des un ensemble d'hyphes végétatifs de couleur jaune vers le marron qui s'incruste dans la gélose.
Micromorphologique	Un ensemble de filaments fragmentés, droits avec des ramifications portant des chaines d'exospores.
Culturelles et production de pigments diffusibles	Abondante sur les milieux GYEA, ISP7 avec des pigments Mélanoïde de couleur marron, ISP5 et milieu SCA. <ul style="list-style-type: none"> • Bonne sur les milieux Bennett et ISP4. • Faible sur les milieux ISP3 et ISP2. • Nulle sur le milieu GN.
Hydrolyse des sucres (sources de carbone)	Les polysaccharides et plus précisément l'amidon en plus de D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose. D-Saccharose.
Hydrolyse des acides aminés (sources d'azote)	L-Arginine et Phénylalanine.
Hydrolyse d'amidon soluble	Abondante sur milieu SCA.
Hydrolyse de la gélatine.	+
Hydrolyse du Tween 80	+
Décomposition des caséines du lait	+
Dégradation de Citrate de sodium	+
Production de la catalase	+
Nitrate réductase	-
Sensibilité au Cristal violet (0.002%)	-
Dégradation d'Acétate de sodium	-
Sensibilité aux antibiotiques	Sensible au Ceftazidime et au Cefotaxime.

III.1. Revivification des souches d'actinobactéries sur milieu SCA

Après incubation à 28° pendant 7 jours, un tapis d'hyphes denses de couleur blanchâtre est obtenu à la surface du milieu SCA qui correspond au mycélium aérien portant une chaîne de spores blanches (sporophore), avec des hyphes végétatifs de couleur jaune marron qui s'incrudent dans la gélose. Cela indique l'obtention d'une croissance importante et intéressante.

III.2. Tests d'antagonisme sur milieu solide

III.2.1 Test des cylindres d'agar

Les zones d'inhibition mesurées autour des colonies caractéristiques des germes cibles après l'incubation à 37C° pendant 24h sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VI : Résultats du test de cylindres d'agar des souches d'actinobactéries *in vitro* vis-à-vis des germes ciblés par mesure des diamètres des zones d'inhibition (en mm) autour des colonies.

Germes Cibles Souches Testées	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
S 1	0	0	<u>12</u>	0	0	0	0	0	0
S 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 3	0	0	<u>13</u>	0	0	0	0	0	0
S 4	0	<u>16</u>	0	0	0	0	0	0	0
S 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 8	0	<u>19</u>	0	0	0	0	0	0	0
S 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 11	0	<u>14</u>	0	0	0	0	0	0	0



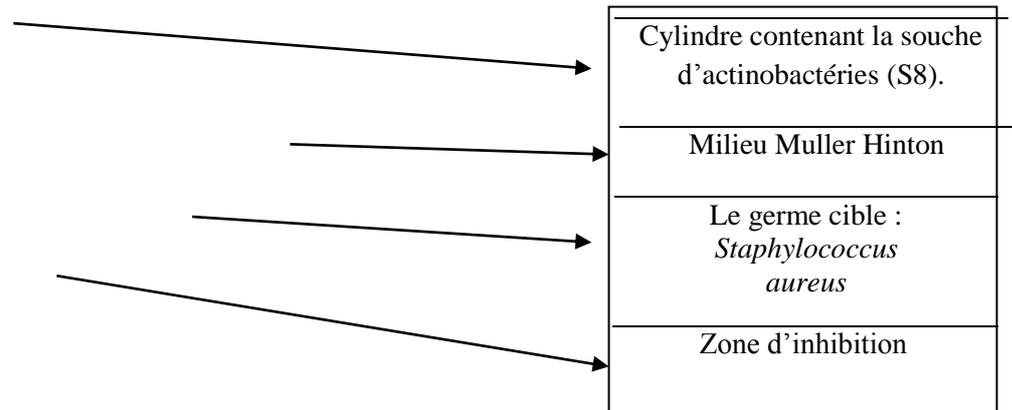


Figure 4 : Photographie de l'activité antibactérienne de la souche d'actinobactérie(S8) testée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par le test des cylindres d'agar.

III.2.2. Test des stris croisées

Les zones d'inhibition déterminées autour des colonies caractéristiques des germes cibles après l'incubation à 37C° pendant 24h sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VII : Résultats du test des stris croisées des souches d'actinobactéries *in vitro* vis-à-vis les germes cibles.

Germes Cibles Souches Testées	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	19mm	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Milieu SCA

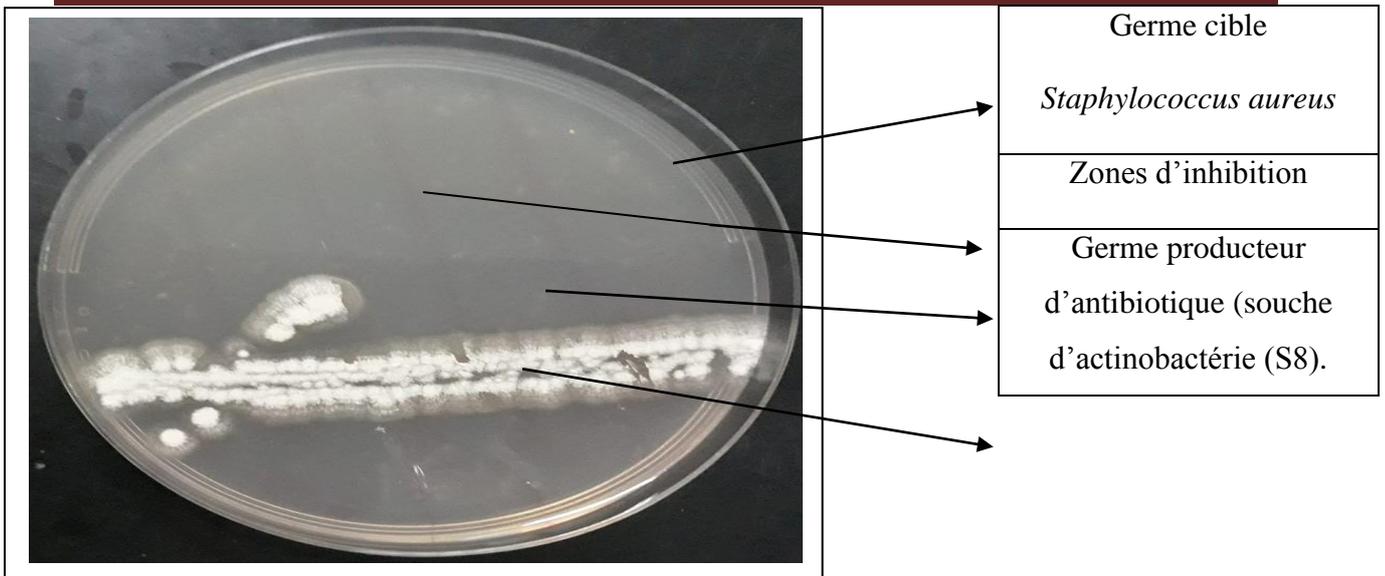


Figure 5 : Photographie de l'activité antibactérienne d'une souche d'actinobactérie (S8) testée vis-à-vis *Staphylococcus aureus* par test des stries croisées.

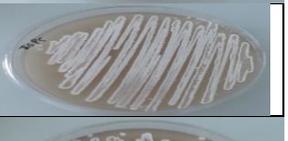
Nous constatons que la souche n° 8 d'actinomycète testée présente une activité importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 19 mm . Seule la souche 1 présente une zone d'inhibition de 12mm à l'égard de *Salmonella Typhi* , la souche 3 présentait toujours une activité vis-à-vis de *Salmonella Typhi* mais avec un diamètre de 14mm. Concernant la souche 4 , elle présente une activité de 16mm vis-à-vis du *S.aureus* , cela démontre que la souche 8 est la plus performante vue l'activité intéressante qu'elle présente à l'égard de *S.aureus*. On remarque aussi qu'il ne y'a aucune souche d'actinobactéries parmi les 11 souches testées qui présente un effet antagoniste vis-à-vis de *Candida albicans*, concernant *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca* et *Enterococcus faecalis*, y'a aucune souche qui présente un effet inhibiteur vis-à-vis de ces bactéries .

D'après ces résultats, on déduit que le test des cylindres d'agar est mieux adapté pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne par rapport au test des stries croisées.

III.3 Caractérisation morphologique et culturelle de la souche d'actinomycète retenue

Après une incubation de 7 jours à 28°C (première semaine), les résultats obtenus sont présentés comme suivant :

Tableau VIII : Caractéristiques morphologiques et culturelles de la souche *Streptomyces* sp. sur différents milieux de culture après 7 jours d'incubation.

Souche retenue / Milieu de culture	Mycélium aérien	Mycélium végétatif	Croissance	Production de pigments diffusibles	Les Illustrations
ISP2	-	+	-	-	
ISP3	Blanc	+	++	-	
ISP4	Blanc	+	++	-	
ISP5	Blanc	+	++	-	
ISP7	Blanc	+	++	+	
Milieu de Bennett	-	+	+	-	
Milieu GYEA	Blanc	+	+++	-	
Milieu de Williams	Blanc	Jaune marron	+++	Rose	
Gélose Nutritive	-	+	---	-	

Note : +++ : Croissance abondante, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - : croissance faible, --- : Croissance très faible.

Tableau IX : Caractéristiques morphologiques et culturales de la souche *Streptomyces* sp. sur différents milieux de culture observés au 14^{ème} et au 21^{ème} jour.

La souche test milieux de culture	Mycélium aérien.	Mycélium du substrat	Croissance	Production de pigments diffusibles	Les Illustrations
ISP2	Beige	+	-	-	
ISP3	Beige	+	++	-	
ISP4	Blanc	+	++	-	
ISP5	Blanc	+	++	Orange foncée	
ISP7	Blanc	+	+	Mélanoïde de couleur marron	
Milieu de Bennett	-	+	+	-	
Milieu GYEA	Blanc	+	++++	-	
Milieu de Williams	Blanc	Jaune marron	+++	Rose	
Gélose Nutritive	-	-	--	-	

Note : +++ : Croissance abondante, + : Croissance bonne, - : Croissance moyenne, --- : Croissance nulle.

une croissance abondante sur les milieux ISP5, ISP7, M2 et GYEA, bonne sur les milieux : Bennett, ISP4 mais elle est faible sur les milieux : ISP2, ISP3 par contre elle est nulle sur milieu GN . Cette souche développe un mycélium aérien blanc à la surface du milieu SCA avec un mycélium végétatif de couleur jaune marron qui s'incruste à l'intérieur de la gélose.

III.4 Caractérisation physiologique

III.4.1 Croissance à différentes valeurs de pH

Après l'incubation de la souche retenue à 28°C pendant 7 jours sur le milieu de Williams à des pH différents : « 4.5 », « 5 », « 6 », « 7 », « 8 », « 9.2 », « 10 » et « 11 ». Les résultats sont exprimés comme suit :

Tableau X : Croissance de la souche *Streptomyces* sp. à différents pH.

Les valeurs du pH	Croissance de la souche retenue
4.5	---
5	+ (pas de M.A)
6	---
7	++
8	---
9.2	+++
10	--
11	---

Note : Croissance abondante + + +, Bonne croissance + +, Croissance moyenne +, Croissance faible - -, Croissance nulle - - -, **MA** : Mycélium Aérien.

Concernant le pH. La souche se développe aux pH 7, 9.2 mais elle ne développe pas aux pH 4.5, 5, 6, 8, 10 et 11 d'après ces résultats on peut déduire que la souche d'actinobactérie sélectionnée est légèrement alcalophile mais beaucoup plus neutrophile

III.4.2 Croissance à des températures différentes

Après une incubation de 7 jours à différentes températures : Les résultats sont présentés comme suit :

Tableau XI : Croissance de la souche *Streptomyces* sp. après 7,14 et 21 jours d'incubation à différentes températures.

Températures (C°)	Croissance de la souche retenue
04	---
22	+
28	++
30	+++
37	++
45	---

Note : +++ : Croissance abondante, ++ : Bonne croissance, + : Croissance moyenne, - - : Croissance faible, --- : Croissance nulle.

Concernant la température , la souche S8 semble croître facilement à des températures de 28°C, 30°C, 37°C mais elle se développe moyennement à 22 °C alors que à 4°C et à 45°C la souche ne présente aucune croissance donc il s'agit d'une bactérie mésophile.

III.4.3. Croissance à des concentrations en NaCl

Après une incubation à 28°C pendant 7 jours à différentes concentrations en NaCl : 0% , 1.5% , 3% , 5%, 7%, 10%, 13% et 15%. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant

Tableau XII : Croissance de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée à différentes concentrations en NaCl après 7 jours d'incubation.

Concentrations en NaCl (%)	Croissance de la souche retenue
0	-
1.5	-
3	-
5	-
7	-
10	-
13	-
15	-

D'après les résultats obtenus le test est non concluant, ces derniers ne sont pas exploitables.

Tableau XIII : Croissance de la souche *Streptomyces* sp à différentes concentrations en NaCl après 21 jours d'incubation.

Concentrations en NaCl (%)	Croissance de la souche retenue
0	-
1.5	-
3	-
5	-
7	-
10	+
13	+
15	+++

Note : + : Croissance modérée, +++ : Croissance bonne, - : Absence de croissance.

D'après les résultats obtenus, la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. développe moyennement à 10% et 13% d'NaCl, mais la croissance est bonne à 15% d'NaCl, on déduit qu'il s'agit d'une bactérie halophile.

III.5. Caractérisation micromorphologique

La figure 6 présente les photographies d'observation de la souche retenue sur les milieu GYEA sous microscope optique grossissement (x 40) après 21 jours d'incubation à 28°C. Les filaments aériens sont droits, fragmentés dotés des ramifications portants des chaînes d'exospores non mobiles. Cette micromorphologie est typique au genre *Streptomyces* appartenant à la famille des *Streptomycetaceae* (Pridham et al., 1958).



Figure 6 : Observation sous microscope optique au grossissement (X 40) des hyphes aériens de la souche *Streptomyces* sp. après 14 jours d'incubation à 28°C sur milieu GYEA.

III.6 Caractérisation biochimique

III.6.1. Utilisation des différentes sources d'azote (acides aminés) par la souche *Streptomyces* sp

Tableau XIV : Dégradation des acides aminés par la souche *Streptomyces* sp. après 21 jours d'incubation.

Hydrolyse des acides aminés	Croissance de la souche retenue	Hydrolyse des acides aminés	Croissance de la souche retenue
Témoin négatif	-	L-Histidine	-
L-Valine	-	DL- Alanine	-
L-Asparagine	-	DL- Valine	-
L-Lysine	-	phénylalanine	+
L- Leucine	-	Arginine	+
L-Tryptophane	-	Glycine	-
L- Glutamine	-		

Résultats et discussion

Après 21 jours d'incubation de la souche retenue à 28°C, le tableau XIV montre que la souche sélectionnée n'est pas capable d'utiliser la plupart des acides aminés testés à l'exception de deux acides aminés : L-Arginine et Phénylalanine.

Après 21 jours d'incubation à 28°C, les caractéristiques biochimiques de la souche 8 sont résumées dans le tableau et les figures suivantes :

Tableau XV : Caractéristiques biochimiques de la souche *Streptomyces* sp.

Les caractères	Croissance de la souche retenue
Hydrolyse de : Gélatine	+
Amidon	+
Acétate de sodium	-
Citrate de sodium	+
Tween 80	+
Coagulation du lait	+

D'après les caractères biochimiques précédents, la souche 8 sécrète au moins une lipase, une gélatinase et une amylase. Elle se caractérise également par une capacité à produire des protéases .

Les figures suivantes illustrent les caractéristiques biochimiques de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée.

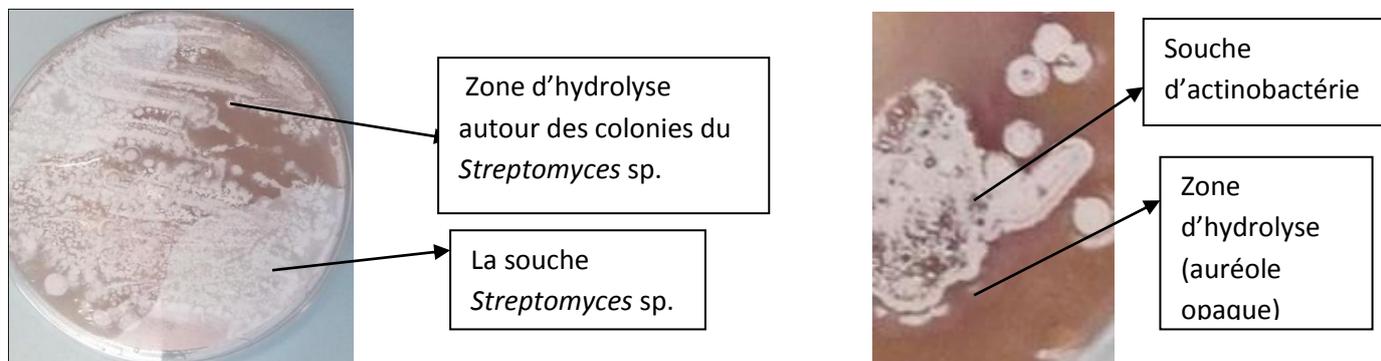


Figure 7:Dégradation des caséines du lait par *Streptomyces* sp. **Figure 8** : Dégradation du Tween 80 par *Streptomyces* sp.

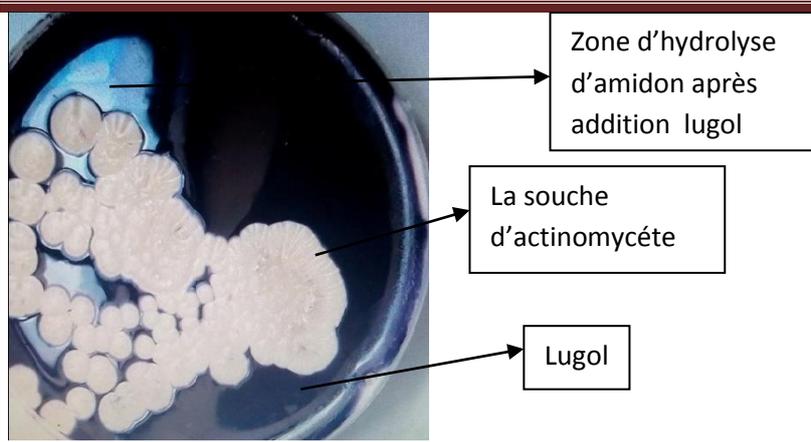


Figure 9 : Dégradation d'amidon par la souche *Streptomyces* sp .

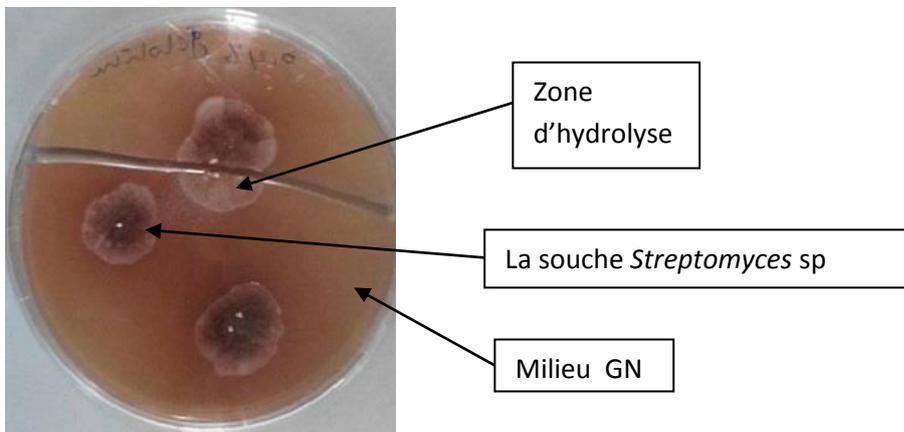


Figure 10 : Décomposition de gélatine par la souche *Streptomyces* sp.

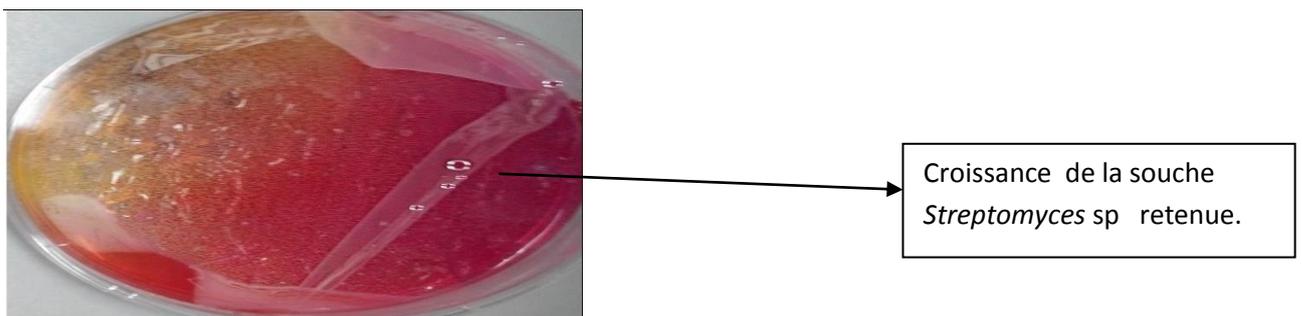


Figure 11 : Dégradation de citrate de sodium par la souche *Streptomyces* sp.

III.6.2. Utilisation des différentes sources de carbone (sucres) par la souche retenue

Après incubation à 28°C pendant 21 jours, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XVI

Tableau XVI : Dégradation des sucres par la souche *Streptomyces* sp. après 21 jours d'incubation.

Les sources de carbone	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp retenue.
D-Mannose	-
D-Fructose	-
D-Saccharose	+
D-Sorbitol	-
Tréhalose	-
D-Cellobiose	-
D-Glucose	+
D-Xylose	+
Arabinose	+
Lactose	-
Témoin négatif	-

D'après le tableau précédent, la souche *Streptomyces* sp. sélectionné semble dégrader préférentiellement l'amidon en plus du Glucose, Xylose , Arabinose et Saccharose.

III.7 Mise en évidence de la production d'antibiotique sur milieu liquide

- Méthode des puits

Sur la base des deux tests d'antagonisme précédents, obtenus sur milieu solide (cylindre d'Agar et stries croisés), nous avons retenu une souche d'actinomycète qui a montré une bonne croissance (croissance rapide par rapport aux autres souches testées) et une activité importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Dans le but de déterminer la capacité de cette dernière à sécréter des antibiotiques sur milieu liquide, une pré-culture et une culture de la souche sélectionnée ont été réalisées sur bouillon de Williams.

Au bout de 21 jours d'incubation la culture a été arrêtée, puis, après une centrifugation à 8000rpm pendant 20min, le surnageant brut non concentré de la souche *Streptomyces* sp obtenue a été testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

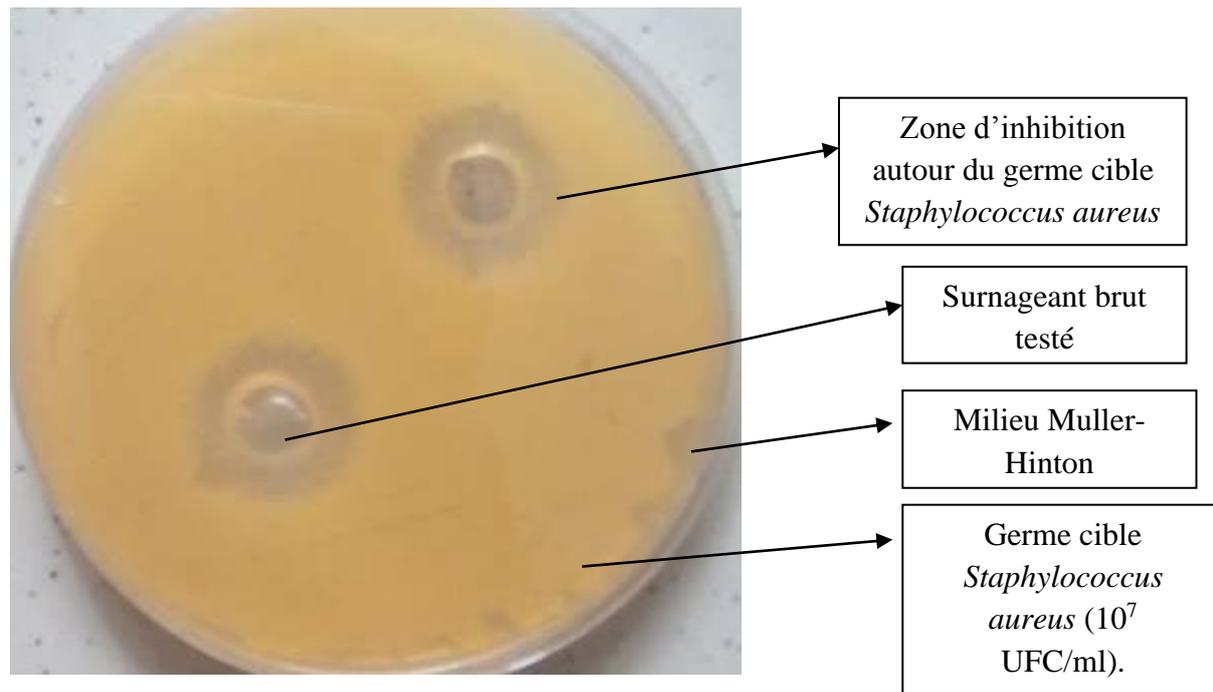


Figure N° 12 : Test d'antagonisme du surnageant brut testé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Concernant le choix de meilleur solvant organique sa n'a pas été fait à cause de la contrainte de Rotavapor.

III.8 Sensibilité aux antibiotiques

Le tableau XVII présente les antibiotiques vis-à-vis lesquelles la souche *Streptomyces* sp. est sensible et d'autres vis-à-vis lesquels est résistante.

Tableau XVII : Résistance ou sensibilité de la souche d'actinobactérie (S8) aux différents antibiotiques après 7 jours d'incubation.

Antibiotiques	Résistance ou Sensibilité de la souche d'actinobactérie	Zone d'inhibition (en mm).
Amoxicilline+ Acide clavulanique (AMC)	R	0
Oxacilline (OX)	R	0
Cefotaxime (CTX)	S	28
Ceftazidime (CAZ)	S	16
Ciprofloxacine (CIP)	R	0
Cefoxitime (FOX)	R	0
Acide nalidixique	R	0

La figure qui suit illustre les résultats du test de sensibilité ou résistance aux antibiotiques.

Résistant (R) ≤ 12 ; Sensible (S) ≥ 18

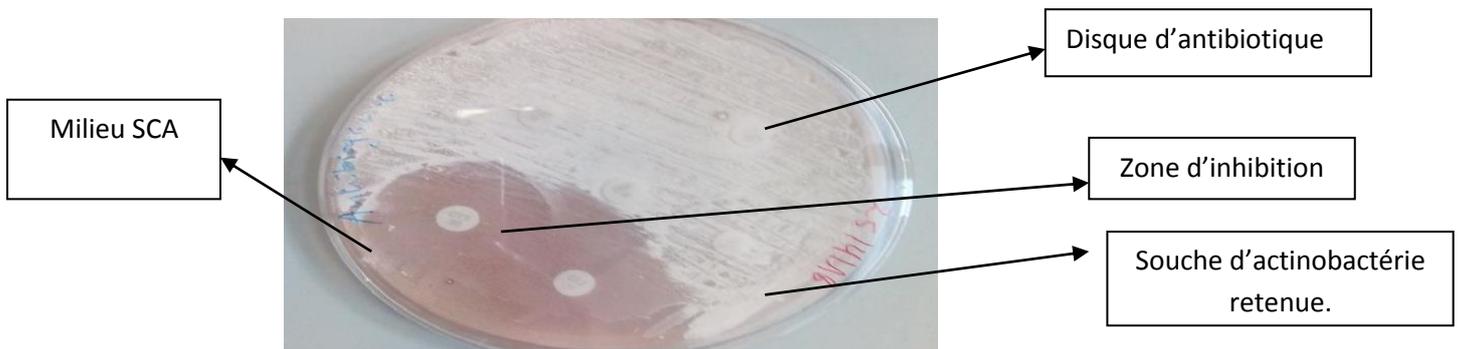


Figure N°13 : Photographie de sensibilité ou résistance aux antibiotiques de la souche *Streptomyces* sp.

Résultats et discussion

D'après ces résultats, la souche retenue est résistante à la majorité des antibiotiques testés toutefois, elle est sensible vis-à-vis deux antibiotiques uniquement et qui appartiennent à la classe des Céphalosporines, à savoir : le Cefotaxime et le Ceftazidime .

Lorsqu'une souche d'actinobactérie est résistante vis-à-vis d'un antibiotique, il est probable qu'elle est capable de le synthétiser.

III.9 Sensibilité au Cristal violet, production de catalase et de Nitrate réductase

Après une incubation de 7 jours à 28°C, les propriétés physiologiques de la souche *Streptomyces* sp sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XVIII : Caractéristiques physiologiques de la souche *Streptomyces* sp.

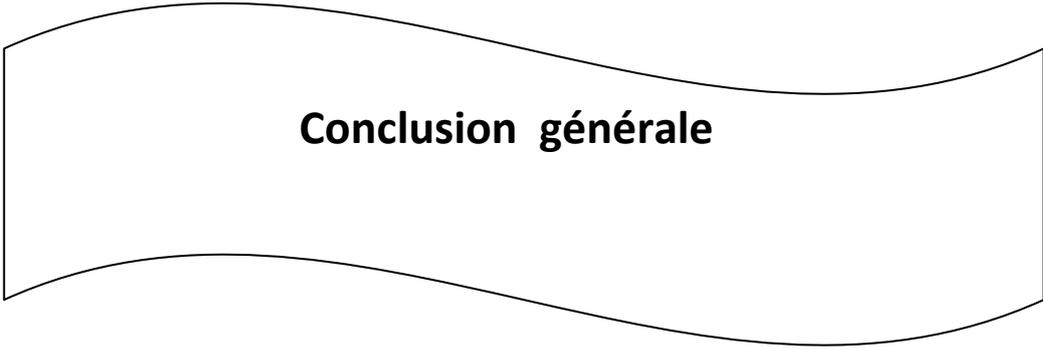
Propriétés	La souche <i>Streptomyces</i> sp.	Illustrations
Cristal violet (0.002%)	sensible	
Production de la catalase	+	
Nitrate réductase (après ajout de quelques mg de poudre de zinc).	-	

La souche *Streptomyces* sp retenue est sensible au Cristal violet à raison de 0.002%, catalase positive, Nitrate réductase négatif.

III.10 Description générale de la souche *Streptomyces* sp sélectionnée.

Tableau XVIII : Ensemble des caractéristiques de la souche *Streptomyces* sp

Caractères et Propriétés	Croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp sélectionnée
Macromorphologique	Tapis d'hyphes de couleur blanchâtre à la surface de milieu SCA. avec des un ensemble d'hyphes végétatifs de couleur jaune vers le marron qui s'incruste dans la gélose.
Micromorphologique	Un ensemble de filaments fragmentés, droits avec des ramifications portant des chaines d'exospores.
Culturelles et production de pigments diffusibles	Abondante sur les milieux GYEA, ISP7 avec des pigments Mélanoïde de couleur marron, ISP5 et milieu SCA. <ul style="list-style-type: none"> • Bonne sur les milieux Bennett et ISP4. • Faible sur les milieux ISP3 et ISP2. • Nulle sur le milieu GN.
Hydrolyse des sucres (sources de carbone)	Les polysaccharides et plus précisément l'amidon en plus de D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose. D-Saccharose.
Hydrolyse des acides aminés (sources d'azote)	L-Arginine et Phénylalanine.
Hydrolyse d'amidon soluble	Abondante sur milieu SCA.
Hydrolyse de la gélatine.	+
Hydrolyse du Tween 80	+
Décomposition des caséines du lait	+
Dégradation de Citrate de sodium	+
Production de la catalase	+
Nitrate réductase	-
Sensibilité au Cristal violet (0.002%)	-
Dégradation d'Acétate de sodium	-
Sensibilité aux antibiotiques	Sensible au Ceftazidime et au Cefotaxime.



Conclusion générale

Ce modeste travail a permis la mise en évidence des activités antimicrobiennes de 11 souches d'actinobactéries isolées à partir d'un écosystème marin et appartenant à la collection du LMA, à partir desquelles la souche la plus active (S8) a été sélectionnée.

La caractérisation phénotypique (macromorphologique, micromorphologique et culturale) ainsi que l'ensemble des critères physiologiques et biochimiques ont permis d'affilier la souche sélectionnée au genre *Streptomyces*.

L'étude des activités antibactériennes et antifongiques par les deux techniques classiques : méthodes des cylindres d'agar et des stries croisées ont montré que la souche S8 se distingue des autres par son activité importante à l'égard de *Staphylococcus aureus* (**19mm**). Mais, aucune activité antifongique n'a été obtenue vis-à-vis de la levure *Candida albicans* testée.

La souche de *Streptomyces* sp. la plus performante sélectionnée a fait l'objet d'un deuxième test sur milieu liquide dans le but de déterminer sa capacité à produire des antibiotiques. Il s'est avéré que cette souche a gardé son activité biologique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et ce en effectuant le test de diffusion dans des puits.

Les substances bioactives brutes de la souche retenue ont été extraites par cinq solvants organiques à polarité différentes, à savoir : n-butanol, acétate d'éthyle, chloroforme, dichlorométhane et l'hexane.

Vu le besoin indispensable de nouvelles substances bioactive liées à la forte incidence des infections bactériennes, la recherche expérimentale dans ce domaine paraît prometteuse

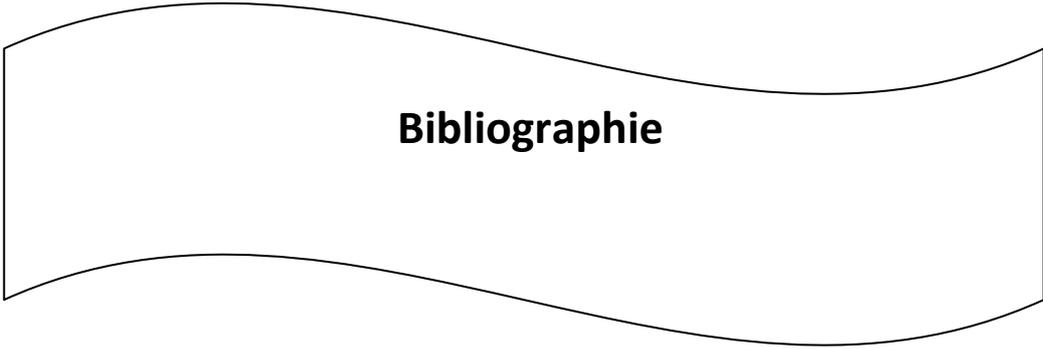
Les résultats obtenus bien qu'il soit préliminaire, sont très encourageants et intéressants et méritent d'être approfondis et exploités dans le proche avenir.

Par conséquent, les perspectives de cette étude sont multiples :

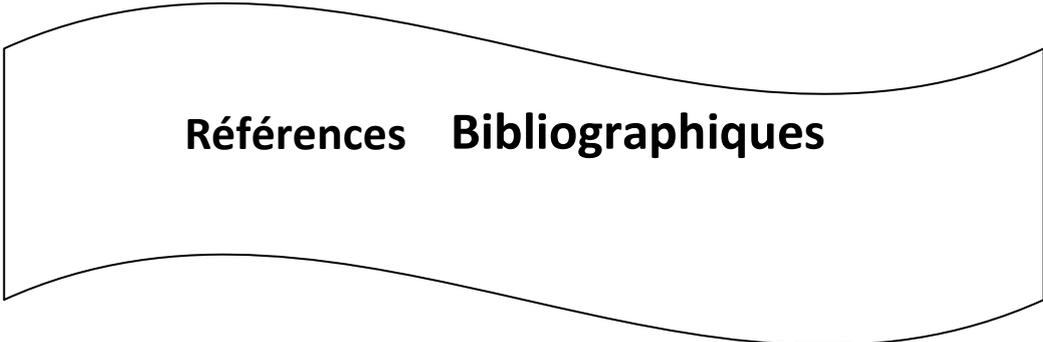
- Purification entière de ou des molécules produites en utilisant des techniques chromatographiques plus performantes tels que l'HPLC et détermination de leurs structures par l'usage de plusieurs méthodes tels que la spectroscopie UV-VIS, Spectroscopie IR, la RMN et la spectrométrie de masse afin de déterminer leurs structures chimiques ;
- Elargir le nombre de germes cibles (bactéries et mycètes) ;

Conclusion générale

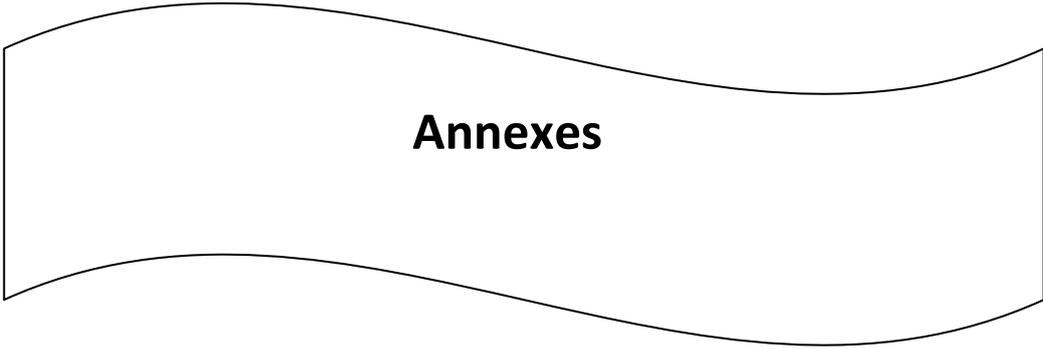
- Mise en évidence d'autres activités enzymatiques ;
- Etude moléculaire (séquençage de l'ARN_{16S} , hybridation ADN/ ADN) pour identifier la souche *Streptomyces* sp au niveau de l'espèce ;
- Optimisation de la production des antibiotiques en milieu liquide, recherche des meilleures sources de carbones et de nitrogène et d'éléments minéraux, aération, pH et agitation.



Bibliographie



Références Bibliographiques



Annexes

Annexe A : Matériel analytique

1. Ampoule à décanter.
2. Ance de platine.
3. Autoclave « Advantage-Lab Model-AL02-12 ».
4. Bain de sable chaud « PHYWE ».
5. Bain maré « GFL MEMMERT ».
6. Balance analytique « ADAM ».
7. Bec Bunsen.
8. Becher.
9. Boîtes de Pétri.
10. Centrifugeuse « METTICH ZENTRIFUGEN (Germany).
11. Cuves en verre.
12. Earlen Meyer.
13. Ecouvillons.
14. Embouts stériles.
15. Etuve « BINDER » (Germany).
16. Four Pasteur « Heraeus ».
17. Micropipette. 100, 1000 µL.
18. Microscope optique « ZEISS » (Germany).
19. Oses stériles.
20. pH mètre « HANA pH 210 » (Romania) (Japan).
21. Plaques agitatrices chauffantes « VELP SCIENTIFICA ».

22. Plaques en verre.
23. Shaker « Stuart orbital incubator ».
24. Spatule.
25. Spectrophotomètre Shimadzu UV mini.1240.
26. Vortex « Techno Kartell ».

Annexe B : Composition des milieux de culture

- 1- Milieu ISP1 : Bouillon tryptone et d'extrait de levure (Pridham et Gottlieb, 1948)
 - Tryptone.....5g.
 - Extrait de levure.....3g.
 - Eau distillé qsp.....1L.
 - pH.....7.2.
- 2- Milieu ISP2: Extrait de levure, Extrait de malt+agar (Pridham et *al.*, 1956-57).
 - Extrait de levure.....4g.
 - Extrait de malt.....10g.
 - Glucose.....4g.
 - Eau distillé qsp.....1L.
 - Agar.....20g.
 - pH.....7.3.
- 3- Milieu ISP3 : Farine d'avoine+agar .
 - Farine d'avoine.....20g.
 - Agar.....18g.
 - Solution saline1ml.
 - Eau distillée qsp.....1000ml.
 - pH.....7.2.
- 4- Milieu ISP4 : Sels inorganiques ; amidon+agar .
 - Solution I :
 - Amidon soluble.....10g.
 - L'eau distillé froide.....500ml.
 - Solution II :
 - K_2HPO_41g.
 - $MgSO_4$1g.
 - Nacl.....1g.
 - $(NH_4)_2SO_4$2g.
 - $CaCO_3$2g.
 - Eau distillé qsp.....500ml.
 - pH.....7.3.
- 5- Milieu ISP5 : Glycérol-asparagine agar .
 - L-asparagine.....1g.
 - Glycérol.....10g.
 - K_2HPO_41g.

- Eau distillé.....1L.
- Solution saline *.....1ml.
- Agar.....20g.
- pH.....7.4.

6- Milieu ISP7: Tyrosine agar .

- Glycerol.....15g.
- L-Tyrosine.....0.5g.
- L-Asparagine.....1g.
- K_2HPO_40.5g.
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$0.05g.
- Nacl.....0.5g.
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0.01g.
- Eau distillé qsp.....1000ml.
- Solution saline.....1ml.
- Agar.....20g.
- pH.....7.2.

7- Solution saline

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0.1g.
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$0.1g.
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$0.1g.
- Eau distillée qsp.....100ml.

8-Milieu ISP8: Bouillon Nitraté

- Infusion cœur-cervelle.....25g.
- Nitrate de sodium.....10g.
- Eau distillé qsp.....1000ml.
- pH.....7.2.

9- Milieu ISP9

A Solution des traces de sels (Pridham et Gottlieb, 1948).

- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$0.64g.
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0.11g.

- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$0.79g.
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.15g.
- Eau distillée qsp.....100ml.

B-Sels minéraux de base

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$2.64g.
- KH_2PO_42.38g.
- K_2HPO_45.56g.
- MgSO_41.00g.
- Eau distillée qsp.....1000ml.

10- Milieu de Bennett (Jones, 1949).

- Extrait de levure.....1g.
- Extrait de viande.....1g.
- Caséines.....2g.
- Glucose.....10g.
- Agar.....15g.
- Eau distillée qsp.....1000ml.
- pH.....7.3.

11- Milieu SCA (Posarla et al., 2013).

- Amidon.....10g.
- Caséines.....1g.
- Solution saline*.....1ml.
- Agar.....20g.
- Eau distillé qsp.....1000ml.

12- Milieu GYEA .Glucose -Yeats Extract-Agar

- Extrait de levure.....10g.
- Glucose.....10g.
- Agar.....18g.
- Eau distillée qsp.....1000ml.

13- Milieu Mueller- Hinton « TM MEDIA » (Williams et Kuster., 1964).

- Infusion d'Extrait de viande.....300g.
- Casaminoacide.....17.5g.
- Amidon.....1.5g.
- Agar.....17g.
- Eau distillée qsp.....1000 ml.
- pH.....7.3.

14- Milieu pour la dilution : Tryptone sel (Billerbeck et *al.*, 2002).

- Tryptone.....10g.
- Sel (Nacl).....9g.

15- Gélose nutritive pour la croissance des germes cibles.

- Peptone.....10g.
- Extrait de viande.....3g.
- Agar.....15g.
- Eau distillée qsp.....1000ml.
- pH.....7.2.

16- Milieu pour dégradation des sels de sodium (Gordon et *al.* ; 1974).

- Nacl.....2g.
- MgSO₄.7H₂O.....0.2g.
- (NH₄)SO₄.....1g.
- KH₂PO₄.....0.5g.
- Agar.....15g.
- Rouge de phénol 0.04%.....20ml.
- Eau distillé qsp.....1000ml.

17- Milieu pour la décomposition de la Tween 80 (Sierra, .1957).

➤ La composition de du milieu de base

- Tween 80.....10ml.
- NaNO₃.....1g.
- Extrait de levure.....5g.
- Solution saline*.....50ml.
- CaCl₂.2 H₂O.....0.1g.
- Eau distillée qsp.....1000ml.
- Agar.....18g

La composition de la solution saline

- K₂HPO₄.....0.25g.
- MgSO₄.....0.125g.
- Nacl.....0.125g.
- FeSO₄.....0.001g.
- MnSO₄.....0.001g.

Selon le Bergey's manuel 2012 volume 5 « The *Actinobacteria* », la classification des *Actinobacteries* est organisée comme suit :

Phylum XXVI. *Actinobacteria*"
 Classe I. "Actinobacteria"
 Ordre I. *Actinomycetales*
 Famille I. *Actinomycetaceae*
 Genre I. *Actinomyces*
 Genre II. *Actinobaculum*
 Genre III. *Arcanobacterium*
 Genre IV. *Mobiluncus*
 Genre V. *Varibaculum*
 Ordre II. "Actinopolysporales"
 Famille I. *Actinopolysporaceae*
 Genre I. *Actinopolyspora*
 Ordre III. *Bifidobacteriales*
 Famille I. *Bifidobacteriaceae*
 Genre I. *Bifidobacterium*
 Genre II. *Aeriscardovia*
 Genre III. *Alloiscardovia*
 Genre IV. *Gardnerella*_{VP}
 Genre V. *Metiscardovia*_{VP}
 Genre VI. *Pariscardovia*_{VP}
 Genre VII. *Scardovia*_{VP}
 Ordre IV. "Catenulisporales"
 Famille I. *Catenulisporaceae*
 Genre I. *Catenulispora*
 Famille II. *Actinospicaceae*
 Genre I. *Actinospica*_{VP(T)}
 Ordre V. "Corynebacteriales"
 Famille I. *Corynebacteriaceae*
 Genre I. *Corynebacterium*
 Genre II. *Turicella*
 Famille II. *Dietziaceae*
 Genre I. *Dietzia*
 Famille III. *Mycobacteriaceae*
 Genre I. *Mycobacterium*
 Famille IV. *Nocardiaceae*
 Genre I. *Nocardia*
 Genre II. *Gordonia*
 Genre III. *Millisia*
 Genre IV. *Rhodococcus*
 Genre V. *Skermania*
 Genre VI. *Smaragdicoccus*
 Genre VII. *Williamsia*
 Famille V. *Segniliparaceae*
 Genre I. *Segniliparus*

Genre IX. *Fron dih abitans*
 Genre XI. *Gulosibacter*
 Genre XII. *Humibacter*
 Genre XIII. *Klugiella*
 Genre XIV. *Labedella*
 Genre XV. *Leifsonia*
 Genre XVI. *Leucobacter*
 Genre XVII. *Microcella*
 Genre XVIII. *Microterricola*
 Genre XIX. *Mycetocola*
 Genre XX. *Okibacterium*
 Genre XXI. *Phycicola*
 Genre XXII. *Plantibacter*
 Genre XXIV. *Rathayibacter*
 Genre XXV. *Rhodoglobus*
 Genre II. *Cellulosimicrobium*
 Genre III. *Isosporicella*
 Genre IV. *Myceligenans*
 Genre V. *Xylanibacterium*
 Genre VI. *Xylanimicrobium*
 Genre VII. *Xylanimonas*
 Famille XIII. *Rarobacteraceae*
 Genre I. *Rarobacter*
 Famille XIV. *Ruaniaceae*
 Genre I. *Ruania*
 Genre II. *Haloactinobacterium*
 Famille XV. *Sanguibacteraceae*
 Genre I. *Sanguibacter*
 Ordre XI. "Micromonosporales"
 Famille I. *Micromonosporaceae*
 Genre I. *Micromonospora*
 Genre II. *Actinocatenispora*
 Genre III. *Actinoplanes*
 Genre IV. *Asanoa*
 Genre V. *Catellatospora*
 Genre VI. *Catelliglobospora*
 Genre VII. *Catenuloplanes*
 Genre VIII. *Couchioplanes*
 Genre IX. *Dactylosporangium*
 Genre X. *Hamadaea*
 Genre XI. *Krasilnikovia*
 Genre XII. *Longispora*
 Genre XIII. *Luedemannella*
 Genre XIV. *Pilimelia*
 Genre XV. *Planosporangium*
 Genre XVI. *Plantactinospora*
 Genre XVII. *Polymorphospora*
 Genre XVIII. *Pseudosporangium*
 Genre XIX. *Rugosimonospora*
 Genre XX. *Salinispora*
 Genre XXI. *Spirilliplanes*
 Genre XXII. *Verrucospora*
 Genre XXIII. *Virigisporangium*

Genre IX. *Sinomonas*
 Genre XI. *Zhihengliuella*
 Famille II. *Beutenbergiaceae*
 Genre I. *Beutenbergia*
 Genre II. *Miniimonas*

 Genre III. *Salana*
 Genre IV. *Serinibacter*
 Famille III. *Bogoriellaceae*
 Genre I. *Bogoriella*
 Genre II. *Georgenia*
 Famille IV. *Brevibacteriaceae*
 Genre I. *Brevibacterium*
 Famille V. *Cellulomonadaceae*
 Genre I. *Cellulomonas*
 Genre II. *Actinotalea*
 Genre III. *Demequin*
 Genre IV. *Oerskovia*
 Genre V. *Paraoerskovia*
 Genre VI. *Tropheryma*
 Famille VI. *Dermabacteraceae*
 Genre I. *Dermabacter*
 Genre II. *Brachybacterium*
 Genre III. *Devriesea*
 Genre IV. *Helcobacillus*
 Famille VII. *Dermacoccaceae*
 Genre I. *Dermacoccus*
 Genre II. *Demetria*
 Genre III. *Kytococcus*
 Famille VIII. *Dermatophilaceae*
 Genre I. *Dermatophilus*
 Genre II. *Kineosphaera*
 Famille IX. *Intrasporangiaceae*
 Genre I. *Intrasporangium*
 Genre II. *Arsenicicoccus*
 Genre IV. *Humibacillus*
 Genre V. *Humihabitans*
 Genre VI. *Janibacter*
 Genre III. *Fodinibacter*

 Genre VII. *Knoellia*
 Genre VIII. *Kribbia*
 Genre IX. *Lapillicoccus*
 Genre X. *Marihabitans*
 Genre XI. *Ornithinicoccus*
 Genre XII. *Ornithinimicrobium*
 Genre XIII. *Oryzihumus*
 Genre XIV. *Phycoccus*
 Genre XV. *Serinicoccus*
 Genre XVI. *Terrabacter*
 Genre XVII. *Terracoccus*
 Genre XVIII. *Tetrasphaera*
 Famille X. *Jonesiaceae*
 Genre I. *Jonesia*
 Famille XI. *Microbacteriaceae*
 Genre I. *Microbacterium*
 Genre II. *Agreia*
 Genre III. *Agrococcus*
 Genre IV. *Agromyces*
 Genre V. *Clavibacter*
 Genre VI. *Cryobacterium*
 Genre VII. *Curtobacterium*
 Genre VIII. *Frigoribacterium*

Famille VI. *Tsukamurellaceae*
 Genre I. *Tsukamurella*
 Ordre VI. “*Frankiales*”
 Famille I. *Frankiaceae*
 Genre I. *Frankia*
 Famille II. *Acidothermaceae*
 Genre I. *Acidothermus*
 Famille III. *Cryptosporangiaceae*
 Genre I. *Cryptosporangium*
 Genre *Incertasedis Fodinicola*
 Famille IV. *Geodermatophilaceae*
 Genre I. *Geodermatophilus*
 Genre II. *Blastococcus*
 Genre III. *Modestobacter*
 Famille V. *Nakamurellaceae*
 Genre I. *Nakamurella*
 Genre II. *Humicoccus*
 Genre III. *Saxeibacter*
 Famille VI. *Sporichthyaceae*
 Genre I. *Sporichthya*

 Ordre VII. “*Glycomycetales*”

 Famille I. *Glycomycetaceae*
 Genre I. *Glycomyces*
 Genre II. *Haloglycomyces*
 Genre III. *Stackebrandtia*
 Ordre VIII. “*Jiangellales*”
 Famille I. *Jiangellaceae*
 Genre I. *Jiangella*
 Genre II. *Haloactinopolyspora*
 Ordre X. “*Kineosporiales*”
 Famille I. *Kineosporiaceae*
 Genre I. *Kineosporia*
 Genre II. *Kineococcus*
 Genre III. *Quadrisphaera*
 Ordre X. *Micrococcales*
 Famille I. *Micrococcaceae*
 Genre I. *Micrococcus*
 Genre II. *Acaricomus*
 Genre III. *Arthrobacter*
 Genre IV. *Citricoccus*
 Genre V. *Kocuria*
 Genre VI. *Nesterenkonia*
 Genre VII. *Renibacterium*
 Genre VIII. *Rothia*

Ordre *Propionibacteriales*Famille *Propionibacteriaceae*

- Genre I. *Propionibacterium*
- Genre II. *Aestuariimicrobium*
- Genre III. *Brooklawnia*
- Genre IV. *Friedmanniella*
- Genre V. *Granulicoccus*
- Genre VI. *Luteococcus*
- Genre VII. *Microlunatus*
- Genre VIII. *Micropruina*
- Genre IX. *Propionicicella*
- Genre X. *Propionicimonas*
- Genre XI. *Propioniferax*
- Genre XII. *Propionimicrobium*
- Genre XIII. *Tessaracoccus*

Famille II. *Nocardioideae*

- Genre I. *Nocardioides*
- Genre II. *Actinopolymorpha*
- Genre III. *Aeromicrobium*
- Genre IV. *Kribbella*
- Genre V. *Marmoricola*

Ordre XIII. “*Pseudonocardiales*”Famille I. *Pseudonocardiaceae*

- Genre I. *Pseudonocardia*
- Genre II. *Actinoalloteichus*
- Genre III. *Actinokineospora*
- Genre IV. *Actinomycetospora*
- Genre V. *Actinosynnema*
- Genre VI. *Alloactinosynnema*
- Genre VII. *Allokutzneria*
- Genre VIII. *Amycolatopsis*
- Genre IX. *Crossiella*
- Genre X. *Goodfellowiella*
- Genre XI. *Kibdelosporangium*
- Genre XII. *Kutzneria*
- Genre XIII. *Lechevalieria*
- Genre XIV. *Lentzea*
- Genre XV. *Prauserella*
- Genre XVI. *Saccharomonospora*
- Genre XVII. *Saccharopolyspora*
- Genre XVIII. *Saccharothrix*
- Genre XIX. *Sciscionella*
- Genre XX. *Streptoalloteichus*
- Genre XXI. *Thermocrisum*
- Genre XXII. *Umezawaea*

Ordre XIV. “*Streptomycetales*”Famille I. *Streptomycetaceae*

- Genre I. *Streptomyces*
- Genre I. *Kitasatospora*
- Genre II. *Streptoacidiphilus*

Ordre XV. *Streptosporangiales*Famille I. *Streptosporangiaceae*

- Genre I. *Streptosporangium*
- Genre II. *Acrocarpospora*
- Genre III. *Herbidospora*
- Genre IV. *Microbispora*
- Genre V. *Microtetraspera*
- Genre VI. *Nonomuraea*
- Genre VII. *Planobispora*
- Genre VIII. *Planomonospora*
- Genre IX. *Planotetraspera*
- Genre X. *Sphaerisporangium*

Genre XI. *Thermopolyspora*Famille II. *Nocardiopsaceae*

- Genre I. *Nocardiopsis*
- Genre II. *Haloactinospora*
- Genre III. *Marinactinospora*
- Genre IV. *Streptomonospora*
- Genre V. *Thermobifida*

Famille III. *Thermomonosporaceae*

- Genre I. *Thermomonospora*
- Genre II. *Actinoallomurus*
- Genre III. *Actinocorallia*
- Genre IV. *Actinomadura*
- Genre V. *Spirillospora*

Classe II. *Acidimicrobia*Ordre I. *Acidimicrobiales*Famille I. *Acidimicrobiaceae*

- Genre I. *Acidimicrobium*
- Genre II. *Ferrimicrobium*
- Genre III. *Ferrithrix*
- Genre IV. *Ilumatobacter*

Famille II. *Iamiaceae*

- Genre I. *Iamia*

Classe III. “*Coriobactria*”Ordre I. *Coriobacteriales*Famille I. *Coriobacteriaceae*

- Genre I. *Coriobacterium*
- Genre II. *Adlercreutzia*
- Genre III. *Asaccharobacter*
- Genre IV. *Atopobium*
- Genre V. *Collinsella*
- Genre VI. *Cryptobacterium*
- Genre VII. *Denitrobacterium*
- Genre VIII. *Eggerthella*
- Genre IX. *Enterorhabdus*
- Genre X. *Gordonibacter*
- Genre XI. *Olsenella*
- Genre XII. *Paraeggerthella*
- Genre XIII. *Slackia*

Classe IV. “*Nitriliruptoria*”Ordre I. *Nitriliruptorales*Famille I. *Nitriliruptoraceae*

- Genre I. *Nitriliruptor*

Ordre II. *Euzebyales*Famille I. *Euzebyaceae*

- Genre I. *Euzebya*

Classe V. *Rubrobacteria*Ordre I. *Rubrobacterales*Famille I. *Rubrobacteraceae*

- Genre I. *Rubrobacter*

Classe VI. *Thermoleophilia*Ordre I. *Thermoleophilales*Famille I. *Thermoleophilaceae*

- Genre I. *Thermoleophilum*

Ordre II. *Solirubrobacterales*Famille I. *Solirubrobacteraceae*

- Genre I. *Solirubrobacter*

Famille II. *Conexibacteraceae*

- Genre I. *Conexibacter*

Famille III. *Patulibacteraceae*

- Genre I. *Patulibacter*

ABSTRACT

The *Actinobacteria* strain isolated from a marine ecosystem was studied; on both solid and liquid media to demonstrate the production of bioactive substances.

Based on the study of morphological, physiological and biochemical characteristics, the retained strain was pertained in the genus *Streptomyces*.

By the technique of agar cylinders and crossed stria but also by the method of diffusion of the wells, the strain presents an antibacterial activity with respect to Gram-negative bacteria pathogenic (*Salmonella Typhi*) and Gram-positive bacteria. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), however, no fungicidal activity against *Candida albicans* was noticed by the selected actinomycetes strain. Antibiotic extraction was performed using a range of five organic solvents of different polarity namely: n-butanol, ethyl acetate, chloroform, dichloromethane and hexane.

These results indicate that aquatic *Actinobacteria* are a promising source for the discovery of new bioactive molecules

Key words: Marine *Actinobacteria*, *Streptomyces*, Antibiotic activity.

تناولت دراسة سلالة البكتيريا الشعيرية (اكتينو بكتيريا) التي تم عزلها من بيئة بحرية إجراء فحوصات على وسط زرع صلب و وسط زرع سائل لتأكيد إنتاج مواد ذات نشاط حيوي.

بناء على دراسة الخصائص الشكلية الفيزيولوجية والكيموحيوية فان السلالة المحددة تنتمي إلى جنس *Streptomyces*

استعمال تقنية اسطوانة وسط الزرع و تقنية الخطوط المتقطعة وكذا تقنية الثقوب بعد انتاج الجزيئة في وسط سائل سمحت باثبات ان السلالة تختص بنشاط مضاد للبكتيريا غرام سالب (*Salmonella Typhi*) وكذلك مضاد للبكتيريا غرام موجب (*Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

فيما يخص النشاط المضاد للفطريات و بالخصوص ضد الخميرة *Candida albicans* أكدت التجارب السابقة بعدم وجود أي نشاط حيوي بحيث لا يوجد أي نشاط صدر من طرف السلالة المحددة ضد هذه الخميرة بصدد استخلاص المضادات الحيوية تم القيام باختبار خمسة محال ليل عضوية ذات درجات استقطاب مختلفة و هي كالتالي بوتانول اسيتات الاثيل كلوروفورم ديكلوروميثان و الهيكسان.

هذه النتائج تظهر ان البكتيريا الشعيرية البحرية تشكل مصدرا هاما لإنتاج جزيئات جديدة ذات نشاط مضاد للجراثيم.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا الشعيرية البحرية, مواد ذات نشاط حيوي مضاد للجراثيم *Streptomyces*

Résumé :

Une souche d'Actinobactérie isolée à partir d'un écosystème marin, a fait l'objet de tests sur milieu solide et liquide afin de mettre en evidence la production des substances bioactives.

En se basant sur l'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques, la souche retenue a été apparentée au genre *Streptomyces*.

Par la technique des cylindres d'agar et des stries croisées mais aussi par la méthode de diffusion des puits, la souche présentait une activité antibactérienne vis-à-vis de bacteries à Gram négatif pathogènes (*Salmonella Typhi*) et de bacteries à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ; par contre aucune activité fongicide à l'égard de *Candida albicans* testée n'a été signalée. L'extraction d'antibiotiques a été réalisée en utilisant une gamme de cinq solvants organiques de polarité différente à savoir : n-butanol, acétate d'ethyl, chloroforme, dichlorométhane et hexane.

Ces résultats indiquent que les Actinobacteries aquatiques constituent une source prometteuse pour la découverte de nouvelles molécules bioactives.

Mots clés : Actinobacteries marines, *Streptomyces*, Activité antimicrobienne.

